



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

***“Nanotecnologías ecocompatibles
para aplicaciones en biomateriales
de titanio”***

Tesista: Lic. Ariel Gonzalez

Directoras: Dra. Mónica Fernández Lorenzo

Dra. Patricia Schilardi

Año: 2024

El presente Trabajo de Tesis para acceder al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas área Ciencias Químicas, fue realizado en los grupos IMBioMat (Interacción de Medios Biológicos y Materiales) y NanoSBio (Nanosuperficies Biofuncionales) pertenecientes al Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata y CONICET, bajo la doble dirección de las Dras. Mónica Fernández Lorenzo y Patricia Schilardi.

Agradecimientos

Quiero comenzar agradeciendo a las instituciones que hicieron posible este sueño:

- A la Universidad Nacional de La Plata y a la Facultad de Ciencias Exactas, por mi formación de posgrado.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por haberme otorgado el financiamiento y becas doctorales para que pudiera realizar este trabajo de tesis.
- Al INIFTA y todo su personal.

Ahora, les toca a aquellas personas que recorrieron día a día el sinuoso y feliz camino que concluye con este trabajo final:

A mis directoras Mónica y Patricia por la enseñanza, paciencia y apoyo científico brindado.

A todos mis compañeros y compañeras de trabajo del IMBioMat y NanoSBio presentes y pasados que son parte de mi formación y de este trabajo final de posgrado.

Gracias a mi familia por haberme acompañado en este tiempo a recorrer este camino que me trajo desde Mar del Plata a La Plata y no sabremos dónde terminará. Gracias infinitas por confiar siempre en mí y por compartir mi alegría de haber sido el primer egresado universitario de la familia y ahora el primer doctor. Nada de esto hubiera sido posible sin su apoyo incondicional; gracias, Mamá y Papá, aunque hoy ya no estén para verme tan feliz.

Gracias a mi hermano Adrián y mi cuñada Jessica por los hermosos momentos compartidos, especialmente durante mis visitas a Mar del Plata en estos últimos años. Gracias por su apoyo en mis aventuras científicas.

Gracias a mis sobrinas, Rocío y Nazaria, por el apoyo y las vivencias que compartimos durante estos 5 años viviendo en la misma ciudad, por primera vez en nuestras vidas.

En especial quiero agradecer a mi pareja, Blas, que me apoyó desde el primer día cuando decidí mudarme a La Plata y hemos sostenido una hermosa relación personal y profesional sin que la distancia fuera un problema.

Gracias a todos mis amigos y amigas por despejarme del trabajo tantos fines de semanas y vacaciones, y por hacer mi vida más divertida. Gracias por apoyarme y motivarme siempre con mi profesión y vocación.

"Caminante no hay camino, se hace camino al andar"

Ariel

Resumen

El aumento de la tolerancia y el desarrollo de resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias ha producido un incremento general de las infecciones intrahospitalarias, entre las que se destacan, por su frecuencia, las infecciones asociadas a materiales implantables. Para combatir bacterias multirresistentes se han propuesto alternativas innovadoras a tratamientos tradicionales, como la utilización de productos nanotecnológicos, ya sean nanopelículas (NPe) o nanopartículas (NPa) metálicas con actividad antimicrobiana. Sin embargo, las síntesis tradicionalmente empleadas para fabricar estos nanoproductos utilizan o producen reactivos y solventes tóxicos para la salud y contaminantes del medio ambiente. Surgen así, como nueva alternativa, las nanotecnologías ecocompatibles (NEC) o “verdes” que utilizan agentes naturales, ampliamente disponibles en la naturaleza y en los desechos de la industria agrícola, para sintetizar NPe y NPa metálicas sin producir o utilizar agentes tóxicos ni contaminantes.

Dentro de las NEC, las más utilizadas son aquellas que emplean fitocompuestos fenólicos, ya que los mismos presentan comprobada actividad antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena y antiviral, entre otras. Además, dichos compuestos fenólicos son componentes principales de muchos aceites y extractos naturales, como por ejemplo los obtenidos de tomillo, romero, eucalipto, etc. La utilidad de estos fitocompuestos fenólicos se debe a que su estructura química les confiere buenas propiedades reductoras que permiten sintetizar NPa de Ag, Au o Cu sin la necesidad de utilizar reactivos tóxicos y contaminantes. Además, la estructura fenólica de estos compuestos también les otorga la capacidad de adsorberse o polimerizar sobre superficies metálicas (Ti, Cu, Mg, otros) formando NPe que se anclan a la superficie por procesos de adsorción/autoensamblado espontáneo, por coordinación con iones metálicos o por técnicas electroquímicas.

En el presente Trabajo de Tesis se plantea la hipótesis de que es posible desarrollar productos nanotecnológicos antimicrobianos y citocompatibles para ser utilizados en biomateriales de Ti, empleando fitocompuestos puros y extractos naturales, reduciendo o eliminando el empleo de reactivos tóxicos y contaminantes. Con este fin, se evaluó la capacidad de fitocompuestos fenólicos isoméricos como el timol y carvacrol (constituyentes principales de aceites esenciales de tomillo y orégano) para desarrollar NPe sobre discos de Ti para uso quirúrgico (grado II) y se analizó tanto su actividad

antimicrobiana como su citocompatibilidad y actividad osteogénica. También se emplearon ácido gálico y pirogalol para fabricar NPe de tipo de redes híbridas metal-fenólicas (MPN) en coordinación con iones Mg^{2+} sobre la superficie de Ti. Asimismo, se utilizaron el ácido gálico y un extracto natural de té verde como agentes reductores para sintetizar NPa de Ag (NPaAg) y se comprobó la actividad antimicrobiana. Finalmente, se desarrollaron superficies multifuncionales de Ti a partir de la combinación de NPe + NPaAg para evaluar efectos antimicrobianos sinérgicos y su citocompatibilidad y actividad osteogénica.

Los resultados obtenidos permiten concluir que es posible fabricar NPe de fitocompuestos fenólicos sobre superficies de Ti a través de diferentes técnicas empleando tecnologías NEC. Las NPe de timol y carvacrol confieren actividad bactericida a la superficie de Ti contra cepas de *Staphylococcus aureus* y en el caso de las NPe de timol, también aumentan la citocompatibilidad y mejoran el proceso de oseointegración del Ti en estudios *in vitro*. Las NPe formadas sobre Ti constituidas por MPN de ácido gálico y pirogalol con iones de Mg^{2+} otorgan a dicho material propiedades antiadherentes y antibiofilm que impiden la producción de la matriz polimérica y el desarrollo de *biofilms* de *S. aureus*. Asimismo, estas MPN presentan acción antimicrobiana sinérgica con antibióticos como la amikacina frente a *biofilms* tempranos de *S. aureus* desarrollados sobre Ti. Por otra parte, las MPN de ácido gálico y pirogalol formadas sobre Ti incrementan considerablemente la citocompatibilidad y la actividad osteogénica de dicho biomaterial.

Por otra parte, se logró obtener NPaAg de tamaño nanométrico y estables con gran poder antimicrobiano contra *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* y buena citocompatibilidad utilizando ácido gálico y extracto natural de té verde como agentes reductores. Además, estas NPa inhibieron la formación de *biofilms* de *S. aureus* cuando fueron inmovilizadas sobre las MPN de pirogalol previamente desarrolladas sobre la superficie de Ti.

Finalmente, se pudo concluir que todos los nanoproducidos obtenidos en el presente trabajo por nanotecnologías NEC (NPe, MPN, NPaAg y sistemas mixtos de MPN+NPaAg) pueden ser obtenidos con procedimientos sencillos y no requieren equipamientos de laboratorio complejos para su síntesis, son además reproducibles, económicos y escalables para ser utilizados sobre superficies de Ti para uso médico o en

otras aplicaciones industriales, logrando, en algunos casos, la erradicación de los microorganismos evaluados. Asimismo, entre los sistemas desarrollados se comprobó una adecuada citocompatibilidad con células fibroblásticas y pre-osteoblásticas y, en algunos casos el incremento de la actividad osteogénica, cualidad muy apreciada en el caso de biomateriales ortopédicos y dentales.

ÍNDICE GENERAL

Parte I: Marco teórico, hipótesis y objetivos

1. Capítulo 1: Introducción general	
1.1 <u>Biomateriales: generalidades</u>	15
1.2 <u>Biomateriales de titanio</u>	16
1.2.1 Propiedades fisicoquímicas del Ti	16
1.2.2 Biocompatibilidad de los materiales de Ti	18
1.3 Biocompatibilidad de los materiales de Ti	19
1.3.1 ¿Qué es un biofilm y cómo se desarrolla?	20
1.3.2 Propiedades fisicoquímicas de los biomateriales metálicos que influyen en la formación de <i>biofilms</i>	24
1.3.3 Estrategias nanotecnológicas para prevenir y combatir <i>biofilms</i> en biomateriales	25
1.4 <u>Nanotecnologías ecocompatibles y su aplicación en biomateriales</u>	27
1.4.1 Propiedades de los fitocompuestos fenólicos	28
1.4.2 Aplicaciones nanotecnológicas de los fitocompuestos fenólicos	29
1.4.2.1 <i>Desarrollo de nanopelículas autoensambladas</i>	29
1.4.2.2 <i>Desarrollo de redes metal-fenólicas (MPN)</i>	30
1.4.2.3 <i>Síntesis ecocompatibles de nanopartículas de plata</i> ..	34
1.4.2.4 <i>Sistemas mixtos y efectos sinérgicos</i>	36
1.5 <u>Hipótesis y objetivos</u>	36

Parte II: Técnicas experimentales

2. Capítulo 2: Ensayos de caracterización fisicoquímica	
2.1 <u>Técnicas electroquímicas</u>	40
2.1.1 Comportamiento electroquímico del Ti	40
2.1.2 Barrido lineal de potencial y voltamperometría cíclica	41
2.1.3 Curvas de Tafel	43
2.1.4 Registro de potencial a circuito abierto	44
2.2 <u>Espectroscopia infrarroja por transformada</u>	45
2.3 <u>Espectroscopia UV-visible</u>	46

2.4 <u>Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-OES)</u>	48
2.5 <u>Ángulo de contacto</u>	49
2.6 <u>Microscopía óptica</u>	51
2.7 <u>Microscopía electrónica de transmisión (TEM)</u>	52
2.8 <u>Microscopía de fuerza atómica (AFM)</u>	53
2.8.1 Parámetros de rugosidad	55
2.9 <u>Dispersión dinámica de luz (DLS)</u>	58
3. Capítulo 3: Ensayos biológicos y microbiológicos	
3.1 <u>Ensayos con células eucariotas</u>	61
3.1.1 Medios de cultivos y líneas celulares	61
3.1.2 Ensayos de citocompatibilidad y citotoxicidad	61
3.1.2.1 <i>Ensayo de reducción de MTT</i>	62
3.1.2.2 <i>Ensayo de reducción de Rojo Neutro (RN)</i>	63
3.1.2.3 <i>Viabilidad y proliferación celular mediante tinción con naranja de acridina</i>	64
3.2 <u>Ensayos de diferenciación osteogénica en células pre-osteoblásticas</u> ...	65
3.2.1 Determinación semicuantitativa de fosfatasa alcalina (FAI)	65
3.2.2 Determinación cuantitativa de colágeno tipo I	66
3.2.3 Determinación cuantitativa de depósitos de calcio	66
3.2.4 Determinación cuantitativa de proteínas por método de Bradford	67
3.3 <u>Ensayos microbiológicos</u>	68
3.3.1 Cepas bacterianas	68
3.3.1.1 <i>Staphylococcus aureus (S. aureus)</i>	69
3.3.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa)</i>	70
3.3.1.3 <i>Klebsiella pneumoniae (K. pneumoniae)</i>	71
3.3.2 Medios de cultivos	72
3.3.3 Recuento de bacterias viables	73
3.3.4 Determinación de CMI y CMB	74
3.3.5 Ensayos antibiofilms sobre materiales de Ti	76

3.3.5.1 <i>Determinación de bacterias vivas o muertas mediante el kit Live/Dead</i>	78
3.3.5.2 <i>Determinación semicuantitativa de formación de matriz polimérica por tinción Sypro Ruby</i>	79
3.3.6 Halo de inhibición	80

Parte III: Resultados y discusión

4. Capítulo 4: Estudio comparativo de la formación de nanopelículas autoensambladas de timol y carvacrol sobre materiales de Ti.	
4.1 <u>Introducción</u>	83
4.2 <u>Materiales y métodos</u>	84
4.2.1 Preparación de las muestras de Ti	84
4.2.2 Adsorción de timol y carvacrol sobre la superficie de Ti: método dip-coating	85
4.2.3 Caracterización fisicoquímica de las nanopelículas obtenidas	85
4.2.4 Ensayos antimicrobianos	87
4.2.5 Ensayos de citocompatibilidad celular	88
4.2.6 Análisis estadísticos	88
4.3 <u>Resultados y discusión</u>	89
4.3.1 Ensayos electroquímicos	89
4.3.1.1 <i>Medición del OCP durante la formación de las nanopelículas</i>	89
4.3.1.2 <i>Respuesta electroquímica de las nanopelículas adsorbidas sobre Ti</i>	90
4.3.2 Caracterización AFM de las nanopelículas de timol y carvacrol	93
4.3.3 Determinación del ángulo de contacto	99
4.3.4 Caracterización por ATR-FTIR de las nanopelículas de timol y carvacrol	100
4.3.5 Liberación de timol y carvacrol desde las nanopelículas	106
4.3.6 Actividad antimicrobiana de las nanopelículas de timol y carvacrol	110

4.3.7	Impacto de las propiedades fisicoquímicas de las películas sobre la adhesión y proliferación de las bacterias	117
4.3.8	Citocompatibilidad y actividad osteogénica de las nanopelículas de timol y carvacrol	118
4.3.9	Impacto de las propiedades fisicoquímicas sobre la adhesión y proliferación de osteoblastos	121
4.4	<u>Conclusiones</u>	122
5.	Capítulo 5: Desarrollo de redes metal-fenólicas sobre la superficie de Ti.	
5.1	<u>Introducción</u>	126
5.2	<u>Materiales y métodos</u>	128
5.2.1	Preparación de las muestras de Ti	128
5.2.2	Formación de las MPN sobre Ti	129
5.2.3	Caracterización fisicoquímica de las diferentes MPN obtenidas	129
5.2.4	Ensayos antimicrobianos	130
5.2.5	Ensayos de citocompatibilidad celular	131
5.2.6	Análisis estadísticos	131
5.3	<u>Resultados y discusión</u>	131
5.3.1	Evaluación de la formación de las MPN por cambios de coloración de la solución y espectroscopía UV-visible	131
5.3.1.1	<i>Formación de las MPN de PG</i>	132
5.3.1.2	<i>Formación de las MPN de AG</i>	134
5.3.1.3	<i>Formación de las MPN de AG+PG</i>	136
5.3.2	Caracterización por ATR-FTIR	139
5.3.3	Ensayos electroquímicos	143
5.3.3.1	<i>Medición del OCP durante la formación de las MPN</i>	143
5.3.3.2	<i>Registros de curvas de polarización: voltamperometría cíclica y curvas de Tafel</i>	146
5.3.4	Caracterización por AFM	152
5.3.4.1	<i>Análisis de imágenes y perfiles a 45x45 μm²</i>	152

5.3.4.2	<i>Análisis de los perfiles y parámetros de rugosidad en imágenes de 5x5 μm^2</i>	155
5.3.5	Estabilidad y liberación de las MPN	161
5.3.5.1	<i>Evaluación de las películas mediante AFM y espectroscopía UV-visible luego de la inmersión en PBS</i>	161
5.3.5.2	<i>Respuesta electroquímica luego de la inmersión de las muestras en PBS</i>	164
5.3.5.3	<i>Grado de estabilidad de las diferentes MPN</i>	165
5.3.6	Determinación del ángulo de contacto	166
5.3.7	Citocompatibilidad y actividad osteogénica de las MPN ...	167
5.3.8	Actividad antimicrobiana de las MPN	170
5.3.8.1	<i>Recuento de las bacterias adheridas: colonización inicial de la superficie</i>	170
5.3.8.2	<i>Evaluación del área colonizada. Efecto antibiofilm</i> ..	171
5.3.8.3	<i>Evaluación de la producción de EPS</i>	174
5.3.8.4	<i>Evaluación de posible efecto sinérgico en la acción antimicrobiana de MPN + antibiótico</i>	176
5.4	<u>Conclusiones</u>	178
6.	Capítulo 6: Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por métodos ecocompatibles formadas a partir de ácido gálico puro o de extracto de té verde.	
6.1	<u>Introducción general</u>	182
6.2	<u>Materiales y métodos</u>	183
6.2.1	Síntesis ecocompatible de nanopartículas de plata utilizando ácido gálico	183
6.2.2	Síntesis ecocompatible de nanopartículas de plata utilizando extracto de té verde	183
6.2.3	Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de plata obtenidas	185
6.2.4	Actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata ...	186
6.2.5	Citocompatibilidad de las nanopartículas de plata	186

6.2.6	Análisis estadísticos	186
6.3	<u>Resultados y discusión</u>	187
6.3.1	Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de plata obtenidas	187
6.3.1.1	<i>Espectros UV-Visibles de las nanopartículas de plata</i>	187
6.3.1.2	<i>Determinación de la concentración de Ag por ICP-OES y construcción de curvas de calibración UV-visible</i>	189
6.3.1.3	<i>Análisis por ATR-FTIR del recubrimiento orgánico de las nanopartículas</i>	191
6.3.2	Estimación de tamaños y distribución de poblaciones de las NPa por S-TEM y DLS. Influencia de la temperatura y fuerza iónica del medio	198
6.3.2.1	<i>Estimaciones de tamaños y distribución de poblaciones de las NPaAgAG y NPaAgTV por S-TEM</i>	198
6.3.2.2	<i>Estimaciones de tamaños y distribución de poblaciones de las NPaAgAG y NPaAgTV por DLS. Efecto del almacenamiento</i>	200
6.3.2.3	<i>Estabilidad de las NPaAg en medios biológicos simulados</i>	205
6.3.3	Ensayos antimicrobianos	208
6.3.4	Ensayos de citocompatibilidad y citotoxicidad celular	211
6.3.4.1	<i>Reducción de MTT</i>	211
6.3.4.2	<i>Reducción de RN</i>	213
6.3.4.3	<i>Viabilidad celular por tinción con naranja de acridina</i>	215
6.3.4.4	<i>Comparación de los resultados de citotoxicidad evaluada por distintos métodos</i>	217
6.3.5	Análisis comparativo de las características fisicoquímicas de las NPaAgTV y NPaAgAG, su acción antimicrobiana y su citocompatibilidad evaluada en células fibroblásticas y pre-osteoblásticas	217
6.4	<u>Conclusiones</u>	221

7. Capítulo 7: Inmovilización de las nanopartículas de plata sobre la superficie de materiales de Ti modificados superficialmente.

7.1 <u>Introducción general</u>	224
7.2 <u>Materiales y métodos</u>	225
7.2.1 Preparación de las muestras	225
7.2.2 Adhesión de las nanopartículas de plata sobre la superficie de Ti	225
7.2.3 Caracterización fisicoquímica	226
7.2.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana	226
7.2.5 Citocompatibilidad celular y actividad osteogénica	227
7.2.6 Análisis estadísticos	227
7.3 <u>Resultados y discusión</u>	227
7.3.1 Caracterización fisicoquímica de las superficies de Ti con NPaAg	227
7.3.1.1 Estudio de la adhesión de las NPaAg sobre superficies de Ti por AFM	227
7.3.1.2 Determinación del ángulo de contacto	239
7.3.2 Actividad antimicrobiana de las superficies de Ti funcionalizadas con NPaAg	241
7.3.3 Análisis de la citocompatibilidad y actividad osteogénica de las superficies de Ti funcionalizadas con NPaAg	248
7.4 <u>Conclusiones</u>	252

Parte IV: Conclusiones generales y apéndices

Conclusiones generales	256
Apéndice A: Abreviaturas y acrónimos	261
Apéndice B: Publicaciones y presentaciones a congresos realizadas en el marco del presente trabajo de Tesis	263
Referencias bibliográficas	266

Parte I:
Marco teórico,
hipótesis y objetivos

Capítulo 1: Introducción general

1.1 Biomateriales: generalidades

Los biomateriales se definen como materiales de origen sintético o natural que se diseñan con el propósito de interactuar con sistemas biológicos para cumplir, principalmente, funciones de sustitución, reparación o regeneración de órgano o tejidos dañados o lesionados. Existen biomateriales degradables y no degradables. Debido a que los biomateriales están en contacto directo con órganos y tejidos del huésped deben cumplir con ciertos requerimientos: a) deben ser cito y biocompatibles con los tejidos y órganos donde serán alojados, y, por lo tanto, no deben ser tóxicos ni cancerígenos; b) en el caso de los no degradables deben ser químicamente estables, c) deben presentar adecuadas propiedades mecánicas en función del órgano o tejido donde se realice la implantación o colocación del mismo y d) es deseable que sean económicos, fáciles de fabricar y reproducibles [1,2].

Existen diversos tipos de biomateriales según su composición: metálicos, poliméricos y cerámicos o bien híbridos. Los biomateriales metálicos y sus diferentes aleaciones pueden ser clasificados, a su vez, en degradables (temporales) y no degradables (temporales o permanentes). Los biomateriales metálicos no degradables son ampliamente utilizados en implantes ortopédicos (como por ejemplos, clavos endomedulares, tornillos, placas, otros) y dentales, ya que presentan resistencia a la corrosión y no se degradan en presencia de fluidos biológicos, poseen gran resistencia al desgaste mecánico y son capaces de soportar la carga adecuada para cumplir su función. Los metales más usados para la fabricación de estos implantes de tipo permanente son: acero inoxidable, aleaciones de Co, Cr, Mo y Ni; y Ti y sus aleaciones con Al y V [3].

Dentro de los biomateriales biodegradables se destacan aquellos compuestos por hierro, utilizados principalmente como *stents* cardiovasculares; magnesio, empleados en una amplia gama de especialidades tales como ortopédica, odontológica, cardiovascular o ginecológica; y cobre, utilizado en dispositivos intrauterinos. Estos biomateriales se degradan progresivamente en medios biológicos mientras van cumpliendo su función específica en el sitio de implantación [4]. En la Figura 1.1 se resumen las principales aplicaciones de los biomateriales metálicos.

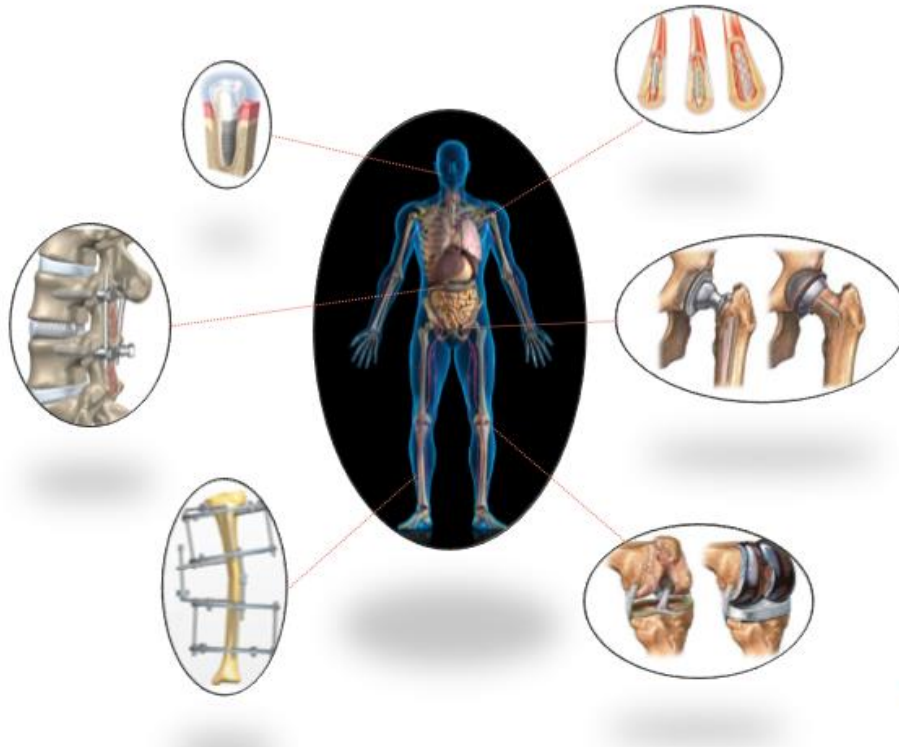


Figura 1.1. Representación de las principales aplicaciones de los biomateriales metálicos para implantes dentales (arriba izquierda) y ortopédicos.

1.2 Biomateriales de titanio

1.2.1 Propiedades fisicoquímicas del Ti

El Ti puro pertenece al grupo de los elementos de transición y presenta un aspecto plateado-grisáceo. Tiene un número atómico de 22 y su masa atómica relativa es 47, 88. Además, presenta baja densidad, alto punto de fusión y bajas conductividades térmica y eléctrica. La maleabilidad y resistencia del Ti se deben a la combinación de un valor del módulo de Young (relacionado con la elasticidad del material) relativamente alto y una dureza promedio de 6 en la escala de Mohs.

Cuando cristaliza, el Ti forma sistemas hexagonales que le permiten tener una relativa resistencia a la deformación plástica, mayor que los materiales que cristalizan en el sistema cúbico. Sin embargo, el Ti presenta un cierto grado de ductilidad. Pasando los 882° C cambia su estructura cristalina por transformación alotrópica y pasa de una estructura hexagonal a una estructura cúbica. La forma hexagonal recibe el nombre de Ti alfa (α), mientras que la cúbica se denomina beta (β) [3]. Las estructuras α y β pueden ser estabilizadas por la incorporación de nuevos metales, es decir, por agregado de aleantes siendo el Al y V los más utilizados.

Existen diferentes tipos de Ti comercialmente “puros” (con estructura α), es decir, sin alear, que son ampliamente utilizados en la industria y en la implantología: grado I, grado II, grado III y grado IV. En la Tabla 1.1 se resumen la composición general de estos tipos de Ti comerciales puros y de la aleación T6Al4V ampliamente utilizada en medicina.

Tabla 1.1. Composición química típica (expresada en porcentaje) de materiales de Ti puros y de la aleación T6Al4V. Datos obtenidos a partir de bibliografía [5,6].

<i>Elemento</i>	<i>Ti grado I</i>	<i>Ti grado II</i>	<i>Ti grado III</i>	<i>Ti grado IV</i>	<i>T6Al4V</i>
<i>Nitrógeno</i>	0,03	0,03	0,05	0,05	0,05
<i>Carbono</i>	0,10	0,10	0,10	0,10	0,08
<i>Hidrogeno</i>	0,015	0,015	0,015	0,015	0,0125
<i>Hierro</i>	0,20	0,30	0,30	0,50	0,25
<i>Oxígeno</i>	0,18	0,25	0,35	0,40	0,13
<i>Titanio</i>	~99,5	~99,3	~99,2	~99	90

Las propiedades mecánicas del biomaterial son fundamentales a la hora de diseñar y fabricar dispositivos ortopédicos implantables, ya que los mismos deben tener parámetros similares a los del hueso humano y así lograr una buena adaptación del paciente en la portación del implante. En la Tabla 1.2 se resumen valores de algunas propiedades mecánicas de materiales implantables y del tejido óseo, donde puede observarse que las correspondientes a materiales base Ti son las más semejantes a las del hueso.

Finalmente, es importante destacar que el Ti es un material altamente reactivo que cuando se expone a la atmosfera o a medios con presencia de oxígeno, reacciona rápidamente para formar, en cuestión de microsegundos, una capa de óxido de Ti (TiO_2) de aproximadamente 10 nm de espesor. Esta capa de óxido nativo es densa y protectora siendo la responsable de la alta resistencia a la corrosión que presentan los materiales de Ti. Esta capa protectora de óxido “pasiva” la superficie de Ti ya que lo hace prácticamente inerte a reacciones químicas superficiales que puedan ocurrir en medios biológicos [3].

Tabla 1.2. Valores de las propiedades mecánicas del tejido óseo y de algunos materiales implantables. Datos obtenidos a partir de bibliografía [5,7].

<i>Material</i>	<i>Módulo de elasticidad o Young (GPa)</i>	<i>Tensión de ruptura o fractura (MPa)</i>	<i>Deformación a la ruptura (%)</i>
<i>Hueso cortical</i>	15 a 30	70 a 150	0-8
<i>Ti grado II</i>	116	345	20
<i>T6Al4V</i>	120	900	18
<i>Aleación de Co. Cr</i>	225	735	10
<i>Acero inoxidable 316</i>	210	600	55

1.2.2 Biocompatibilidad de los materiales de Ti

Además de las propiedades fisicoquímicas y mecánicas que hacen al Ti un buen material para la construcción de implantes, este material presenta elevada biocompatibilidad con órganos y tejidos. Para que un material implantable sea biocompatible debe generar una respuesta adecuada en el tejido circundante y en el organismo del hospedador, evitando una respuesta inflamatoria, reacciones alérgicas y posibles infecciones que conlleven su rechazo [1].

Los biomateriales de Ti se consideran “inertes” ya que la liberación de iones de Ti al medio biológico circundante por efectos de corrosión es mínima, gracias a la capa protectora de óxido que recubre su superficie. Consecuentemente, la biocompatibilidad de los mismos se debe, en gran medida, a la presencia de esta capa de TiO₂ ya que, en la interfaz, las células y el medio biológico circundante se encuentran en estrecho contacto con dicho óxido. La poca reactividad de TiO₂ hace que la respuesta inmune del hospedador a la presencia del objeto extraño (biomaterial implantado) sea mínima y, que *a priori*, no comprometa la funcionalidad del implante [8].

La biocompatibilidad de los biomateriales a base de Ti favorece fuertemente el proceso de oseointegración, que puede ser definido como la conexión directa, estructural y funcional de las células que conforman el tejido óseo y la superficie del implante, sin la interposición de tejido fibroso en la interfaz hueso/biomaterial [9]. 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 oseointegración, los osteoblastos están continuamente depositando nuevas capas de tejido óseo sobre la superficie del biomaterial permitiendo así la integración de éste al hueso. El proceso de oseointegración es complejo y depende de muchos factores, que van desde las propiedades fisicoquímicas superficiales del biomaterial hasta factores propios de la salud del paciente. Fallas en el proceso quirúrgico pueden producir reacciones inflamatorias e inmunes que reconozcan al biomaterial como objeto extraño, desencadenando procesos celulares que conlleven a la formación de tejido fibroso o conectivo sobre la superficie del implante, encapsulando al mismo e impidiendo la correcta integración del implante al hueso así como, en ciertos casos, provocando el rechazo o expulsión de éste de su sitio de implantación [10].

Por lo tanto, en las últimas décadas, comprender el proceso de oseointegración con el propósito favorecerlo o acelerarlo ha llevado al incremento del estudio y análisis de las propiedades físicas, químicas y de la topografía de la superficie de los implantes de Ti. Como consecuencia, en los últimos años se ha incrementado la investigación y el desarrollo de diferentes tipos de tratamientos o modificaciones superficiales con el fin de mejorar la conexión en la interfaz hueso/biomaterial. A modo de ejemplos, se pueden mencionar la modificación de la estructura y espesor del TiO_2 por técnicas electroquímicas o la funcionalización de la superficie de Ti con nanopelículas o recubrimientos con diferentes moléculas que favorezcan y promuevan la asociación célula/superficie del biomaterial [11].

1.3 Procesos infecciosos en biomateriales

Se considera que un biomaterial “falla” cuando debe ser removido prematuramente del sitio de implantación ya que podría producir riesgos en la salud del paciente. La principal causa de fallas de un implante es aquella causada por inconvenientes o problemas en la composición y/o estructura del implante que conlleven a un proceso de oseointegración defectuoso. Entre éstas se pueden mencionar: deformaciones permanentes, fracturas por sobrecarga o fatiga, corrosión y desgaste [1,10]. La segunda causa de fallas es producida por infecciones del implante o reacciones antiinflamatorias, alérgicas o inmunes. En las últimas décadas, el número y gravedad de infecciones de implantes permanentes ha aumentado considerablemente debido,

principalmente, al aumento de la resistencia de los microorganismos a los antibióticos [12].

La infección de un implante puede producirse por diversas causas tales como el ingreso de microorganismos presentes en piel o mucosas del paciente al sitio de implantación, presencia de microorganismos en el ambiente donde se realiza el proceso quirúrgico, esterilización defectuosa de los instrumentos quirúrgicos, procedimientos incorrectos del personal de salud durante la implantación del biomaterial, etc. Cuando esto sucede, las bacterias quedan en contacto estrecho con la superficie del material y los fluidos biológicos del paciente. Algunas de ellas pueden alojarse sobre la superficie del implante, proliferar sobre este formando *biofilms* (ver Sección 1.3.1) y desencadenar la infección y falla del biomaterial. Esto se ve favorecido debido a que la interfaz biomaterial/medio biológico constituye un nicho adecuado para la proliferación microbiana debido a la poca irrigación, la presencia de una superficie (la del implante) que permite la adhesión de bacterias y un medio rico en nutrientes (plasma del paciente) que permite su crecimiento [13].

En las Secciones siguientes se detallará qué es un biofilm, cuáles son sus características y cómo se desarrollan sobre una superficie. También se indicará cómo las propiedades fisicoquímicas del implante pueden afectar el desarrollo de un biofilm cuando las bacterias logran ingresar al sitio de implantación. Por último, se brindará información sobre nuevas estrategias nanotecnológicas para prevenir la formación de *biofilms* sobre materiales implantables.

1.3.1 ¿Qué es un biofilm y cómo se desarrolla?

Las bacterias son organismos unicelulares procariotas, no poseen membrana nuclear, mitocondrias o un núcleo verdadero, y se reproducen por división asexual. Poseen una pared celular que está compuesta por peptidoglicanos o mureína, que otorga forma y rigidez a las bacterias. Pueden identificarse en dos grandes grupos de acuerdo con su respuesta frente a la tinción diferencial de Gram, la cual divide a las bacterias en Gram positivas y Gram negativas. La estructura de la pared celular en las bacterias Gram positivas está compuesta por una gruesa capa de un solo tipo de moléculas, denominadas peptidoglicanos. En cambio, las paredes de las bacterias Gram negativas están compuestas por una capa delgada de peptidoglicano y membranas celulares externas e

internas, obteniéndose así una estructura más compleja que en el caso de las Gram positivas.

Las bacterias, al igual que otros microorganismos, pueden encontrarse en su hábitat en dos formas de vida o fenotipos diferentes:

- En estado planctónico o libre, cuando se encuentran suspendidas y flotando libremente (en forma individual o formando pequeños agregados) en un medio líquido. Solo el 1% de las bacterias vive en este estado.
- En estado sésil, cuando se encuentran adheridas sobre un sustrato (biótico o abiótico) formando grandes comunidades microbianas o colonias que dan lugar a la formación de *biofilms*. Aproximadamente el 99% de las bacterias viven en comunidades o *biofilms* adheridas sobre diferentes superficies.

Los *biofilms* son la forma más común de vida de las bacterias y son los responsables de la gran mayoría de las infecciones que afectan al ser humano en general y a los biomateriales en particular. Un biofilm puede definirse como una comunidad de células bacterianas intercomunicadas entre sí, que viven adheridas sobre un sustrato o superficie y que se encuentran rodeadas por una matriz polimérica extracelular (EPS, por sus siglas en inglés *Extracellular Polymeric Substances*) [14]. Esta matriz constituye su principal barrera de defensa contra agentes antimicrobianos, ya que disminuye la penetración y la concentración local de los agentes agresivos, resultando en una alta resistencia a los tratamientos comúnmente utilizados (antibióticos). Por lo tanto, la vida en comunidades o *biofilms* permite a las bacterias conseguir protección frente a ambientes nocivos y a ataques externos, como por ejemplo a antibióticos u otros agentes antimicrobianos. En consecuencia, la formación de *biofilms* es una estrategia de supervivencia que lleva a la colonización de nuevos nichos (superficies y sustratos) [15,16].

Por otra parte, dentro de los *biofilms*, las bacterias presentan alteraciones metabólicas que incrementan la producción de proteínas, polisacáridos y factores de virulencia y también aumentan su grado de replicación o división celular, al igual que la expresión de genes y moléculas de comunicación celular. Para comunicarse entre ellas, utilizan moléculas de señalización que constituyen un sistema denominado *quorum sensing*. Este sistema de comunicación depende de la densidad poblacional y regula muchas actividades y respuestas de las bacterias como, por ejemplo, la formación y

desarrollo de *biofilms*, el cambio de fenotipo (sésil a planctónico o viceversa), la síntesis de factores de virulencia, la síntesis de componentes de la matriz o EPS que protegen al biofilm de agentes antimicrobianos, etc. [13,17].

El desarrollo de un biofilm sobre una superficie involucra un proceso que puede resumirse en 5 etapas principales (Figura 1.2):

1. Formación de la película condicionante: la fase inicial en la formación del biofilm es la adhesión de moléculas orgánicas, principalmente glicoproteínas y lípidos del microambiente, sobre la superficie del sustrato (etapa 1, Figura 1.2). Estas moléculas forman una fina capa denominada película condicionante que favorece la posterior adhesión de las bacterias planctónicas. Dependiendo de la naturaleza y de la cantidad de las moléculas que formen esta película condicionante, la superficie donde se desarrollará el biofilm puede ver modificada su energía y carga superficial [18,19].
2. Adhesión reversible y colonización inicial de la superficie: el siguiente paso es la adhesión primaria de las bacterias planctónicas sobre la superficie condicionada. Esta fase es reversible y está determinada por una serie de variables fisicoquímicas que definen la interacción entre la pared bacteriana y la superficie del sustrato. Las bacterias pueden unirse a la superficie de dos maneras: 1) de forma activa o por movilidad, gracias a la presencia de flagelos que favorecen su desplazamiento hacia la superficie y el anclaje en ella (un ejemplo de este tipo de unión se da en la formación de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*) y 2) de forma pasiva, mediante la producción de proteínas adhesivas (adhesinas) que aumentan la afinidad de anclaje entre la pared bacteriana y la superficie. En este tipo de adhesión intervienen otros factores externos como la difusión en el medio líquido y la gravedad, y también estrategias de adhesión desarrolladas por las bacterias como la formación de agregados e hileras microbianas para anclarse a la superficie. Un ejemplo de adhesión pasiva ocurre en bacterias tipo “coco” que no poseen movilidad propia como *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* [20].
3. Adhesión irreversible, crecimiento y producción de EPS: una vez que las bacterias se encuentran adheridas en la superficie, comienzan a duplicarse y a formar colonias y, a la vez, van produciendo EPS que las envuelve y las adhiere de forma irreversible sobre el sustrato. La EPS le da al agregado una

estructura bidimensional (2D) tipo “balsa” y lo protege de agentes antimicrobianos, ya que los atrapa en su red disminuyendo su penetración y llegada a las bacterias que conforman el biofilm. De esta forma, los *biofilms* adquieren resistencia a tratamientos convencionales con antibióticos, siendo necesario el estudio y desarrollo de nuevas terapias antimicrobianas para eliminarlos. La conformación química de la EPS depende exclusivamente de las bacterias que forman el biofilm. Por ejemplo, en *biofilms* formados por *P. aeruginosa*, el principal componente es alginato y en *biofilms* de *S. aureus*, es poli-N-acetil-glucosamina [15,21].

4. Maduración del biofilm: la maduración del biofilm se alcanza cuando se desarrolla una estructura compleja con canales, poros y redistribución de las bacterias sobre el sustrato. En este momento el biofilm adquiere estructura tridimensional (3D) con una arquitectura parecida a un hongo.
5. Dispersión del biofilm: una vez que el biofilm ha alcanzado la madurez, bacterias ubicadas en la parte externa pueden desprenderse del biofilm, en forma de mini colonias o como bacterias planctónicas, para colonizar otras zonas del sustrato o nuevas superficies.

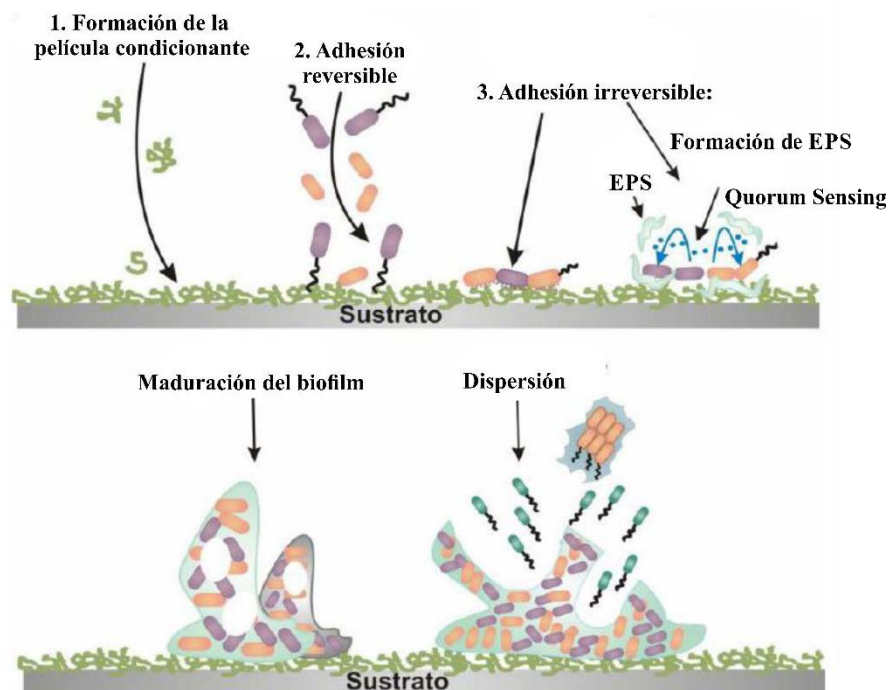


Figura 1.2. Esquema representativo de la formación de un biofilm sobre una superficie [22].

1.3.2 Propiedades fisicoquímicas de los biomateriales metálicos que influyen en la formación de *biofilms*.

Cuando las bacterias logran ingresar al órgano o tejido donde se ha colocado un implante, hay ciertas propiedades fisicoquímicas superficiales del biomaterial que puedan influenciar o aumentar las probabilidades de formación de *biofilms* en el sitio de implantación. Esto se debe a que la superficie del metal ofrece un buen sustrato en el cual las bacterias pueden adherirse y desarrollar un biofilm. La formación de una película condicionante sobre el biomaterial puede alterar o enmascarar las propiedades fisicoquímicas de su superficie haciéndola más favorable para la adhesión bacteriana [23].

Las propiedades fisicoquímicas de la interfaz metal/solución con actividad biológica influyen sobre la cinética y termodinámica de la adhesión bacteriana en formas complejas. Los modelos recientes consideran las interacciones electrostáticas en la doble capa eléctrica y las de Van der Waals y tienen en cuenta además la contribución de la energía elástica debido a las deformaciones inducidas por la adhesión en las interfaces intercelulares y sustrato-célula [24]. Sin embargo, se consideran en general las siguientes tres propiedades como las principales:

1. Energía superficial: los biomateriales metálicos como los de acero inoxidable o Ti presentan alta energía superficial, lo cual favorece la hidrofiliidad de la superficie. Las superficies hidrofóbicas presentan menor afinidad a la adhesión bacteriana. Una estrategia utilizada para prevenir la colonización bacteriana de la superficie de un biomaterial es modificarla para volverla más hidrofóbica [25,26]. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las superficies hidrofóbicas también pueden disminuir la afinidad entre el biomaterial y las células osteoblásticas [27].
2. Rugosidad superficial: algunos autores han sugerido que superficies rugosas en la microescala pueden disminuir la adhesión bacteriana en las etapas iniciales de formación del biofilm (etapa 1 y 2, Figura 1.2), ya que pueden afectar la longitud de las bacterias adheridas y su alineación y distribución sobre el sustrato. De esta forma, la rugosidad superficial puede obstaculizar la formación de *biofilms* en las etapas iniciales de colonización de la superficie por bacterias planctónicas y afectar la formación de microcolonias sobre ella [28–30].

3. **Carga superficial:** la superficie de Ti presenta una capa de óxido nativo que lo protege contra la corrosión. El punto isoelectrónico del TiO_2 es 4.5, por lo tanto, a pH fisiológico ($\text{pH} \approx 7,4$) la superficie del Ti se encuentra cargada negativamente, exponiendo grupos $-\text{OH}$ en la interfase [31]. Esta carga superficial negativa puede interactuar o atraer electroestáticamente biomoléculas para que se adhieran a la superficie de Ti formando la película condicionante. [15,32] .

En definitiva, frente a la presencia de bacterias en el sitio de implantación, la superficie del Ti ofrece un excelente sitio de anclaje para las bacterias planctónicas. Por lo tanto, la investigación y el desarrollo de modificaciones superficiales a través de técnicas nanotecnológicas que otorguen propiedades antimicrobianas a los biomateriales es una alternativa innovadora para la prevención de la formación de *biofilms* y el desarrollo de infecciones que comprometan la funcionalidad del implante y la salud del paciente. En la siguiente Sección se mencionarán las principales nanotecnologías aplicadas a combatir *biofilms* en biomateriales.

1.3.3 Estrategias nanotecnológicas para prevenir y combatir *biofilms* en biomateriales.

Frente al aumento de las infecciones severas por el desarrollo de cepas resistentes a antibióticos, en los últimos años se han investigado alternativas innovadoras para combatir *biofilms*. Entre ellas se destacan el empleo de nuevos agentes antimicrobianos de origen nanotecnológico a los cuales las bacterias no suelen presentar resistencia, como las nanopartículas (NPa) metálicas (de Ag, Cu, otros) o nanopelículas (NPe) de fitocompuestos fenólicos (FF) [33].

En el caso particular de los biomateriales, para prevenir su infección es fundamental conferir propiedades antimicrobianas a la superficie que impidan o reduzcan la colonización bacteriana de la misma en las primeras etapas de formación del biofilm (etapa 1 y 2, Figura 1.2). La superficie de los biomateriales puede ser modificada químicamente depositando sobre ellas agentes antimicrobianos tales como NPa metálicas mencionadas previamente y/o NPe producidas por diferentes moléculas, logrando desarrollar superficies antiadhesivas o antimicrobianas. Las **superficies antiadhesivas** dificultan o impiden la adhesión bacteriana, mientras que las **superficies antimicrobianas** producen la muerte o infringen daño en las bacterias, ya sea por

contacto directo o por la liberación de agentes antimicrobianos desde la superficie al medio (Figura 1.3) [34] .



Figura 1.3. Esquema representativo de modificaciones superficiales de características antiadherentes o antimicrobianas en biomateriales.

Las superficies antiadherentes se pueden obtener por la adhesión, adsorción o polimerización de diferentes moléculas antimicrobianas que forman recubrimientos o NPe sobre la superficie del material implantable. Los agentes antimicrobianos utilizados, ya sean de origen sintético (como por ejemplo polietilenglicol, poliacrilamida, polimetacrilato) [35–37] o natural (aceites esenciales vegetales, FF, polisacáridos como quitosano, otros) [35,38–40], pueden afectar la adhesión bacteriana por diferentes mecanismos. En primer lugar, los recubrimientos o NPe pueden modificar la carga y la energía superficial del biomaterial dificultando la formación de la película condicionante y/o disminuyendo la afinidad de las bacterias por la superficie [41]. Las bacterias suelen tener una carga neta negativa en su superficie a pH fisiológico, por lo cual modificaciones superficiales que negativicen la superficie de los biomateriales disminuyen la adhesión bacteriana por repulsión electrostática. Por otra parte, los agentes antimicrobianos adheridos sobre la superficie del biomaterial pueden intervenir en la comunicación bacteria-bacteria, es decir, pueden afectar el *quorum sensing* impidiendo que las bacterias se adhieran sobre la superficie [37,42] .

Las superficies antimicrobianas son más eficaces que las superficies antiadherentes, ya que infringen daños u ocasionan la muerte de las bacterias [11,34]. Estas superficies se pueden fabricar por diferentes tipos de estrategias nanotecnológicas o por la combinación de varias de ellas:

1) Recubrimientos o NPe antimicrobianos formados por la inmovilización superficial de diferentes agentes como antibióticos, péptidos antimicrobianos, iones

metálicos como Ag^+ , Zn^{2+} o Cu^{2+} , FF, aceites esenciales de origen vegetal que producen la muerte bacteriana una vez que éstas se adhieren sobre la superficie [43–47];

2) deposición de NPa metálicas de Ag^0 , Cu^0 y de óxidos metálicos como MgO y ZnO entre otros que liberan iones con acción bactericida o bien nanomateriales cargados con agentes antimicrobianos que provocan la muerte de las bacterias antes o durante su adhesión [48–53];

o 3) el desarrollo de superficies multifuncionales obtenidas por la combinación de NPe antimicrobianas con NPa de Ag^0 u otros nanomateriales que liberan agentes antimicrobianos al medio, de forma tal que hay un efecto combinado entre la acción antimicrobiana y/o antiadherente que se produce en las bacterias cercanas o adheridas sobre el recubrimiento o NPe y la acción bactericida que se produce por la liberación de agentes antimicrobianos al medio que afecta tanto a bacterias sésiles del biofilm como a las bacterias planctónicas [54–57].

Además de modificaciones químicas, se pueden realizar modificaciones físicas del sustrato para desarrollar superficies antimicrobianas. Entre ellas pueden mencionarse las modificaciones topográficas de la superficie generando micro o nanoestructuras aleatorias u ordenadas que impiden la adhesión de bacterias, o bien pueden dañarlas o impedir su proliferación. Por ejemplo, se pueden desarrollar superficies cuya topografía presente nanopilares puntiagudos capaces de provocar la ruptura de la pared bacteriana [58,59]. También, es posible desarrollar nanotopografías ordenadas en formas de canales que impidan la adhesión bacteriana o atrapen a las mismas dentro de ellas, dificultando su desplazamiento y duplicación [60,61] o favoreciendo el aislamiento y la acción de los antibióticos [33].

1.4 Nanotecnologías ecocompatibles y su aplicación en biomateriales

Como se mencionó anteriormente, en los últimos años se han incrementado el número de infecciones de materiales y dispositivos implantables debido principalmente al uso indiscriminado de antibióticos que ha contribuido al desarrollo de bacterias resistentes a los mismos. Entre las principales opciones innovadoras propuestas para hallar una respuesta a dicho problema se encuentran aquéllas que utilizan NPa y/o NPe antimicrobianas. Sin embargo, los procedimientos tradicionales para la fabricación de productos nanotecnológicos emplean reactivos y/o producen desechos tóxicos y

contaminantes tanto para la salud como para el medio ambiente. De forma que es importante que la nanociencia y las nanotecnologías emergentes no sigan los pasos que han sido típicos de innovaciones pasadas en la industria química que, a pesar de proveer beneficios significativos, no han tenido suficientemente en cuenta los impactos negativos producidos en la salud y en el ambiente.

Surgen así, las nanotecnologías “verdes” o ecocompatibles (NEC) con el propósito de reducir el impacto ambiental de los productos nanotecnológicos. Las mismas tienen como misión reducir los riesgos emergentes de los procesos y productos nanotecnológicos utilizando "*fuentes renovables, de baja o nula toxicidad y que permitan reducir o eliminar el uso y generación de materiales peligrosos*" [62] Entre dichos materiales renovables de baja o nula toxicidad que podrían ser utilizados con fines nanotecnológicos se destacan los FF, que fueron seleccionados para el desarrollo de NPe y NPa de plata en la presente Tesis doctoral.

1.4.1 Propiedades de los fitocompuestos fenólicos

La utilización de componentes provenientes del reino vegetal con fines medicinales y terapéuticos data de los comienzos de la humanidad. De hecho, muchas culturas han utilizado desde hace siglos plantas medicinales que han llevado al desarrollo de terapias homeopáticas alternativas y complementarias a la medicina tradicional actual como, por ejemplo, el Ayurveda en India [63].

Los FF en particular son componentes metabólicos secundarios de las plantas y forman parte de los aceites esenciales y extractos naturales que se pueden obtener de las hojas, ramas, semillas, flores y frutos de diversas plantas. Los FF desempeñan diversas funciones esenciales relacionadas con la protección contra la radiación UV gracias a su actividad antioxidante y también contra diversos agentes patógenos vegetales, como hongos y bacterias, debido a sus propiedades antimicrobianas. En los últimos años, los FF han sido ampliamente utilizados como agentes antimicrobianos y antioxidantes en la producción de cosméticos, en la conservación de alimentos y en la fabricación de enjuagues bucales. Además, se ha comprobado que los FF también presentan propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas, cardio y neuro protectoras, entre otras características útiles en la medicina [64].

La estructura fenólica de los FF proporciona buenas propiedades fisicoquímicas capaces de ser aprovechadas para la síntesis y fabricación de diferentes productos nanotecnológicos. Entre estas propiedades fisicoquímicas se destacan: 1) la capacidad de establecer coordinación electrostática, enlaces tipo puente de hidrógeno y covalentes e interacciones π útiles para la construcción de NPe sobre diferentes sustratos; 2) la sensibilidad al pH, potenciales redox y capacidad reductora que les permite ser utilizados en síntesis de diferentes NPa; y 3) la captura o eliminación de radicales libres y/o especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés *reactive oxygen species*) debido a su poder antioxidante, que pueden aprovecharse para aplicaciones cosméticas, conservación de alimentos y médicas (propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas) [65].

Finalmente, la capacidad de los FF de formar NPe y NPa sumada a sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes hace que estos compuestos cobren relevancia para prevenir y combatir la formación de los *biofilms* en biomateriales. Esto se debe a que las NPe y NPa obtenidas pueden conservar las propiedades antimicrobianas de los FF puros, siendo alternativas nanotecnológicas ecocompatibles capaces de desarrollar superficies antiadherentes o antimicrobianas en biomateriales metálicos.

1.4.2 Aplicaciones nanotecnológicas de los fitocompuestos fenólicos

Los FF pueden ser utilizados para sintetizar diferentes tipos de nanomateriales antimicrobianos (NPa de Ag, Cu, otros) y para formar NPe y recubrimientos antimicrobianos sobre la superficie de Ti y otros tipos biomateriales (Mg, Cu, Zn, hidrogeles, etc) por diferentes técnicas y procedimientos. A continuación, se describirán las principales técnicas utilizadas para obtener NPe y NPa a partir de FF.

1.4.2.1 Desarrollo de nanopelículas autoensambladas

Como se mencionó anteriormente, los FF pueden interactuar entre ellos y con la superficie de los biomateriales a través de coordinación electrostática, enlaces tipo puente de hidrógeno y covalentes e interacciones π útiles para la construcción de NPe (Figura 1.4).

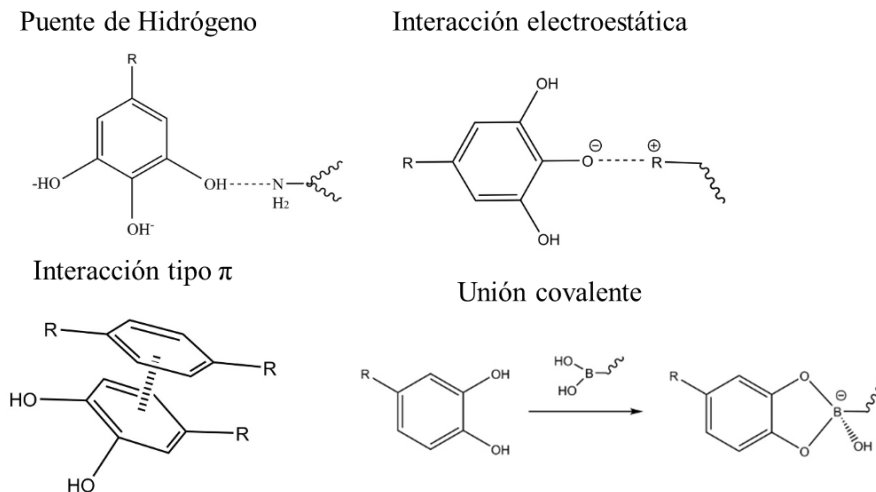


Figura 1.4. Principales tipos de interacciones fenólicas para la formación de nanopelículas [65].

El procedimiento más simple y rápido para formar NPe o *coatings* sobre la superficie de un biomaterial es el autoensamblaje de las moléculas de los FF. Este método consiste simplemente en sumergir, por un periodo determinado de tiempo, una muestra del biomaterial en una solución que contenga el o los FF de interés [66]. Los recubrimientos o *coatings* formados por este procedimiento se denominan NPe autoensambladas. En este tipo de NPe, la interacción fisicoquímica de los FF con la superficie del biomaterial depende del tipo de interacciones fenólicas que puedan ocurrir sobre ella. Se ha reportado que los FF son quimisorbidos en la superficie del biomaterial y, a la vez, desarrollan interacciones intermoleculares que desencadenan la formación de dímeros, trímeros y oligómeros de los FF que conforman la NPe [67]. Las NPe autoensambladas se forman, en general, por procesos espontáneos de autooxidación de los FF sobre la superficie del sustrato, desarrollando generalmente NPe antimicrobianas simples de espesores nanométricos [44]. En la bibliografía pueden encontrarse NPe autoensambladas desarrolladas con diferentes FF sobre diferentes tipos de biomateriales. Los FF más utilizados son: timol (TOH), carvacrol (Carv), ácido cafeico, ácido gálico (AG), ácido tánico (AT), dopamina, galato de epigallocatequina (EGCG por sus siglas en inglés *Epigallocatechin Gallate*) [65].

1.4.2.2 Desarrollo de redes metal-fenólicas (MPN)

Otro procedimiento para desarrollar NPe sobre materiales implantables, es la utilización de FF en medios líquidos que contengan cationes inorgánicos metálicos, como Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Ag^+ , entre otros. En presencia de estos iones metálicos, los FF y los

iones presentes interaccionan para formar redes metal-fenólicas (MPN, por sus siglas en inglés *Metal Phenolic Networks*). Las MPN son redes supramoleculares formadas por la coordinación entre iones metálicos y ligandos fenólicos (Figura 1.5) [65,66].

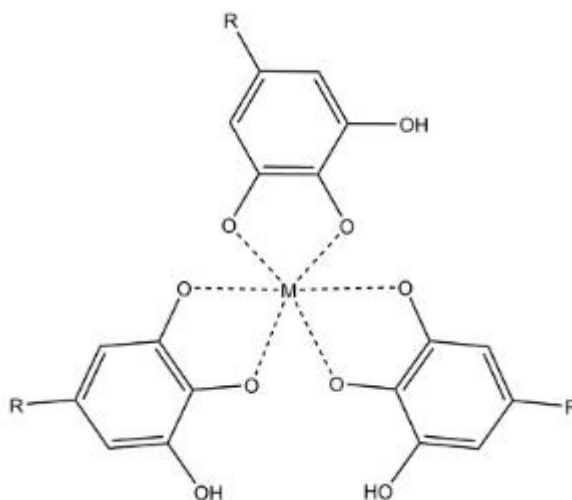


Figura 1.5. Esquema representativo de la coordinación metal-fenólica [65].

El desarrollo de MPN fue reportado por primera vez por Ejima *et al.* [68] que desarrollaron MPN por coordinación de AT y Fe^{3+} . Los autores analizaron la estabilidad de las MPN frente al pH de la solución en el cual se forman y demostraron que las MPN son más estables y adquieren mejores propiedades a pH alcalinos ($\text{pH} > 7$). Esto se debe a que a $\text{pH} < 2$ el FF forma monocomplejos con el Fe^{3+} y a valores $3 < \text{pH} < 6$ forma bicomplejos (Figura 1.6). En cambio, a $\text{pH} > 7$, el FF forma tricomplejos con el Fe^{3+} desarrollando redes estables, altamente polimerizadas, de gran tamaño y permeables debido a la presencia de poros. Esto se debe a que a $\text{pH} > 7$ los FF se encuentran total parcialmente desprotonados lo que aumenta su reactividad y afinidad por los cationes metálicos [68].

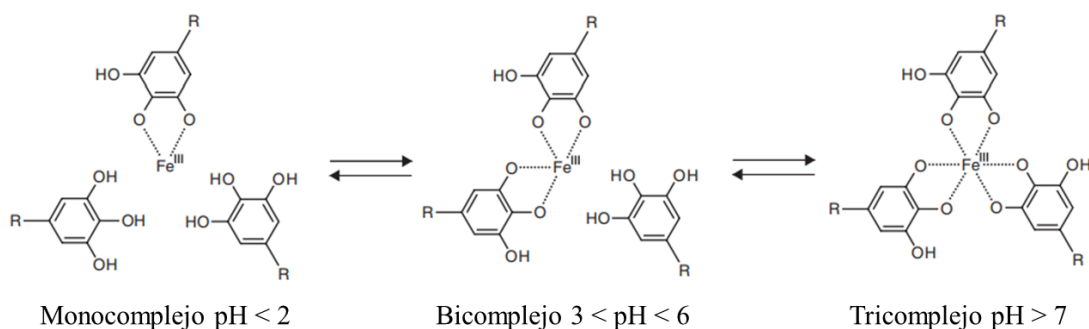


Figura 1.6. Transición pH-dependiente del estado de formación de MPN formadas con Fe^{3+}

[68]

A diferencia de las NPe autoensambladas, las MPN (Figura 1.7) son estructuras complejas de espesores entre nano y micrómetros que adquieren nuevas propiedades muy útiles en la medicina. Algunas de esas propiedades son [65,69,70]:

1. Adhesividad: las MPN presentan una gran adhesividad sobre diferentes tipos de sustratos, por lo cual producen cambios químicos y topográficos considerables en la superficie del biomaterial en el cual se adhieren. Esta propiedad es realmente útil para el desarrollo de NPe multifuncionales continuas y estables sobre la superficie de materiales implantables. A la vez, la adhesividad obtenida permite que las MPN actúen como sistemas de encapsulamiento y/o liberación de drogas (*drug delivery*) ya que pueden retener en su red principios activos con diferentes aplicaciones (antimicrobianas, antiinflamatorias, anticancerígenas, antioxidantes, etc) [71].
2. Conversión fototérmica: las MPN exhiben una fuerte absorción en el infrarrojo cercano (NIR, por sus siglas en inglés *near-infrared*) pudiendo transducir la luz en energía térmica, actuando como un nanomaterial fototérmico y fotodinámico para terapias de hipertermia contra cáncer [72].
3. Incremento de las ROS: Frente a la irradiación, los FF presentes en las MPN aceleran la reacción de Fenton convirtiendo el Fe^{3+} en Fe^{2+} , lo cual lleva a un aumento en la producción de ROS. Esta habilidad de las MPN puede ser utilizada en tratamientos contra cáncer para producir la reducción de tumores y también para eliminar o erradicar *biofilms* ya formados sobre una superficie [73].
4. Mejoras en la citocompatibilidad y oseointegración: muchos autores han reportado que MPN desarrolladas sobre materiales de Ti con diferentes FF, como por ejemplo el AG y AT en coordinación con iones Fe^{3+} presentan mejoras en la oseointegración determinada tanto en condiciones *in vitro* (en cultivos celulares) como *in vivo* (animales de laboratorio) [74–78]. También se han reportado aumentos en la citocompatibilidad de materiales de Ti o Mg con MPN [76,78–80]. En general, las mejoras en la citocompatibilidad y en la oseointegración debidas a la presencia de las MPN incrementan la afinidad de las células por la superficie del biomaterial, favoreciendo la proliferación celular sobre esta. Esto puede ser explicado por los cambios químicos y

topográficos que producen los FF y las MPN al adherirse sobre la superficie del biomaterial que pueden favorecer la adhesión y proliferación celular [75].

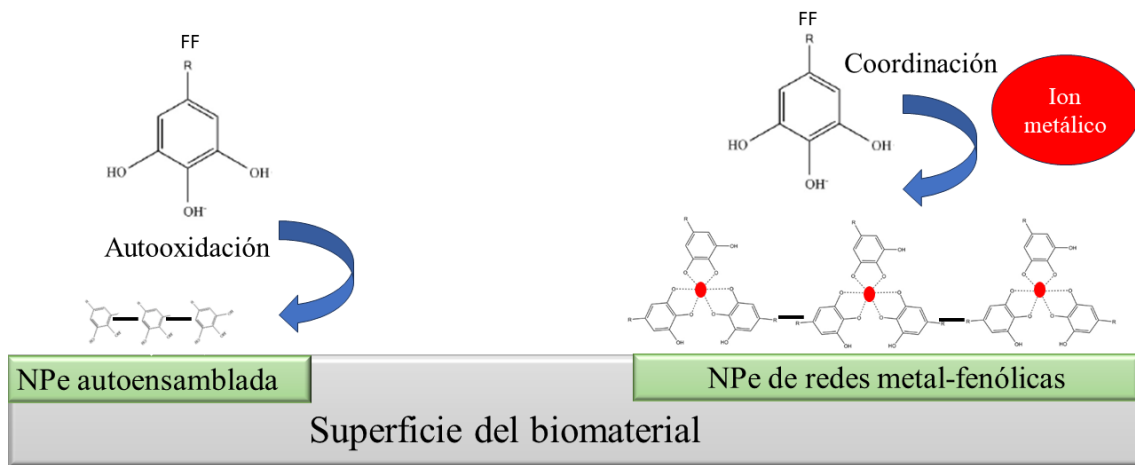


Figura 1.7. Esquema comparativo de nanopelículas autoensambladas y redes metal-fenólicas.

Finalmente, la formación de MPN es un procedimiento económico, sencillo, reproducible, de conformación química planificada y funcionalmente versátil que permite obtener NPe sobre diferentes superficies. Sin embargo, como desventaja puede mencionarse que los FF que pueden ser utilizados deben tener una solubilidad en agua relativamente alta, debido a que la síntesis de MPN se realiza en medio acuoso. Por ejemplo, FF con baja solubilidad en agua como TOH y Carv son poco adecuados para formar MPN. Por otra parte, para formar MPN estables se deben utilizar FF con varios grupos -OH disponibles para aumentar la interacción de estos grupos desprotonados en medio alcalino con los iones metálicos. Esto limita la variedad de FF que pueden ser seleccionados para formar MPN. Por estos motivos, los FF más estudiados para desarrollar MPN son: pirogalol (PG), AG, EGCG y AT (Figura 1.8).

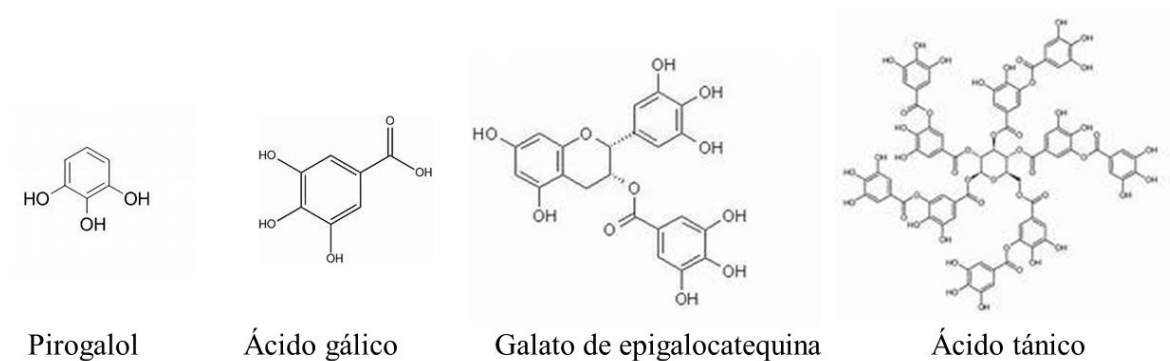


Figura 1.8. Estructura molecular de los principales fitocompuestos fenólicos utilizados en la formación de redes metal-fenólicas.

1.4.2.3 Síntesis ecocompatibles de nanopartículas de plata

La forma más tradicional de sintetizar NPa de plata (NP_{Ag}) es a través de la reducción o síntesis química, donde los iones Ag^+ se reducen para nuclearse y formar nanoestructuras de Ag^0 . El agente reductor más utilizado en las síntesis químicas es el borohidruro de sodio, el cual es tóxico para el medio ambiente y un agente considerado peligroso para el personal que lo manipula [81]. Por otra parte, para que las NPa se mantengan estables en suspensión y no precipiten, es necesario utilizar algún agente estabilizante que las recubra (*capping*). Los reactivos más utilizados para formar *cappings* en NP_{Ag} son el citrato de sodio, polivinilpirrolidona (PVP) y polivinilalcohol (PVA) entre otros. Además, muchas rutas de síntesis química de NP_{Ag} utilizan reactivos químicos, como peróxido de hidrógeno o bromuro de potasio, para regular el tamaño y forma de las NP_{Ag} obtenidas. De esta forma, pueden obtenerse NP_{Ag} con diferentes formas (esférica, triangular, hexagonal) y tamaños, cuyas dispersiones presentan diferentes colores (amarillo, verde, azul, violeta), dependiendo de la relación forma/tamaño [82,83].

Como se mencionó antes, las NEC proponen reemplazar y/o reducir la cantidad de reactivos y desechos nanotecnológicos tóxicos empleados en la síntesis de NPe y NPa. En el caso particular de las NP_{Ag}, es amplia la bibliografía que soporta que las mismas pueden sintetizarse utilizando FF puros, aceites esenciales o extractos naturales provenientes de una gran variedad de plantas [84–86]. Esto se debe a que los FF y varios componentes orgánicos presentes en aceites o extractos naturales presentan capacidad antioxidante que les confiere gran poder reductor para sintetizar NP_{Ag} y también otros tipos de NPa como de Cu o Au. Asimismo, estos agentes reductores ecocompatibles actúan también como agentes estabilizantes o formadores del *capping* de las NPa obtenidas por síntesis que emplean NEC. Entonces, en una síntesis NEC con el empleo de un FF puro o de un aceite/extracto natural se pueden obtener NP_{Ag} nanométricas, estables y funcionales, ya que los compuestos orgánicos naturales actúan como agentes reductores y como agentes estabilizantes a la vez, reduciendo de esta manera la cantidad de reactivos empleados en una síntesis química tradicional [87].

Ahmed *et al.* [85] y Khan *et al.* [86] han realizados importantes revisiones bibliográficas sobre el empleo de los principales FF, aceites esenciales y extractos naturales utilizados para síntesis NEC de NP_{Ag} y sobre las propiedades antimicrobianas

y citocompatibles de las NPa obtenidas por estas vías alternativas. En dichas revisiones se citan y mencionan más de 200 síntesis de NP_{Ag} obtenidas por NEC utilizando principalmente FF puros o FF naturales presentes en diferentes aceites o extractos provenientes de hojas, flores, semillas y frutos de origen vegetal. En general, la gran mayoría de las NP_{Ag} sintetizadas por NEC presentaron:

1. Tamaños de 5 a 100 nm promedio.
2. Forma principalmente esférica o circular.
3. Coloración de las dispersiones principalmente amarilla o anaranjada con picos máximos de absorbancia entre 400-500 nm en el espectro visible.
4. Gran actividad antimicrobiana contra diferentes especies de bacterias (*P. aeruginosa* y *P. fluorescens*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecal*, *S. aureus* y *S. epidermis*, entre otras).
5. Buena citocompatibilidad y baja citotoxicidad ensayadas con diferentes tipos de líneas celulares murinas y humanas.

Las síntesis por NEC reportadas se realizaron principalmente a temperatura ambiente, con y sin alcalinización del medio de reacción y por periodos de tiempo de reacción variables desde 10 minutos hasta 48 horas. Se utilizaron principalmente dos reactivos: nitrato de plata como fuente de iones Ag^+ y los FF o extractos naturales como fuente de agentes reductores y estabilizantes. En algunos casos, se alcalinizó el medio con hidróxido de sodio o de amonio para que los FF puros o los presentes en los aceites y extractos tomaran carga negativa neta (ver Figura 1.6). La desprotonación de grupos -OH o -COOH de los FF a $pH > 7$ favorece y acelera la formación de las NP_{Ag} debido a que los FF desprotonados pueden reaccionar fácilmente con los cationes de Ag^+ para reducirlos y formar NPa [88].

Como desventaja o diferencia frente a las síntesis químicas tradicionales, puede mencionarse que las síntesis por NEC de NP_{Ag} no permiten controlar la forma de las NPa obtenidas. La gran mayoría de las síntesis ecocompatibles dan como resultado nanopartículas esféricas [85]. Sin embargo, algunos autores han reportado la síntesis de: 1) NP_{Ag} con forma de prismas triangulares con presencia de pocas esféricas utilizando extracto de hojas de *Aloe vera* [89]; 2) mezclas de NP_{Ag} triangulares y circulares utilizando extractos de *Nelumbo nucifera* (flor de loto) [90,91]; 3) mezclas variables de NP_{Ag} triangulares, circulares y hexagonales con extracto de hojas de *Memecylon edule*

(árbol originario de India) [92] y de *Eclipta prostrate* [93] (hierba originaria de India, China y Tailandia); y 4) NPAG de forma cuasi lineal o de bastón alargado utilizando extracto de hojas de *Datura metel* (arbusto originario de China e India) [94].

Es importante mencionar que los extractos o aceites naturales obtenidos de hojas, semillas, flores o frutos de plantas pueden variar en su composición química entre diferentes cosechas o épocas del año. Es decir, que la proporción o cantidad de FF y otros componentes orgánicos presentes en ellos puede no ser la misma, lo cual podría afectar la capacidad reductora para sintetizar las NPa y también podría afectar la reproducibilidad de los tamaños de las NPa obtenidas entre diferentes síntesis. Sin embargo, a pesar de esto, varios trabajos destacan que las síntesis de NPAG por NEC son reproducibles en tamaño, forma, distribución y rendimiento [84–87].

Finalmente, las ventajas de las síntesis por NEC de NPa frente a las síntesis químicas tradicionales son: respeto por el medio ambiente; preservación de la salud humana, en particular de quienes realizan las síntesis, al no emplear reactivos tóxicos o cancerígenos; menor costo y más rentables, generación en condiciones ambientales sin utilizar altas temperaturas ni presión.

1.4.2.4 *Sistemas mixtos y efectos sinérgicos*

La potencialidad de las NPe podría ampliarse y eventualmente obtenerse efectos sinérgicos mediante la combinación de esta estrategia antimicrobiana con el uso simultáneo de antibióticos o bien la adhesión de NPAG a las superficies de las NPe. De esta forma se podrían combinar efectos antiadherentes y antibacterianos de las NPe con el importante efecto antibacteriano de los antibióticos tradicionales o de las NPAG. Este tipo de sistemas mixtos (NPe+NPAG) han sido poco investigados y podrían conducir a incrementar los efectos antimicrobianos de las NPe, por lo que es de sumo interés su estudio.

1.5 Hipótesis y objetivos

A partir de lo descrito anteriormente, el **objetivo general** del presente trabajo de Tesis Doctoral es desarrollar NPa y NPe biocompatibles con propiedades antimicrobianas, así como sistemas mixtos (NPe+NPAG) que potencien dicha acción y que sean efectivos, tanto para los microorganismos (sésiles y planctónicos) sensibles a los agentes antimicrobianos como a los resistentes a los mismos, mediante procedimientos

ecocompatibles (NEC) que reduzcan los impactos negativos sobre la salud y el medio ambiente surgidos de la utilización de tecnologías y/o reactivos contaminantes.

Para alcanzar dicho objetivo general, se plantearon los siguientes **objetivos particulares**:

1. Seleccionar y caracterizar fisicoquímicamente los FF puros y naturales a utilizar para el desarrollo de NPe y NPa por procedimientos NEC.
2. Desarrollar y optimizar diversos procedimientos o técnicas NEC para la fabricación de NPe (autoensambladas y MPN) sobre la superficie de Ti.
3. Estudiar el posible mecanismo de adsorción/autoensamblado/polimerización de los FF para desarrollar NPe sobre Ti.
4. Desarrollar y optimizar procedimientos NEC para sintetizar NPaAg con actividad antimicrobiana.
5. Desarrollar sistemas mixtos de NPe+NPaAg sobre la superficie de Ti y evaluar efectos antimicrobianos sinérgicos.
6. Determinar la acción antimicrobiana de las NPe y NPaAg y de los sistemas mixtos obtenidos por NEC frente a microorganismos (planctónicos y sésiles), así como su acción antiadherente (antibiofilm).
7. Estudiar la interacción de las células eucariotas, en particular fibroblastos (línea L929) y pre-osteoblastos (línea MC3T3-E1), con las NPe, NPaAg y sistemas mixtos NPe+NPaAg para determinar su citotoxicidad y citocompatibilidad.
8. Analizar comparativamente los resultados con el fin de seleccionar las NEC más eficaces y optimizar los tratamientos antimicrobianos.

Para lograr estos objetivos particulares, se desarrollaron y se estudiaron los siguientes sistemas producidos completamente por NEC:

- Discos de Ti grado II modificados superficialmente por la formación de NPe autoensambladas de TOH y Carv (Capítulo 4).
- Discos de Ti grado II modificados superficialmente por la formación de MPN de AG y PG en coordinación con iones Mg^{2+} (Capítulo 5).
- NPaAg sintetizadas por procedimientos NEC utilizando AG como FF puro (NPaAg-AG) y extracto de té verde (NPaAgTV) como fuente natural de FF (Capítulo 6).

- Discos de Ti grado II modificados superficialmente por el desarrollo de sistemas mixtos de MPN + amikacina (antibiótico) y MPN + NPaAg (NPe+NPa) (Capítulo 7).

La **hipótesis general** que se planteó para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral es que es posible desarrollar NPe, NPa y sistemas mixtos con efecto antimicrobiano y citocompatibles, por metodologías NEC. Dichas nanotecnologías permiten reducir los efectos adversos para la salud y el medio ambiente que se producen a partir de las nanotecnologías tradicionales.

Parte II: Técnicas experimentales

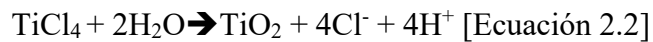
Capítulo 2: Ensayos de caracterización fisicoquímica

2.1 Técnicas electroquímicas

2.1.1 Comportamiento electroquímico del Ti.

La corrosión representa el deterioro de un material producto de un ataque químico del ambiente circundante. Es usual referirse con este término a la corrosión metálica, de origen electroquímico, ya que los electrones libres de los metales los hace susceptibles a este tipo de ataque. Las ecuaciones que describen estas reacciones químicas constan de dos hemirreacciones: una anódica, donde el metal pierde uno o más electrones (oxidación del metal), y otra catódica, donde se consumen dichos electrones (reducción del hidrógeno del agua o del oxígeno disuelto). Se ha reportado [95] que en el caso del Ti sumergido en medios biológicos que contienen iones Cl^- , el mecanismo de corrosión-pasivación incluye la formación del complejo quimisorbido $[\text{TiCl}_4]^{1-}$ que se transforma en TiCl_4 (Ecuación 2.1), el cual rápidamente hidroliza para formar el TiO_2 que pasiva la superficie (Ecuación 2.2) de acuerdo a:

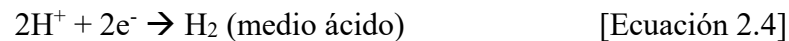
1. Reacción anódica



2. Reacción catódica:

Dependiendo del pH de la solución en la interfaz y de la concentración de oxígeno se pueden formular las siguientes hemirreacciones catódicas que pueden implicar [77] :

A) la reducción del H^+ :



B) o bien la reducción del O_2 :



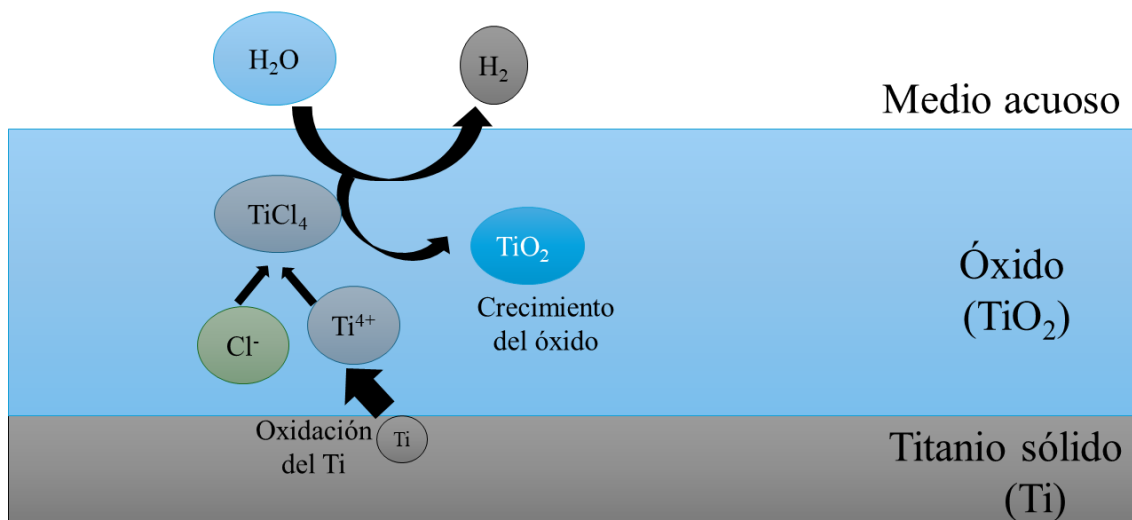


Figura 2.1. Esquema simplificado de la corrosión-pasivación del Ti. Se muestra la reacción catódica de formación de hidrógeno.

Como se mencionó en el Capítulo anterior, la excelente resistencia a la corrosión que posee el Ti como biomaterial se debe a la pasivación superficial espontánea que se produce ante la presencia de oxígeno en el medio. Dicha pasivación involucra la formación de una capa de óxidos amorfos de Ti que le proporciona una elevada estabilidad electroquímica en el cuerpo humano y otros medios corrosivos.

2.1.2 Barrido lineal de potencial y voltamperometría cíclica

El barrido lineal de potencial es una técnica comúnmente empleada para investigar la corrosión de metales en diferentes medios electrolíticos y las propiedades redox de compuestos químicos y de estructuras interfaciales. Se registran los valores de corriente a medida que varía el potencial en forma lineal entre dos límites E_i y E_f .

Generalmente se realiza en una celda electroquímica con un electrodo de trabajo (ET) (muestra metálica de estudio), un contraelectrodo (CE) generalmente de Pt y un electrodo de referencia (ER) usualmente de calomel saturado (SCE) ($\text{Hg}|\text{Hg}_2\text{Cl}_2|\text{KCl}_{(\text{sat})}$) [80]. En dicha configuración, esquematizada en la Figura 2.3, la corriente circula entre el ET y el electrodo auxiliar o CE, que se fabrica con un material que no produzca sustancias interferentes, como por ejemplo Pt. El potencial entre ambos electrodos está controlado por un potencióstato de modo de ajustar su diferencia de potencial y garantizar así un valor predeterminado de potencial en el ET. Los potencióstatos utilizados para realizar

experimentos de voltamperometría lineal y cíclica permiten aplicar una rampa de potencial entre el ET y el ER. Es decir, controla el potencial del ET referido al de referencia, utilizando una impedancia elevada de manera tal que no circule corriente por el electrodo de referencia. Cuando se realiza una polarización lineal la función que se aplica tiene la siguiente fórmula:

$$E = E_i + vt \text{ [Ecuación 2. 6]}$$

donde E es el potencial en un tiempo t determinado, E_i es el potencial inicial y v es la velocidad de barrido del potencial.

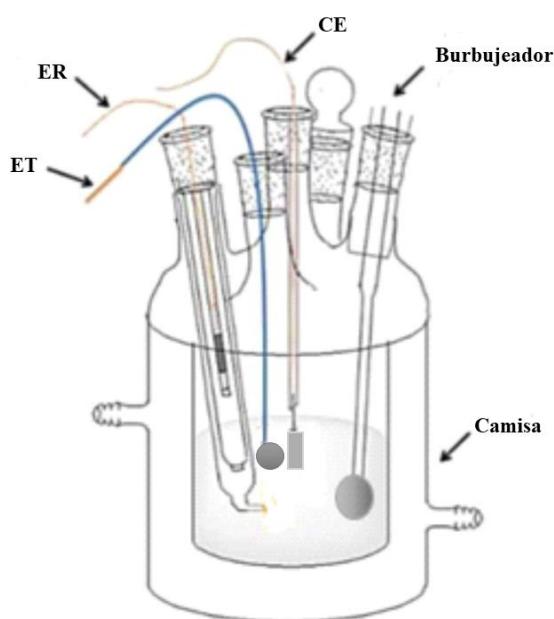


Figura 2.2. Esquema de la celda electroquímica empleada en la presente tesis. ET: electrodo de trabajo de Ti; ER: electrodo de referencia de calomel saturado; CE: contraelectrodo de Pt. Adaptado de Daza Millone (2011) [81].

La voltamperometría cíclica es una técnica mediante la cual se aplica n veces un ciclo de potencial barriendo en sentido anódico entre el límite catódico E_i y el anódico E_f y luego desde dicho potencial en sentido catódico hasta E_i , con una variación lineal en el tiempo. A medida que se modifica el potencial, se registra la corriente que circula entre el ET y el CE. Con los datos registrados por el potenciostato, se crea un gráfico de densidad de corriente (i) en función del potencial E denominado voltamperograma (Figura 2.3).

En la presente Tesis se realizaron voltamperometrías cíclicas con el propósito de evaluar el comportamiento electroquímico de las NPe formadas sobre materiales de Ti.

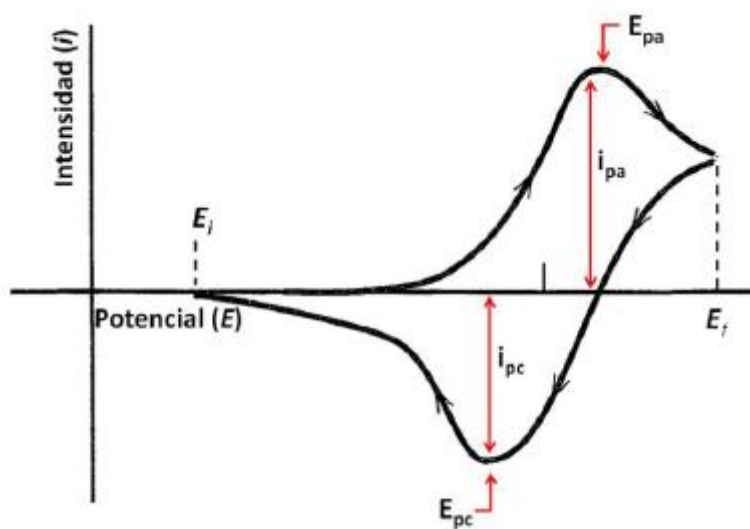


Figura 2.3. Representación de un voltamperograma. Se indican los parámetros de potencial E e intensidad corriente i en los picos anódicos (E_{pa} , i_{pa}) y catódicos (E_{pc} , i_{pc}).

2.1.3 Curvas de Tafel

En el caso de las curvas de Tafel se aplica al electrodo de trabajo (muestra en estudio) un incremento lineal de potencial. Se realizan barridos de potencial desde el potencial a circuito abierto, en sentido catódico y anódico. El diagrama de Tafel (Figura 2.4) se obtiene a partir de la representación de la corriente en escala logarítmica versus el potencial (escala lineal). Estos gráficos facilitan la determinación de los parámetros E_{corr} e i_{corr} [99].

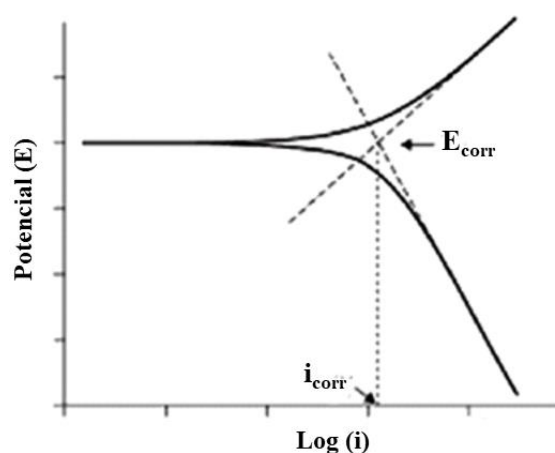


Figura 2.4. Representación de un diagrama de Tafel.

Las curvas anódica y catódica en el diagrama de Tafel presentan una región aproximadamente recta (región de activación) que puede extrapolarse constituyendo una línea de Tafel. Las líneas de Tafel (anódica y catódica) se cruzan en el punto de coordenadas (E_{corr} , $\log i_{\text{corr}}$) (Figura 2.4) que permite la estimación de la densidad de corriente de intercambio i_{corr} y el potencial mixto de corrosión E_{corr} [99]. En el potencial E_{corr} , la corriente anódica (i^+) y catódica (i^-) son iguales; por tanto, la densidad de corriente neta es cero. Todos los electrones generados por la oxidación del metal en la reacción de disolución son consumidos por la reacción de reducción del oxidante en la misma superficie del metal por lo que $i=0$.

En la presente Tesis, se realizaron curvas de Tafel con el propósito de determinar los valores de E_{corr} e i_{corr} de materiales de Ti modificados con NPe y compararlos con los valores obtenidos para el Ti sin modificar (Ti control).

2.1.4 Registro de potencial a circuito abierto

Durante las mediciones de potencial a circuito abierto (OCP, por sus siglas en inglés *Open Circuit Potential*) se evalúa la diferencia de potencial entre el ET en contacto con un electrolito y el ER, diferencia que varía con el tiempo. El potencial inicial OCPi presenta un valor similar al potencial mixto E_{corr} obtenido mediante curvas de Tafel y luego varía con el tiempo de medición.

Las mediciones de OCP constituyen una herramienta de gran utilidad para estudiar la disolución de un metal en un medio sin aplicarle perturbaciones. Para analizar los registros de OCP, conviene distinguir el tipo de ataque corrosivo que se desarrolla, representados esquemáticamente en la Figura 2.5. En el caso de una superficie de un metal pasivo como el Ti (curva a), se observa un ascenso en el potencial hasta alcanzar un valor estable producto de la pasivación del material por la formación del TiO_2 sobre la superficie del ET de Ti. En caso de que el ET sufra corrosión localizada en múltiples regiones confinadas genera inestabilidades y oscilaciones en el registro de potencial, como se observa en la curva b con descensos y ascensos del potencial atribuidos a la disolución y pasivación en los sitios activos. Por último, en la curva c se ejemplifica una corrosión generalizada uniforme, donde si bien el OCP inicialmente crece, pero luego se estabiliza y permanece constante.

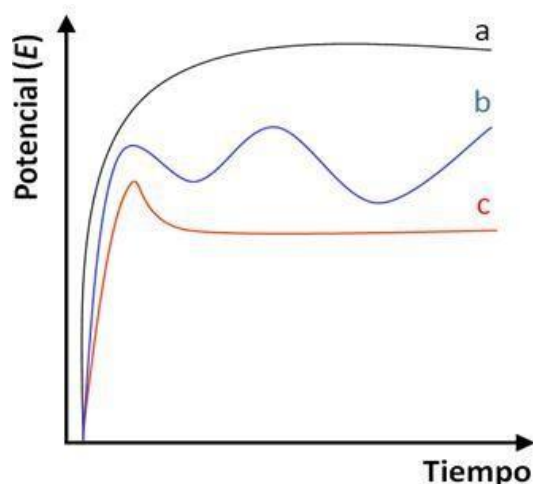


Figura 2.5. Ejemplos de registros de potencial a circuito abierto para diversos procesos: a) pasividad, b) corrosión localizada y c) corrosión generalizada.

2.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Durante las espectroscopías FTIR se irradia una muestra con frecuencias variables en la zona infrarroja del espectro electromagnético. Esta zona infrarroja se divide en tres regiones denominadas infrarrojo cercano, infrarrojo medio e infrarrojo lejano (respectivamente *NIR*, *MIR* y *FIR* por sus siglas en inglés). La irradiación a dichas frecuencias provoca mayor intensidad en la vibración intramolecular de los enlaces que posean igual frecuencia que la irradiada. En este sentido, con el registro de la intensidad de absorción en función de la longitud de la onda irradiada se pueden identificar y localizar grupos funcionales, observando los picos correspondientes a sus transiciones vibracionales particulares. Asimismo, gracias al empleo de transformadas de Fourier, los espectros se obtienen de forma más rápida, precisa y con relaciones señal/ruido más elevadas.

La espectroscopía infrarroja (IR), entonces, se utiliza para detectar vibraciones de enlaces moleculares y vibraciones rotacionales a través de la absorción de luz infrarroja. Dado que diferentes grupos funcionales absorben a diferentes frecuencias, la espectroscopía IR puede ser empleada para el estudio de la estructura molecular y constituye una “huella dactilar”.

En este trabajo se utilizaron dos modos de detección, el más frecuente es la técnica de transmitancia en el cual se fabrica una pastilla de KBr con el compuesto a analizar

sobre la cual incide el haz de luz infrarroja y, con un detector del otro lado de la muestra, se determina qué fracción de la radiación incidente (longitud de onda) ha sido adsorbida.

Existe una variación de la espectroscopía IR, que se utilizó en este trabajo, denominada reflexión total atenuada (del inglés *ATR-FTIR*) que se emplea principalmente para el estudio de la absorbancia de radiación infrarroja de compuestos químicos depositados sobre una superficie. Mientras que en el FTIR se analiza la transmitancia de la muestra haciendo que un haz de luz la atraviese, el ATR usa la reflectancia de la muestra. Entonces, la técnica de ATR-FTIR consiste en hacer incidir la radiación en un cristal transmisor de alto índice de refracción (generalmente de ZnSe o diamante), de modo tal que surja una reflexión interna total que permita caracterizar la muestra. La reflectancia del cristal genera una onda evanescente sobre la superficie del cristal que, al estar en íntimo contacto con la muestra, penetra sobre ésta y permite analizar su composición superficial. (Figura 2.6) [100].

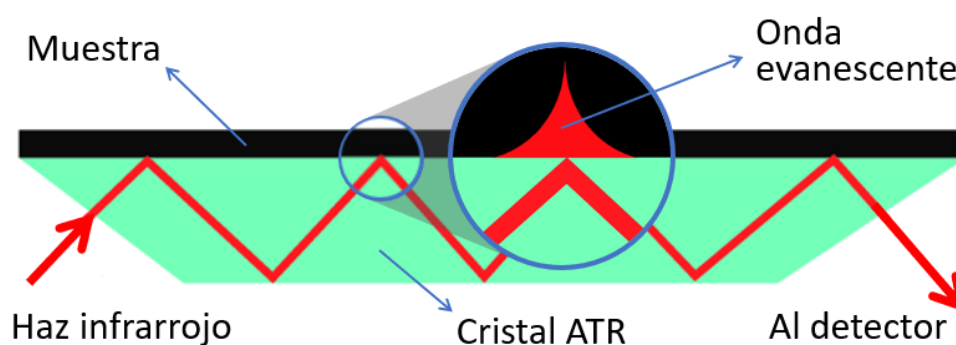


Figura 2.6. Diagrama explicativo de la espectroscopía ATR-FTIR.

En el presente trabajo se utilizó un espectrómetro Agilent Cary 630 equipado con un accesorio ATR (Agilent Technologies) con un prisma de ZnSe. Se analizaron los espectros de los FF puros y luego los espectros de las diferentes NPe y NPaAg obtenidas con estos FF. En todos los casos los espectros fueron obtenidos en el rango de $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$ y como el resultado de 256 escaneos realizados con una resolución espectral de 2 cm^{-1} .

2.3 Espectroscopia UV-visible

La espectroscopía de absorción de luz ultravioleta-visible (UV-visible) es muy utilizada para la determinación cuantitativa de diversos analitos. Esta técnica se basa en que las diferentes moléculas/iones adsorben radiación UV-vis (generalmente entre longitudes de onda $\lambda = 200$ a 800 nm) produciendo la excitación de electrones. Los

espectros de absorción de cada elemento son únicos, es decir, presentan máximos de energía a longitudes de onda específicas y con distintas intensidades [101]. Esta espectroscopía es particularmente útil para analizar iones metálicos de transición y compuestos orgánicos en solución.

Existe una relación entre la cantidad de radiación absorbida y la concentración de la especie en solución dada por la Ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \cdot d \cdot c \text{ [Ecuación 2.7]}$$

donde A es la absorbancia (adimensional); ϵ es el coeficiente de extinción propio de cada sustancia (L/(mol.cm)); d es la distancia que atraviesa el haz de luz (usualmente dada por el ancho de la cubeta utilizada (cm)) y c es la concentración de la especie que absorbe la radiación (mol/L). Esto implica una relación directamente proporcional entre la absorbancia y la concentración de la especie de la solución.

Para una longitud de onda determinada (λ), se puede definir la absorbancia como sigue:

$$A = \log (I_{\lambda_0} / I_{\lambda}) \text{ [Ecuación 2.8]}$$

donde I_{λ_0} es la intensidad del haz incidente en la muestra e I_{λ} es la intensidad del haz emergente de la muestra.

Las propiedades del espectro de absorción de una sustancia se ven habitualmente afectadas por el tipo de disolvente utilizado, el pH de la solución, la temperatura, altas concentraciones de electrolitos y la presencia de compuestos que puedan interferir. Es crucial comprender cómo estos elementos influyen en el espectro y seleccionar las condiciones de análisis de forma cuidadosa para minimizar el impacto de las fluctuaciones no deseadas, evitando que estos factores afecten la medición de la absorbancia.

Para realizar dichas mediciones, se compara la muestra con un blanco conformado generalmente por el solvente o bien una solución de los mismos componentes excepto la especie a analizar, facilitando la identificación de la radiación generada por la especie analizada.

De este modo, la práctica habitual mediante esta técnica consiste en realizar primeramente un primer espectro amplio para hallar la longitud de onda a la que la especie en cuestión absorbe mayor radiación. Seguidamente, se elabora una curva de calibración

que relaciona la absorbancia (A) a la longitud de onda elegida con la concentración de la especie. Se requieren varias soluciones de concentración (c) conocida a fin de verificar la dependencia lineal A y c , calcular la pendiente de la recta y luego, mediante la Ecuación 2.7, la concentración del analito.

Por otra parte, los nanomateriales metálicos presentan espectros de absorción en el UV-visible, debido al fenómeno de resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés *Surface Plasmon Resonance*) producido por la oscilación colectiva de los electrones de la superficie de las NPa en respuesta a la luz. El espectro UV-vis y el valor máximo de absorbancia o plasmón de las NPa metálicas dependen de la naturaleza, la forma y el tamaño del metal, y de las características del solvente o medio donde se encuentran dispersas [102,103].

En la presente Tesis se empleó un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800, el cual posee un sistema fotométrico de doble haz. La espectroscopia UV-visible se utilizó para realizar curvas de calibración para cuantificar FF puros y proteínas, así como para caracterizar las NPaAg obtenidas por NEC.

2.4 Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-OES)

La técnica de Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-OES) se fundamenta en la emisión de radiación cuando un átomo o ion, excitado tras absorber energía de una fuente de alta temperatura, regresa a su estado fundamental. La cantidad de energía emitida está ligada a la cantidad de átomos del metal en cuestión, lo que la convierte en una herramienta útil para determinar concentraciones de estos elementos en solución [86].

El proceso comienza con la atomización de la muestra empleando plasma de argón a 10.000 K para excitar los átomos, formando una mezcla gaseosa conductora de argón, electrones y cationes de la muestra bajo análisis. Asimismo, se requiere un nebulizador para generar un aerosol de partículas y un atomizador que, mediante el calor (plasma o llama), genere átomos o iones individuales. De esta forma, se cuenta con un sistema de excitación térmica (la fuente de atomización) y un detector. Para cuantificar la concentración de metales, se desarrollan curvas de calibración para cada metal, abarcando concentraciones de 0 a 10 mg/L.

En el presente trabajo, se utilizó ICP-OES para cuantificar la concentración de las NPaAg sintetizadas por NEC, calculada como $[Ag^+]$ total en solución. Para realizar la cuantificación por ICP-OES, las suspensiones de las NPaAg obtenidas fueron digeridas con ácido nítrico al 2% para oxidarlas de Ag^0 a Ag^+ y fueron analizadas en la Unidad Plapimu-Laseisic (UPL), dependiente de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP y de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC-PBA).

2.5 Ángulo de contacto

Para determinar la hidrofiliidad de las diferentes superficies desarrolladas en la presente Tesis, se empleó la medida del ángulo de contacto. El ángulo de contacto es una medida de la capacidad que presenta un líquido para mojar un sólido. Cuando un líquido se esparce sobre una superficie sólida se forma una línea de contacto denominada línea de mojado. Si el líquido se esparce totalmente, el ángulo que se forma entre la superficie del líquido y la superficie sólida es cero, en cambio, si se forma una gota se establece un ángulo de contacto definido que es representativo de la hidrofiliidad de la superficie.

El ángulo de contacto entonces es determinado por un equilibrio de fuerzas en la interfase sólido-líquido-gas. Cuando la energía interfacial sólido-líquido (γ_{SL}) es elevada, la gota del líquido tiende a reducir su área de contacto contrayéndose y aumentando el ángulo formado entre las superficies del líquida y del sólido. Un ángulo elevado se interpreta como una escasa adhesión entre las superficies, y en la práctica puede emplearse para analizar el grado de hidrofiliidad/hidrofobicidad [104].

Las energías superficiales de la interfaz líquido-gas (γ_{LG}), de la interfaz sólido-gas (γ_{SG}) y el ángulo de contacto líquido-sólido (θ) se relacionan a través de la ecuación de Young:

$$\gamma_{LG} \cdot \cos \theta = \gamma_{SG} - \gamma_{SL} \text{ [Ecuación 2.9]}$$

Si $\gamma_{SG} > \gamma_{SL}$ entonces el $\cos \theta$ es positivo y el ángulo de contacto es menor a 90° , por lo tanto, la superficie es hidrofílica. En el caso de una superficie hidrofóbica, el $\cos \theta$ es negativo y el ángulo de contacto es mayor a 90° (Figura 2.7).

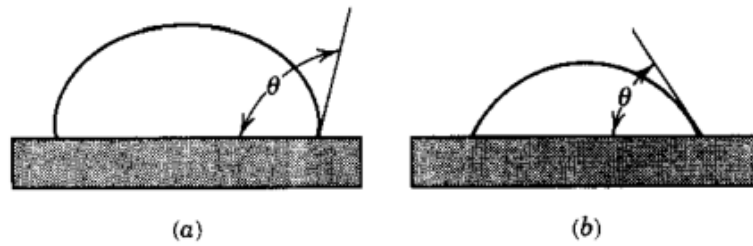


Figura 2.7. Ilustración de a) superficie hidrofóbica con baja mojabilidad ($\theta > 90^\circ$) y b) superficie hidrofílica con alta mojabilidad ($0^\circ < \theta < 90^\circ$).

En el presente trabajo, esta medición se realizó con un goniómetro Ramé-Hart modelo 290. Se depositó una gota de 1 μL de agua ultrapura sobre el sustrato de Ti, se tomaron fotografías de alta resolución de la interfase y determinó mediante un software (Drop Image) el ángulo de contacto promedio. Estas mediciones fueron realizadas con el propósito de determinar si las NPe y NP_aAg desarrolladas y depositadas sobre la superficie de Ti modificaban la mojabilidad de la superficie de dicho material en comparación al Ti control sin modificar. El equipo empleado para el presente trabajo se muestra en la Figura 2.8.



Figura 2.8. Goniómetro empleado. a) Bomba y mangueras por las que circula el líquido. b) Base porta muestras donde se coloca la muestra. c) Brazo que sujeta el *tip* por donde se vierte la gota durante la medida. d) Cámara.

2.6 Microscopía óptica

Dentro del conjunto de las microscopías, la microscopía óptica permite un reconocimiento rápido de la morfología superficial de un material. En la Figura 2.9 se muestra el microscopio óptico Olympus BX51 utilizado.

En este trabajo se empleó principalmente microscopía óptica de fluorescencia, la cual consta de los mismos componentes de un microscopio óptico al que se le añaden una fuente luminosa y filtros especiales con la finalidad de que emita, de manera selectiva, radiaciones de determinadas longitudes de onda: radiación ultravioleta u ondas luminosas de color violeta, azul ó verde. En este caso, se emplearon filtros tipo #WB correspondientes a: espejo dicróico DM460, filtro de excitación BP350 y barrera de filtro BA400 BP, que son filtros que dejan pasar una banda comprendida entre dos longitudes de onda, por ejemplo “BP460-580” significa que es opaco a longitudes de onda no comprendidas entre 460 nm y 580 nm. En el microscopio de epifluorescencia la radiación excitatoria es aplicada sobre la muestra a través de un sistema incorporado al objetivo y no atraviesa el espécimen. Además, posee espejo divisor de haces, cuya función es reflejar hacia el espécimen la longitud de onda filtrada y seleccionada, mientras que las radiaciones que no fueron bloqueadas por el filtro excitador atraviesan el espejo divisor y continúan su trayectoria sin ser reflejados.



Figura 2.9 Microscopio óptico de epifluorescencia y de campo abierto Olympus BX51 utilizado en el presente trabajo.

2.7 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés, *Transmission Electronic Microscopy*) se destaca como técnica para la determinación de la estructura cristalina en metales, así como también la detección de impurezas, precipitados, bordes de grano, interfaces y hasta estructuras moleculares. Su rango de trabajo abarca desde la décima parte de un micrómetro hasta el nanómetro. Al bombardear la muestra con un haz de electrones, algunos logran atravesarla sin ser alterados y otros interactúan con la misma, sea por difracción o dispersión, creando la imagen aumentada de la muestra en análisis. Esto es posible gracias a que los electrones son partículas cargadas negativamente que pueden ser acelerados y dirigidos con precisión mediante las lentes electromagnéticas del TEM. Los rayos dispersos pueden ser recogidos por una lente y reenfocados para formar la imagen del espacio real, donde cada punto de la imagen corresponde a un punto específico del objeto [105].

El grado de penetración de los electrones depende del espesor de la muestra y la energía de dichos electrones. A mayor energía aplicada se podrán analizar muestras con mayor espesor y menos transparentes.

El equipo consta de un cañón de electrones, un sistema de lentes magnéticas y una pantalla fluorescente, como se aprecia en la siguiente Figura 2.10:

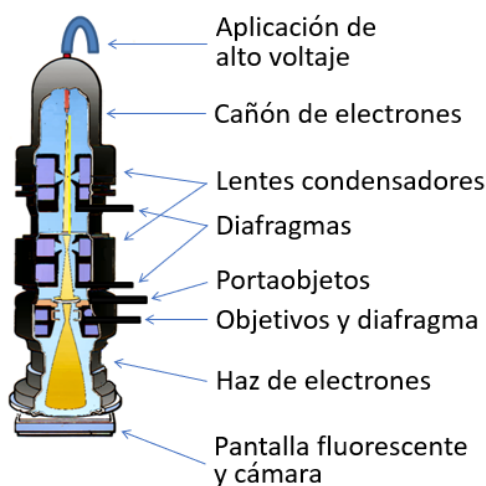


Figura 2.10. Esquema representativo de los componentes de un TEM.

En el presente trabajo se utilizó una variante de TEM, denominada microscopía electrónica de transmisión de barrido o S-TEM (por sus siglas en inglés *Scanning Transmission Electronic Microscopy*). A diferencia del TEM tradicional, en el S-TEM se desliza un haz de electrones fino y focalizado a lo largo de la muestra. La interacción

entre este haz y los átomos de la muestra genera un flujo de señales que se correlacionan con la posición del haz para construir una imagen virtual, donde la intensidad de señal en cualquier localización de la muestra es representada por la intensidad en la escala de gris de la correspondiente localización en la imagen. La principal ventaja respecto al TEM convencional es la mejora en la resolución espacial.

En la presente Tesis se utilizaron los servicios de S-TEM provistos por YPF Tecnología (Y-TEC) (Berisso, Buenos Aires) para observar y determinar forma y tamaños de las NPa sintetizadas por NEC.

2.8 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Desde su invención en 1986 por Binnig, Quate y Gerber, la microscopía de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés *Atomic Force Microscopy*) se utiliza esencialmente como herramienta de caracterización superficial a escala micro y nanométrica. En particular, lo que caracteriza especialmente al AFM es que proporciona información tridimensional en las coordenadas X, Y y Z de una superficie con gran precisión [105].

El AFM barre o “escanea” la superficie de una muestra mediante una sonda aguda, punta, adosada a un cantiléver y registra los cambios de la fuerza de interacción existente entre la punta y la muestra. Las interacciones de fuerzas punta-muestra se miden mediante pequeñas flexiones del cantiléver que se registran empleando un haz láser reflejado en su parte posterior. Durante el escaneo de la superficie, las fuerzas de interacción entre la punta y la muestra pueden ser de tipo atractivas (van der Waals), cuando la distancia punta-muestra es relativamente grande, o de tipo repulsivas (repulsión de Pauli), cuando las distancias son pequeñas. De esta manera, el mapeo de fuerzas se traduce en el registro de la señal de flexión del cantiléver en unos fotodiodos que permiten obtener una imagen topográfica de la superficie de la muestra (Figura 2.11). Un sistema piezoeléctrico es el encargado de desplazar la muestra respecto de la punta y registrar así una imagen tridimensional de la superficie.

De este modo, se puede generar una imagen tridimensional de la topografía de diversas muestras a través de las fuerzas generadas entre el cantiléver y la superficie de la muestra. Por lo tanto, las fuerzas que se miden con el AFM pueden ser mecánicas, de van der Waals, fuerzas capilares, magnéticas, electrostáticas, entre otras [106] .

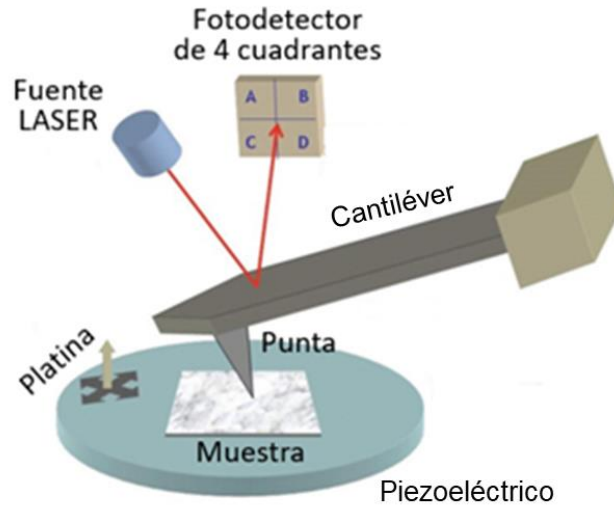


Figura 2.11. Esquema de los componentes y del principio de funcionamiento de un microscopio de fuerza atómica.

Existen varios métodos de operación del AFM, los cuales pueden dividirse en dos grupos: modos de contacto continuo y dinámicos. En principio se empleaban únicamente los modos de contacto continuo o también llamados modos estáticos, donde la punta se encuentra en contacto perpetuo con la muestra. Esto permite realizar espectroscopías de fuerzas sin sistemas de retroalimentación ni variables de control. Sin embargo, ante el rápido desgaste de la punta y la dificultad de estudiar muestras blandas, pocos años después se propuso tomar imágenes a partir de la oscilación de la sonda. Entre los métodos dinámicos más empleados actualmente se encuentra el de contacto intermitente.

En este método, comúnmente conocido como “*Tapping mode*®” en inglés, el cantiléver oscila con amplitudes en el rango nanométrico (aproximadamente entre 5 y 200 nm) [107]. Este sistema incorpora un circuito de modulación de amplitud, el cual se esquematiza en la Figura 2.12:

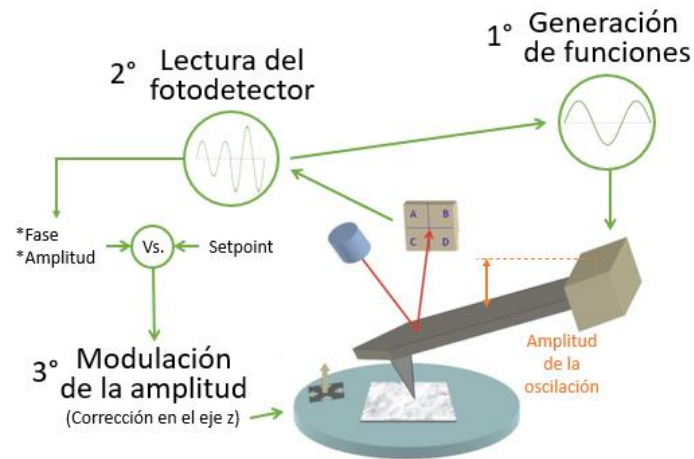


Figura 2.12. Arreglo experimental del AFM en contacto intermitente o modulación de amplitud.

La amplitud es calculada internamente con los valores de pendiente del cantiléver que lee el fotodetector. Al comparar las mediciones con el valor preestablecido de amplitud, en caso de existir diferencia, el sistema envía una señal al escáner. El escáner se encarga de hacer la corrección en el eje “z” para poder alcanzar el valor preestablecido y de esta forma mantener la variable control (amplitud) constante (la preestablecida en el *setpoint*). Por ende, como los cambios topográficos generan cambios en la amplitud de oscilación, las exploraciones en los ejes “x”, “y” junto con las correcciones en el eje “z” generan la imagen topográfica de la muestra.

En lo que respecta al análisis cuantitativo mediante AFM, la topografía de los materiales se puede evaluar mediante parámetros de rugosidad, propios de la distribución estadística de alturas del perfil o la superficie analizada.

2.8.1 Parámetros de rugosidad

Entre la gran variedad de parámetros disponibles para estudiar la rugosidad de una muestra, en el presente trabajo fueron utilizados los siguientes [108,109]:

- La rugosidad promedio (R_a): representa la desviación promedio de los valores absolutos de las alturas de las irregularidades superficiales (y_i) de un perfil desde la línea media. Matemáticamente se define como:

$$R_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i| \quad [\text{Ecuación 2.10}]$$

donde n es el número de segmentos en los que se divide el eje X. Este parámetro describe las variaciones de altura de la muestra.

- La rugosidad cuadrática media (R_q): representa la desviación estándar de las alturas promedio y, al ser un parámetro más sensible que R_a , permite distinguir picos y valles. Su cálculo se expresa como sigue:

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2} \quad [\text{Ecuación 2.11}]$$

- La máxima altura del perfil (R_{max}): representa la distancia vertical máxima entre los puntos más altos y bajos a lo largo del perfil.

En la Figura 2.13 se representan esquemáticamente R_{max} , R_a y R_q .

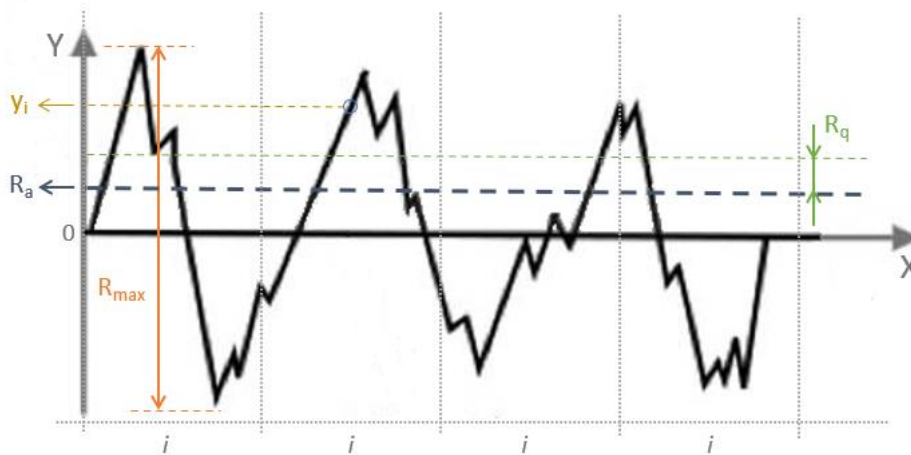


Figura 2.13. Representación de los parámetros de rugosidad R_a , R_q y R_{max} .

- La asimetría en la rugosidad (*skewness*) (S_{sk}) mide el grado de simetría en la superficie respecto de la rugosidad promedio. Al tener alta sensibilidad a picos y valles, permite distinguir las formas presentes entre dos perfiles que tengan similar R_a o R_q . En la Figura 2.14 se esquematiza su análisis. Valores de S_{sk} cercanos a cero representan una distribución simétrica de picos y valles. En cambio, valores positivos de S_{sk} indican la predominancia de picos altos o agudos y valles poco profundos y redondeados, mientras que valores negativos indican predominancia de valles finos y agudos y picos redondeados y pocos prominentes.

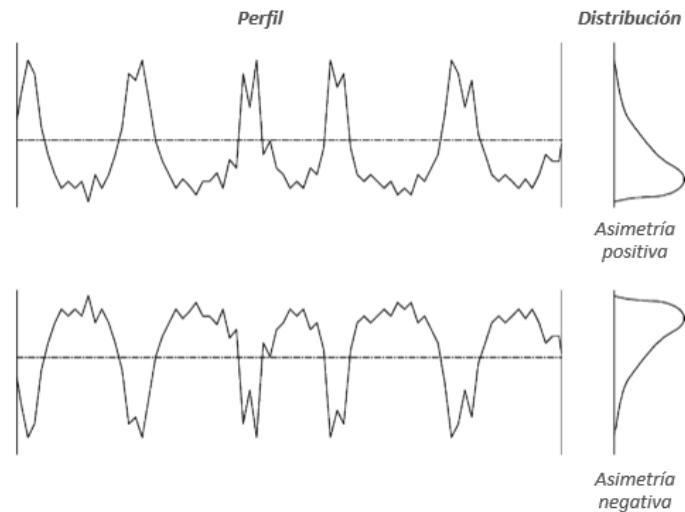


Figura 2.14. Definición de la asimetría en la rugosidad (S_{sk}) y sus posibles curvas de distribución.

- El coeficiente de Curtosis (S_{ku}): se aplica para estudiar la distribución de alturas de la superficie, la cual se esquematiza en la Figura 2.15. Si el valor de curtosis es mayor que 3, se dice que la distribución de alturas es leptocúrtica, es decir, con una gran cantidad de picos y valles abruptos. Por lo contrario, valores de curtosis menores que 3 indican la presencia de una distribución de alturas platicúrtica, es decir, una topografía más suavizada con pocos picos y valles.

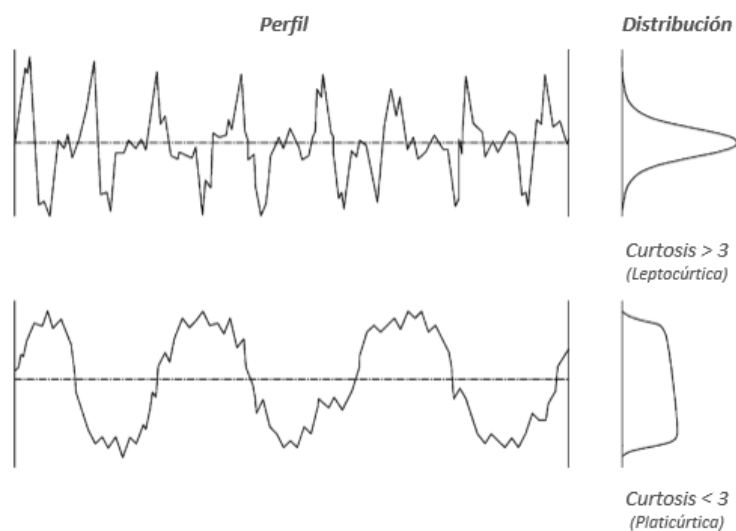


Figura 2.15. Definición del parámetro de Curtosis (S_{ku}) y sus posibles curvas de distribución.

- La diferencia en el área superficial de la imagen (R_{isad}): Se emplea con el propósito de conocer la diferencia porcentual entre el área superficial de la proyección bidimensional y la imagen tridimensional. Ofrece información topográfica complementaria a la curtosis. Las superficies suavizadas o lisas

(platicúrticas) tendrán valores porcentuales bajos o cercanos a cero en comparación con superficies muy rugosas (leptocúrticas) donde dicha diferencia será mayor. Este parámetro es muy útil para caracterizar superficies rugosas que han sido recubiertas con NPe, ya que estas pueden suavizar la superficie del material “rellenando” o cubriendo los valles presentes y el valor de R_{isad} puede disminuir en comparación a la superficie sin NPe.

En la presente Tesis se realizaron análisis AFM de las NPe y NPa adheridas sobre la superficie de Ti y se compararon las imágenes topográficas y sus parámetros de rugosidad con los obtenidos para las muestras de Ti control sin modificaciones superficiales. Las imágenes se obtuvieron en modo *Tapping* con un AFM Nanoscope V Multimode (Bruker, Santa Barbara, CA) y se analizaron en el software NanoScope Analysis 1.5.

2.9 Dispersión dinámica de luz (DLS)

La dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés *Dynamic light scattering*), también conocida como espectroscopía de correlación de fotones (ECF) y dispersión de luz casi elástica (DLCE), resulta muy conveniente para sondear la cinética de soluciones y dimensionar tamaños de partículas. Permite obtener en pocos minutos información de tamaños para partículas con diámetros entre pocos nanómetros y 5 μm . Esta técnica resulta muy útil para caracterizar NPa, ya que permite obtener un tamaño promedio aproximado (diámetro hidrodinámico) de manera rápida y sencilla, analizar la estabilidad de las dispersiones de NPa según el pH y la fuerza iónica, por citar algunos ejemplos [110].

Esta técnica se basa en las mediciones del ensanchamiento Doppler de la luz dispersada como resultado del movimiento browniano de las partículas. Cuando se analiza la distribución de velocidades en dicho movimiento térmico, se miden las fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada. Esto permite aproximar el diámetro de las partículas por medio de la ecuación de Stock-Einstein. Asumiendo partículas esféricas, el coeficiente de difusión D de las partículas se relaciona con el diámetro hidrodinámico de la partícula R como sigue:

$$D = \frac{k.T}{6.\pi.\eta.R} \quad [\text{Ecuación 2.12}]$$

donde k es la constante de Boltzmann, T la temperatura del sistema y η la viscosidad del solvente.

El diámetro hidrodinámico determinado por DLS corresponde al diámetro de una esfera que posee el mismo coeficiente de difusión traslacional que el de la partícula que se mide, suponiendo una capa de hidratación que rodea la partícula o molécula. Debido a esto, el diámetro calculado a partir de las propiedades difusionales de la partícula indica el tamaño de la partícula dinámica hidratada y solvatada [111].

Dicha distribución, se pondera de acuerdo con la intensidad de la dispersión de luz de cada fracción o población de partículas. La intensidad de la luz dispersada producida por una partícula es proporcional al peso molecular promedio y a la concentración de las partículas. De este modo, pequeñas cantidades de partículas aglomeradas pueden predominar en la medida por distribución de intensidad. A su vez, los resultados obtenidos por intensidad pueden ser transformados a una distribución de volumen (mediante la teoría de Mie) que describe la proporción relativa de los componentes de la muestra basado en su volumen en lugar de su dispersión (intensidad). La distribución en volumen, en general, se utiliza con fines comparativos con los valores obtenidos por intensidad y también para estimar las proporciones relativas de las diferentes poblaciones que componen una muestra con dos o más picos. Sin embargo, al convertir los datos de intensidad en volumen se aceptan principios que no siempre se cumplen o se conocen:

1. Todas las partículas son esféricas.
2. Todas las partículas son homogéneas.
3. Las propiedades ópticas de las partículas se conocen, es decir, los componentes reales e imaginarios del índice de refracción.

Por lo tanto, los resultados obtenidos por volumen no deben ser considerados absolutos, pero son útiles para comparar con los resultados determinados por intensidad y para estimar la representación en porcentajes relativos de cada población de partículas dentro de una muestra [112]. En el presente trabajo se utilizó un equipo Zetasizer Nano-ZS de Malvern Instruments, que utiliza un láser de 4-mW He-Ne (633 nm) y un generador de campo eléctrico, para estimar el diámetro hidrodinámico de las NP_{Ag} sintetizadas por NEC. Los resultados fueron expresados en distribución de intensidad y también se estimaron los valores para la distribución de volumen con fines comparativos. Con el

propósito de evaluar la estabilidad de las NPaAg frente a la fuerza iónica de una solución salina tamponada con fosfatos, PBS (*Phosphate Buffered Saline*) con pH fisiológico (~7.4) se realizaron mediciones de diámetro hidrodinámico en distintas condiciones: a 25 y 37°C, usando agua Milli-Q y PBS como solventes.

Capítulo 3: Ensayos biológicos y microbiológicos

3.1 Ensayos con células eucariotas

3.1.1 Medios de cultivos y líneas celulares

Para la realización de los ensayos con cultivos de células eucariotas se empleó medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 50 UI/ml de penicilina y 50 µg/ml de sulfato de estreptomicina. Las líneas celulares fueron mantenidas y repicadas en medio DMEM e incubadas en estufa a 37°C con 5% de CO₂.

Se utilizaron diferentes líneas celulares de origen murino:

- Células pre-osteoblásticas MC3T3-E1 como modelo de estudio de células osteoblásticas de hueso.
- Células fibroblásticas L929 como modelo de estudio para células fibroblásticas de tejido conectivo.

3.1.2 Ensayos de citocompatibilidad y citotoxicidad

En las últimas décadas, debido al avance en el desarrollo de productos nanotecnológicos, la evaluación de la toxicidad que producen a nivel celular los mismos se ha convertido en un punto crucial de estudio para la comercialización y producción industrial de nuevas nanotecnologías. La citotoxicidad puede definirse como la alteración de las funciones celulares básicas que producen cambios o daños en la respuesta celular [113]. Estas alteraciones pueden ser detectadas en diferentes niveles:

- Disminución de la actividad metabólica, la cual puede ser evaluada por disminución de los niveles de ATP (adenosina trifosfato), actividad mitocondrial o en el sistema de endomembranas. Estos daños en la actividad metabólica se consideran como injurias “leves o tempranas” ya que no ocasionan directamente la muerte celular.
- Pérdida o ruptura de la integridad de la membrana plasmática, la cual puede ser detectada por diferentes tipos de coloraciones (ioduro de propidio, tinción Live/Dead, otras). Este tipo de daño se considera grave ya que la disrupción de la membrana celular ocasiona la muerte de las células al no poder separar su medio interno del externo.

Dentro de los ensayos de citotoxicidad más utilizados se destacan los ensayos de reducción de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) y reducción de rojo neutro (RN) y ensayos de viabilidad celular con tinción con naranja de acridina que serán descritos a continuación.

3.1.2.1 *Ensayo de reducción de MTT*

Se fundamenta en la reducción metabólica, a través de las enzimas succinato-deshidrogenasa que se encuentran dentro de las mitocondrias, de la sal de tetrazolio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, de color amarillo) a formazán (de color azul) que es un compuesto insoluble que queda atrapado dentro de las células [114]. Las mitocondrias son organelas esenciales para el metabolismo celular, ya que desempeñan un papel fundamental en el proceso de respiración celular y producción de energía en forma de ATP.

De esta forma, la reducción del MTT por parte de las mitocondrias dentro de las células vivas permite estimar la actividad mitocondrial y la viabilidad celular, ya que la cantidad de formazán producido es directamente proporcional a la cantidad de células vivas. Para cuantificar la cantidad de formazán se utilizó el siguiente protocolo:

1. Sembrar 20.000 células en placa de 96 pocillos e incubar a 37°C durante 24 horas para que las células crezcan.
2. Descartar el medio DMEM y adicionar medio fresco con la sustancia a testear en el rango de concentraciones deseadas. Incubar 24 horas más.
3. Eliminar el medio con la sustancia a testear y adicionar MTT (concentración 0,5 mg/ml) e incubar 3 horas.
4. Retirar el MTT y lavar con PBS.
5. Adicionar DMSO (dimetil sulfóxido) y dejar actuar a temperatura ambiente durante 10 minutos para producir la lisis celular y la liberación de formazán.
6. Medir la absorbancia ($\lambda = 570$ nm) en espectrofotómetro de placas ELISA (7530 Microplate Reader Cambridge Technology, Inc., St. Watertown, MA, EE. UU.).
7. Calcular el porcentaje de actividad mitocondrial/viabilidad celular en relación con las muestras control, de acuerdo a la siguiente formula:

$$Viabilidad\ celular\ (MTT) = \frac{b}{a} \times 100 \text{ [Ecuación 3.1]}$$

donde a es la absorbancia determinada para las muestras control y b la absorbancia medida para las muestras tratadas.

En el presente trabajo, se utilizó la técnica de MTT para estimar la citotoxicidad de las NP_{Ag} obtenidas por NEC a concentraciones de 5, 10, 20, 40 y 80 $\mu\text{g/mL}$ de plata total. También se utilizó para determinar la toxicidad de los productos de liberación de las NPE de FF formadas sobre Ti.

3.1.2.2 Ensayo de reducción de Rojo Neutro

Se basa en la detección de los daños que producen diversos componentes tóxicos sobre la integridad de membrana de los lisosomas. Esta técnica cuantifica el transporte celular del colorante rojo neutro (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina) incorporado a las células a través de lisosomas y endosomas.

Los lisosomas son organelas importantes dentro del metabolismo celular ya que se encargan de la detoxificación y digestión de sustancias extrañas o tóxicas para las células. En su interior contienen una gran batería de enzimas hidrolíticas y proteolíticas capaces de digerir las sustancias tóxicas que ingresen a las células. En consecuencia, la retención del colorante de RN es directamente proporcional a la actividad lisosomal de las células, ya que cuando se produce una disminución en la retención del colorante se observa también una disminución en la viabilidad celular [115].

La cuantificación de la actividad lisosomal y la viabilidad celular por RN se evaluó a través del siguiente protocolo:

1. Sembrar 20.000 células en placa de 96 pocillos e incubar a 37°C durante 24 horas para que las células crezcan.
2. Descartar el medio DMEM y adicionar medio fresco con la sustancia a testear en el rango de concentraciones deseadas. Incubar 24 horas más.
3. Retirar el medio con las sustancias testeadas y adicionar RN al 0,01% e incubar por 3 horas.
4. Retirar el RN y lavar con PBS.
5. Extraer el colorante con una solución de ácido acético al 1% en 50% de etanol.
6. Medir absorbancia ($\lambda = 540 \text{ nm}$) en espectrofotómetro de placas ELISA (7530 Microplate Reader Cambridge Technology, Inc., St. Watertown, MA, EE. UU.).

7. Calcular el porcentaje de actividad lisosomal/viabilidad celular en relación con las muestras control, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad celular (RN)} = \frac{b}{a} \times 100 \text{ [Ecuación 3.2]}$$

Donde *a* es la absorbancia determinada para las muestras control y *b* la absorbancia medida para las muestras tratadas.

En el presente trabajo, se utilizó la técnica de RN para estimar la citotoxicidad de las NP_aAg sintetizadas por NEC a concentraciones de 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL de plata total.

3.1.2.3 Viabilidad y proliferación celular mediante tinción con naranja de acridina

La citocompatibilidad también se evaluó por tinción con naranja de acridina (N,N,N',N'-tetrametilacridina, Sigma, St Louis, MO, USA) que es un colorante catiónico selectivo que interactúa mediante fuerzas electroestáticas con las moléculas del ADN celular. Cuando dicho colorante se encuentra unido al ADN presenta un máximo de excitación a 502 nm y una emisión a 525 nm (en el rango de emisión verde), por lo cual tiñe verde a las células en fase de división activa, es decir, que contienen una alta cantidad de ácidos nucleicos [116].

Mediante esta técnica se determinó la viabilidad y la proliferación celular tanto a tiempos cortos (24 horas) como a tiempos largos (hasta 7 días) de incubación, acorde se mencionará en detalle en los capítulos siguientes. Esta técnica se utilizó tanto para evaluar los efectos citotóxicos de NP_aAg en suspensión sobre células cultivadas en placas de múltiples pocillos o placas *multiwell*, como así también en células adheridas sobre la superficie de diferentes muestras de Ti. El protocolo general que se utilizó fue el siguiente:

1. Sembrar la cantidad deseada de células en placa de múltiples pocillos o sobre la superficie de titanio e incubar por 24 horas o hasta 7 días, dependiendo del ensayo, a 37°C en estufa de cultivo.
2. Remover medio de cultivo y lavar con PBS.
3. Teñir con naranja de acridina y observar inmediatamente por epifluorescencia utilizando un filtro de 515-560nm (Olympus BX51, Olympus Corp., Tokyo,

Japón) conectado a una cámara de Olympus DP73 (Olympus Corp., Tokyo, Japón).

4. Tomar entre 15 y 20 fotos digitales por cada muestra y calcular el porcentaje de área cubierta por células utilizando el programa Image-Pro Plus®.
5. Los resultados de viabilidad celular se expresaron en función del porcentaje de adhesión celular/área cubierta por células en relación con las muestras control a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ adhesión} = \frac{a}{b} \times 100 \text{ [Ecuación 3.3]}$$

donde a es el área cubierta por células en las muestras problema y b es el área cubierta por células en las muestras control.

3.2 Ensayos de diferenciación osteogénica en células pre-osteoblásticas

Como se mencionó en el Capítulo 1, los FF pueden presentar propiedades osteogénicas, siendo capaces de incrementar la producción de colágeno tipo I, la formación de depósitos de calcio y/o la producción de fosfatasa alcalina. Por lo tanto, pueden favorecer el proceso de oseointegración [65].

Con el objetivo de evaluar las propiedades osteogénicas de las diferentes superficies de Ti modificadas con NPe y/o NPAg, se indujo la diferenciación de las células pre-osteoblásticas MC3T3-E1 a osteoblastos maduros y metabólicamente activos utilizando medio de cultivo osteogénico (medio DMEM suplementado con β -glicerol fosfato 10 mM y 50 μ g/ml de ácido ascórbico) [117,118]. Luego de 15 o 21 días de incubación en medio osteogénico (el medio de cultivo fue cambiado cada 3 días para evitar el envejecimiento celular), se determinó la producción de fosfatasa alcalina (FAI), colágeno tipo I y depósitos de calcio.

3.2.1 Determinación semicuantitativa de fosfatasa alcalina (FAI)

Luego de 15 días de incubación de células MC3T3-E1 en medio osteogénico, se procedió a determinar la producción de FAI mediante la tinción con el kit VECTOR® Red Alkaline Phosphatase Substrate de las células diferenciadas y adheridas sobre las diferentes superficies de Ti. Dicho kit reacciona con la FAI producida por las células generando un complejo fluorescente color rojizo que puede ser observado en el microscopio de epifluorescencia. El protocolo es provisto por el kit y consiste en colorear

con 30 μL del reactivo la superficie de Ti durante 30 minutos en oscuridad, luego se enjuaga con PBS y se observa inmediatamente en microscopio de epifluorescencia. Para el análisis de resultados se tomaron 15 fotos por muestra, se midió el área cubierta usando el software ImageJ y se realizó el siguiente cálculo:

$$\% \text{FAI} = \frac{a}{b} \times 100 \text{ [Ecuación 3.4]}$$

donde a es el área cubierta por FAI en las muestras problema y b es el área cubierta en las muestras control.

3.2.2 Determinación cuantitativa de colágeno tipo I

La producción de colágeno tipo I se determinó luego de 21 días de incubación de las células MC3T3-E1 en medio osteogénico, acorde a protocolos vigentes [57]. Primero, se fijaron las células adheridas en las diferentes superficies de Ti con solución fijadora de Bouin (ácido pícrico, formol y ácido acético en una proporción 15:5:1) durante 30 minutos. Luego se lavaron con agua destilada y se adicionó el reactivo de Sirius Red (0,1 % p/v en solución acuosa saturada con ácido pícrico) que se dejó reaccionar durante 1 hora. Este colorante aniónico reacciona con los grupos amino del colágeno presente para formar un complejo color rosado. Finalmente, se retiró el exceso de colorante, se lavó con HCl 0,01 N y se extrajo de las células con NaOH 0,1N. Se midió la absorbancia a $\lambda = 550$ nm y los resultados (% de colágeno) se expresaron con relación al control como:

$$\% \text{Colágeno} = \frac{a}{b} \times 100 \text{ [Ecuación 3.5]}$$

donde a es la absorbancia medida para las muestras problema y b para las muestras control.

3.2.3 Determinación cuantitativa de depósitos de calcio

La formación de depósitos de calcio se determinó luego de 21 días de incubación de las células MC3T3-E1 en medio osteogénico acorde a protocolos vigentes [55], [101]. [55], [101]. En primer lugar, las células fueron fijadas con formalina al 10 % p/v en PBS durante 10 minutos y luego fueron enjuagadas con agua destilada. Posteriormente, fueron coloreadas con Rojo de Alzarina (2% p/v en agua, pH=4,2) por 10 minutos. Dicho reactivo une selectivamente al catión Ca^{2+} a pH 4,2 formando un precipitado rojo-anaranjado. Por último, se retiró el exceso de colorante con agua destilada y se solubilizaron los precipitados con NaOH 0,1 N. La producción de depósitos de calcio se

cuantificó mediante medidas de absorbancia ($\lambda = 548 \text{ nm}$) y se expresaron los resultados de la siguiente manera:

$$\% \text{ Calcio} = \frac{a}{b} \times 100 \text{ [Ecuación 3.6]}$$

donde a es la absorbancia medida para las muestras problema y b para las muestras control.

3.2.4 Determinación cuantitativa de proteínas por método de Bradford

La determinación de proteínas totales sobre las diferentes muestras de Ti analizadas en la presente Tesis se realizó por el método de Bradford luego de 15 o 21 días de incubar células MC3T3-E1 en medio osteogénico. Este método se basa en la unión del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 (Reactivo de Bradford) con las proteínas produciendo un complejo color azul intenso. La formación de este complejo es muy rápida (2 minutos aproximadamente) y es estable en suspensión por al menos 1 hora [120]. La cuantificación de las proteínas se realizó en base al siguiente protocolo:

1. Las células adheridas sobre las muestras de Ti fueron lisadas con Triton X-100 al 0,1% y se recolectó la suspensión obtenida.
2. La suspensión de lisis celular fue centrifugada a 12.000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos a 4°C.
3. Se recolectó el sobrenadante (con las proteínas en suspensión) y se descartó el precipitado o *pellet*.
4. El sobrenadante con las proteínas se colocó en placas de 96 pocillos y se adicionó el reactivo de Bradford para formar el complejo coloreado.
5. En paralelo, se realizó una curva estándar de calibrado utilizando seroalbúmina bovina (BSA por sus siglas en inglés, *bovine serum albumin*) como proteína de referencia en un rango de concentraciones de 0 a 20 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 3.1)

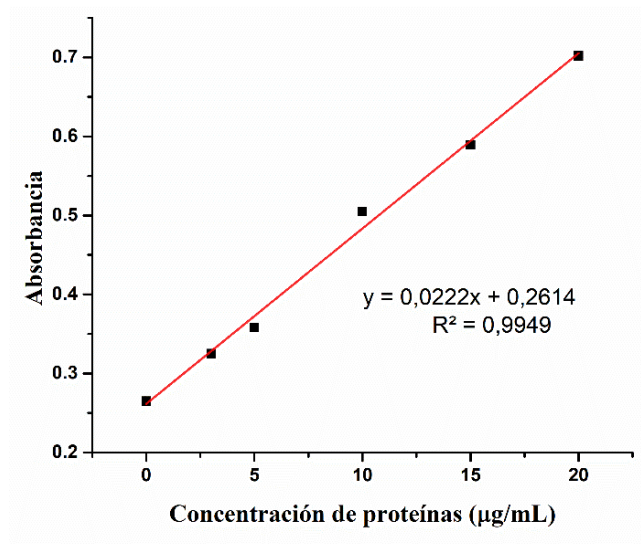


Figura 3.1. Curva estándar obtenida por el método de Bradford.

6. Se cuantifico la cantidad de proteínas por medida de la absorbancia ($\lambda = 595$ nm) en el espectrofotómetro.
7. Los resultados se expresaron respecto del control de la siguiente forma:

$$\% \text{ Proteínas} = \frac{a}{b} \times 100 \text{ [Ecuación 3.7]}$$

donde a es la concentración de proteínas determinada para las muestras problema y b para las muestras control.

3.3 Ensayos microbiológicos

3.3.1 Cepas bacterianas

Para la realización de la presente Tesis se utilizaron tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas de interés médico:

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), principal bacteria involucrada en infecciones de materiales implantables.
- *Pseudomonas aeruginosa* (aislado clínico), principal bacteria involucrada en infecciones nosocomiales.
- *Klebsiella pneumoniae* (aislado clínico), bacteria multiresistente a terapias convencionales (antibióticos).

3.3.1.1 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

S. aureus es una bacteria con forma de “coco” o esférica, no móvil, sin flagelo, no encapsulada, poseen un tamaño entre promedio de 0,8 y 1 μm , es resistente a la salinidad y con metabolismo aerobio facultativo, es decir, que puede obtener energía para su normal funcionamiento tanto en presencia como en ausencia de oxígeno [121,122]. Se considera una bacteria Gram positiva debido a la gran presencia de peptidoglicano en su gruesa pared celular que le permite retener el colorante utilizado en la tinción de Gram (cristal violeta), coloreándose de color morado [123] (Figura 3.2).

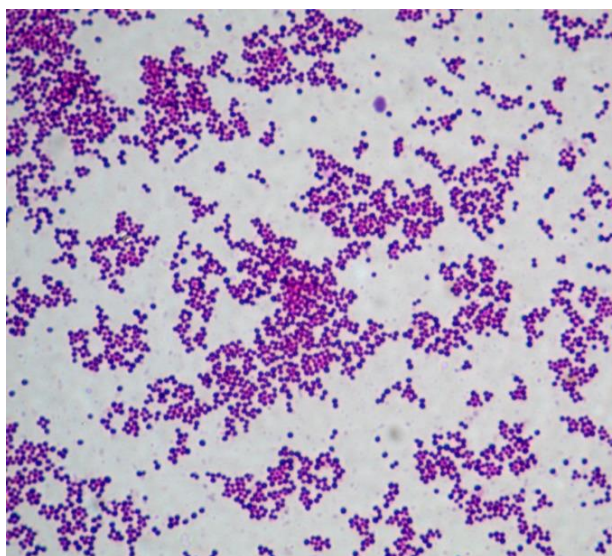


Figura 3.2. Tinción de Gram para *S. aureus* [124].

S. aureus es una bacteria patógena oportunista que habita normalmente la piel y mucosas de los seres humanos sin producir daño alguno, pero a través de heridas u objetos quirúrgicos contaminados, puede penetrar en órganos y en el torrente sanguíneo produciendo infecciones. Es la principal bacteria involucrada en las infecciones de materiales implantables que pueden implicar la remoción del implante infectado en una segunda cirugía [125].

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

3.3.1.2 *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)

P. aeruginosa es una bacteria con forma de “bacilo” o bastón corto, móvil con presencia de un único flagelo, no esporulada y con metabolismo principalmente aerobio, aunque puede crecer en condiciones anaeróbicas utilizando nitratos. Presenta un tamaño variable de 0,5 a 1 μm . Se caracteriza por la capacidad de producir una variedad de pigmentos, como la piocianina (de color azul verdoso), la pioverdina (pigmento fluorescente de color verde amarillento) y la pirrubina (de color rojo) [126,127]. Es una bacteria Gram negativa, ya que presenta una capa delgada de peptidoglicano que no retiene el colorante (cristal violeta), por lo cual toma un color rosado debido a la utilización de safranina como colorante de contra tinción (Figura 3.3).



Figura 3.3. Tinción de Gram para *P. aeruginosa* [128].

P. aeruginosa es una bacteria que habita en gran variedad de ambientes: suelo, agua, vegetación y piel y mucosas de seres humanos y otros animales. Es una bacteria patógena oportunista pudiendo infectar los pulmones y vías respiratorias, vías urinarias, heridas y también implantes. *P. aeruginosa* puede adquirir resistencia y protección frente a diversos antibióticos y agentes antimicrobianos, ya que presenta capacidad para producir grandes cantidades de EPS cuando forma *biofilms* sobre diferentes sustratos [129]. Además, esta bacteria es un microorganismo que posee resistencia natural a antimicrobianos debido a la baja permeabilidad de su membrana celular externa (entre 12 y 100 veces menos que *Escherichia coli*, por ejemplo), que constituye una barrera selectiva frente a la entrada de las moléculas de antibióticos u otros agentes agresivos [130].

La cepa utilizada para los ensayos realizados en este trabajo de Tesis doctoral es un aislado clínico cedido por el Dr. Alejandro Miñán.

3.3.1.3 *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*)

K. pneumoniae es una bacteria con forma de “bacilo”, no móvil, sin flagelo, no esporulada, con una cápsula prominente y fermentadora de la lactosa. Es una bacteria con tamaños de 0,5 a 0,8 μm y Gram negativa, ya que presenta una capa delgada de peptidoglicano que no retiene el colorante (cristal violeta), por lo cual toma un color rosado debido a la utilización de safranina como colorante de contra tinción (Figura 3.4) [131].



Figura 3.4. Tinción de Gram para *K. pneumoniae* donde puede observarse la cápsula [132].

K. pneumoniae es una bacteria patógena oportunista que se encuentra principalmente en la boca, piel e intestinos, así como también en entornos hospitalarios. Afecta principalmente a personas inmunocomprometidas por lo que es una bacteria frecuente en infecciones nosocomiales. Además, es común encontrarla formando *biofilms* en dispositivos médicos como catéteres y tubos endotraqueales [133,134]. La gran mayoría de las infecciones nosocomiales provocadas por *K. pneumoniae* tienden a convertirse en infecciones crónicas debido principalmente a que: 1) los *biofilms* formados son muy resistentes a los antibióticos y a la respuesta inmune del huésped y 2) los aislados clínicos de infecciones nosocomiales de dicha bacteria presentan múltiple resistencia a un amplio espectro de antibióticos β -lactamasas o carbapenemasas, dificultando la acción terapéutica para la eliminación de la infección [135].

La cepa utilizada para los ensayos realizados en este trabajo de Tesis doctoral es un aislado clínico cedido por el Dr. Alejandro Miñán.

3.3.2 Medios de cultivos

Se utilizaron medios líquidos para el crecimiento de las cepas bacterianas y medios sólidos para el mantenimiento y conservación de las cepas.

Medios líquidos utilizados:

- Caldo nutritivo Merck o Britania: se utilizó para el crecimiento de las cepas bacterianas bajo agitación en estufa de cultivo (*shaker*). La composición se detalla abajo:

Peptona de carne: 5 g/L

Extracto de carne: 3g /L

- Medio sintético GMP: se utilizó particularmente en los ensayos microbianos que contenían NP_aAg con el propósito de evitar las interferencias que provocan los componentes presentes en el caldo nutritivo tradicional en la liberación de iones Ag⁺. Componentes tales como proteínas y cloruros, presentes en el caldo nutritivo, pueden atrapar a los iones Ag⁺, impidiendo que interactúen con las bacterias de forma adecuada. De esta forma, con la utilización del medio GMP se puede evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana de NP_aAg o sustratos de Ti con estas NP_aAg adheridas sin interferencias de componentes externos. En trabajos previos del grupo se comprobó que el medio GMP permite el correcto crecimiento de las bacterias y que no ocasiona déficit nutricional para estas [51]. La composición del medio GMP se detalla a continuación:

Manitol: 5 g/L

Glucosa: 5 g/L

Glicina: 10 g/L

Buffer fosfato a pH:7,4 (1 L)

Como medio de cultivo sólido se utilizó agar nutritivo solidificado en placas de Petri. Estas placas con medio nutritivo sólido se emplearon para ensayos de recuento de bacterias viables y para mantenimiento en heladera a 4°C de las cepas bacterianas. La composición del agar nutritivo es la siguiente:

Peptona de carne: 5 g/L
Extracto de carne: 3 g/L
Agar-agar: 12 g/L

3.3.3 Recuento de bacterias viables

La técnica más utilizada para determinar la cantidad de bacterias en un volumen dado es el recuento en placa de Petri de unidades formadoras de colonias (UFCs). Para lograr cuantificar las UFCs es necesario obtener un rango limitado de bacterias viables de 30 a 300 UFCs/mL para poder contabilizarlas en las placas de Petri. Por dicho motivo, se debe realizar una serie de diluciones de la muestra o inóculo original de forma tal de tener varias alícuotas para sembrar y encontrar la dilución que permita contabilizar entre 30 y 300 UFCs por placa. En la presente Tesis se trabajó con diluciones seriadas 1/10 con un mínimo de 3 diluciones y un máximo de 6. Así, se obtienen diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-6} que luego son sembradas con ansa estéril sobre el agar solidificado en placas de Petri. Posteriormente, se incuban por 24 h a 37°C y finalmente se cuentan las colonias que se formaron [44,51]. El número de UFCs se determina por la siguiente ecuación:

$$UFCs = \frac{n^{\circ} \text{ colonias} \times 10}{\text{factor de dilución}} \quad [\text{Ecuación 3.7}]$$

Otra forma de determinar la cantidad de bacterias en suspensión es a través de la determinación de turbidez con espectrofotómetro, donde la medida de absorbancia o densidad óptica (DO) está relacionada con una cantidad definida de bacterias (UFCs). Mientras mayor sea la cantidad de bacterias que haya en la muestra mayor será la DO obtenida. Sin embargo, a medida que aumenta la concentración de bacterias, la suspensión se vuelve cada vez más turbia y se reduce la cantidad de luz transmitida, por lo tanto, disminuye la DO perdiendo linealidad en concentraciones muy elevadas de bacterias. Esto se soluciona diluyendo la muestra y ajustando la DO obtenida a valores menores de $DO = 1$. En los ensayos realizados en la presente Tesis se determinó la DO a 600 nm, para todas las cepas utilizadas, donde una $DO = 0,5$ equivale a $\sim 10^8$ UFCs.

Para cuantificar el número de bacterias sésiles adheridas sobre las diferentes superficies de Ti luego de 3 horas o 24 horas de exposición a *S. aureus* se utilizó la técnica de recuento en placa de UFCs, siguiendo el siguiente protocolo:

1. Finalizado el tiempo de exposición a *S. aureus* (3 o 24 horas), las bacterias sésiles adheridas sobre Ti se desprendieron utilizando un baño ultrasónico (se ha demostrado que en estas condiciones de trabajo el baño ultrasónico no afecta la viabilidad bacteriana [46]. Con ese propósito las muestras de Ti fueron colocadas dentro de tubos de ensayo con 1 mL de agua estéril y se sonicaron por 10 minutos.
2. Se realizaron diluciones seriadas 1/10 de la suspensión bacteriana obtenida previamente.
3. Se sembraron 100 μ L de cada dilución en placas de Petri con agar solidificado y se incubaron por 24 horas a 37°C.
4. Finalmente, se procedió a contar el número de UFCs utilizando la ecuación 3.7.

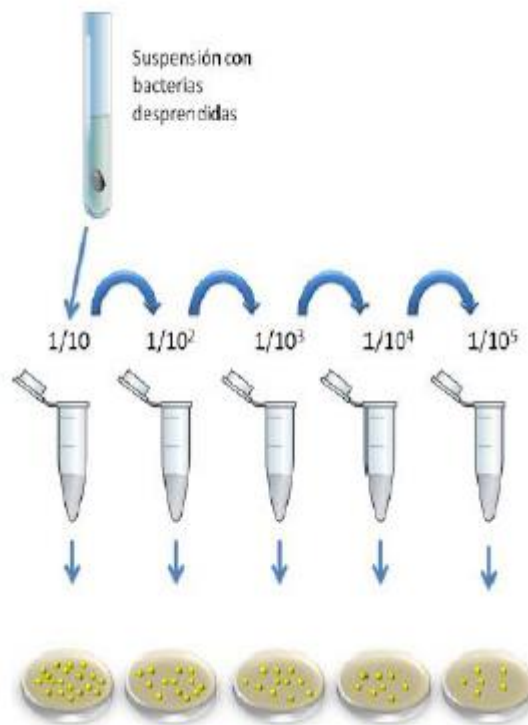


Figura 3.5. Esquema correspondiente al ensayo de recuento en placas de las bacterias desprendidas de los sustratos de titanio [136].

3.3.4 Determinación de CMI y CMB

La técnica más utilizada para evaluar la sensibilidad de las bacterias planctónicas a los agentes antimicrobianos (antibióticos, NPa, FF, otros agentes antimicrobianos) es la

determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) [137].

La CMI se determina como la concentración más baja del agente antimicrobiano necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano tras 24 horas de incubación del cultivo bacteriano con el agente antimicrobiano. En la práctica, la CMI se determina por ausencia de turbidez en el medio de cultivo, lo que indica ausencia de crecimiento bacteriano. Como se explicó en el apartado anterior, la turbidez es indicio de crecimiento bacteriano y puede observarse a simple vista [138]

La CMB se define como la concentración del agente antimicrobiano necesaria para matar el 99,9% de la población microbiana inicial trascurridas 24 horas de incubación del cultivo bacteriano con el agente antimicrobiano. Para encontrar la CMB es necesario realizar recuento en placa y contabilizar las colonias formadas. La CMB es aquella concentración en la cual la cantidad de UFCs es igual a cero [139]

La técnica se basa en la exponer durante 24 horas una concentración de microorganismos estandarizada y conocida a concentraciones crecientes de un agente antimicrobiano, obtenidas por dilución seriada 1:2 en placas de 96 pocillos o en tubos de ensayos. Trascurrido el tiempo de incubación en estufa de cultivo, se procede a determinar la CMI (por observación de turbidez) y la CMB (por recuento en placa de UFCs).

En la presente Tesis, se determinó la CMI y CMB para las diferentes NPAG sintetizadas por NEC en un rango de concentraciones crecientes de Ag entre 0,15 a 75 $\mu\text{g/mL}$ (expresadas como concentración de Ag total) a través del siguiente protocolo [138,139]:

1. Se realizó un cultivo en caldo nutritivo *overnight* (por el periodo de una noche) para todas las cepas estudiadas en *shaker* con una agitación de 170 rpm a 37°C.
2. Se determinó la DO a 600 nm del cultivo *overnight* y se realizaron diluciones necesarias utilizando medio GMP para obtener una DO = 0,5 (equivalente a 10^8 UFCs).
3. Se realizaron dos diluciones 1/10 más con medio GMP para obtener el inoculo inicial de trabajo con 10^6 UFCs.
4. Se sembraron 100 μL de inoculo en cada pocillo de una placa de 96 pocillos.

5. La primera columna se completó con 100 μL adicionales de medio GMP como control positivo de crecimiento bacteriano (volumen final de ensayo 200 μL).
6. En los demás pocillos (columna 2 a 12) se adicionaron las dispersiones de NPaAg en concentraciones crecientes de 0,1 a 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y, de ser necesario, se completó el volumen final de 200 μL con medio GMP.
7. Se incubó la placa de 96 pocillos en estufa de cultivo a 37°C por 24 horas.
8. Trascurridas las 24 horas necesarios para que las NPa ejercieran su actividad antimicrobiana, se procedió a determinar la CMI y CMB.

El ensayo se realizó por triplicado para cada NPaAg y cepa bacteriana con el propósito de verificar la reproducibilidad de los resultados.

3.3.5 Ensayos antibiofilms sobre materiales de Ti

Se evaluó el efecto antibiofilm de las diferentes NPe o NPaAg formadas por metodologías NEC sobre la superficie de Ti, utilizando *S. aureus* como bacteria modelo.

Como se mencionó en el Capítulo 1, para prevenir la formación de biofilm sobre superficies es fundamental intervenir en las primeras etapas de formación (ver Figura 1.2). Con el fin de inhibir la adhesión y proliferación bacteriana, se determinó la actividad antimicrobiana de las diferentes superficies modificadas de Ti en dos situaciones diferentes: A (colonización inicial) y B (formación de *biofilms* tempranos: definida aquí como una biopelícula en proceso de crecimiento) de acuerdo a [31], [42], [47], [49] :

- A. Colonización inicial de la superficie de Ti: se determinó la adhesión de *S. aureus* luego de **3 horas** de exposición de las diferentes superficies de Ti modificado a través del siguiente protocolo general:
 1. Se realizó un cultivo *overnight* de *S. aureus* en caldo nutritivo en *shaker* con una agitación de 170 rpm a 37°C.
 2. Se determinó la DO a 600 nm del cultivo *overnight* y se realizaron diluciones necesarias para obtener una DO = 0,5 (equivalente a 10^8 UFCs que se utilizó como inóculo inicial del ensayo).
 3. Se colocó cada muestra de Ti en un pocillo dentro de una placa de 6 *wells* y se adicionaron 5 mL de inóculo de *S. aureus* en el caldo nutritivo (DO = 0,5, $\sim 10^8$ UFCs).
 4. Se incubaron las muestras por 2 o 3 horas en estufa de cultivo a 37°C.

5. Se realizó recuento en placa de UFCs y tinción Live/Dead para cuantificar bacterias vivas o muertas adheridas sobre las diferentes superficies de los sustratos.
- B. Formación de *biofilms* tempranos sobre Ti: se determinó la formación de *biofilms* tempranos de *S. aureus* luego de **24 horas** de exposición de las diferentes superficies de Ti a través del siguiente protocolo general:
1. Se realizó un cultivo *overnight* de *S. aureus* en caldo nutritivo en *shaker* con una agitación de 170 rpm a 37°C.
 2. Se determinó la DO a 600 nm del cultivo *overnight* y se realizaron diluciones necesarias para obtener una DO = 0,5 (equivalente a 10^8 UFCs que se utilizó como inóculo inicial del ensayo).
 3. Se colocó cada muestra de Ti en un pocillo dentro de una placa de 6 *wells* y se adicionaron 5 mL de inóculo de *S. aureus* en caldo nutritivo (DO = 0,5, $\sim 10^8$ UFCs).
 4. Se incubaron las muestras por 24 horas en estufa de cultivo a 37°C.
 5. Se realizó el recuento en placa de UFCs y tinción Live/Dead para cuantificar bacterias vivas o muertas adheridas sobre las diferentes superficies de Ti y tinción Sypro Ruby para cuantificar la producción de EPS.

En el caso particular de aquellas muestras de Ti que contenían NP_{Ag} adheridas en su superficie se utilizó medio GMP. En estos casos se realizó el siguiente protocolo [51]:

1. Se realizó un cultivo *overnight* de *S. aureus* en caldo nutritivo en *shaker* con una agitación de 170 rpm a 37°C.
2. Se determinó la DO a 600 nm del cultivo *overnight* y se realizaron diluciones necesarias para obtener una DO = 0,5 (equivalente a 10^8 UFCs). Esta suspensión bacteriana en caldo nutritivo se utilizó como inóculo inicial del ensayo.
3. Se colocó cada muestra de Ti en un pocillo dentro de una placa de 24 *wells* y se adicionaron 3 mL de inóculo de *S. aureus* (DO = 0,5, $\sim 10^8$ UFCs).
4. Se incubaron las muestras por 3 horas en estufa de cultivo a 37°C para favorecer la adhesión bacteriana sobre las muestras.
5. Luego de 3 horas de exposición a *S. aureus* en caldo nutritivo, se removió el medio de cultivo con el inóculo y se adicionó medio GMP fresco (sin

bacterias) y se incubaron las muestras por 24 horas más para evaluar el efecto antimicrobiano de las NP_aAg sobre la formación de *biofilms* tempranos en las diferentes superficies de Ti modificadas.

6. Finalmente se procedió a analizar el efecto antimicrobiano mediante: recuento en placa de UFCs, tinción Live/Dead para cuantificar bacterias vivas o muertas adheridas sobre las diferentes superficies de Ti y tinción Sypro Ruby para cuantificar la producción de EPS.

A continuación, se procede a detallar las técnicas de tinción Live/Dead y Sypro Ruby con las cuales se determinó la actividad antimicrobiana de las muestras de Ti estudiadas en la presente Tesis.

3.3.5.1 Determinación de bacterias vivas o muertas mediante el kit Live/Dead

Para determinar el estado fisiológico (vivo o muerto) de las bacterias sésiles adheridas sobre las diferentes muestras de Ti se realizó la tinción de Live/Dead a través del kit FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability. Dicho kit está compuesto por una mezcla de un colorante verde fluorescente denominado SYTO9® y un colorante rojo fluorescente (yoduro de propidio). Las longitudes de onda de excitación/emisión corresponden a 480/500 nm para el SYTO9® (color verde) y 490/635 nm para el yoduro de propidio (color rojo). El SYTO9® es capaz de penetrar en todas las células, tanto si tienen o no la membrana dañada, mientras que el yoduro de propidio solamente penetra en las bacterias que poseen la membrana dañada. De esta manera, las células con la membrana intacta (vivas) emiten fluorescencia de color verde y aquellas que tienen la membrana dañada (muertas) emiten fluorescencia de color rojo.

La tinción se realizó acorde al protocolo provisto por el kit, mezclando 1 µL de cada reactivo en 1 mL de agua destilada estéril. Luego se cubrió la superficie de Ti de cada muestra con 30 µL de la mezcla de reactivos y se incubó a temperatura ambiente, protegidos de la luz por 15 minutos. Posteriormente, se procedió a la observación en el microscopio de epifluorescencia (Olympus BX51, Olympus Corp., Tokyo, Japón) conectado a una cámara de Olympus DP73 (Olympus Corp., Tokyo, Japón). Se tomaron entre 15-20 fotos por muestra y se analizaron en el software ImageJ para calcular el porcentaje de bacterias vivas y muertas adheridas en cada superficie. Los resultados se expresaron en función de las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ bacterias vivas} = \frac{a}{a + b} \times 100 \text{ [Ecuación 3.8]}$$

donde a es el área cubierta por bacterias vivas en la superficie de cada muestra y b es el área cubierta por bacterias muertas, siendo $a + b$ el área cubierta total.

$$\% \text{ bacterias muertas} = \frac{b}{a + b} \times 100 \text{ [Ecuación 3.9]}$$

donde a es el área cubierta por bacterias vivas en la superficie de cada muestra y b es el área cubierta por bacterias muertas, siendo $a + b$ el área cubierta total.

3.3.5.2 Determinación semicuantitativa de formación de matriz polimérica por tinción Sypro Ruby

Como se mencionó en la Introducción, las bacterias sintetizan EPS para poder adherirse y desarrollar *biofilms* sobre diferentes superficies. Dicha matriz está compuesta por sustancias como proteínas y ácidos nucleicos, principalmente. Dado a que la EPS desempeña un papel fundamental, no solo en la formación de *biofilms*, sino que también en la protección contra agentes antimicrobianos es necesario evaluar la acción que ejercen los productos nanotecnológicos sobre la capacidad de las bacterias de producir EPS sobre diferentes superficies.

En la presente Tesis, se evaluó el efecto de las NPe y/o NPa adheridas sobre Ti en la capacidad de las bacterias sésiles adheridas sobre dichas superficies de producir EPS a través del uso del kit FilmTracer SYPRO® Ruby Biofilm Matrix Stain de Invitrogen, que tiñe las proteínas de la matriz. Dado que las longitudes de onda excitación/emisión son, aproximadamente, 450/610 nm, las proteínas del EPS quedan teñidas de color rojo. El protocolo de tinción es muy sencillo:

1. Se lavó la muestra de Ti con el biofilm temprano formado luego de 24 h de exposición e incubación con *S. aureus*, primero con PBS y luego con agua.
2. Se cubrió la superficie con 50 μ l de reactivo Sypro Ruby y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente protegiendo de la luz.
3. Se enjuagaron las muestras con agua estéril para retirar el exceso del colorante.
4. Las muestras teñidas se observaron inmediatamente al microscopio de epifluorescencia. Se tomaron 15 fotos por muestra y se calculó el área cubierta por EPS utilizando el software ImageJ. Los resultados fueron expresados en función a las muestras de Ti control:

$$\% EPS = \frac{a}{b} \times 100 \text{ [Ecuación 3.10]}$$

donde a es el porcentaje de área cubierta por EPS en la superficie de muestras modificadas de Ti y b es el porcentaje de área cubierta por EPS en el Ti control (sin modificación superficial).

3.3.6 Halo de inhibición

El método de difusión en agar o halo de inhibición es una técnica ampliamente utilizada en el diagnóstico y en la industria, ya que permite analizar la sensibilidad de los microorganismos a diferentes antibióticos o agentes antimicrobianos. En este procedimiento, una concentración conocida de UFCs/mL es sembrada sobre una placa de Petri con agar solidificado y luego se colocan discos de papel embebidos con los agentes antimicrobianos a evaluar. Luego de 24 horas de incubación en estufa de cultivo, se procede a medir el diámetro del halo de inhibición alrededor del papel que contiene el agente antimicrobiano. Mientras mayor sea el diámetro del halo, mayor inhibición del crecimiento microbiano habrá y, por lo tanto, mayor será la susceptibilidad del microorganismo al agente utilizado. Una desventaja de esta técnica es que la determinación de la actividad antimicrobiana depende de la difusión del agente antimicrobiano en el medio.

En la presente Tesis, la técnica de halo de inhibición se utilizó con el propósito de evaluar si los componentes de las diferentes NPe formadas sobre la superficie de Ti difunden desde el sustrato a la superficie del medio (superficie del agar), inhibiendo el crecimiento de *S. aureus*. Se utilizó el siguiente protocolo [44]:

1. Se realizó un cultivo *overnight* de *S. aureus* en caldo nutritivo en *shaker* con una agitación de 170 rpm a 37°C.
2. Concluida la incubación *overnight* se determinó la DO a 600 nm del cultivo y se realizaron las diluciones necesarias para obtener una DO = 0,5 (equivalente a 10^8 UFCs).
3. Se sembró 100 μ L (DO = 0,5, $\sim 10^8$ UFCs) sobre una placa de Petri con agar solidificado y se esparció con ansa estéril hasta lograr su completa absorción sobre el agar.
4. En el centro de cada placa de Petri ya inoculada se colocaron discos de Ti recubiertos con las diferentes NPe.

5. Se incubaron en estufa de cultivo por 24 horas a 37°C.
6. Se determinó el halo de inhibición midiendo el diámetro del halo alrededor de las muestras de Ti sin y con NPe.

Parte III:
Resultados

y

Discusión

Capítulo 4: Estudio comparativo de la formación de nanopelículas autoensambladas de timol y carvacrol sobre materiales de Ti.

4.1 Introducción

Como se mencionó anteriormente, los FF presentan diferentes propiedades estructurales y fisicoquímicas que les permiten interactuar químicamente con la superficie de un sustrato metálico pudiéndose adsorber y autoensamblar espontáneamente o polimerizar a través de procesos electroquímicos sobre ciertas superficies metálicas formando NPe [38]. Por otra parte, muchos de ellos son bien conocidos por sus propiedades antimicrobianas y por esos motivos han sido propuestos como agentes antimicrobianos y antibiofilm [65,140]. En este Capítulo se seleccionaron dos FF puros: el TOH y el Carv con el objeto de estudiar la posibilidad de formación de NPe autoensambladas sobre sustratos de Ti. Trabajos previos de nuestro grupo de investigación han mostrado que estos FF son capaces de formar NPe sobre materiales metálicos biodegradables de Cu y Mg por técnicas electroquímicas [121]-[125]. También se han reportado la adsorción de TOH y Carv sobre acero inoxidable [145] y biomateriales no metálicos, como *films* de ácido poliláctico (PLA) o hidrogeles de quitosano [145,146].

El TOH y Carv son monoterpenos isoméricos cuya única diferencia estructural es la posición del grupo -OH con respecto al anillo fenólico, estando en posición meta para el TOH y orto para el Carv (Figura 4.1). Ambos FF han sido declarados sustancias seguras por la FDA (*Food and Drug Administration*) en 2016 (clasificadas como *Generally Recognized as Safe, GRAS*) y también fueron registradas en la Comisión Europea para ser utilizados como aromatizantes en alimentos debido a que no presentan riesgos para su consumo [148]. Tanto el TOH como el Carv tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anestésicas a nivel local, cicatrizantes, antisépticas, antibacterianas y antifúngicas. Actualmente, el TOH y Carv son utilizados comercialmente como agentes antimicrobianos y antioxidantes en productos cosméticos, enjuagues bucales y en la conservación de alimentos [63].

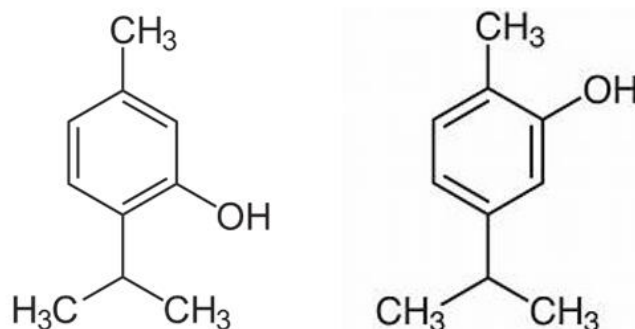


Figura 4.1. Estructura molecular de los isómeros conformacionales: timol (izquierda) y carvacrol (derecha).

El TOH (2-isopropil-5-metilfenol) es el principal monoterpreno presente en aceites esenciales de diferentes plantas pertenecientes a la familia de las lamiáceas, como las del género *Thymus*, *Ocimum*, *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra*, y *Monarda*. A temperatura ambiente es un sólido cristalino con baja solubilidad en agua. Por otra parte, el Carv (5-isopropil-2-metil fenol) se encuentra principalmente en las hojas de diversas plantas incluyendo bergamota, tomillo y mostaza silvestre, siendo más abundante en el orégano. Es líquido a temperatura ambiente, denso, de consistencia aceitosa y prácticamente insoluble en agua, pero soluble en etanol y éter.

En el presente Capítulo se reporta primeramente el análisis comparativo de los procesos de formación de NPe de TOH y Carv sobre sustratos de Ti. Dichas NPe se caracterizaron fisicoquímicamente por diversas técnicas (electroquímicas, espectroscopias UV-visible y ATR-FTIR, AFM, determinación del ángulo de contacto). Posteriormente se evaluó si las NPe obtenidas por NEC otorgan propiedades antimicrobianas a la superficie de Ti contra *S. aureus*. Finalmente, se analizó en forma comparativa la citocompatibilidad de las NPe obtenidas en cultivos celulares eucariotas.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Preparación de las muestras de Ti

Se utilizaron muestras de Ti grado II provistas por NMM Machinery Manufacturing Co. Ltd., (Guangdong, China) las cuales fueron cortadas en discos de 10 mm de diámetro y 1 mm de espesor. Los discos de Ti fueron pulidos mecánicamente utilizando papel abrasivo de P320, P400 y P600. Posteriormente las muestras fueron pulidas químicamente sumergiendo los discos en una solución de HF(48%wt):HNO₃(70%wt):H₂O (relación 1:3:10) durante 30 segundos. Finalmente,

fueron lavadas abundantemente con agua Milli-Q y posteriormente sonicadas durante 2 min para eliminar de la superficie de Ti todos los residuos remanentes del pulido y tratamiento químico posterior.

4.2.2 Adsorción de timol y carvacrol sobre la superficie de Ti: método *dip-coating*

Las NPe de TOH y Carv se desarrollaron sobre la superficie de Ti por adsorción espontánea a través del método *dip-coating*. Este procedimiento consiste en sumergir la muestra en una solución con las moléculas de interés que se quieran adsorber y autoensamblar sobre la superficie de ésta [149,150].

Una vez pulidos, los discos de Ti fueron sumergidos durante 2 h en forma vertical en una solución hidroalcohólica de etanol absoluto/0,5M H₂SO₄ (relación 30:70) conteniendo 0,1M de TOH o Carv (volumen final de 15 mL, solución saturada). El agregado de etanol absoluto se realiza con el fin de aumentar la solubilidad en medio acuoso de los FF seleccionados. Después de las 2 h, los discos fueron sucesivamente enjuagados en PBS y agua Milli-Q durante 1 min en cada solución con el fin de eliminar aquellas moléculas de TOH o Carv que estuvieran débilmente adheridas sobre la superficie de Ti. Una vez finalizado el proceso, se obtuvieron las muestras de Ti con las NPe de TOH o adheridas en su superficie (muestras denominadas de ahora en adelante como Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv, respectivamente).

Muestras de Ti pulidas y sin NPe fueron utilizadas como controles en todos los ensayos (desde ahora, denominadas Ti control).

4.2.3 Caracterización fisicoquímica de las nanopelículas obtenidas

Las muestras de Ti control, Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv fueron caracterizadas fisicoquímicamente utilizando espectroscopia ATR-FTIR, microscopia AFM y un goniómetro para determinar la hidrofiliicidad de la superficie, según se detalla en el Capítulo 2.

Para evaluar el proceso de formación de las NPe sobre la superficie de Ti se registró el OCP durante todo el tiempo de formación (2 h) en el medio de síntesis de estas (solución hidroalcohólica de etanol absoluto/0,5M H₂SO₄ (relación 30:70) conteniendo 0,1M de TOH o Carv).

Se analizó el comportamiento electroquímico de las NPe obtenidas por NEC. Se obtuvieron curvas de Tafel de las diferentes muestras realizando la curva de polarización desde -1 V a 1 V con una velocidad de barrido de 1 mV/s y en presencia de KCl 5mM como electrolito. A partir de los resultados, se calcularon los valores de E_{corr} e i_{corr} . Los voltamperogramas se obtuvieron realizando barridos cíclicos de las diferentes muestras de Ti desde -1 V a 2 V con una velocidad de barrido de 50 mV/s y utilizando KCl 5mM como electrolito. Ocasionalmente se realizó solo el barrido anódico en la misma región de potencial y a la misma velocidad.

Además, se determinó por espectroscopia UV-visible la liberación en el tiempo de moléculas de TOH o Carv desde la superficie de las muestras Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv, respectivamente. Para dicho fin, se colocaron las muestras en placas multiwells de 24 pocillos y se cubrieron con 1 mL de PBS. Se incubaron por 14 días en estufa de cultivo a 37°C y la concentración de TOH o Carv liberado se determinó a 2, 4, 12, 24, 48, 120, 168, 240 y 336 h midiendo la absorbancia a $\lambda = 274$ nm para el TOH y $\lambda = 273$ nm para el Carv (Figura 4.2). Previamente, se realizaron curvas de calibración con concentraciones conocidas de TOH y Carv puros en el rango de 2,5–100 $\mu\text{g/mL}$. Dichas curvas mostraron dependencia lineal dentro de dicho rango con valores de $R^2 = 0,9959$ y 0,9927 para TOH y Carv, respectivamente (Figura 4.3).

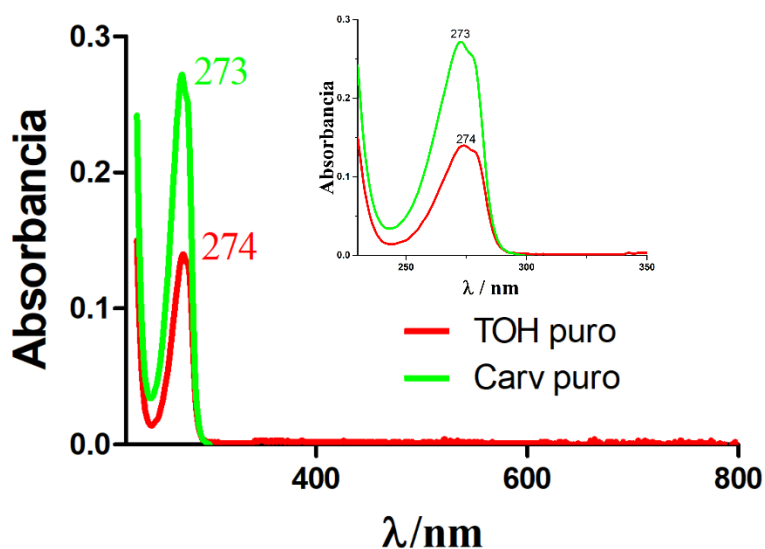


Figura 4.2. Espectros UV-Visibles para el timol y carvacrol puros (220-800 nm). [TOH = 2,5 $\mu\text{g/mL}$]; [Carv = 10 $\mu\text{g/mL}$]. En la parte superior se muestra una ampliación de los espectros (220-350 nm).

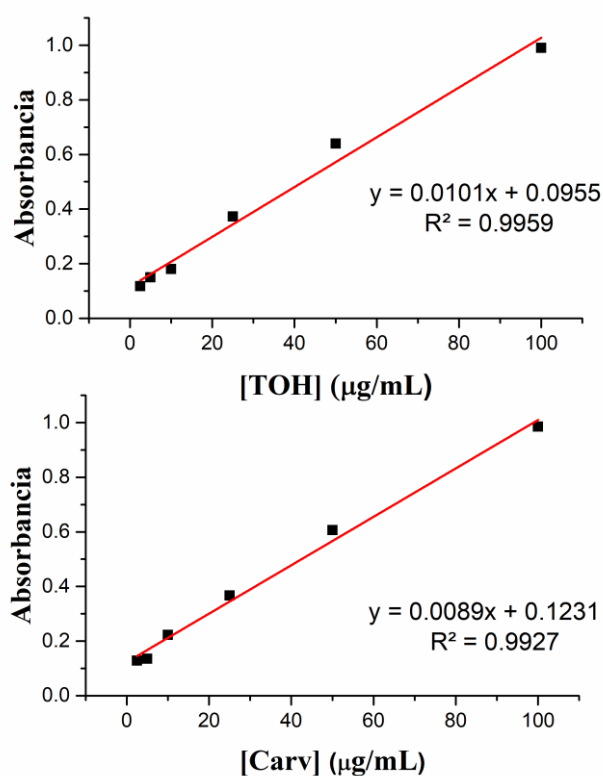


Figura 4.3. Curvas de calibración obtenidas para timol (arriba) y carvacrol (abajo).

4.2.4 Ensayos antimicrobianos

La evaluación de la acción antimicrobiana contra *S. aureus* de las NPe autoensambladas de TOH y Carv formadas sobre la superficie de Ti se realizó mediante distintos métodos: 1) se determinó el halo de inhibición en placa de Petri, 2) se evaluó la colonización y adhesión inicial de las bacterias enumerando las UFCs/cm² formadas luego de 3 h de inmersión en el cultivo, 3) se evaluó el efecto antibiofilm luego de 24 h de inmersión en el cultivo (biofilm temprano), 4) se analizó y cuantificó el estado fisiológico de las bacterias adheridas sobre las diferentes superficies por la tinción con Live/Dead, y 5) se cuantificó la producción de EPS por la tinción con Sypro Ruby, como se detalla en la Sección 3.3 del Capítulo 3.

Para determinar el efecto antimicrobiano remanente de las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv luego de determinados períodos de liberación de FF, se realizaron los siguientes pretratamientos: se colocaron las muestras en placas *multi-wells* de 24 pocillos durante 24 o 48 h y se cubrieron con 1 mL de medio de cultivo estéril para permitir la liberación de moléculas de TOH y Carv desde la superficie de Ti-NPeTOH y

Ti-NPeCarv hacia el medio durante dichos lapsos. Transcurridos los periodos de tiempos mencionados (24 y 48 h), se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco inoculado con bacterias ($\sim 10^8$ UFC/mL) y se mantuvo el cultivo en estufa a 37°C por 24 h para permitir la formación del biofilm temprano sobre las diferentes superficies (que de ahora en más se llamarán Ti-NPeTOH-24hL, Ti-NPeCarv-24hL, Ti-NPeTOH-48hL y Ti-NPeCarv-48HL), acorde al protocolo descrito en el Capítulo 3.3. El efecto antimicrobiano remanente se determinó por recuento en placa de UFCs, por tinción con Live/Dead y tinción con Sypro Ruby para analizar la formación de EPS.

4.2.5 Ensayos de citocompatibilidad celular

Para determinar la citocompatibilidad de las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv, se determinó el área cubierta por células fibroblásticas (L929) y pre-osteoblásticas (MC3T3-E1) por tinción con naranja de acridina luego de 1, 2, 5 y 7 días de incubación. Se determinó la toxicidad de NPe mediante los ensayos de MTT y RN acorde a normas ISO 10993-5 y a los protocolos descritos en el Capítulo 3.1.2. En primer lugar, las muestras Ti control, Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv se sumergieron en 1 mL de medio de cultivo DMEM e incubados en estufa por 24 h para recolectar los productos de liberación desde las NPe al medio y obtener así, extractos de liberación de cada muestra. Luego, los extractos con los productos de liberación fueron puestos en contacto con células fibroblásticas y pre-osteoblásticas por 24 h para determinar la citotoxicidad por MTT y RN, acorde a los protocolos 3.1.2.1 y 3.1.2.2 (Capítulo 3). Finalmente, se determinó la actividad osteogénica de las superficies en estudio a través de la cuantificación de producción de FAI, colágeno tipo I y mineralización por depósitos de calcio, como se detalla en el Capítulo 3.2.

4.2.6 Análisis estadísticos

Todos los ensayos presentados en este Capítulo fueron realizados al menos por triplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA (test de Bonferroni) previamente confirmada la normalidad de los datos con un nivel de confianza del 95%.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Ensayos electroquímicos

Se realizaron diferentes ensayos electroquímicos con el propósito de evaluar la interacción entre el TOH y Carv con la superficie de materiales de Ti tanto durante su formación (medición del OCP) como también luego de su adsorción y formación (respuesta obtenida durante la aplicación de voltamperometría cíclica y curvas de Tafel).

4.3.1.1 Medición del OCP durante la formación de las nanopelículas

El proceso de adsorción del TOH y Carv sobre Ti se evaluó a través la medición del OCP durante el periodo de formación de las NPe. El registro del OCP para las muestras de Ti control se realizó en solución hidroalcohólica (etanol/H₂SO₄) pero sin el agregado de TOH o Carv. Como puede verse en la Figura 4.4, en las muestras Ti control se observa el aumento del potencial con el tiempo (ver Figura 2.5, Capítulo 2), conforme la superficie se va pasivando por el crecimiento del óxido de Ti. En cambio, en presencia de TOH y Carv el registro del OCP cambia notablemente para ambos compuestos, mostrando un valor de potencial mucho más positivo a tiempo cero (~100 mV y 125 mV más alto para el TOH y Carv respectivamente, respecto al valor del Ti control). Esto indica que las moléculas de TOH y Carv presentes en el electrolito interactúan de forma inmediata y significativa con la superficie de Ti. A los pocos segundos se observa, una caída abrupta del potencial para las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv para luego mantenerse constante durante 5000 segundos (83 minutos aprox.) a potenciales aproximados de -100 mV y -75 mV, respectivamente, conforme se va produciendo la adsorción de TOH y Carv sobre la superficie de Ti para formar las NPe. Similares comportamientos se han reportado para el ensayo de la adsorción de glucosa en electrodos de oro [151] y para la formación de diferentes tipos de *coatings* sobre Ti [152,153]. El valor del potencial está condicionado por la estabilidad de la película superficial y su mayor o menor grado de interacción con los iones del medio.

Finalmente, a partir de los 5000 segundos de medición se observa que el OCP para las muestras Ti-NPeCarv aumenta haciéndose la señal paralela a la curva del Ti control, finalizando en potenciales más positivos que ésta. En cambio, las muestras Ti-NPe-TOH experimentan una caída del potencial hacia valores más negativos que el Ti control, presentando una serie de inestabilidades posiblemente atribuidas a cambios estructurales

de la NPe que pueden llevar a desprendimientos parciales de la misma dejando al descubierto zonas más desnudas y menos protegidas.

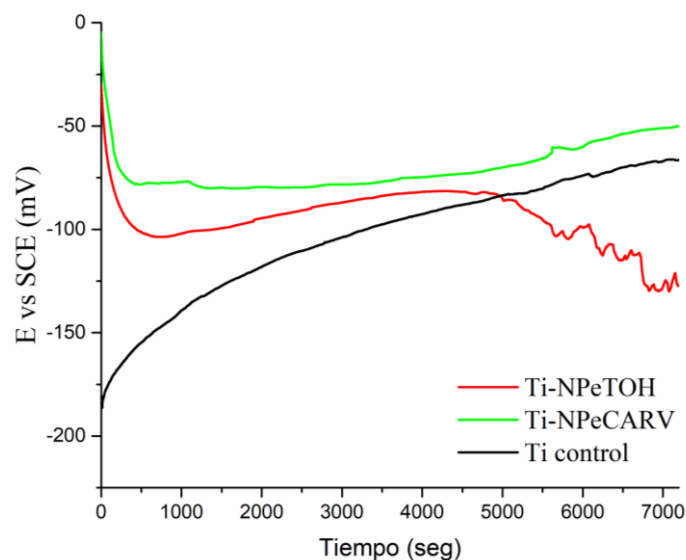


Figura 4.4. Determinación del potencial a circuito abierto durante la formación de las nanopelículas de timol y carvacrol. Electrolito solución hidroalcohólica 0,1 M de cada fitocompuesto disuelto en etanol/ácido sulfúrico. Para el Ti control no se adiciona fitocompuestos a la solución.

4.3.1.2 Respuesta electroquímica de las nanopelículas adsorbidas sobre Ti

Una vez desarrolladas las NPe de TOH y Carv se evaluó el efecto de su presencia en la superficie de Ti midiendo el OCP en KCl 5 mM durante 1 minuto de estabilización. Los resultados mostraron valores de OCP más positivos en las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv, -247 ± 13.6 mV y -173.5 ± 4.3 mV respectivamente, en comparación con el Ti control cuyo valor de OCP determinado fue de: -378.5 ± 7.4 mV. Los valores obtenidos de OCP, luego de un periodo de estabilización, pueden relacionarse con la mayor estabilidad electroquímica de las superficies cubiertas por las NPe [153,154].

La presencia de las NPe también fue detectada y estudiada por voltamperometría cíclica. Como se puede observar en la Figura 4.5, para el Ti control durante el primer ciclo (voltamperograma superior) se registra un aumento pronunciado de la densidad de corriente (j) a partir de potenciales mayores que 0,5 V debido a la formación o crecimiento del óxido de Ti sobre la superficie del Ti. Otros trabajos han demostrado que esto se debe a que durante el barrido anódico (oxidativo) diferentes tipos de óxidos (TiO , Ti_2O_3 , Ti_3O_5 ,

Ti₄O₇ y principalmente, TiO₂) pueden formarse sobre la superficie de Ti [155,156]. En el caso de las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv durante el primer ciclo se puede observar también que la corriente anódica aumenta a partir de valores de potencial mayores que 0,5 V, finalizando el barrido anódico con valores de densidad de corrientes más altos que para el Ti control, debido a la electro-oxidación de las moléculas de TOH y Carv que conforman las NPe. Durante el barrido en sentido catódico del primer ciclo, puede observarse que las corrientes catódicas son menores a las anódicas para las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv. Esto sugiere que los procesos redox de formación de óxidos y de oxidación de compuestos orgánicos ocurridos son irreversibles [143]. Además, en todos los casos durante el barrido catódico solo se revelan valores de densidad de corriente negativas cerca del límite catódico (a partir de potenciales de -0,4 V), atribuidos a la reacción de la reducción del hidrogeno, siendo mayor esta reacción en muestras de Ti control.

Durante el segundo y último ciclo de la voltamperometría cíclica (voltamperograma inferior, Figura 4.5) puede observarse que la superficie no admite más óxido adicional, ya que la densidad de corriente se mantiene en valores cercanos a cero durante todo el ciclo. Esto se debe a que el óxido de Ti formado durante el primer ciclo pasiva la superficie de Ti, impidiendo que se forme óxido adicional [96,156]. En el caso de las muestras Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv puede observarse que durante el segundo ciclo la densidad de corriente se mantiene baja, cercana a cero, excepto en las proximidades del límite anódico, debido a que los productos formados durante la oxidación de NPe durante el primer ciclo bloquean la superficie. Sin embargo, se registraron valores de corriente anódica de oxidación superiores al Ti control (siendo notablemente mayores en Ti-NPeCarv) en el rango de potencial de 1,2 a 2V, indicando la oxidación de componentes de las NPe que no fueron oxidados durante el primer ciclo. Finalmente, durante el barrido en sentido catódico del segundo ciclo también se observaron valores de corriente cercanos a cero en todas las muestras, excepto a partir de valores de -0,4 V, donde se registra la reacción de reducción de hidrógeno. Esta reacción es evidentemente mayor en muestras de Ti control, lo cual sugiere que las Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv reducen la reacción catódica probablemente debido a la disminución de sitios activos causado por bloqueo producido por los compuestos orgánicos.

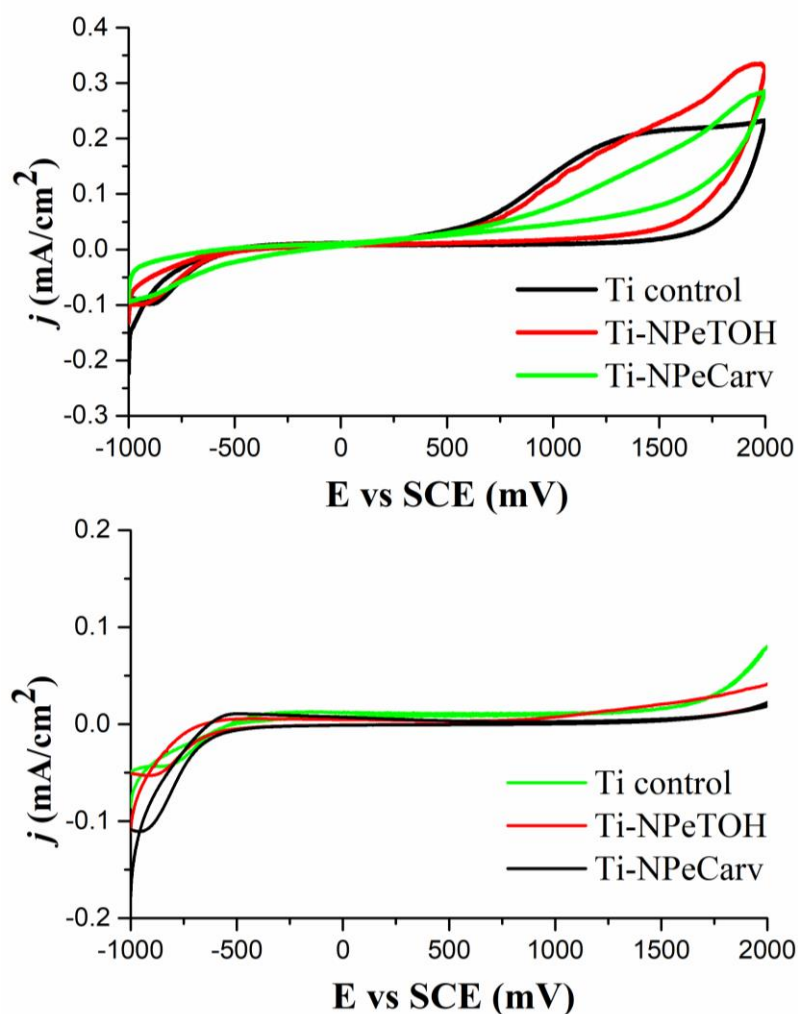


Figura 4.5. Voltamperogramas obtenidos para Ti control, Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv en KCl 5 mM. Arriba primer ciclo, abajo segundo ciclo.

Por medio de las curvas de Tafel (Figura 4.6) se pudo comprobar que los registros de las muestras Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv muestran valores de corriente anódica marcadamente más bajos que el Ti control y con valores más positivos de E_{corr} que evidencian las modificaciones superficiales debidas a la presencia de las NPe sobre la superficie de Ti. También, se determinaron los valores de i_{corr} los cuales muestran valores más altos para las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv de mayor actividad superficial que el control (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Valores de E_{corr} y i_{corr} obtenidos por curvas de polarización o Tafel (Figura 4.6).

Muestras	E_{corr} (mV)	i_{corr} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
<i>Ti control</i>	-598 ± 4	38 ± 5
<i>Ti-NPeTOH</i>	-516 ± 3	210 ± 2
<i>Ti-NPeCarv</i>	-568 ± 5	150 ± 2

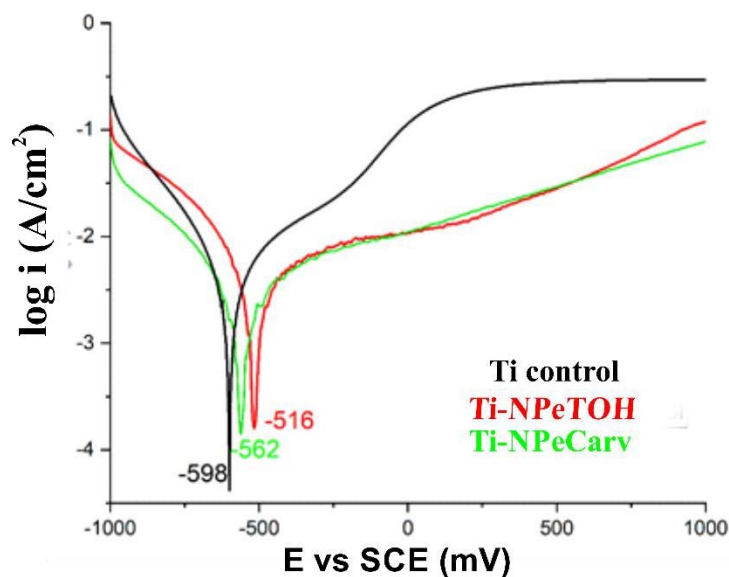


Figura 4.6. Curvas de Tafel obtenidas para Ti control, Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv en KCl 5 mM. Se muestran los valores de E_{corr} .

Los resultados aquí presentados demuestran que los procedimientos electroquímicos empleados son útiles, rápidos, de bajo costo y sencillos y permiten detectar la presencia de las NPe de TOH y Carv sobre materiales de Ti e identificar su mayor o menor interacción con el medio. A modo de resumen, los resultados electroquímicos por medición del OCP sugieren que las moléculas de Carv y TOH interactúan fuertemente desde tiempo cero con la superficie de Ti, modificando el registro del OCP en comparación al de Ti control. Una vez formada la NPe, el potencial se mantiene constante y estable durante gran parte del tiempo, lo que sugiere que las NPe cubren la superficie y reducen su interacción con el medio. Finalmente, por voltamperometría cíclica se pudo demostrar que las NP modifican la actividad superficial y que los componentes de las mismas se electro-oxidan. Dichas modificaciones también se detectaron en las curvas de Tafel donde se midieron mayores valores de i_{corr} y potenciales E_{corr} más anódicos.

4.3.2 Caracterización AFM de las nanopelículas de timol y carvacrol

Las NPe de TOH y Carv fueron detectadas, observadas a diferentes escalas y caracterizadas por AFM. Se detectaron cambios topográficos y en los correspondientes parámetros de rugosidad. En la Figura 4.7 se muestran las imágenes 2D y 3D ($20 \times 20 \mu\text{m}^2$) de las muestras Ti control (A), Ti-NPeTOH (B) y Ti-NPeCarv (C). Las muestras de Ti control presentan una topografía microestructurada muy rugosa con un perfil altamente

nanoestructurado de forma aleatoria (Figura 4.7-D). En esta escala puede observarse que las Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv una vez formadas, no producen cambios topográficos considerables sobre la superficie de Ti, de hecho, la presencia de las NPe no es distinguible al comparar las tres imágenes topográficas. En concordancia, las NPe adsorbidas sobre Ti no modifican significativamente los parámetros típicos de rugosidad (R_a , R_q y R_{max} definidos en el Capítulo 2.8.1) en comparación con las muestras control, tal como se puede observar en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Valores de rugosidad determinados para las muestras de Ti control, Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv en imágenes AFM (20x20 μm^2).

<i>Parámetro</i>	<i>Ti control</i>	<i>Ti-NPeTOH</i>	<i>Ti-NPeCARV</i>
R_a (nm)	160±20	150±30	170±40
R_q (nm)	200±20	185±40	195±40
R_{max} (nm)	1240±40	1050±80*	937±90*
R_{isad} (%)	6,2±1,2	3,7±0,8*	2,3±0,7*
S_{ku}	3,1 ±0,3	2,8±0,5	2,6±0,6
S_{sk}	0,3±0,1	-0,16±0,05*	-0,12±0,03*

*Indica diferencias significativas con Ti control ($p < 0,01$)

A pesar de que los parámetros R_a , R_q y R_{max} son los más utilizados para caracterizar las superficies, en algunos casos tales como los que estamos analizando, no son lo suficientemente sensibles a los cambios topográficos producidos por la presencia de las NPe. Los parámetros R_{isad} , S_{ku} o S_{sk} pueden ser útiles para identificar la presencia de las mismas sobre una superficie altamente rugosa. Como puede observarse en la Tabla 4.2, los valores de R_{isad} disminuyen en las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv, indicando la presencia de las NPe sobre la superficie de Ti. Además, los valores de asimetría S_{sk} cambian de valores positivos en las muestras de Ti control a valores negativos en las muestras Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv. Como se indicó anteriormente, valores positivos de S_{sk} indican la predominancia de picos altos y agudos con valles redondeados, mientras que valores negativos de S_{sk} indican predominancia de valles finos o agudos con picos redondeados. Por otra parte, los valores de S_{ku} , que indican la agudeza de los picos, son mayores en el caso del control.

Es importante destacar que en las secciones transversales de las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv (perfil rojo y verde de la Figura 4.7-D respectivamente), puede

detectarse que la presencia de las NPe suaviza ligeramente la rugosidad de la superficie de Ti; siendo esto más evidente en las muestras de Ti-NPeCarv.

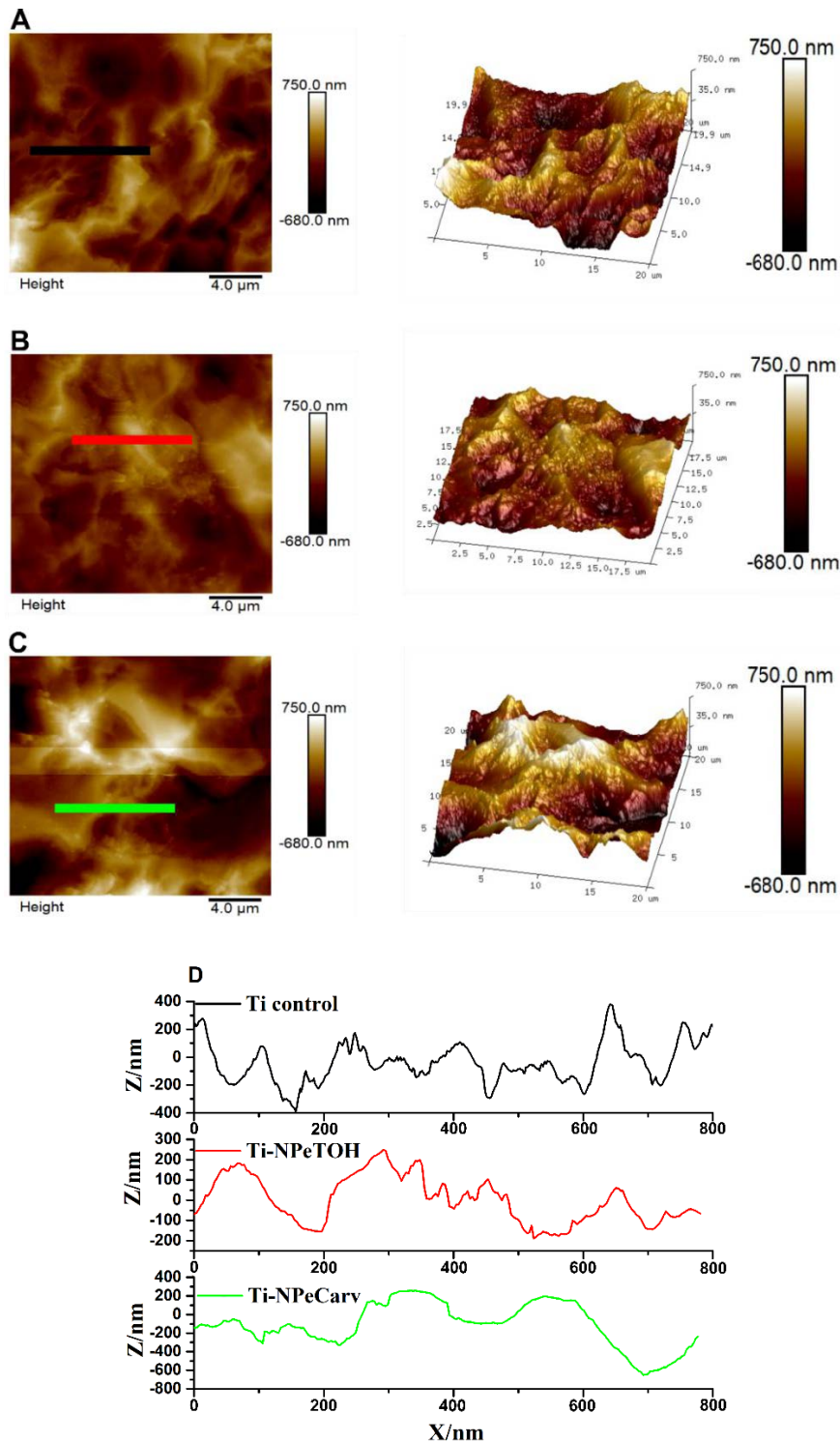


Figura 4.7. Imágenes AFM ($20 \times 20 \mu\text{m}^2$) de las nanopelículas de TOH y Carv. A) Imágenes 2D y 3D para Ti control; B) Imágenes 2D y 3D para Ti-NPe-TOH; C) Imágenes 2D y 3D para Ti-NPeCarv; D) Perfiles correspondientes a las barras indicadas en (A), (B) y (C). Cada perfil corresponde a la barra del mismo color.

Con el propósito de identificar y caracterizar con mayor precisión las NPe sobre la superficie de Ti, se tomaron imágenes AFM en un área de $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ (Figura 4.8). A esta escala de análisis, los cambios topográficos de las NPe de TOH y Carv son evidentes en relación con las muestras de Ti control y puede observarse que las NPe adsorbidas presentan una estructura compacta recubriendo el óxido de Ti superficial (flechas rojas). Además, en las superficies de las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv se identificaron zonas aparentemente descubiertas o con un cubrimiento delgado de tipo conformal (flechas verdes), indicando que el TOH y Carv se adsorben sobre la superficie formando estructuras compactas pero discontinuas sobre la superficie de Ti. En la Figura 4.8-D se muestra el análisis de los perfiles obtenidos para todas las muestras. Nuevamente, las muestras de Ti control presentaron una nanoestructuración aleatoria del óxido de Ti superficial (perfil en color negro). Los perfiles topográficos de las NPe se analizaron en dos regiones: 1) en el borde de la película, que marca el límite entre la región cubierta por las NPe y la descubierta o conformal, con el propósito de estimar el espesor aproximado de la NPe y 2) dentro del área cubierta por las NPe.

El perfil zona de la Ti-NPeTOH evaluada (Figura 4.8-D, perfil rojo) corresponde a la zona marcada en la Figura 4.8.B (inferior) con una barra roja. Dicho perfil demuestra que dicha NPe presenta un espesor variable de 30 a 80 nm. En cambio, la NPe de Carv analizada presenta un espesor menos variable y más homogéneo de 100 nm aproximadamente (Figura 4.8-D, perfil verde). En el área cubierta exclusivamente por NPe, la muestra de Ti-NPeTOH (Figura 4.8-D, perfil magenta) exhibió nuevamente un perfil variable que forma picos de 4 a 20 nm en la superficie de la NPe. Por el contrario, la muestra de Ti-NPeCarv presentó una variabilidad menor, con lomas entre 2 y 7 nm de altura (Figura 4.8-D, perfil azul). Estos resultados sugieren que las Ti-NPeCarv presentan una topografía más homogénea y suave en relación con las Ti-NPeTOH. Esto se hace evidencia en las imágenes 3D para cada muestra (Figura 4.8) donde se puede observar una estructura más lisa y suave en las muestras de Ti-NPeCarv.

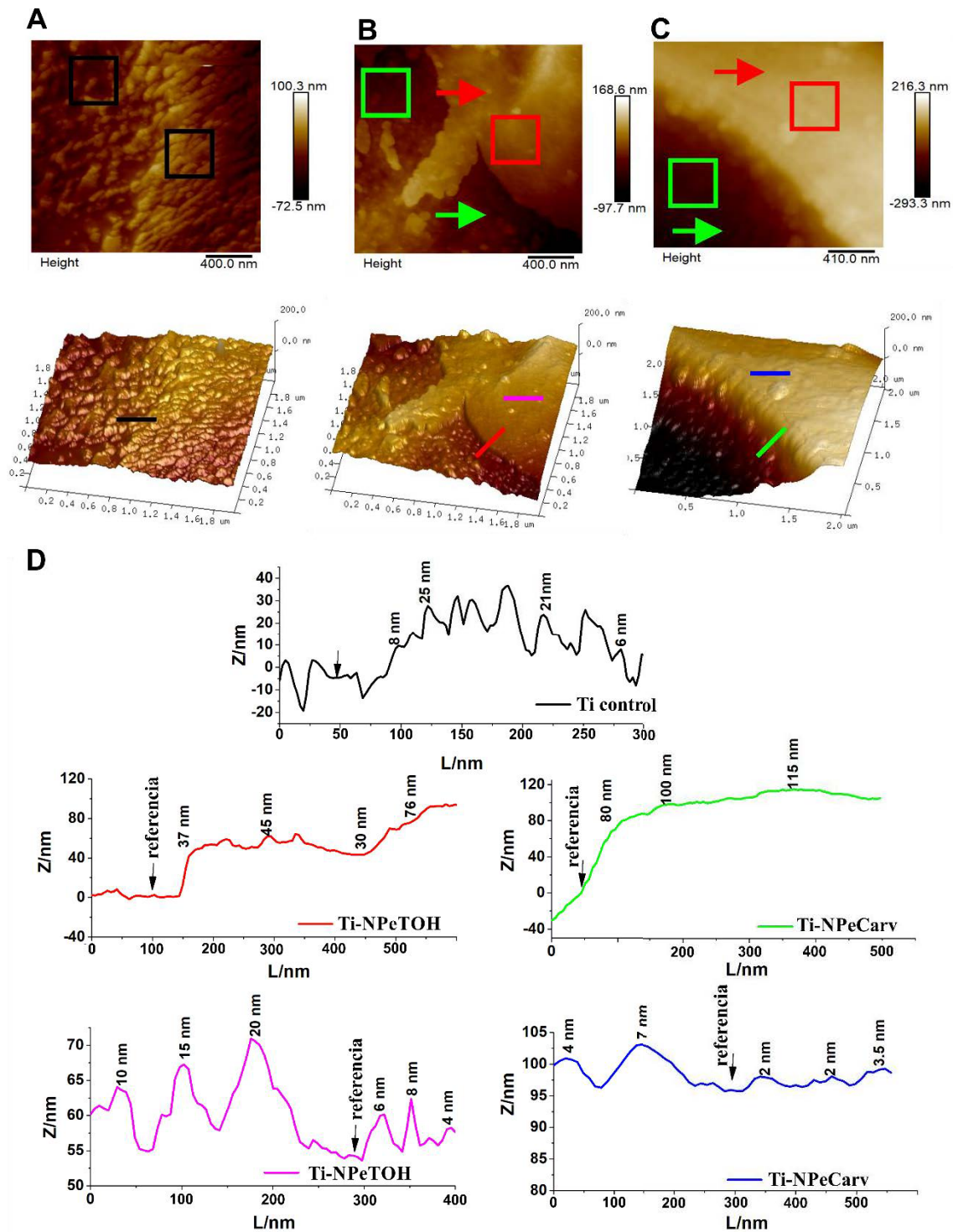


Figura 4.8. Imágenes AFM ($2 \times 2 \mu\text{m}^2$). A) Imágenes 2 y 3D para Ti control; B) Imágenes 2 y 3D para Ti-NPe-TOH; C) Imágenes 2 y 3D para Ti-NPeCarv. Flechas rojas indican la presencia de las NPe y las verdes las zonas descubiertas o conformales. Los cuadrados indican las diferentes zonas donde se registraron los parámetros de rugosidad indicados en la Tabla 4.3. D) Perfiles asociados a cada muestra correspondientes a las barras indicadas en las Figuras (A), (B), (C) inferiores, con su respectivo color.

Los parámetros de rugosidad para las imágenes AFM de $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ se resumen en la Tabla 4.3. Los parámetros R_a , R_q y R_{max} se calcularon en dos regiones: en las áreas cubiertas por las NPe (cuadrados rojos en la Figura 4.8) y en las regiones descubiertas o poco cubiertas (conformales) de NPe (cuadrados verdes en la Figura 4.8) dentro de cada imagen AFM de $2 \times 2 \mu\text{m}^2$. Para dicho propósito, se registraron los parámetros de rugosidad de forma aleatoria en cuadrados de $400 \times 400 \text{ nm}^2$ en dichas zonas. Los parámetros de R_{isad} , S_{ku} y S_{sk} se determinaron en la imagen completa ($2 \times 2 \mu\text{m}^2$).

Tabla 4.3. Valores de rugosidad determinados para las muestras de Ti control, Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv. R_a , R_q y R_{max} en imágenes AFM de $400 \times 400 \text{ nm}^2$, R_{isad} , S_{ku} y S_{sk} , en imágenes AFM de $2 \times 2 \mu\text{m}^2$.

Parámetros	Muestras				
	Ti control	Ti-NPeTOH		Ti-NPeCarv	
		Zona descubierta o conformal	Zona cubierta por NPe	Zona descubierta o conformal	Zona cubierta por NPe
R_q (nm)	19±2	17±4	6±2 *	16±4	5,8±1,6 *
R_a (nm)	15±5	15±3	4,4±1,6 *	13±2	5±1 *
R_{max} (nm)	87±5	85±7	60±8 *,#	76±8	48±7 *, #
R_{isad} (%)	16,1±1,3	8,7±1,3 *, #		4,8±0,7 *, #	
S_{ku}	2,9±0,2	2,8±0,4		2,6±0,5	
S_{sk}	0,20±0,05	- 0,26±0,08*		- 0,22±0,03*	

* Indica diferencias significativas con Ti control y # indica diferencias significativas entre NPeTOH y Ti-NPeCarv ($p < 0,01$).

A partir de los resultados de rugosidad obtenidos, puede concluirse que, si se comparan los parámetros de rugosidad medidos en las regiones cubiertas por Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv los parámetros de R_a , R_q y R_{max} disminuyen considerablemente en relación con las muestras de Ti control. En cambio, en la zona descubierta o conformal estos valores son similares a los registrados para el Ti control. Asimismo, los valores de R_{isad} disminuyen dos veces en las muestras de Ti-NPeTOH y cuatro veces en Ti-NPeCarv en comparación con el Ti control. Todos estos resultados demuestran que las NPe suavizan y aplanan la topografía de la superficie de Ti especialmente en el caso de las muestras de Ti-NPeCarv.

Los valores de asimetría S_{sk} mostrados en la Tabla 4.3, al igual que los correspondientes a las imágenes de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ (Tabla 4.2), se tornan negativos en las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv. Por lo tanto, esto sugiere que dichas NPe cubren los picos agudos observados en Ti control y los hacen más redondeados y, a la vez, al

depositarse en los valles reducen el volumen libre. Esto da como resultado una superficie más plana y suave.

Los valores de curtosis S_{ku} asociados a la agudeza de los picos, si bien disminuyen ligeramente en el caso de las superficies cubiertas, no reflejan un cambio significativo.

Finalmente, los resultados de AFM demuestran que en la escala de análisis de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ la presencia de las NPe no es fácilmente distinguible. Los cambios topográficos son evidenciados a alta magnificación en regiones de $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ debido a que las irregularidades pertenecen a la escala nanométrica. En dicha escala pudo comprobarse a través de los análisis de los perfiles que las NPe se forman sobre la superficie de Ti suavizando la agudeza de los picos y, por lo tanto, aplanando la topografía superficial, especialmente en el caso de las Ti-NPeCarv. Las Ti-NPeTOH son más inhomogéneas presentando más discontinuidades en forma de parches. Si bien los parámetros R_a y R_q son los más frecuentemente reportados, no resultaron sensibles a los cambios de rugosidad causados por la presencia de las NPe en ninguna de las escalas analizadas. Por el contrario, las imágenes en la escala $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ y los correspondientes perfiles, además de permitir identificar la formación de las NPe sobre la superficie de Ti posibilitaron el cálculo de los parámetros de R_{isad} y S_{sk} e identificar los cambios en la topografía al compararlos con los del control.

4.3.3 Determinación del ángulo de contacto

El ángulo de contacto es útil para conocer las propiedades de mojado de una superficie, permitiendo saber su grado de hidrofiliidad o hidrofobicidad. En general, superficies hidrofílicas presentan mejores propiedades y afinidad con medios biológicos, ya que aumentan la interacción de las células con el material favoreciendo la adhesión celular. En la Figura 4.9 se muestran los resultados para las superficies bajo análisis. Como puede observarse, todas las muestras presentan ángulos de contacto menores a 90° , por lo tanto, son superficies hidrofílicas. Las Ti-NPeCarv presentaron ángulos similares al Ti control (61 ± 1 y 64 ± 2 , respectivamente), mientras que en las muestras de Ti-NPeTOH se observa un leve pero significativo incremento del ángulo de contacto (71 ± 2) respecto del mismo. Nuevamente, se observa un comportamiento fisicoquímico con una leve pero significativa diferencia entre el TOH y Carv

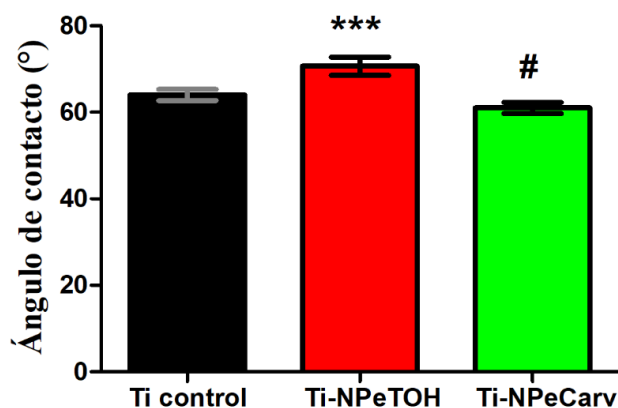


Figura 4.9. Determinación del ángulo de contacto. *** Indica diferencias significativas respecto al Ti control; # indica diferencias significativas entre las muestras Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv ($p < 0,01$).

4.3.4 Caracterización por ATR-FTIR de las nanopelículas de timol y carvacrol

La formación de las NPe autoensambladas de TOH y Carv fue caracterizada por espectroscopía ATR-FTIR (Figura 4.10). A fin de establecer comparaciones, primeramente, se obtuvieron los espectros de TOH y Carv puros (Figura 4.10-A y C respectivamente). Los mismos presentaron las contribuciones típicas descritas en bibliografía para TOH y Carv [67,157–160] correspondientes a: el estiramiento de los grupos -OH ($3400-3000\text{ cm}^{-1}$), el estiramiento del doble enlace $C=C$ ($1600-1500\text{ cm}^{-1}$), la flexión de los grupos -OH (1458 y 1421 cm^{-1}) y la flexión fuera del plano del C-H ($1000-800\text{ cm}^{-1}$). El Carv puro es líquido y presenta un amplio pico a 3378 cm^{-1} correspondiente a los grupos -OH involucrados en enlaces tipo puente de hidrógeno con otras moléculas de Carv. El TOH, en cambio, al ser sólido, presenta un pico estrecho a 3171 cm^{-1} . Sin embargo, luego de la formación de las NPe, las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv presentan un pico amplio a 3450 y 3436 cm^{-1} , respectivamente, relacionado a la participación de los grupos -OH para formar enlaces tipo puente de hidrógeno tanto con otras moléculas de TOH o Carv presentes en la NPe como con el TiO_2 de la superficie. Este cambio entre el comportamiento disímil de los compuestos puros y el similar al formar la NPe, puede relacionarse con el cambio que sufren las moléculas de TOH al pasar del estado sólido cristalino inicial para formar parte de la solución. Un cambio similar se observó al comparar ambos compuestos a mayor temperatura, ambos en estado líquido [161].

Los espectros para Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv son muy similares entre sí (Figura 4.10-B y D), lo cual sugiere que los mecanismos de formación de las NPe de TOH y Carv involucran procesos similares de adsorción sobre la superficie de Ti. Esta similitud se atribuye a la capacidad de formar enlaces tipo puente de hidrógeno con el grupo -OH en la superficie de Ti y/u otras moléculas de TOH o Carv y a las fuerzas de Van der Waals, que son las principales responsables del proceso de adsorción. Sin embargo, en los espectros de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv se observa la presencia de un pico a 1730 cm^{-1} ausente tanto en el TOH como el Carv puros. Esta señal es atribuida a la presencia de grupos cetónicos, lo cual indica que la formación de ambas NPe se debe a la oxidación espontánea de los grupos -OH a grupos cetónicos (C=O) sobre la superficie de Ti. Asimismo, la señal de los grupos -OH no desaparece en las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv lo que revela que no todas las moléculas de TOH o Carv sobre la superficie se han oxidado para dar grupos cetónicos, sino que es posible que se encuentren moléculas de TOH o Carv no oxidadas atrapadas dentro de la NPe interactuando con ésta mediante puente hidrógeno. Varios autores han señalado que picos amplios en la región de $3500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ pueden atribuirse a la hidratación de las NPe, a la presencia de moléculas no oxidadas (de TOH y Carv en este caso) dentro de la NPe interactuando por puentes de hidrógeno con las moléculas que conforman la NPe y/o a la interacción por puente de hidrógeno de las moléculas de la NPe con el TiO_2 [162–164]. Finalmente, el grupo isopropilo se detecta en todos los espectros a través de vibraciones simétricas ($1360\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$) y asimétricas ($1460\text{--}1420\text{ cm}^{-1}$) y el estiramiento de los grupos C-O se detecta en picos ubicados entre $1100\text{--}900\text{ cm}^{-1}$.

Es importante destacar que Mangiacapre *et al.* [161] investigaron recientemente las características estructurales del TOH y Carv a altas temperaturas para comparar su comportamiento estando ambos compuestos en estado líquido. Los autores encontraron diferencias en la interacción de las moléculas de TOH y Carv entre ellas mismas que podrían explicar las diferencias de las NPe formadas sobre Ti que hemos descrito. Por un lado, demostraron que las moléculas de Carv tienden a orientar sus anillos aromáticos en forma perpendicular entre ellos, mientras que las moléculas de TOH presentan organizaciones estructurales heterogéneas donde los anillos pueden orientarse de forma paralela y antiparalela. Además, se observó que el TOH tiende a formar enlaces tipo puente hidrógeno, en cambio, las moléculas de Carv presentan mayor inclinación a enlaces de tipo -OH- π . A partir de estos resultados, los autores sugieren que las moléculas

de Carv se disponen de forma más organizada y compacta con relación a las moléculas de TOH en estado líquido. Estos resultados son congruentes con la organización nanoestructurada encontrada en Ti-NPeCarv y Ti-NPeTOH en imágenes AFM, donde el Carv forma NPe más homogéneas y compactas que el TOH. Por lo tanto, es posible inferir que las disposiciones moleculares del TOH y Carv en solución acuosa pueden influir en las propiedades de autoensamblaje para formar las NPe sobre la superficie de Ti.

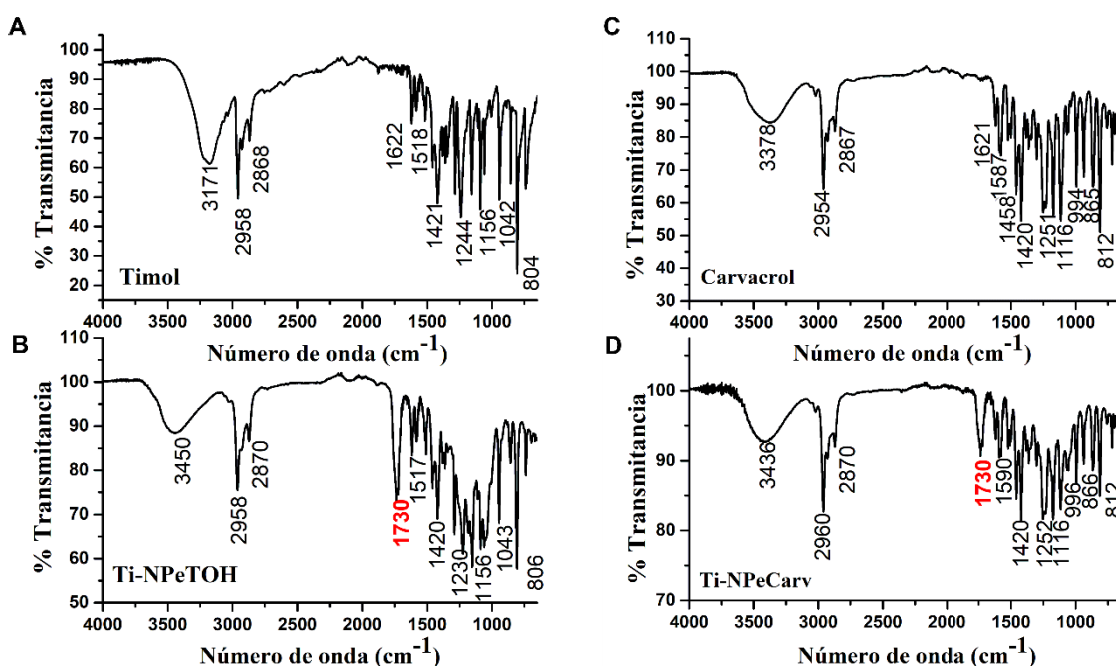


Figura 4.10. Espectros ATR-FTIR obtenidos para A) timol puro, B) Ti-NPe-TOH, C) carvacrol puro y D) Ti-NPeCarv. En rojo se muestra el principal cambio en las señales obtenidas.

En la Figura 4.5 se muestra que durante la voltamperometría cíclica las NPe de TOH y Carv, en la polarización en sentido anódico (PA) desde -1,0 V a 2,0 V, se produce la electro-oxidación de las NPe en un proceso irreversible como se explicó en la Sección 4.3.1.2 del presente Capítulo. Con el propósito de comprobar esta oxidación de las NPe, se realizaron espectros ATR-FTIR luego de aplicar PA en dicha región de potencial a una velocidad de 50 mV/s en KCl 5 mM y se analizaron las señales obtenidas (Figura 4.11).

En primer lugar, puede observarse que los espectros obtenidos son muy diferentes a los que presentan las NPe originalmente, indicando que éstas se ven fuertemente perturbadas por la PA. En segundo lugar, se detectó que la señal cetónica de 1730 cm^{-1} desaparece luego de la PA en las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv y que aparecen

nuevas señales (indicadas en rojo en la Figura 4.11) entre 1250-1050 cm^{-1} correspondientes a grupos éteres. Esto confirma que, durante la PA, las NPe se oxidan de grupos cetónicos a grupos éteres sobre la superficie de Ti.

Por otra parte, de los espectros obtenidos, puede deducirse que las muestras de Ti-NPeCarv son más susceptibles a la PA: 1) las señales de los grupos -OH se ven reducidas a un pico débil a 3190 cm^{-1} atribuida a -OH que no interactúan por puente hidrógeno, 2) las contribuciones de los grupos $-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2$ (2900-2800 cm^{-1}) se encuentran reducidas a picos débiles y 3) la señal de estiramiento C=C (1600-1500 cm^{-1}) fue casi indetectable. Por el contrario, para las muestras de Ti-NPeTOH todas estas señales están fuertemente presentes en los espectros, lo cual sugiere que las NPe de TOH pueden ser menos afectadas por la oxidación forzada durante la PA. Estas diferencias permiten concluir que existen diferencias en la composición/estructura molecular de los componentes de las NPe que conducen a distinta capacidad oxidativa.

En la Tabla 4.4 se resumen todas las señales presentes en los espectros de las Figuras 4.10 y 4.11 con sus contribuciones asociadas y la bibliografía consultada.

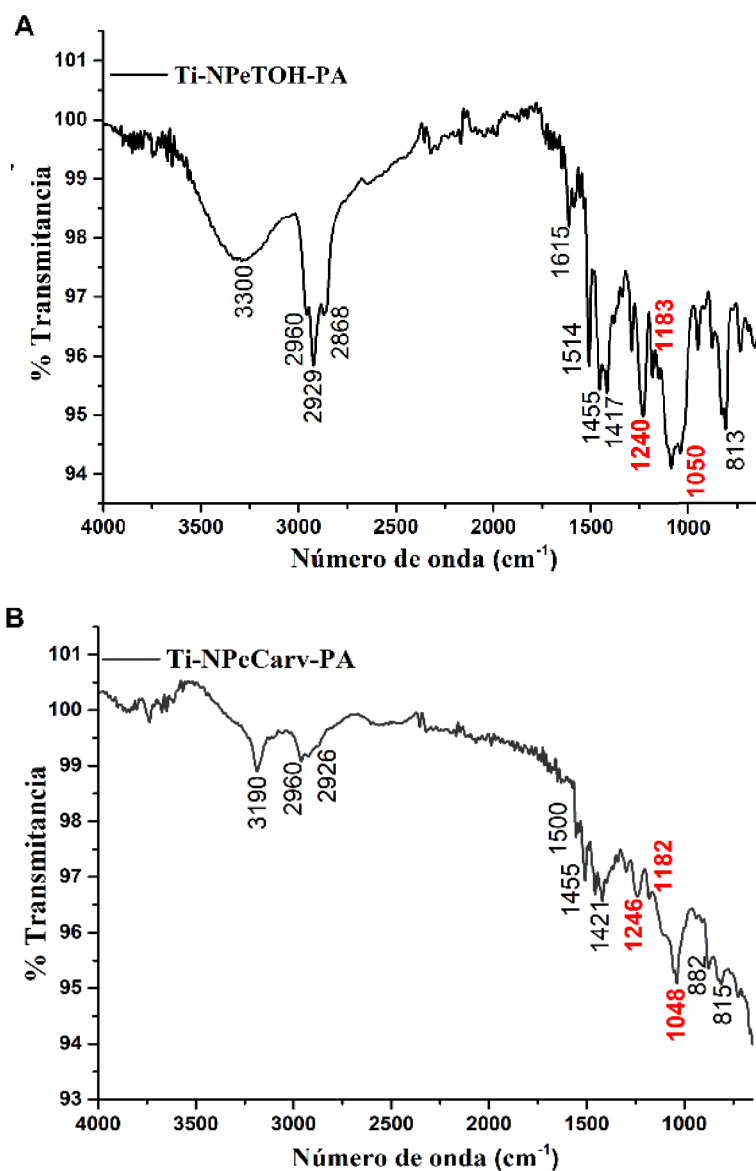


Figura 4.11. Espectros ATR-FTIR luego de la polarización anódica (PA) para A) Ti-NPe-TOH-PA y B) Ti-NPe Carv-PA. En rojo se indican las señales correspondientes a los enlaces tipo éteres formados.

Tabla 4.4. Números de onda y asignaciones de grupos funcionales (según bibliografía) para espectros ATR-FTIR de TOH puro, nanopelículas autoensambladas de TOH (Ti-NPeTOH), nanopelículas autoensambladas de TOH sometidas a polarización anódica (Ti-NPeTOH-PA), Carv puro, nanopelículas autoensambladas de Carv (Ti-NPeCarv), nanopelículas autoensambladas de Carv sometidas a polarización anódica (Ti-NPeCarv-PA).

Grupos funcionales	Números de onda observados (cm ⁻¹)						Bibliografía consultada
	TOH puro	Ti-NPeTOH	Ti-NPeTOH-PA	Carv puro	Ti-NPeCarv	Ti-NPeCarv-PA	
Estiramiento ν -OH (sin puente de hidrógeno)	3171	-	-	-	-	3190	[142]
Estiramiento ν -OH (con puente de hidrógeno)	-	3450	3300	3378	3436	-	[165,166]
ν_{as} -CH ₃	2958	2958	2960	2954	2960	2960	[67,144,167]
ν_{as} -CH ₂	2928	2928	2929	2929	2929	2926	
ν_s -CH ₃	2868	2870	2868	2867	2870	-	
-C=O (grupos cetónicos con puente de hidrógeno)	-	1730	-	-	1730	-	[168,169]
Estiramiento -C=C del anillo fenólico	1622	1621	1615	1621, 1587	1619, 1590	1500	[167,170]
Flexion C-H y CH ₃	1518	1517	1514	-	-	-	[67,144,167]
ν_{as} del grupo isopropilo	1421	1420	1455, 1417	1458, 1420	1458, 1420	1455, 1421	[122], [125], [141]
ν_s del grupo isopropilo	1360	1358	-	1365	1365	-	

Phenyl ring ρ =C-H	1244	1230	-	1251	1252	-	[170]
ν-C-O-C (grupos éteres)	-	-	1240 (pico fuerte) 1183 (pico débil)	-	-	1246 (pico fuerte) 1182 (pico débil)	[143,144,171]
Sustitución Meta	1156	1156	-	-	-	-	[172,173]
Sustitución Orto	-	-	-	1116	1116	-	
Estiramiento -C-O	1042	1043	-	994	996	-	[142,143,174]
Estiramiento de los grupos éteres -C-O-C	-	-	1050	-	-	1048	[171]
ν-C-H fuera del plano	804	806	813	865, 812	866, 812	882, 815	[175]

Referencias: ν_{as} = vibración de tensión asimétrica; ν_s = vibración de tensión simétrica; ρ = vibración en plano

4.3.5 Liberación de timol y carvacrol desde las nanopelículas

Los resultados de ATR-FTIR sugieren que podrían encontrarse moléculas no oxidadas de TOH y Carv dentro de las NPe adsorbidas sobre Ti, lo cual indicaría que las mismas podrían liberarse desde la superficie al medio. Entonces, con el objetivo de evaluar si hay liberación de moléculas de TOH y Carv desde las NPe, las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv fueron expuestas en soluciones de PBS (pH = 7,4) por un periodo de hasta 14 días y se determinó la presencia de productos de liberación por espectroscopía UV-visible a 2, 4, 12, 24, 48, 120, 168, 240 y 336 horas midiendo la absorbancia a $\lambda = 274$ nm para el TOH y $\lambda = 273$ nm para el Carv.

Los espectros UV-visible de liberación mostraron únicamente máximos de absorbancia a 274 y 273 nm coincidentes con moléculas de TOH y Carv respectivamente liberadas desde la superficie de las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv al medio. Esto

sugiere que los productos de liberación detectados por esta técnica corresponden únicamente a moléculas de TOH y Carv. A modo de ejemplo se muestran los espectros UV de los productos de liberación medidos luego 14 días (336 h) de incubación (Figura 4.12).

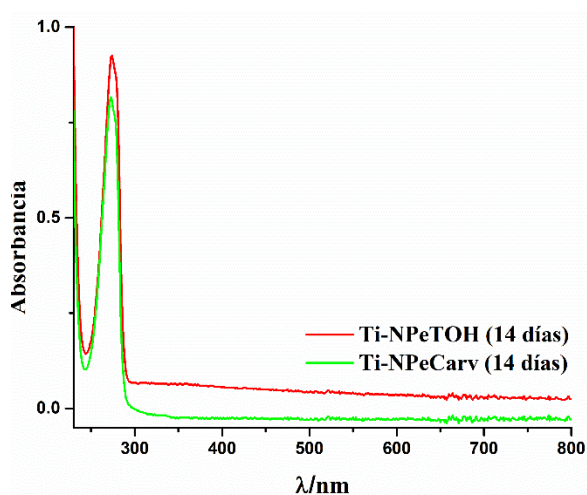


Figura 4.12. Espectro UV-visible de los productos de liberación para Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv luego de 14 días de incubación en PBS (pH fisiológico) a 37°C.

Las curvas de liberación para las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv se reportan en la Figura 4.13. Dentro de las primeras 24 h de liberación, la concentración de TOH y Carv acumulada es similar entre ambas muestras, pero con un leve incremento en las muestras de Ti-NPeTOH (Figura 4.13, gráfico inferior). Además, dentro de este periodo de tiempo, se observa que ambas muestras presentan una tasa inicial de liberación de TOH y Carv a la solución dentro de las primeras 12 h ligeramente superior para el caso del Ti-NPeTOH ($0,90 \pm 0,04$ ($\mu\text{g/mL}$)/h para Ti-NPeTOH y $0,70 \pm 0,02$ ($\mu\text{g/mL}$)/h para Ti-NPeCarv). Esto puede deberse a que las moléculas débilmente adsorbidas en la superficie o atrapadas dentro de las NPe se liberan rápidamente cuando las muestras entran en contacto con la solución de PBS. A partir de las 24 h, se observa que las muestras de Ti-NPeCarv liberan moléculas de Carv a una velocidad constante hasta alcanzar el máximo de liberación a los 10 días (velocidad promedio de $0,30 \pm 0,02$ $\mu\text{g/mL}$), a partir del cual la concentración acumulada de Carv permanece constante. En cambio, las muestras de Ti-NPeTOH presentan una curva de liberación de TOH variable en el tiempo donde pueden detectarse 3 fases: 1) la primera fase de liberación abrupta ocurre dentro de las primeras 12 h (velocidad promedio de liberación de $0,90 \pm 0,04$ ($\mu\text{g/mL}$)/h) para luego reducirse paulatinamente hasta las 24 h, 2) en la segunda etapa se produce un nuevo incremento abrupto en la liberación de TOH entre las 24 y 48 h ($1,3 \pm$

0,1 ($\mu\text{g}/\text{mL}/\text{h}$) hasta alcanza otra reducción en la liberación entre las 120 y 168 h (5-7 días) y 3) finalmente, la tercera etapa de liberación ocurre desde las 168 h hasta las 240 h (10 días) a una velocidad promedio de $0,14 \pm 0,02$ ($\mu\text{g}/\text{mL}/\text{h}$), a partir de este momento no se observa más liberación de TOH. Cabe mencionar que las muestras de Ti-NPeTOH exhiben una concentración acumulada de liberación más alta en el tiempo que las muestras de Ti-NPeCarv que se vuelve significativamente diferente a la de su isómero a partir de las 48 h.

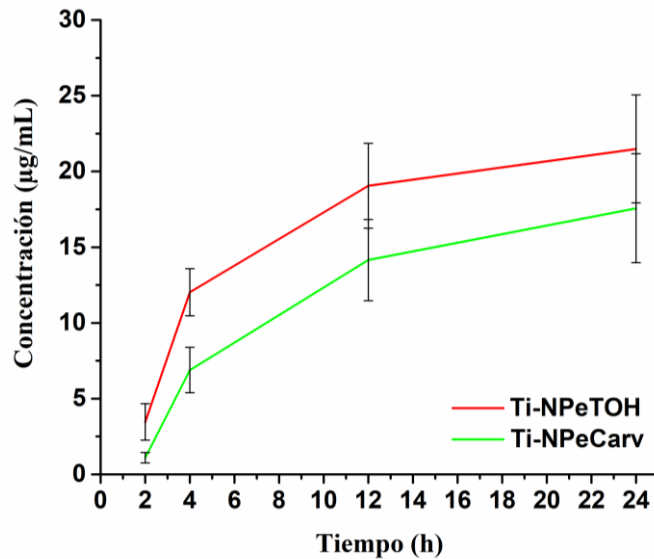
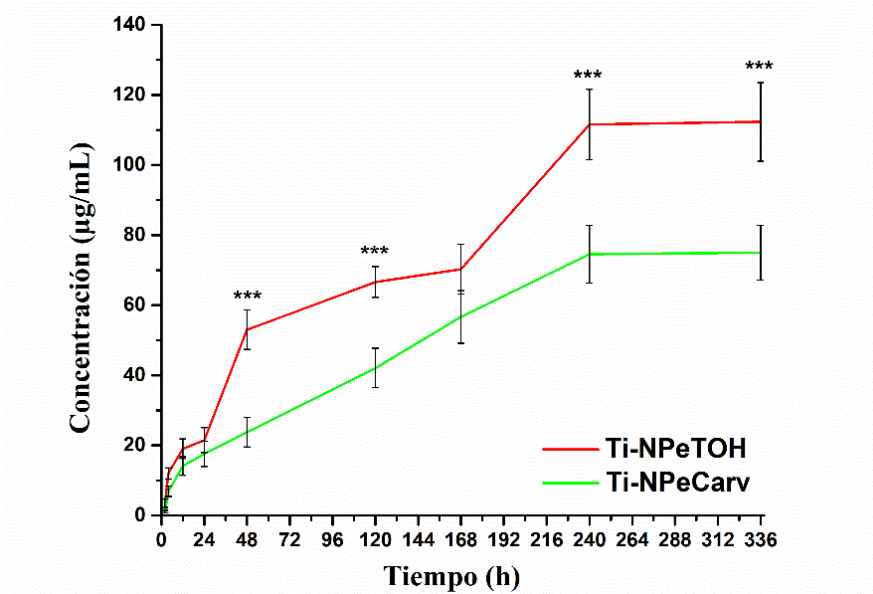


Figura 4.13. Curvas de liberación en PBS de TOH y Carv desde las muestras Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv obtenidas por UV-visible hasta 14 días de liberación (arriba). Se muestra, para mayor claridad, una ampliación de las curvas de liberación hasta 24 horas (abajo). *** Indica diferencias significativas ($p < 0,01$).

Las diferencias en las curvas de liberación del TOH y Carv pueden estar motivadas por distintas causas. Es importante recordar que el TOH presenta una solubilidad más alta en agua que el Carv (TOH: 980 $\mu\text{g/mL}$ y Carv: y 830 $\mu\text{g/mL}$) y mayor migración que se asocian con una mayor capacidad antioxidante [176]. Por otra parte, las moléculas de Carv muestran una mayor inclinación a formar enlaces del tipo -OH- π mientras que las moléculas de TOH forman enlaces de hidrógenos entre sus grupos oxhidrilos. Estas diferencias, como se explicó antes, pueden impactar sobre el proceso de autoensamblado y la naturaleza de las películas formadas (más compactas en el caso del Carv), así como en la respuesta en sistemas biológicos.

Por otra parte, la estructura discontinua y en forma de parches que se observó en las imágenes AFM y que probablemente sea debida a desprendimientos de parte de la película podría ser la causante de la liberación del TOH en etapas. Morsch *et al.* [177] demostraron por imágenes AFM y espectros FTIR que *coatings* epoxy-fenólicos adsorbidos sobre materiales de acero son altamente hidratados y perturbados al ser expuestos en medios acuosos, ya que los *coatings* se hinchan al ser hidratados y presentan más interacciones de tipo puente hidrógeno en espectros FTIR. Entonces, las Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv podrían experimentar procesos de hidratación incorporando agua al ser sumergidos en PBS u en otro medio acuoso. Como se observó en la Figura 4.8, las muestras de Ti-NPeTOH presentan un espesor variable y poco homogéneo, por lo cual, las islas de estas NPe podrían sufrir ciclos de hidratación, es decir, periodos de hidratación seguidos por la liberación de moléculas de TOH y re-hidratación nuevamente, que se detectan a través de los cambios de pendiente formando escalones en las curvas de liberación de FF (Figura 4.13). Similares comportamientos de liberación de TOH y Carv se han observado en nanovehículos adheridos sobre otros sustratos [178]. El Carv, en cambio, al presentar una estructura más lisa, uniforme y compacta se puede hidratar gradual o constantemente, dando como resultado un perfil de liberación continuo de moléculas de Carv durante los primeros 10 días.

Finalmente, para analizar el proceso de hidratación de las NPe, se tomaron espectros ATR-FTIR de las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv luego de 1, 24 y 48 h de liberación en PBS (Figura 4.14). Para ambas muestras se observa una caída drástica de la transmitancia a 24 y 48 h, lo cual indica que las mismas son perturbadas por el medio acuoso y que las señales FTIR son alteradas por el proceso de liberación que ocurre en dicho periodo de tiempo con la consecuente disminución de la concentración superficial

que conduce a la pérdida de eficiencia antimicrobiana (ver Sección 4.3.6). En el caso de los espectros para Ti-NPeTOH (Figura 4.14-A) se observa que el pico original de 3450 cm^{-1} se vuelve más amplio y toma valores cercanos a 3300 cm^{-1} . En el caso de las muestras Ti-NPeCarv, se observa también corrimiento en la señal de los grupos -OH hacia valores de 3300 cm^{-1} ; pero además se detecta que estas señales junto con las señales de 2900-2800 cm^{-1} y el pico cetónico de 1730 cm^{-1} disminuyen gradualmente en intensidad a lo largo del proceso de liberación de Carv. Todos estos cambios en los espectros FTIR están reportados y asociados a procesos de hidratación-deshidratación de las películas de FF [179–181]. Por lo tanto, se puede inferir que dichos procesos afectan la liberación de las moléculas desde la superficie de las NPe al medio.

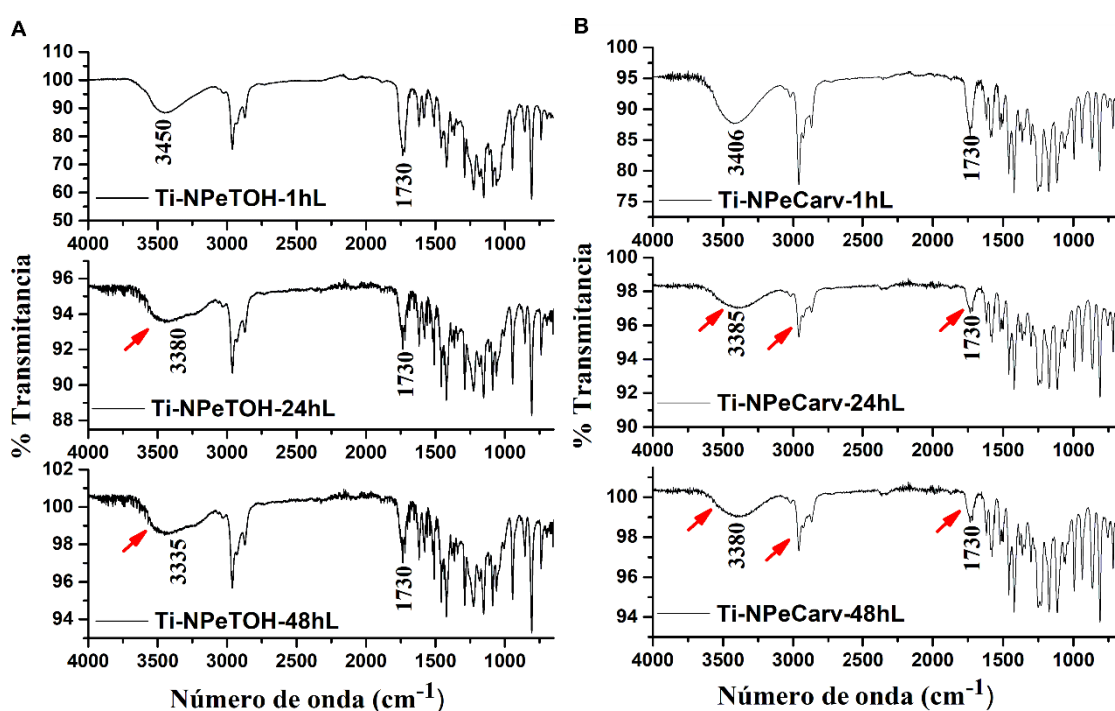


Figura 4.14. Espectros ATR-FTIR obtenidos luego de 1, 24 y 48 horas de liberación (1hL, 24hL y 48hL) en PBS a 37°C para las muestras de: A) Ti-NPeTOH y B) Ti-NPeCarv. Las flechas rojas indican diferencias en el ancho y largo de los picos en el tiempo.

4.3.6 Actividad antimicrobiana de las nanopelículas de timol y carvacrol

En primer lugar, dado a que las NPe liberan moléculas de TOH y Carv desde la superficie de Ti al medio, se procedió a determinar la actividad antimicrobiana de las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv mediante la técnica de difusión en agar o halo de inhibición. Los resultados mostraron que ambas NPe presentan difusión de agentes

antimicrobianos hacia el agar con similar efectividad, inhibiendo el crecimiento de *S. aureus* en la zona del halo de aproximadamente 2 cm, mientras que las muestras de Ti control, como era de esperar, no presentaron halo de inhibición (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Determinación del halo de inhibición contra *S. aureus*.

Ti Control	Ti-NPeTOH	Ti-NPeCarv
No se encontró difusión	2,0 ± 0,2 cm	1,8 ± 0,2 cm

Por otra parte, la actividad antimicrobiana también se evaluó mediante el recuento en placa de UFCs luego de la inmersión en el medio de cultivo durante 3 h para analizar el proceso de colonización bacteriana inicial de la superficie de Ti. Los resultados arrojaron que las superficies de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv son antibacterianas pues no se detectaron bacterias vivas sobre la superficie de ambas muestras (erradicación). En cambio, sobre las muestras de Ti control se encontraron $4,0 \pm 0,5 \times 10^5$ UFCs/cm² (Figura 4.15). Con el propósito de determinar el estado fisiológico de las bacterias adheridas sobre las superficies de Ti tras 3 h de cultivo, se realizó la tinción Live/Dead (Figura 4.16). Se pudo comprobar que las bacterias adheridas sobre las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv estaban muertas (>99%) (Figura 4.16-B y C respectivamente), mientras que las adheridas sobre las muestras control estaban vivas (>99%) (Figura 4.16-A). Estos resultados indican que la superficie de las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv presenta un fuerte efecto bactericida a 3 h que impide que las bacterias colonicen la superficie, ya que cuando se adhieren a la superficie no pueden sobrevivir sobre ella durante este periodo de tiempo.

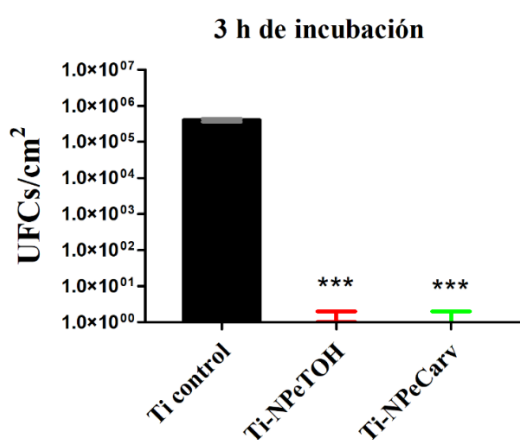


Figura 4.15. Colonización inicial de las diferentes superficies por *S. aureus* tras 3 horas de cultivo a 37°C. *** indica diferencias significativas con el Ti control ($p < 0,01$).

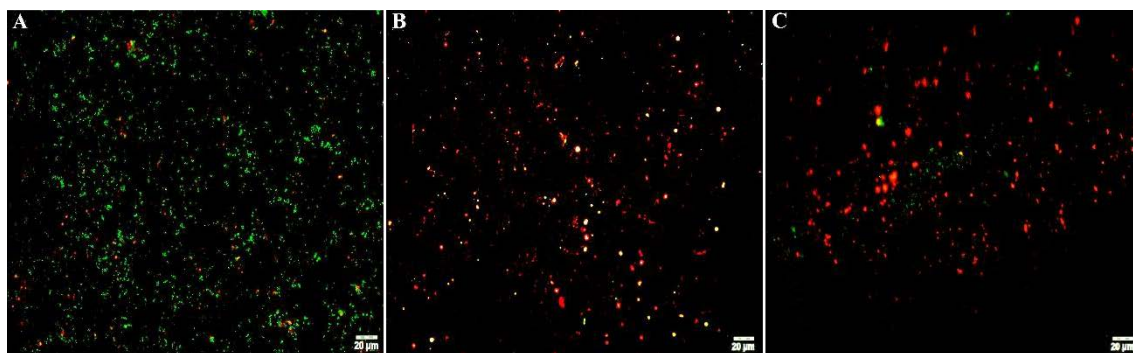


Figura 4.16. Tinción Live/Dead tras 3 horas de cultivo con *S. aureus*. A) Ti control, B) Ti-NPeTOH y C) Ti-NPeCarv. En verde o amarillo bacterias vivas y en rojo bacterias muertas.

Para evaluar el efecto antimicrobiano sobre el desarrollo de *biofilms* tempranos, se determinó la actividad antibiofilms de las NPe tras 24 h de exposición de las muestras a cultivos de *S. aureus*. Los resultados de recuento en placa de UFCs se resumen en la Figura 4.17. Nuevamente, las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv no presentaron formación de UFCs; en cambio, el Ti control desarrolló $5,0 \pm 0,7 \times 10^6$ UFCs/cm². Estos resultados demuestran que las NPe de TOH y Carv confieren a la superficie de Ti actividad bactericida de tipo erradicadora, ya que no permite el crecimiento y supervivencia de las bacterias ni el posterior desarrollo de biofilm.

Teniendo en cuenta que las Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv se liberan desde la superficie de Ti durante un periodo de 10 días, se estudió la actividad antimicrobiana de las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv tras 24 y 48 h de liberación del agente antimicrobiano en un medio estéril. En primer lugar, se sumergieron las muestras por el tiempo indicado en medio de cultivo estéril para favorecer el proceso de liberación de moléculas de TOH y Carv. Luego, se retiró el medio de cultivo y se adicionó medio fresco con inóculo de bacterias ($\sim 10^8$ UFCs/mL) y se evaluó el efecto antimicrobiano remanente de las NPe (tras el proceso previo de liberación) sobre el desarrollo de *biofilms* (24 h de incubación en medio con bacterias). Los resultados también se indican en la Figura 4.17. En el caso de las muestras de 24 h de liberación (Ti-NPeTOH-24hL y Ti-NPeCarv-24hL) las mismas conservan gran poder bactericida, ya que reducen las UFCs/cm² en 4 órdenes de magnitud en relación con el Ti control, dificultando la formación del biofilm durante las siguientes 24 h. En cambio, tras 48 h de liberación (Ti-NPeTOH-48hL y Ti-NPeCarv-48hL) ya no conservan propiedades antimicrobianas y la cantidad de UFCs/cm² desarrolladas sobre su superficie es similar al Ti control.

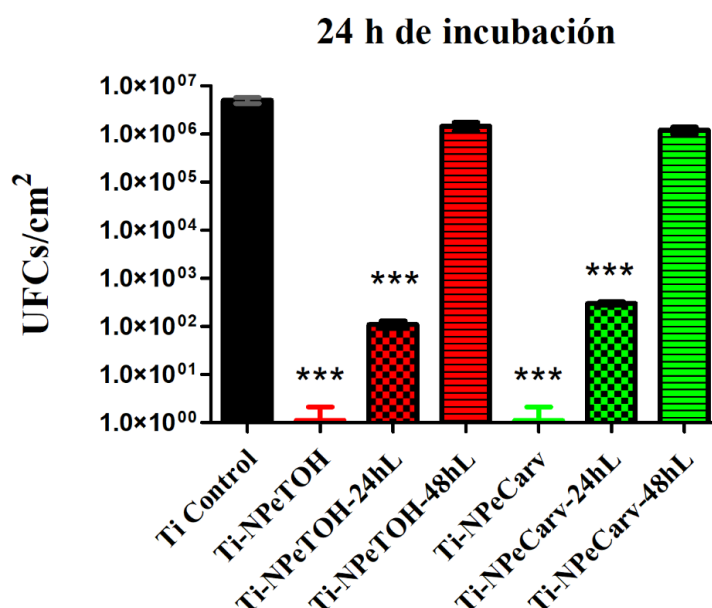


Figura 4.17. Desarrollo de *biofilms* tempranos sobre las diferentes superficies de Ti tras 24 horas de incubación a 37°C de las muestras con *S. aureus*. *** indica diferencias significativas con el Ti control ($p < 0,01$).

Adicionalmente, se determinó por tinción Live/Dead el estado fisiológico de las bacterias que conformaban el biofilm desarrollado sobre las diferentes superficies de Ti. Como se observa en la Figura 4.18-A las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv tras 24 h de incubación en el medio con microorganismos presentaron únicamente bacterias muertas sobre su superficie, mientras que en el Ti control la gran mayoría de las bacterias estaban vivas (resultados coincidentes con el recuento en placa de UFCs, Figura 4.17). Las muestras que sufrieron un proceso previo 24 h de liberación de agente antimicrobiano (Ti-NPeTOH-24hL y Ti-NPeCarv-24hL) exhibieron un área de 20 y 25% aproximadamente correspondiente a bacterias vivas adheridas sobre su superficie. Sin embargo, cuando el proceso previo de liberación es de 48 h (Ti-NPeTOH-48hL y Ti-NPeCarv-48hL), las bacterias adheridas se encuentran totalmente vivas, al igual que para el Ti control (Figura 4.18-B). Por lo cual, tras 48 h de liberación, las NPe remanentes no presentan actividad antimicrobiana. Estos resultados sugieren que la actividad antimicrobiana proviene de las moléculas de TOH y Carv no oxidadas (es decir en estado puro) que se encuentran “atrapadas” dentro de la película y que se liberan en el tiempo. Tras 48 h de liberación, las NPe remanentes y las moléculas de TOH y Carv que se siguen liberando hasta el día 10 no ejercen acción antimicrobiana, muy probablemente por motivos de baja concentración superficial.

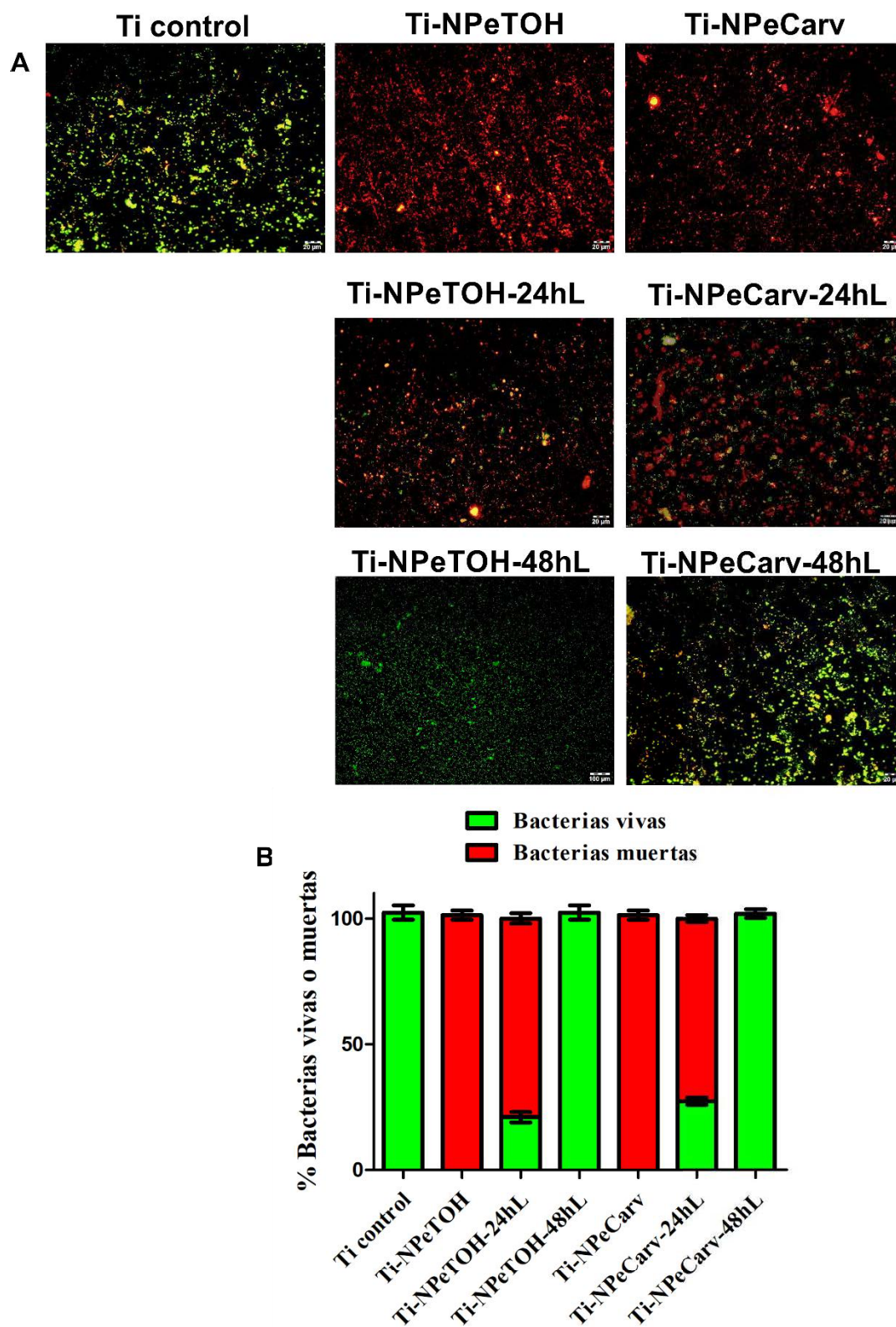


Figura 4.18. Tinción Live/Dead tras 24 horas de cultivo con *S. aureus*. A) Imágenes Live/Dead representativas para cada muestra. B) Resultados de la cuantificación de bacterias vivas (verdes o amarillas) y/o muertas (rojas) sobre cada superficie estudiada.

La actividad antimicrobiana del TOH y Carv en estado libre o puro ha sido ampliamente demostrada contra diferentes cepas bacterianas. En el caso particular de *S. aureus* se sabe que ambos FF son agentes antimicrobianos *multi-targets*, es decir que provocan la muerte bacteriana atacando diferentes niveles metabólicos. Por un lado, el TOH y Carv alteran la estabilidad de la membrana lipídica, provocando su disrupción y la lisis bacteriana [182–184]. Por otra parte, estos FF decrecen la actividad de las enzimas deshidrogenasas de *S. aureus* provocando una disminución en la producción de ATP, lo cual genera que las bacterias estén en desventaja para superar los efectos de estrés inducidos por la acción antimicrobiana de TOH o Carv [185,186].

Por otra parte, trabajos previos han demostrado que películas electropolimerizadas de TOH y Carv sobre materiales biodegradables pierden la actividad bactericida con el tiempo [38]. Procesos similares pueden ocurrir en las Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv desarrolladas sobre Ti donde el efecto bactericida proviene de las moléculas de TOH y Carv liberadas por la NPe y dicha capacidad se reduce con el tiempo.

Finalmente, se determinó el efecto antimicrobiano de las Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv sobre la producción de EPS de *S. aureus* luego de 24 h de incubación (Figura 4.19). Las muestras de Ti-NPeTOH, Ti-NPeTOH-24hL, Ti-NPeCarv y Ti-NPeCarv-24hL presentaron una fuerte inhibición de la producción de EPS, mientras que las muestras de Ti-NPeTOH-48hL y Ti-NPeCarv-48hL exhibieron similares valores que el Ti control. En acuerdo con estos resultados se ha reportado que el TOH inhibe la producción de PIA (por sus siglas en inglés, *polysaccharide intracellular adhesin*) y la liberación de ADN extracelular, fundamentales para la producción del EPS y la formación de *biofilms* [140]. De esta forma, el TOH y Carv desestabilizan y provocan la muerte de *S. aureus* por diversas vías, dificultando el desarrollo de estrategias de supervivencia.

Los resultados muestran que las NPe de TOH y Carv conceden a la superficie de Ti actividad erradicadora por 24 h y luego bactericida por 24 h más. Es decir, que estas NPe impiden la colonización bacteriana y el posterior desarrollo de *biofilms* de *S. aureus* por un período de 48 h; tiempo suficiente para impedir la infección *in vivo* del implante de Ti, actuando como coadyuvante de los antimicrobianos convencionales en el período de mayor riesgo de infección.

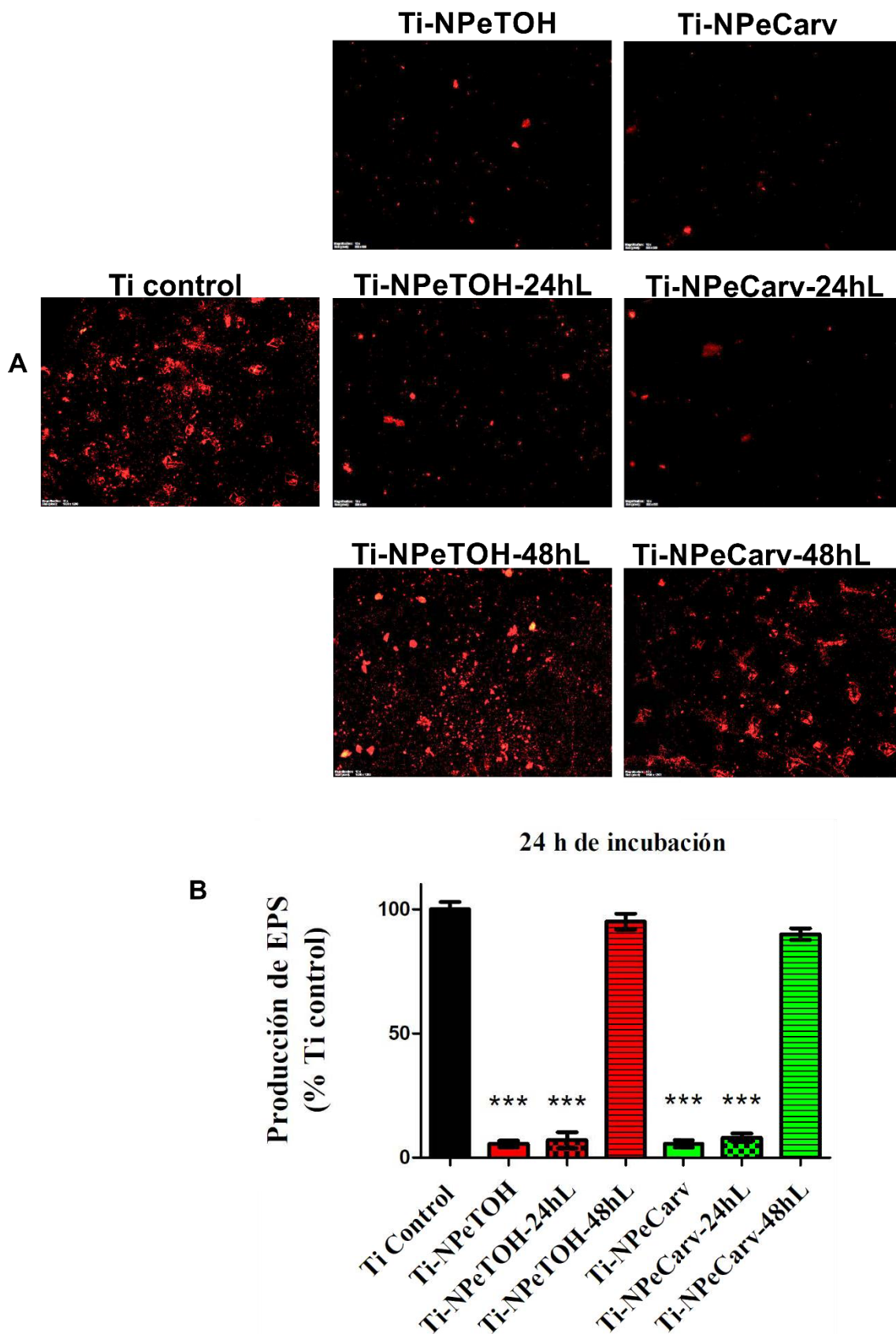


Figura 4.19. Determinación de la producción de EPS por tinción Sypro Ruby tras 24 horas de cultivo con *S. aureus*. A) Imágenes representativas para cada muestra. B) Resultados de la cuantificación EPS sobre cada superficie estudiada.

4.3.7 Impacto de las propiedades fisicoquímicas de las películas sobre la adhesión y proliferación de las bacterias.

Las propiedades fisicoquímicas de los NPe influyen en la adhesión bacteriana e impactan sobre su estructura y metabolismo. Debe considerarse que, tanto el Carv como el TOH, pueden funcionar como intercambiadores de protones, reduciendo así el gradiente de pH a través de la membrana citoplasmática, lo que lleva al colapso de la fuerza motriz de los protones y al agotamiento de la reserva de ATP. La posición del grupo -OH de los isómeros no parece ser decisiva para la eficacia antimicrobiana [187]. Es importante destacar que la toxicidad de TOH y Carv está fuertemente relacionada con la alteración de la detección de *quórum sensing* (QS). En presencia de compuestos fenólicos se detectó una reducción significativa en la producción de autoinductores del QS y la inhibición de la motilidad [188,189].

En coincidencia con nuestros resultados, las superficies de Ti modificadas con Carv y aceite esencial que contiene TOH, incorporadas en un recubrimiento de hidroxiapatita rociado con plasma, brindaron prevención de infecciones de *S. epidermidis* en aplicaciones dentales y ortopédicas [190]. Es importante señalar que, con base en los perfiles derivados de los modelos de difusión [191], la concentración de FF en la interfaz Ti-NPe/solución es varias veces mayor que la concentración medida en el medio acuoso durante los ensayos de liberación. Por lo tanto, a pesar de que la concentración medida está por debajo del valor MIC (120-2000mg/L según la resistencia de la cepa utilizada), existe un efecto pronunciado del FF en la superficie de la NPe asociado a la concentración superficial del mismo [191]. Las bacterias detectan inmediatamente la alta concentración en la interfaz y tienen un efecto más fuerte sobre los microorganismos adheridos en comparación con los del resto. En concordancia con lo informado previamente, los resultados actuales representan la reducción de EPS por Carv y TOH en *S. aureus* y se alinean con los hallazgos de estudios anteriores [188]. Como consecuencia, la formación de colonias se ve obstaculizada porque las agregaciones bacterianas iniciales son más susceptibles a los ataques antimicrobianos [192–194]. En línea con lo mencionado, los resultados de los halos de inhibición (Tabla 4.5) confirman que el TOH y Carv difunden desde la superficie de Ti al agar, dificultando el crecimiento bacteriano en las proximidades de las muestras. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la liberación explosiva (conocida por su denominación en inglés *burst release*) dentro de las 48 h iniciales, junto con el alto contenido de Carv y TOH en la interfaz, parecen ser los

principales factores que contribuyen a la acción antibiofilms y a la erradicación bacteriana observada (24 h) o efectos bactericidas (disminución de 4 órdenes en UFCs/cm² a 48 h) de ambos NPe (Figura 4.17). Cabe destacar que se ha demostrado que Carv inhibe la formación de *biofilms* por ciertos patógenos incluso a niveles de concentración que no afectan el crecimiento o la supervivencia bacteriana debido a su acción sobre el QS [188,195–197].

4.3.8 Citocompatibilidad y actividad osteogénica de las nanopelículas de timol y carvacrol

Se evaluó la citocompatibilidad de las NPe sobre Ti en líneas celulares pre-osteoblásticas (MC3T3-E1) y fibroblásticas (L929) de ratón. Para dicho fin, se sembraron células sobre las muestras de Ti control, Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv y se incubaron por 7 días para cuantificar la adhesión y proliferación celular por tinción con naranja de acridina. Las muestras Ti-NPeTOH presentaron un aumento en la viabilidad y proliferación celular en células pre-osteoblásticas en todos los tiempos evaluados con relación al Ti control (Figura 4.20-A). En contraste, las muestras de Ti-NPeCarv exhibieron una menor viabilidad y proliferación con células pre-osteoblásticas en todos los tiempos ensayados (entre un 20-25% menos en relación con el Ti control y entre un 25-50% menos que Ti-NPeTOH). Por lo contrario, las muestras de Ti-NPeCarv incrementaron la proliferación celular en células fibroblásticas hasta un 50% más que el Ti control luego de 7 días de incubación; mientras que las muestras con NPe de TOH exhibieron una reducción en la viabilidad celular de fibroblastos del 35% en relación con el Ti control (Figura 4.20-B).

Adicionalmente, se estudiaron los efectos de citotoxicidad mitocondrial de las NPe por ensayos de reducción de MTT. Para dicho fin, se recolectaron extractos de los productos de liberación de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv luego de 24 h en medio de cultivo y posteriormente dichos extractos fueron sembrados con fibroblastos y preosteoblastos para cuantificar la citotoxicidad. Las muestras de Ti-NPeTOH no presentaron efectos citotóxicos en las dos líneas celulares estudiadas, mientras que las de Ti-NPeCarv presentaron una disminución de la actividad mitocondrial de un 30% aproximadamente en células pre-osteoblásticas (Figura 4.21).

Por último, se estudiaron los efectos de las NPe sobre la diferenciación osteogénicas de células pre-osteoblásticas a 15 y 21 días de incubación con medio

osteogénico (Figura 4.22). Finalizados los 15 días de incubación se determinó la producción de FAI y de proteínas totales. Las muestras de Ti-NPeTOH incrementaron en un 30% aproximadamente la producción de FAI y proteínas, mientras que las muestras de Ti-NPeCarv disminuyeron dichos parámetros en un 20%. Luego de 21 días de diferenciación, las muestras de Ti-NPeTOH incrementaron en un 35, 45 y 40 % la producción de depósitos de calcio (mineralización), colágeno tipo I y proteínas, respectivamente, con relación a las muestras Ti control. En cambio, las muestras de Ti-NPeCarv redujeron la producción de estos parámetros osteogénicos en concordancia con los resultados que mostraron la disminución de la proliferación de osteoblastos.

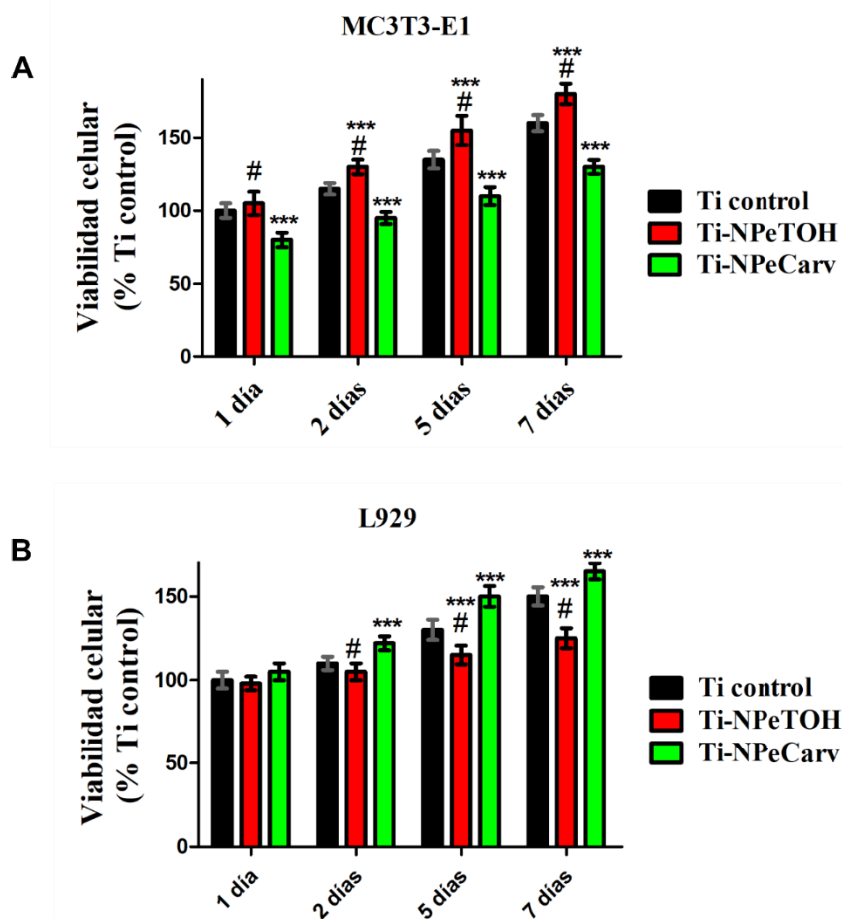


Figura 4.20. Viabilidad celular en células pre-osteoblásticas (A) y fibroblásticas (B) determinada por tinción con naranja de acridina luego de 1 a 7 días de incubación. Resultados expresados en función del Ti control a 1 día de incubación. *** indica diferencias significativas con el Ti control y # indica diferencias significativas entre las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv ($p < 0,01$).

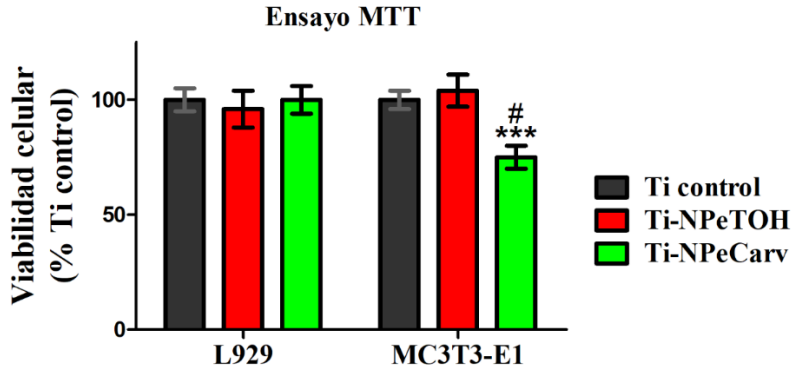


Figura 4.21. Citotoxicidad de las NPe determinada por ensayo de reducción de MTT. *** indica diferencias significativas con el Ti control y # indica diferencias significativas entre las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv ($p < 0,01$).

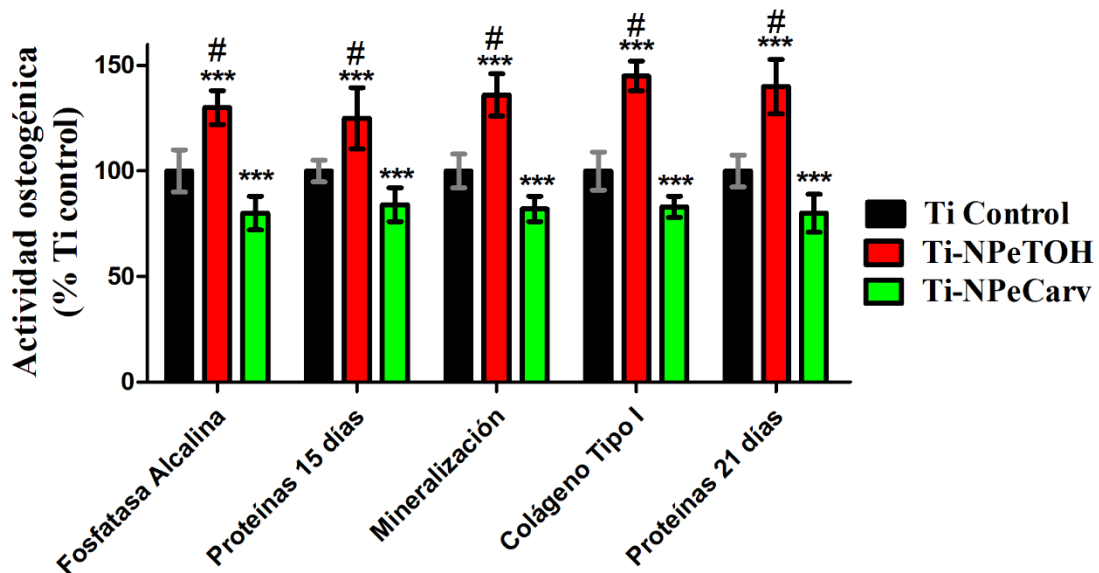


Figura 4.22. Efectos en la actividad osteogénica de las Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv en células pre-osteoblásticas diferenciadas luego de 15 y 21 días de incubación. *** indica diferencias significativas con el Ti control y # indica diferencias significativas entre las muestras de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv ($p < 0,01$).

Trabajos previos *in vitro* en células madre demostraron que el TOH y Carv puros incrementan la diferenciación de estas células a osteoblastos maduros y, a la vez, incrementan la producción de depósitos de calcio o mineralización [198–200]. Los resultados de las Figuras 4.20 y 4.22 revelaron que las muestras de Ti-NPeTOH presentan mejoras en la citocompatibilidad y proliferación en células pre-osteoblásticas y también

aumentan la actividad osteogénica medida a través del incremento de la producción de FAI, depósitos de calcio y colágeno tipo I. Los resultados demostraron que el TOH adsorbido y autoensamblado formando NPe sobre Ti conserva la actividad osteogénica previamente descrita en bibliografía para el TOH en estado libre o puro. En cambio, el Carv adsorbido en las NPe no conserva dicha propiedad, incluso la disminuye. Estas diferencias pueden deberse a las propiedades fisicoquímicas que presentan ambas NPe.

4.3.9 Impacto de las propiedades fisicoquímicas sobre la adhesión y proliferación de osteoblastos

Los resultados descritos previamente permiten concluir que las Ti-NPeCarv suavizan y disminuyen la topografía en la nanoescala pudiendo ser esta la causa de que las muestras de Ti-NPeCarv aumenten la viabilidad de los fibroblastos. Por el contrario, las Ti-NPeTOH presentaron espesores variables y estructuras menos homogéneas y lisas que las Ti-NPeCarv. Esto pudo verse en la nanoescala y en los parámetros de R_{\max} y R_{isad} determinados en imágenes AFM de $400 \times 400 \text{ nm}^2$ y de $2 \times 2 \text{ }\mu\text{m}^2$, respectivamente. La mayor rugosidad en la nanoescala de las Ti-NPeTOH podría explicar la mayor proliferación de células pre-osteoblásticas sobre la superficie de Ti con el consecuente incremento de los parámetros de actividad osteogénica. Estudios previos demuestran que los osteoblastos muestran preferencia por superficies rugosas mientras que los fibroblastos prosperan mejor en estructuras más lisas [201].

De acuerdo con nuestros resultados, investigaciones anteriores han indicado una alta tasa de proliferación de células epiteliales y fibroblastos en superficies lisas [202] o superficies con nanorugosidad [203] donde se realizan procesos de deslizamiento. Kunzler *et al.* [204] especulan que la proliferación de osteoblastos se prefiere en estructuras superficiales localmente lisas, pero macroscópicamente rugosas. Adicionalmente, experimentos con osteoblastos de rata (RCO) y fibroblastos gingivales humanos (HGF) en un gradiente de rugosidad sobre aluminio también demostraron que los RCO mostraron una proliferación significativamente un mayor porcentaje con aumento de la rugosidad de la superficie, mientras que los fibroblastos mostraron una menor proliferación en sustratos más rugosos [204]. Por último, también se ha reportado que algunas superficies rugosas producen una mejor osteointegración *in vivo* que las superficies más lisas, lo que sugiere que la superficie modula la respuesta ósea, incluida

la diferenciación de osteoblastos, la deposición de matriz extracelular y la calcificación [205–207].

4.4 Conclusiones

A partir de los resultados de este Capítulo se pudo demostrar que es posible desarrollar NPe autoensambladas de TOH y Carv sobre la superficie de Ti por metodologías rápidas, sencillas y de bajo costo, como el método *dip-coating*.

Las Ti-NPeCarv y Ti-NPeTOH presentaron espectros ATR-FTIR semejantes que sugieren mecanismos similares de formación de las NPe sobre la superficie de Ti a partir de las soluciones de Carv y TOH. Los resultados ATR-FTIR demostraron que las NPe se forman por autooxidación de los grupos -OH a grupos cetónicos y por interacciones tipo puente de hidrógeno entre las moléculas de TOH o Carv entre ellas mismas y con el TiO₂. Sin embargo, diferentes tipos de interacciones entre las moléculas de TOH o Carv ocurren en estado líquido, lo cual conduce a la formación de NPe con diferentes propiedades.

Los resultados electroquímicos revelaron que las NPe se forman sobre la superficie de Ti modificando los valores del OCP respecto a los del control de Ti. Durante la formación de las NPe el registro de OCP se vuelve más positivo y se mantiene constante en el tiempo durante gran parte del proceso de formación de las NPe sugiriendo que la formación de la película modifica la formación de óxido sobre la superficie del metal.

La presencia de las NPe fue detectada a través de las variaciones en los registros de voltamperometría cíclica y en las curvas de Tafel, demostrando que las mismas son oxidadas en la superficie de Ti durante el barrido anódico. Los espectros ATR-FTIR obtenidos luego de la PA demostraron que las NPe presentan diferentes productos y grados de electro-oxidación, lo cual indica un comportamiento electroquímico diferencial entre ambos FF adsorbidos sobre el metal a partir de la inmersión en medio acuoso.

Además, se demostró que las NPe presentan un comportamiento diferencial cuando son sumergidas en soluciones de PBS. Por un lado, las Ti-NPeCarv se liberan de forma continua y constante en el tiempo hasta alcanzar un máximo de liberación a los 10 días. En cambio, las Ti-NPe-TOH producen 3 etapas de liberación que muestran saltos abruptos en la concentración del FF, lo cual sugiere diferentes procesos de hidratación, deshidratación y liberación de las moléculas de TOH.

Por AFM se demostró que ambas NPe no producen cambios topográficos detectables a grandes escalas de análisis ($20 \times 20 \mu\text{m}^2$). Sin embargo, la presencia de las mismas puede ser revelada en escalas menores por los parámetros de R_{max} y R_{isad} que disminuyen en presencia de las NPe. En escalas de $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ las NPe pueden ser localizadas y presentan estructuras compactas nanométricas en forma de parches discontinuos, ya que no recubren toda la topografía del sustrato. Además, en dichos “parches”, las NPe suavizan la superficie de Ti reduciendo significativamente los parámetros R_a , R_q , R_{max} y R_{isad} . Las NPe de Carv presentaron perfiles más suaves, compactos y homogéneos que las NPe de TOH y esta topografía en particular podría estar asociada al aumento de la viabilidad celular observada en el caso de los pre-osteoblastos.

Ambas NPe demostraron gran actividad antimicrobiana contra *S. aureus* logrando un efecto erradicador a las 24h e impidiendo el crecimiento de *biofilms* sobre la superficie de Ti hasta 48h. La actividad antimicrobiana fue detectada tanto a nivel fisiológico (demostrando que en presencia de las NPe las bacterias que se adhieren sobre ellas mueren) como en relación con la formación de *biofilms* (se redujo notablemente la capacidad de *S. aureus* para producir EPS en presencia de estas). La gran actividad antimicrobiana de las Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv estaría relacionada a la gran concentración superficial de los FF. Posteriormente la concentración a nivel de la superficie disminuye y las bacterias comienzan a adherirse y proliferar.

Por otra parte, las muestras de Ti-NPeTOH aumentan la citocompatibilidad y la actividad osteogénica de la superficie de Ti con células pre-osteoblásticas, favoreciendo el proceso de oseointegración en condiciones *in vitro*. En cambio, Ti-NPe-Carv disminuye la citocompatibilidad y la actividad osteogénica de la superficie del Ti y, a la vez, incrementan la proliferación de fibroblastos sobre las muestras de Ti-NPeCarv. Estos resultados sugieren que las muestras de Ti-NPeCarv podrían favorecer la encapsulación del implante por células fibroblásticas del tejido conectivo comprometiendo la oseointegración del implante en condiciones *in vivo*. Pero por otra parte podrían ser útiles en ciertos tratamientos dentales [208].

Por lo expuesto anteriormente, es posible concluir que las NPe autoensambladas de TOH y Carv constituyen superficies antibacterianas capaces de reducir e impedir la formación de *biofilms* sobre la superficie de Ti durante las primeras 48 horas, y por tanto útiles en tratamientos post cirugía. Sin embargo, solo Ti-NPeTOH presenta un efecto dual

o multifuncional donde no solo previenen la formación de *biofilms*, sino que además incrementan la citocompatibilidad y actividad osteogénica del Ti favoreciendo procesos de oseointegración del implante.

Dadas las características específicas de las NPe formadas por TOH o Carv, se podría considerar el uso de Ti-NPeCarv o bien Ti-NPeTOH para ajustar las propiedades fisicoquímicas específicas para el sistema biológico

Capítulo 5: Desarrollo de redes metal-fenólicas sobre la superficie de Ti.

5.1 Introducción

El desarrollo de MPN es un proceso económico, sencillo, versátil, escalable industrialmente y reproducible por lo que se torna atractiva su aplicación en biomedicina. Existen diferentes métodos para sintetizar MPN los cuales requieren de 3 componentes básicos: un FF, un ion metálico y un solvente acuoso con $\text{pH} > 7$ (preferentemente una solución buffer). El proceso más empleado por su sencillez, ya que requiere un solo paso, es la autooxidación y polimerización de los FF en coordinación con iones metálicos en soluciones buffer alcalinas, donde el proceso de formación de las MPN es espontáneo [68]. Las MPN son redes complejas, de estructura cristalina, composición definida y permeables por la presencia de poros o canales que son formados por la coordinación de FF con iones metálicos, siendo el AT y el ion Fe^{3+} los más utilizados. La superficie de diferentes sustratos, en particular el Ti, se puede recubrir con las MPN a medida que las mismas se van formando en solución. Para esto, simplemente se coloca la muestra de Ti en la misma solución donde se forman las MPN y, a medida que estas se van formando, también se van adhiriendo sobre la superficie del sustrato [55,66,209].

Existen procedimientos de adhesión de MPN sobre superficies que involucran 2 o más pasos. Por ejemplo, se pueden formar las MPN en solución y luego, una vez formadas, se pueden adherir sobre una superficie mediante procesos secuenciales de “*spraying*” utilizando atomizadores [210]. También se puede ir cubriendo la superficie del sustrato gota a gota con las MPN formadas en solución mediante el empleo de jeringas o pipetas Pasteur como primer paso, seguido de un secado rápido en estufa a alta temperatura para que la MPN se adhiera sobre la superficie [211]. Asimismo, se han reportado procesos de polimerización sobre superficies de las MPN ya formadas empleando radiación UV [212,213].

Otro procedimiento utilizado es la deposición capa por capa o *layer by layer* donde el sustrato se expone varias veces a la solución con MPN para formar varias capas de esta sobre su superficie [214]. Por último, también se pueden adherir las MPN formadas en solución sobre un sustrato utilizando procesos electroforéticos [215,216]. El detalle de estas técnicas puede encontrarse en el trabajo de revisión sobre esta temática que ha realizado recientemente nuestro grupo de trabajo [65].

Las MPN adquieren diferentes propiedades y aplicaciones de acuerdo a sus FF constituyentes. Entre las propiedades de las MPN se destaca su adhesividad, que permite recubrir superficies de diferentes sustratos, tal como se mencionó en el Capítulo 1. En el caso particular de las MPN desarrolladas sobre biomateriales, se ha demostrado que MPN formadas por AG o AT con iones Fe^{3+} sobre superficies de Ti aumentan la biocompatibilidad y mejorar los procesos de oseointegración tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* en modelos animales [74,75]. También se reportaron efectos similares para MPN de AT y Fe^{3+} desarrolladas sobre materiales biodegradables de Mg [217,218].

Sin embargo, poco se conoce de los efectos antimicrobianos, de la citocompatibilidad y de su interacción durante el proceso de osteogénesis de MPN de PG y AG desarrolladas con iones Mg^{2+} . Si bien Geißler *et al.* [219] desarrollaron MPN utilizando PG y Mg^{2+} a pH de 7,4 sobre materiales de Ti grado IV y proveyeron información valiosa acerca de la estructura del *coating* formado y de la optimización del proceso de síntesis de la MPN, dichos autores no investigaron su actividad antimicrobiana ni su citocompatibilidad.

El AG es un componente esencial de la corteza de muchos árboles, como el roble, y de las hojas del té. Sin embargo, es común encontrarlo polimerizado en forma de esteres (catequinas o galatos) o taninos. Por otra parte, el PG es un derivado descarboxilado del AG que forma parte de la estructura del AT y de algunas antocianinas y catequinas. Las estructuras del AG y PG se presentan en la Figura 5.1. Tanto el AG como el PG presentan 3 grupos -OH capaces de desprotonarse parcialmente a $\text{pH} > 7$ para adquirir carga negativa, lo cual permite que en presencia de iones Mg^{2+} se formen MPN acorde a los mecanismos detallados en el Capítulo 1.4.2.2 y Figuras 1.5 y 1.6.

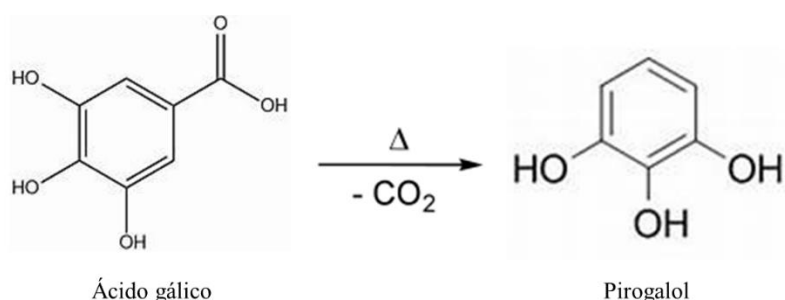


Figura 5.1. Estructuras fenólicas del AG y PG. Se muestra el proceso de descarboxilación del AG para obtener PG.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, la información sobre la formación de las MPN de PG y AG se centra fundamentalmente en aquellos procesos desarrollados con

iones Fe^{3+} , siendo escasa la correspondiente a las redes coordinadas con iones Mg^{2+} así como del uso de mezclas de FF (PG + AG). Dada la simplicidad, reproducibilidad y bajo costo de la técnica de un único paso y su posibilidad de escalado a nivel industrial, este Capítulo se enfoca en el desarrollo de MPN con iones Mg^{2+} . Se utilizarán tanto PG, AG como su mezcla AG+PG. Los objetivos de las investigaciones realizadas fueron los siguientes:

1. Desarrollar MPN de PG, AG y mixtas (PG+AG) en coordinación con Mg^{2+} sobre superficies de Ti a través de una metodología simple de autooxidación espontánea en solución alcalina y en un único paso.
2. Estudiar las características fisicoquímicas de la película a través de espectroscopía UV-visible y ATR-FTIR, registros de OCP, voltamperometrías cíclicas, curvas de Tafel, microscopía por AFM y evaluación de los parámetros de rugosidad e hidrofiliidad.
3. Evaluar su actividad antimicrobiana contra *S. aureus* (recuento de UFCs/cm², Live/Dead, evaluación de la formación de EPS).
4. Evaluar la posible sinergia en la actividad antimicrobiana de las MPN cuando se utiliza simultáneamente un antibiótico (amikacina).
5. Analizar su citocompatibilidad en dos líneas celulares (fibroblásticas y pre-osteoblásticas) y actividad osteogénica (producción de colágeno Tipo I, FAI y mineralización,) en las células pre-osteoblásticas en condiciones *in vitro*.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Preparación de las muestras de Ti

Se utilizaron muestras de Ti grado II provistas por NMM Machinery Manufacturing Co. Ltd., (Guangdong, China), las cuales fueron cortadas en discos de 10 mm de diámetro y 1 mm de espesor. Los discos de Ti fueron previamente pulidos mecánicamente mediante sucesivos pasos utilizando papel abrasivo de P320, P400 y P600 durante 5 min en cada una. Posteriormente, fueron pulidos químicamente sumergiéndolos en una solución de HF (48%wt):HNO₃(70%wt):H₂O (relación 1:3:10) durante 30 segundos. Finalmente, fueron lavados minuciosamente en agua Milli-Q y posteriormente sonicados durante 2 min para eliminar de la superficie de Ti todos los residuos remanentes del pulido.

5.2.2 Formación de las MPN sobre Ti

Para el desarrollo de las MPN sobre Ti, se seleccionaron el PG, AG y mezclas equimolares de ambos FF. Como ion metálico de coordinación se estudió al Mg^{2+} .

El desarrollo de las MPN se realizó de la siguiente manera:

1. Se prepararon soluciones de los siguientes FF: (a) 10 mM de PG, (b) 10 mM de AG y (c) 10 mM de AG + 10 mM de PG disueltos en buffer 0,1 M de Tris-HCl (pH = 9) y se utilizaron (a), (b) o (c) inmediatamente después de su preparación para preparar las MPN respectivas.
2. Se colocaron 15 mL de cada solución con FF en vasos de precipitado.
3. Se adicionó $MgCl_2$ (concentración final de 0,1 M) y se determinó el pH final de reacción.
4. Se colocaron las muestras de Ti en el fondo del vaso de precipitado y se mantuvieron protegidas de la luz durante 4 h y a temperatura ambiente para que se produzca la formación de las MPN en la solución y se depositaran en la muestra de Ti.
5. Trascurrido dicho tiempo, las muestras de Ti fueron lavadas en agua Milli-Q para eliminar moléculas y restos de MPN que no estuvieran fuertemente adheridas sobre la superficie de Ti.
6. Se desarrollaron muestras de Ti recubiertas con las distintas MPN a las que se denominó con los siguientes acrónimos para identificarlas: Ti-MPN-PG (Ti + MPN desarrollada con PG+ Mg^{2+}), Ti-MPN-AG (Ti + MPN desarrollada con AG+ Mg^{2+}) y Ti-MPN-AG+PG (Ti + MPN desarrollada con AG+PG+ Mg^{2+}).
7. Se utilizaron muestras de Ti pulido sin MPN como muestras control (Ti control).

El protocolo fue desarrollado, adaptado y modificado a partir de lo reportado en un artículo previo realizado con Ti grado IV [219]. En este trabajo se estudiaron los tiempos de reacción, el pH y las concentraciones de las sales metálicas con el fin de establecer las condiciones óptimas para desarrollar MPN estables, compactas, rígidas y de espesor nanométrico uniforme sobre las superficies de Ti grado IV.

5.2.3 Caracterización fisicoquímica de las diferentes MPN obtenidas

Durante el periodo de 4 h de formación de las MPN se evaluaron los cambios en el color de la solución y se tomaron distintas alícuotas de 100 μ L de la solución de reacción antes del agregado de Mg^{2+} (paso 3 del protocolo) y a diferentes tiempos de

incubación (de 0 a 4 h) con el propósito de seguir la reacción por espectroscopía UV-visible en el rango de 200 a 700 nm. También se registraron espectros del PG y AG puros en suspensiones de agua ultrapura (Milli-Q).

Una vez finalizado el proceso de formación de las MPN, las muestras de Ti control, Ti-MPN-PG, Ti-MPN-AG y Ti-MPN-AG+PG fueron caracterizadas fisicoquímicamente por espectroscopia ATR-FTIR, microscopia AFM y determinándose la hidrofiliidad de la superficie mediante un goniómetro.

Para evaluar el proceso de formación de las diferentes MPN sobre la superficie de Ti se registró el OCP durante la síntesis de las mismas y la formación de la película (4 h) (electrolito: buffer Tris-HCl + FF + Mg^{2+}).

Se analizó el comportamiento electroquímico de las MPN obtenidas por NEC. Se obtuvieron curvas de Tafel de las diferentes muestras polarizando en la región -1 V a 1 V con una velocidad de barrido de 1 mV/s y en presencia de KCl 5 mM como electrolito. A partir de los resultados, se calcularon los valores de E_{corr} e i_{corr} . Los voltamperogramas se obtuvieron realizando las voltamperometrías cíclicas de las diferentes muestras de Ti desde -1 V a 2 V con una velocidad de barrido de 50 mV/s y utilizando soluciones de 5 mM KCl como electrolito.

La estabilidad y liberación de las MPN desde la superficie de Ti al medio se estudió colocando las diferentes muestras en soluciones de PBS durante diferentes tiempos. Se tomaron espectros UV-visible para detectar productos de liberación y también se tomaron imágenes AFM para ver modificaciones topográficas en las MPN adheridas sobre Ti a través del tiempo.

5.2.4 Ensayos antimicrobianos

Para evaluar la acción antimicrobiana contra *S. aureus* de las MPN formadas sobre la superficie de Ti se realizaron los siguientes ensayos descritos en el Capítulo 3.1) se determinó el halo de inhibición de crecimiento bacteriano en placa de Petri, 2) se evaluó la colonización y adherencia inicial de las bacterias enumerando la formación de UFC/cm² a 3 h de exposición, 3) se evaluó el efecto antibiofilms a 24 h de exposición (biofilm temprano), 4) se evaluó y cuantificó el estado fisiológico de las bacterias adheridas sobre las diferentes superficies por la tinción de Live/Dead, y 5) se cuantificó la producción de EPS por la tinción de Sypro Ruby.

También se evaluaron efectos antimicrobianos sinérgicos entre las diferentes MPN y la amikacina, un antibiótico de amplio espectro utilizado comúnmente para tratar

infecciones nosocomiales e infecciones de prótesis. La amikacina se utilizó en concentración de 5 mg/mL en medio de cultivo. Dicha concentración es la más utilizada en la clínica médica para tratar y curar infecciones y está demostrado que tiene gran efecto bactericida contra diferentes cepas bacterianas, entre ellas *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

5.2.5 Ensayos de citocompatibilidad celular

Para determinar la citocompatibilidad de las muestras de Ti-MPN-PG, Ti-MPN-AG y Ti-MPN-AG+PG, se determinó el área cubierta por células fibroblásticas (L929) y pre-osteoblásticas (MC3T3-E1) por tinción con naranja de acridina luego de 1, 2, 5 y 7 días de incubación. También se determinó la actividad osteogénica de las superficies en estudio a través de la cuantificación de producción de FAI, colágeno tipo I y mineralización por depósitos de calcio, como se detalla en el Capítulo 3.2.

5.2.6 Análisis estadísticos

Todos los ensayos presentados en este Capítulo fueron realizados al menos por triplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA (test de Bonferroni) previamente confirmada la normalidad de los datos con un nivel de confianza del 95%.

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Evaluación de la formación de las MPN por cambios de coloración de la solución y espectroscopía UV-visible

Como se mencionó anteriormente, las MPN se forman por coordinación de FF con iones metálicos constituyendo redes de estructuras cristalinas y porosas con diferentes propiedades y tamaños. Ejima *et al.*[68] describieron por primera vez la formación de las MPN entre el AT en coordinación con Fe^{3+} . Reportaron que las MPN formadas presentaban tamaños desde los 100 nm hasta 10 μm con formas cristalinas planas, esféricas y elipsoidales. Además, describieron que la formación de las MPN puede observarse a simple vista por cambios en la coloración de la solución de reacción. Al formarse las MPN, la solución toma color anaranjado o rojo intenso y esos cambios se pueden detectar por espectroscopia UV-visible, ya que presentan picos de absorbancia entre los 400-550 nm [55,68].

En la Figura 5.2 se muestran los espectros UV-visibles del PG, AG y AG+PG puros disueltos en agua y a pH 8,5. El PG presenta máximos de absorbancia a 241 y 319 nm, el AG a 210 y 260 nm y la mezcla de AG+PG a 210, 260 y 319 nm. Estos resultados

son coincidentes con los *screenings* realizados de los espectros UV de estos FF a diferentes pH [212,220].

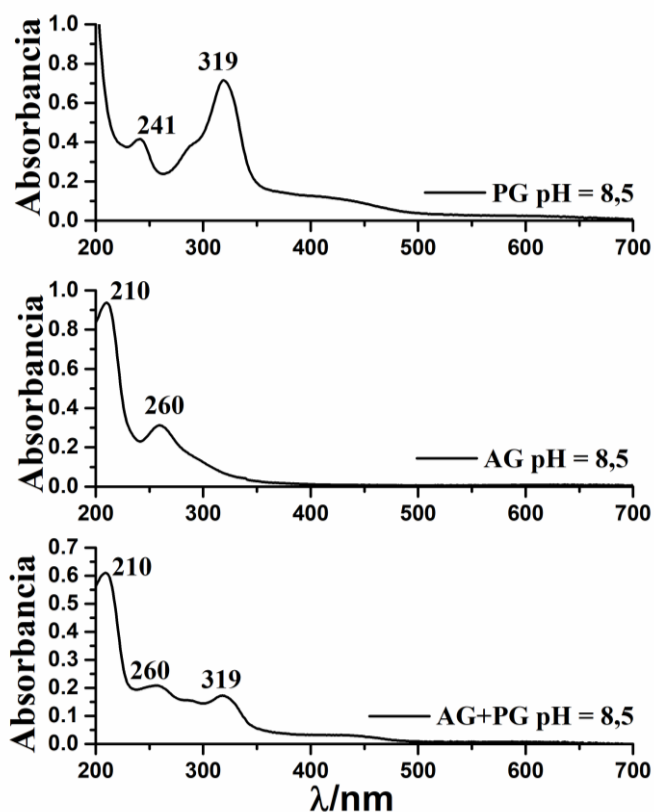


Figura 5.2. Espectros UV-visibles para soluciones acuosas de PG, AG y AG+PG a pH = 8,5.

5.3.1.1 Formación de las MPN de PG:

En la Figura 5.3 se muestran los cambios de coloración de la solución de reacción en la cual se forman las MPN y luego se depositan sobre las superficies de Ti. En la imagen 5.3-A se observa el color amarillo del PG disuelto en el buffer de 0,1 M Tris-HCl. La solución presenta dos máximos de absorbancia a 241 y 319 nm detectados por espectroscopía UV-visible (Figura 5.4). Estos picos son coincidentes a los determinados para el PG puro disuelto en agua, lo cual indica que el buffer Tris-HCl no afecta la estabilidad del PG. Con el agregado de Mg^{2+} (considerado $t = 0$) se observa un cambio inmediato de coloración en la solución hacia un anaranjado tenue (Figura 5.3-B). El espectro UV a este tiempo muestra el desplazamiento de los picos de 241 y 319 nm a valores de 235 y 331 nm respectivamente, y aparece una nueva señal de absorbancia a 420 nm (ver Figura 5.4, $t = 0$). Los cambios de coloración y la presencia de un máximo de absorbancia a 420 nm indican que las MPN de PG comienzan a formarse a $t = 0$ cuando

se agregan las sales de Mg^{2+} . Similares resultados se obtuvieron para MPN de AT con Fe^{3+} [68,70,221].

Luego de 30 minutos de reacción, el espectro UV de la solución de MPN de PG y el color de la misma no muestran cambios. Sin embargo, a partir de 1 hora de reacción y hasta finalizar (4 h), la solución presenta un color rojo intenso (Figura 5.3-C). Por otra parte, el espectro UV-visible muestra máximos de absorbancia bien definidos a 326 y 404 nm, mientras que la señal de 241-235 nm desaparece (Figura 5.4, $t = 1, 2$ y 4 h). Esto indicaría que la mayor parte del PG presente originalmente en la solución estaría formando parte de las MPN. Por otra parte, los espectros UV se mantienen constantes a partir de 1 h de reacción, lo cual sugeriría que el proceso de formación de las MPN se mantiene constante en el tiempo.

Además, se observó una gran cantidad de estructuras cristalinas de las MPN formadas flotando en la solución (Figura 5.3-C, flecha roja). Cabe mencionar que no se notaron variaciones significativas en el pH de la solución durante la formación de las MPN de PG.

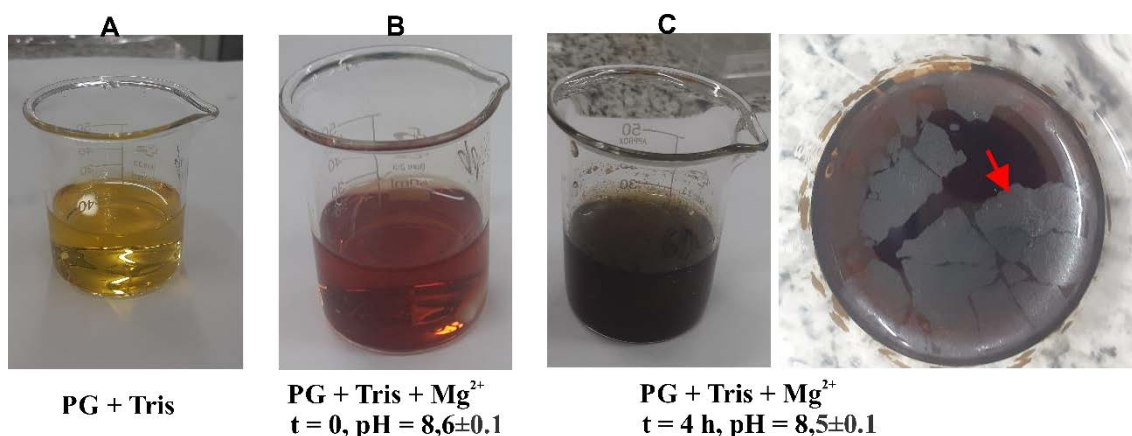


Figura 5.3. Cambios de color producidos en la solución de reacción a medida que se forman las MPN de PG. A) Solución de PG disuelto en buffer 0,1 M Tris-HCl. B). Inicio de la formación de las MPN de PG ($t = 0$) cuando se adiciona Mg^{2+} . C) Final de reacción ($t = 4$ h) de la formación de las MPN de PG. En la foto de la derecha se muestra la vista superior de la solución, donde pueden observarse estructuras cristalinas de gran tamaño correspondientes a las MPN formadas (flecha roja).

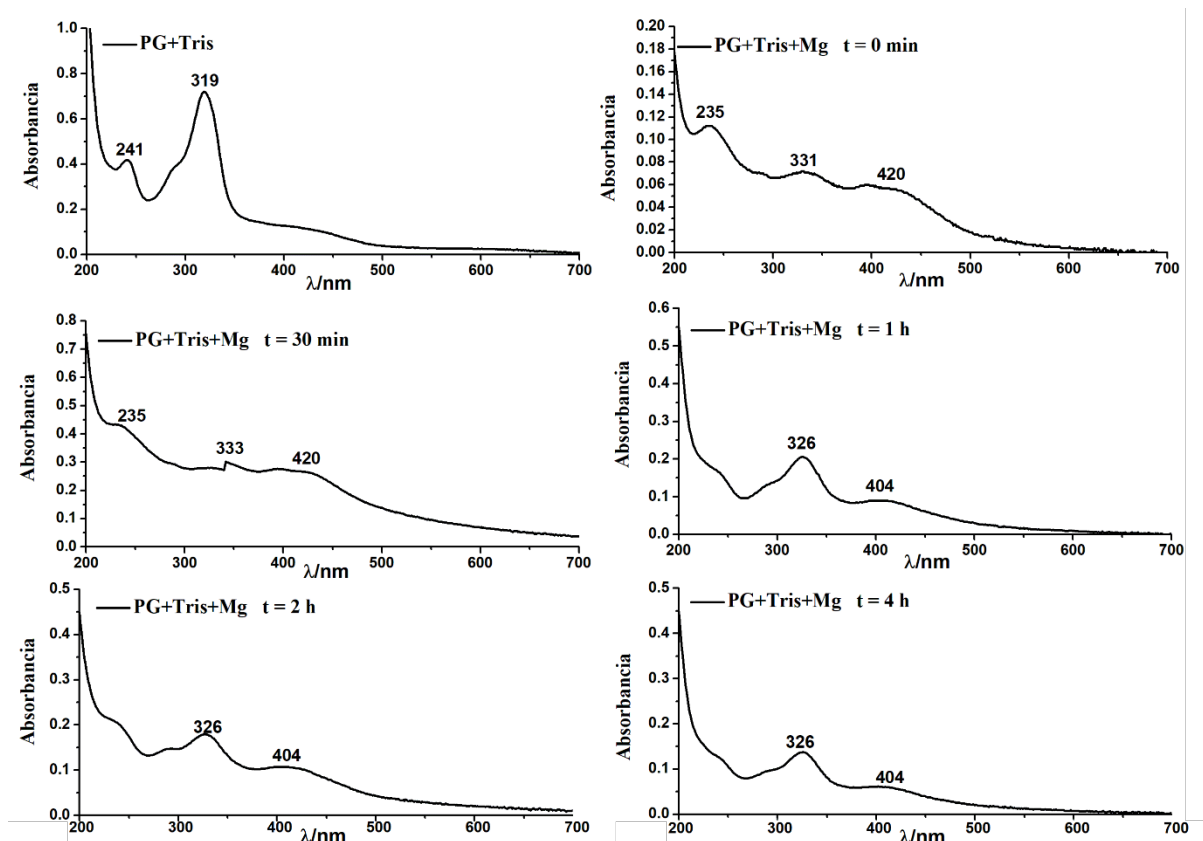


Figura 5.4. Espectros UV-visibles tomados a diferentes tiempos durante la formación de las MPN de PG.

5.3.1.2 Formación de las MPN de AG:

En la Figura 5.5 se muestran los cambios de coloración de la solución de reacción durante la formación de las MPN de AG que se depositan sobre la superficie de Ti. La solución de AG + buffer Tris-HCl presenta coloración verde (Figura 5.5-A) típica del AG a $\text{pH} > 7$ [222], y el espectro UV-visible muestra máximos de absorbancia a 210 y 260 nm en coincidencia con el espectro de AG disuelto en agua (Figura 5.6). A diferencia de las MPN de PG, cuando se adiciona la sal de Mg^{2+} ($t = 0$) no se produce inmediatamente un cambio de coloración de la solución. Se observó, en cambio, que la solución para la formación de las MPN de AG cambia de color verde a anaranjado tenue a partir de las 2 h de reacción (Figura 5.5-B). Asimismo, los espectros UV-visibles tomados a tiempo $t=0$, 30 min y 1 h tampoco cambian en comparación al espectro correspondiente a AG + buffer Tris-HCl (ver Figura 5.6). A partir de las 2 h de reacción, la variación en la coloración también viene acompañada con modificaciones en el espectro UV donde pueden notarse máximos de absorbancia a 260 y 423 nm (Figura 5.6, $t = 2$ y 4 h). Estos cambios se mantienen hasta finalizar la reacción, indicando que la formación de las MPN de AG es

un proceso constante desde las 2 h hasta 4 h. Además, en la solución final de formación de las MPN de AG se observan estructuras cristalinas flotando (Figura 5.5-C, flecha roja).

A diferencia del proceso de formación de las MPN de PG, la correspondiente a MPN de AG es más lenta, ya que los cambios en coloración y en los espectros UV asociados al desarrollo de las MPN ocurren a partir de las 2 h de reacción. Además, la solución final de reacción de las MPN de AG presenta color anaranjado con formación de pequeñas estructuras flotantes de MPN. Estos resultados contrastan con lo observado para las MPN de PG, para las que, después del mismo tiempo de reacción, la solución se torna roja intensa y presenta MPN de gran tamaño flotando en su superficie.

Al igual que en las MPN de PG, no se detectaron cambios significativos del pH a lo largo de la reacción, manteniéndose a valores cercanos a 8,5; excepto al final de la reacción donde el valor descendió a 8,3.

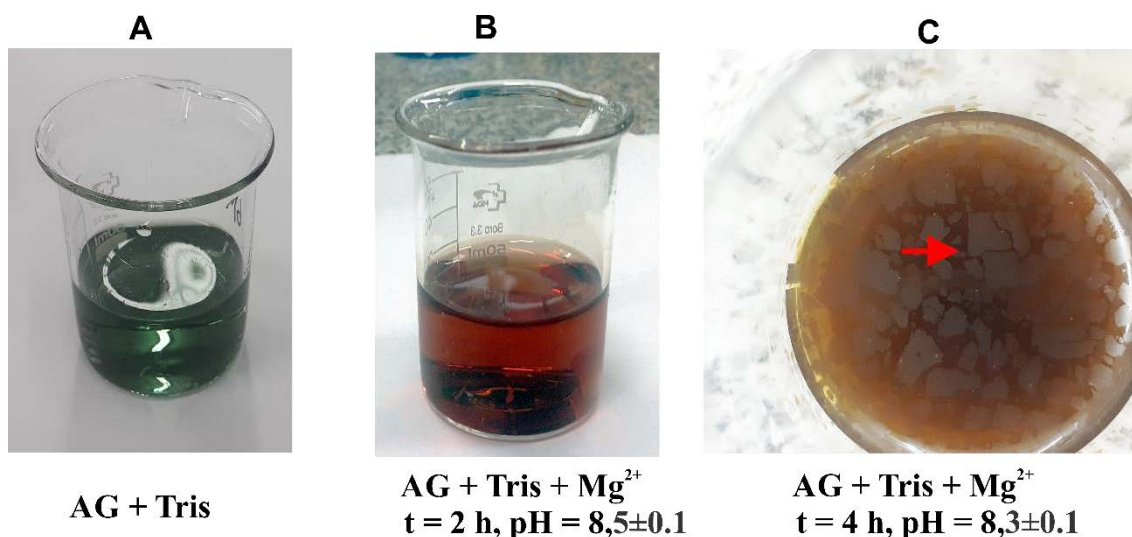


Figura 5.5. Cambios de color producidos en la solución de reacción a medida que se forman las MPN de AG. A) Solución de AG disuelto en buffer 0,1 M Tris-HCl (t = 0). B) Después de 2 h de formación de las MPN de AG. C) Después de 4 h (fin de la reacción) de formación de las MPN de AG, donde pueden observarse las estructuras cristalinas de las MPN formadas (flecha roja).

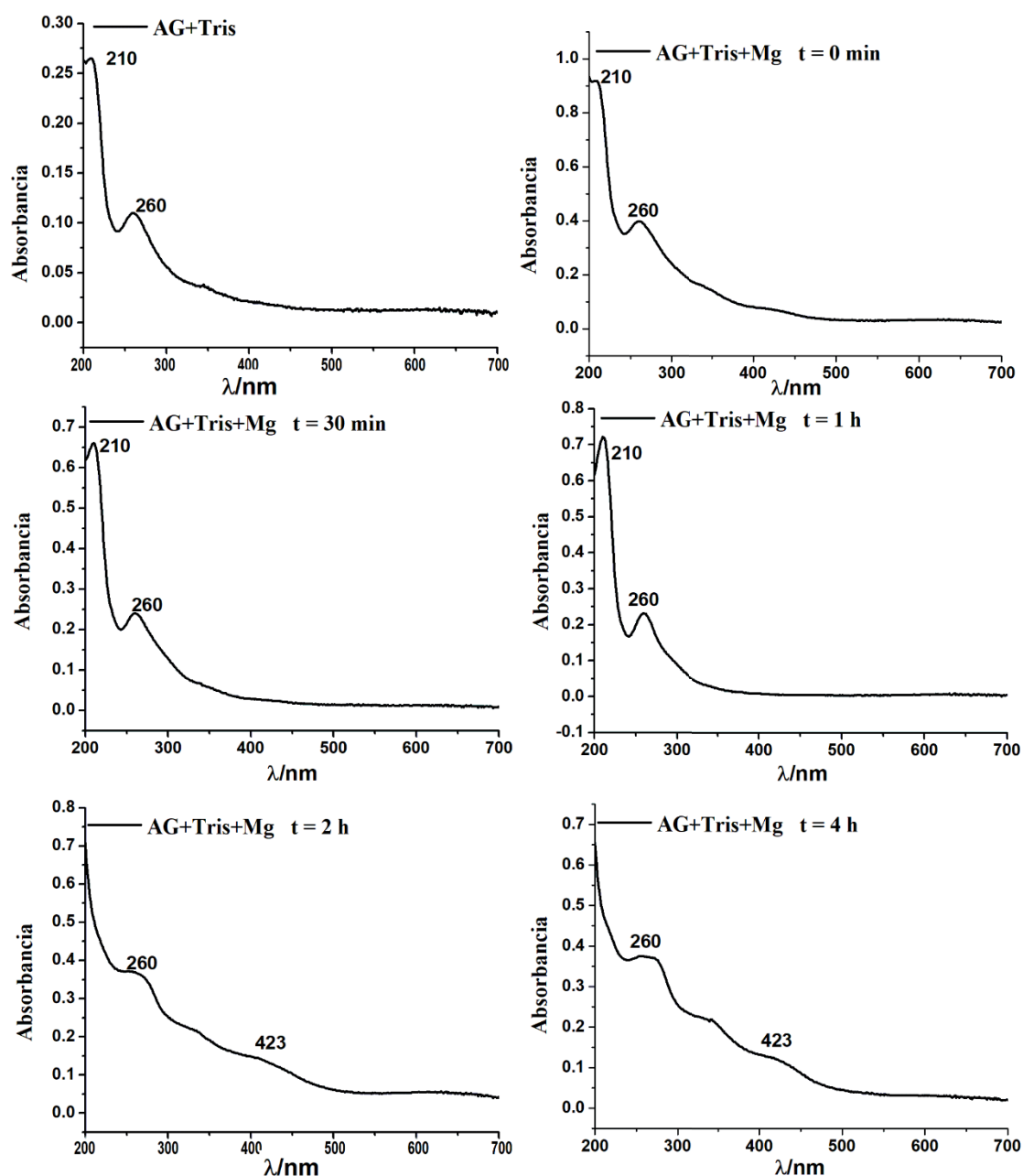


Figura 5.6. Espectros UV-visibles tomados a diferentes tiempos durante la formación de las MPN de AG.

5.3.1.3 Formación de las MPN de AG+PG:

La formación de MPN ha sido recientemente evaluada para diferentes FF y iones [223–225], pero las MPN mixtas con dos o más FF interactuando entre sí y con iones metálicos ha sido poco estudiada. Por ese motivo se evaluó también la formación de MPN mixtas combinando cantidades equimolares de AG y PG coordinadas con iones Mg^{2+} .

Los cambios en la coloración de la solución de formación de las MPN de AG+PG y los espectros UV-visibles tomados a lo largo de la reacción presentaron resultados intermedios o combinados a los ya descritos para las MPN individuales de AG y PG.

Al igual que las MPN de PG, la solución de AG+PG+Tris presentó una coloración amarilla (Figura 5.7-A), a diferencia de la correspondiente a solo AG que era verde. Asimismo, para las MPN de AG+PG el cambio de color de amarillo a anaranjado tenue fue inmediato al adicionar la sal de Mg^{2+} (Figura 5.7-B, $t = 0$). Finalmente, a $t = 4$ h la solución presentó color rojo intenso (Figura 5.7-C). Estos resultados sugieren que durante la formación de las MPN de AG+PG predominan los cambios de coloración reportados para el PG solo. Sin embargo, a diferencia de las MPN de AG o PG individuales, las MPN de la mezcla AG+PG no presentaron estructuras cristalinas flotando en la superficie de la solución, sino que estas estructuras se encontraron en forma de precipitado en el fondo del vaso de precipitados y fuertemente adheridas al vidrio (Figura 5.7-D).

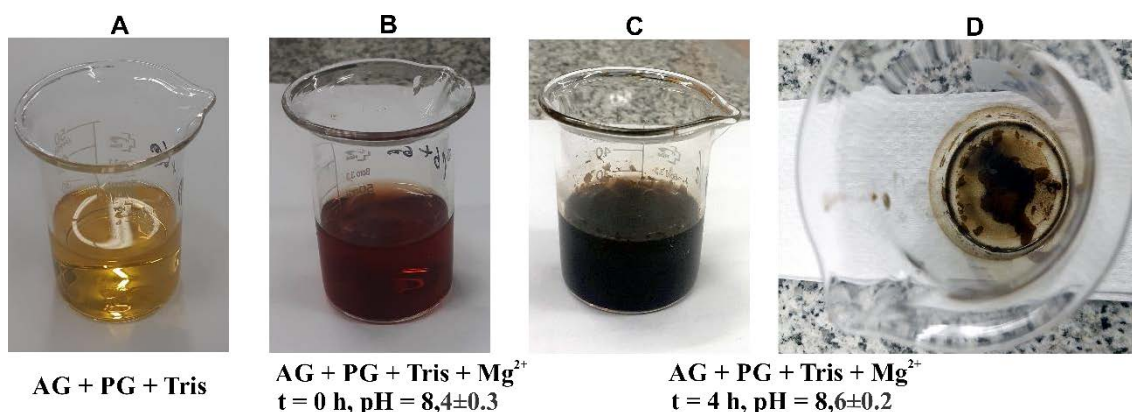


Figura 5.7. Cambios de color producidos en la solución de reacción a medida que se forman las MPN de AG+PG. A) Solución de AG+PG disuelto en buffer 0,1 M Tris-HCl. B) Agregado del Mg^{2+} , $t = 0$, inicio de la formación de las MPN de AG+PG. C) Después de 4 h (fin de la reacción) de la solución de formación de las MPN de AG+PG. D) Fondo del vaso de precipitado donde pueden observarse estructuras cristalinas de las MPN formadas y precipitadas, fuertemente adheridas al vidrio, al finalizar la reacción.

En cuanto a los espectros UV-visibles de las MPN de AG+PG, se observaron espectros que parecían ser la combinación de los de AG y PG (Figura 5.8). Inicialmente la solución de AG+PG+Tris presentó máximos de absorbancia a 210 y 260 nm al igual que el AG y a 319 nm similares a los de PG disuelto en agua. A $t = 0$, con el agregado de Mg^{2+} , se observan los picos de 210, 260 y 423 nm del AG y el pico de 331 nm del PG. Estos resultados son coincidentes con el cambio de coloración que sucede al inicio ($t = 0$)

de reacción, lo que indica que las MPN de AG+PG comienzan su formación en ese momento, al igual que sucede en el caso de las redes de PG. Los espectros obtenidos a 30 min y 1 h y 2 h son idénticos, con máximos de absorbancia de MPN de AG (210, 260 y 423 nm) y de MPN de PG (326 nm). Para el tiempo final de reacción (4 h), se encontró el pico de 260 y 423 nm asociado al AG y un pico poco definido a 326 nm coincidente con el observado para las MPN de PG. Estos resultados sugieren que los espectros UV para la formación de las MPN de AG+PG presentan comportamientos intermedios entre las MPN de AG y PG individuales, pero predominaron los máximos de absorbancia similares a los encontrados para las MPN de AG (de las MPN de PG solo se observan los picos de 331 y 326 nm).

Puede notarse que las modificaciones en la coloración de la solución se asemejan más a los reportados para las MPN de PG, sin embargo, los cambios en los espectros UV-visibles son similares a los encontrados para las MPN de AG. Si se observan los espectros de las muestras de MPN de PG, el pico a 326 nm es prominente y bien definido. En cambio, en las MPN de AG+PG este pico es menos definido y más achatado. A partir de estos resultados, se puede inferir que el agregado de PG acelera el proceso de formación de las MPN de AG+PG, ya que se demostró que en presencia exclusiva de AG el inicio del proceso de formación de las MPN se detecta luego de 2 h.

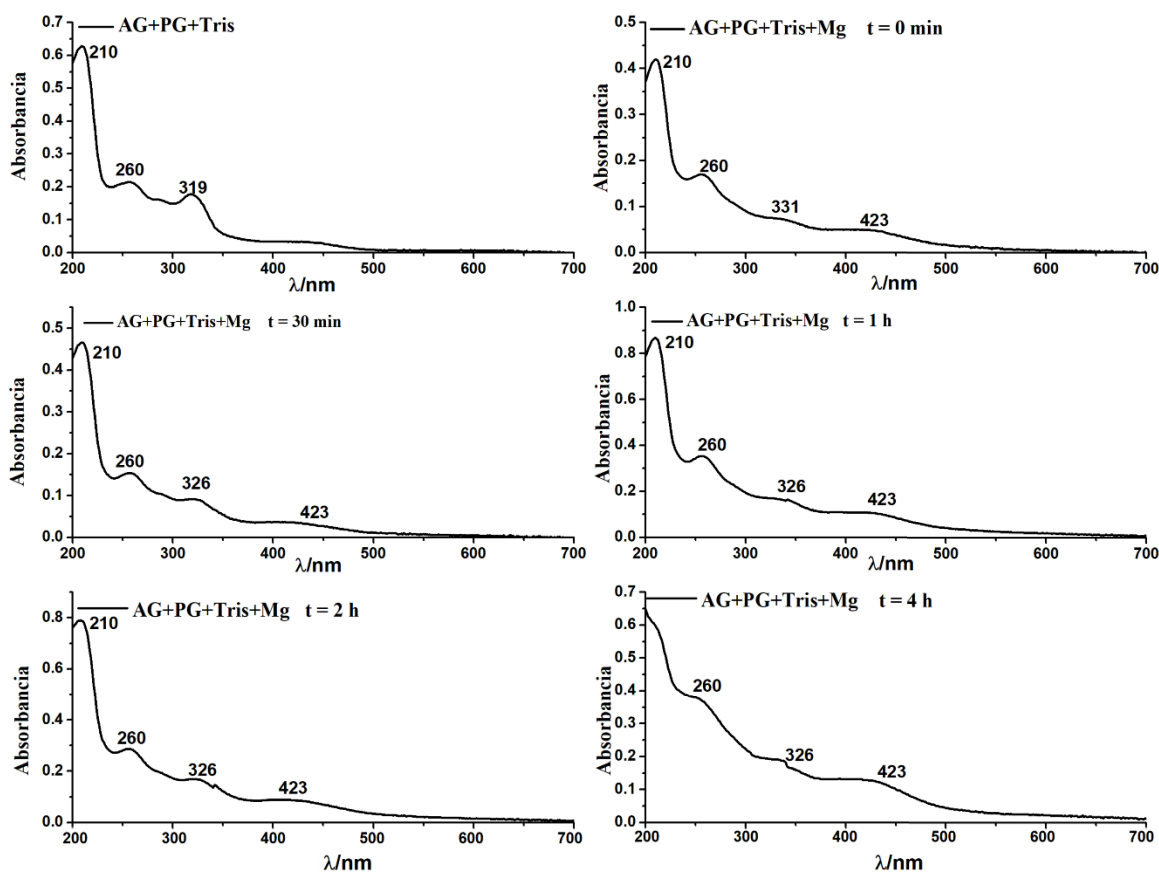


Figura 5.8. Espectros UV-visibles tomados luego de diferentes tiempos durante la formación de las MPN de AG+PG.

5.3.2 Caracterización por ATR-FTIR

Una vez formadas las MPN sobre la superficie de Ti, las mismas fueron caracterizadas por espectroscopía ATR-FTIR y los resultados comparados con los espectros obtenidos del PG y AG puros (Figura 5.9).

El espectro de PG puro (Figura 5.9-A) muestra señales similares a las reportadas por otros autores [226,227]. Las contribuciones de los grupos -OH fueron detectadas en el rango de 3370 a 3050 cm^{-1} , la señal a 1610 cm^{-1} puede atribuirse al estiramiento del C=C, mientras que los picos en la región de 1519-1400 cm^{-1} pueden asociarse a la flexión de los grupos -CH. Las señales entre 1300 y 990 cm^{-1} corresponden al estiramiento del grupo C-O, mientras que el pico en 763 cm^{-1} estaría ligado a las vibraciones del -CH fuera del plano.

El espectro ATR-FTIR para las muestras de Ti-MPN-PG (Figura 5.9-B) presentó cambios con relación al PG puro y una reducción en la cantidad de señales que indican la formación de la MPN. En primer lugar, se observa un corrimiento de las señales de -OH

formando un pico muy ancho y prominente a 3260 cm^{-1} y una señal débil a 2995 cm^{-1} . Al igual que en las NPe autoensambladas de TOH y Carv, esto puede explicarse considerando que los grupos -OH del PG están interactuando entre ellos para conformar la red y con el TiO_2 mediante la formación de enlaces de tipo puente de hidrógeno. El estiramiento del doble enlace $\text{C}=\text{C}$ se detectó a 1630 cm^{-1} y un pico muy débil a 1519 cm^{-1} asociado a flexión de los grupo -CH. La región de los grupos C-O, comprendida entre $1300\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ para los FF, presentó grandes cambios que indicarían la polimerización del PG para formar las MPN sobre Ti. Por un lado, la señal del estiramiento del C-O se vio desplazada a 1392 cm^{-1} lo cual ha sido reportado para la auto-polimerización espontánea de PG sobre Ti [228]. Además, se detectó un nuevo pico a 1042 cm^{-1} correspondiente a la formación de enlaces tipo éter (C-O-C). Estos resultados sugieren que la formación de las MPN de PG sobre Ti involucra la polimerización de las moléculas de PG mediante la formación de enlaces tipo éter. Sin embargo, la señal de -OH aún es detectada, indicando que la oxidación para formar enlaces tipo éter no es completa y/o que hay interacciones de tipo puente hidrógeno entre las MPN y el TiO_2 de la superficie metálica.

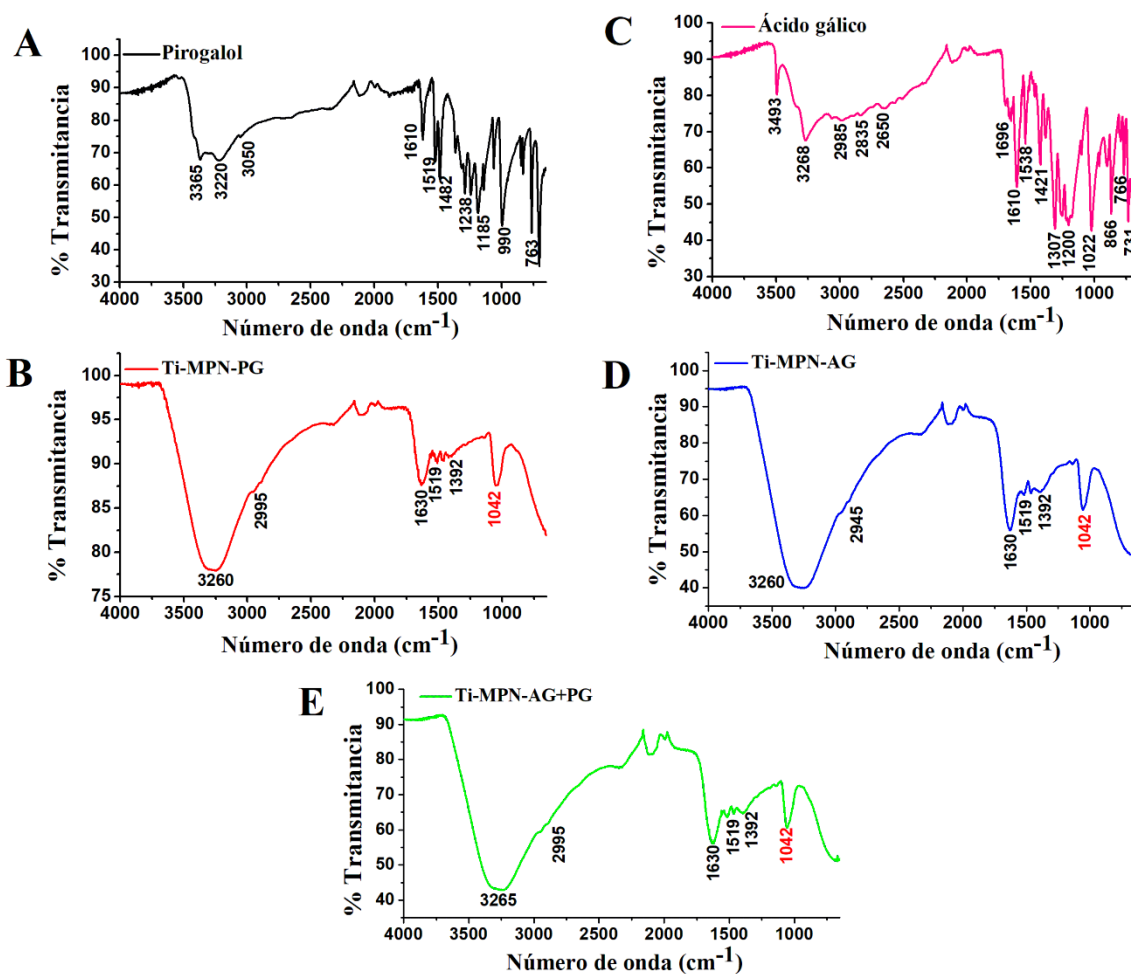


Figura 5.9. Espectros ATR-FTIR obtenidos para A) PG puro, B) AG puro, C) Ti-MPN-PG, D) Ti-MPN-AG, y E) Ti-MPN-AG+PG.

Por otra parte, el espectro obtenido para el AG puro presentó las señales típicas ya reportadas en la literatura para este FF (Figura 5.9-C) [229]. Los grupos -OH presentaron una señal amplia a 3268 cm⁻¹ y varias contribuciones más débiles entre 3000-2600 cm⁻¹. El -OH del grupo carboxilo podría identificarse con los picos en 3493 y 1696 cm⁻¹. Las señales del grupo ácido (-COOH) se detectaron a 1538 y 1200 cm⁻¹ y la del grupo -C=O dentro grupo ácido se observó a 1610 cm⁻¹. Si bien el pico en 1610 cm⁻¹ está reportado para la vibración del C=C del anillo fenólico de varios FF, también ha sido atribuido al grupo -C=O del grupo carboxilo para el AG, AT y diferentes catequinas y epicatequinas en señales comprendidas entre 1620-1610 cm⁻¹ [230]. El estiramiento del grupo C-O se reveló a través de los picos a 1307 y 1022 cm⁻¹. Finalmente, las vibraciones del anillo fenólico presentaron contribuciones a 1421, 866, 766 y 731 cm⁻¹.

Los espectros obtenidos para las muestras de Ti-MPN-AG y Ti-MPN-AG+PG (Figura 5.9-D y E, respectivamente) mostraron las mismas señales que las obtenidas con Ti-MPN-PG, lo cual indica que el resultado final del proceso de autoensamblado y polimerización de las moléculas de PG, AG o AG+PG entre sí para formar las diferentes MPN sobre Ti es similar y expone los mismos grupos funcionales sobre la superficie. Esto podría explicarse considerando la similitud estructural de ambos FF (ver Figura 5.1).

Los resultados presentados previamente permitirían inferir que, al igual que las MPN-PG, las redes que contienen AG, es decir MPN-AG y MPN-AG+PG, se forman sobre Ti por la auto-polimerización del AG o AG+PG que involucra la oxidación de grupos -OH a grupos éteres y por la interacción de puentes hidrógeno de las moléculas de AG entre ellas y con el TiO₂. Varios autores coinciden en atribuir a las contribuciones entre 1390-1380 cm⁻¹ a la vibración simétrica del grupo -COO⁻ del AG cuando este se utiliza en medios alcalinos. Araujo *et al.* [231] describieron esta misma señal a 1380 cm⁻¹ para coberturas de AG formados sobre partículas de TiO₂, Singh *et al.* [232] encontraron la señal de -COO⁻ a 1387 cm⁻¹ en AG encapsulado en liposomas, y Tóth *et al.* [222] describieron la señal del -COO⁻ a 1392 cm⁻¹ en el *capping* de NP_a de magnéticas sintetizadas con AG. Por lo tanto, en el caso de las muestras de Ti-MPN-AG la señal de 1392 cm⁻¹ podría ser atribuida a la presencia del grupo ácido desprotonado, teniendo en cuenta que las MPN de AG se desarrollan a pH alcalino donde el AG se encuentra mayormente en dicho estado [222].

Tal como se vio en el Capítulo 4, las NPe autoensambladas de TOH y Carv se adsorben espontáneamente sobre la superficie de Ti formando polímeros u oligómeros con bajo estado de oxidación (los C-OH se autooxidan a grupos cetónicos C=O durante la formación de las NPe) y no recubren en forma continua la superficie de Ti. Las MPN, en cambio, forman grandes estructuras poliméricas altamente oxidadas (los C-OH se autooxidan a C-O-C) que recubren completamente la superficie de Ti (ver Figuras AFM 5.15 y 5.17). En trabajos previos, se comprobó que la presencia de los iones metálicos aumenta la posibilidad de autooxidación de los FF para formar MPN [55,68]. Asimismo, se mostró que la autooxidación de PG o AT para formar las MPN depende fuertemente de la concentración de iones metálicos Mg²⁺ o Na⁺: a mayores concentraciones de estos iones más rápido se forman las MPN y más alto es su espesor [219]. En coincidencia, en los sistemas que hemos estudiado, la aceleración de la autooxidación del PG y AG para formar MPN polimerizadas a través de la constitución de enlaces éteres ocurre en

presencia de una concentración alta de Mg^{2+} (0,1 M) en relación con la concentración de ambos FF (0,010 M).

Finalmente, a partir de los resultados obtenidos por espectroscopia ATR-FTIR y de acuerdo con otros sistemas reportados [233] es posible suponer que las MPN de PG y AG se conforman a partir de las unidades de polimerización esquematizadas en la Figura 5.10.

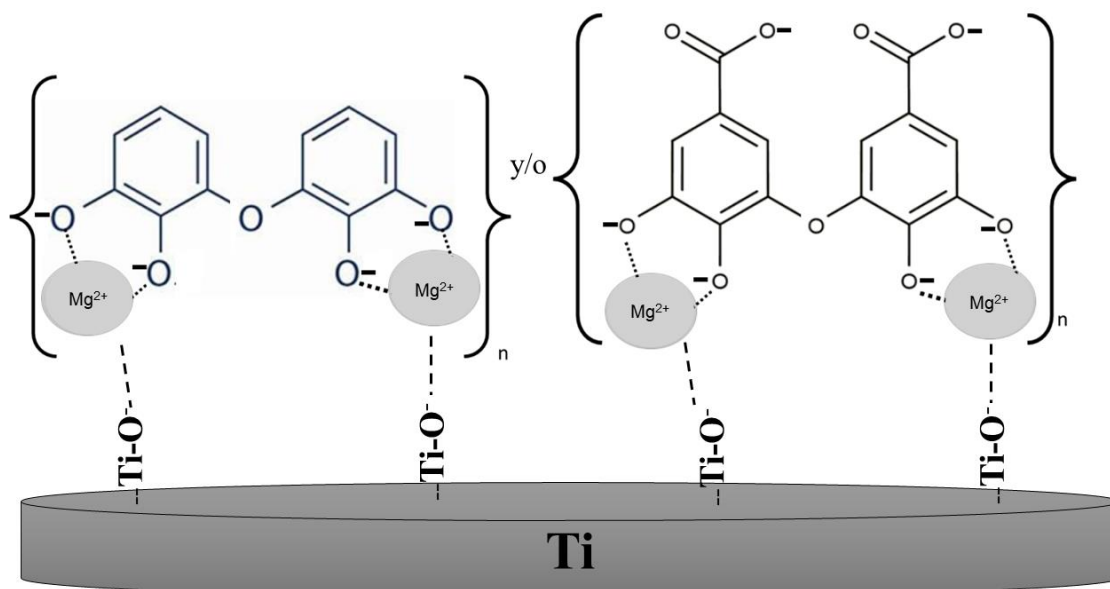


Figura 5.10. Esquema representativo de las unidades de polimerización del PG (izquierda) y de las de AG (derecha) para formar Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG. Las muestras de Ti-MPN-AG+PG podrían presentar combinaciones de ambas estructuras.

5.3.3 Ensayos electroquímicos

Se realizaron diferentes ensayos electroquímicos con el propósito de evaluar la interacción entre las MPN desarrolladas con la superficie de materiales de Ti tanto durante su formación (medición del OCP) como luego de su formación (respuesta frente a la voltamperometría cíclica y curvas de Tafel).

5.3.3.1 Medición del OCP durante la formación de las MPN

El proceso de formación de las MPN y su interacción con la superficie del Ti se estudió a través del registro de la variación del OCP durante las 4 h de formación sobre la superficie metálica (Figura 5.11). Como ya se describió en el Capítulo 4, las muestras de Ti control presentan una curva de registro de OCP típica de pasivación de la superficie (ver Figura 2.5, Capítulo 2), donde el registro del OCP aumenta en el tiempo conforme

se va pasivando la superficie por la formación óxido de Ti adicional. Por el contrario, en presencia de los FF las curvas de OCP cambian notablemente. En primer lugar, se observa que los registros de las MPN comienzan a potenciales más positivos en relación con el Ti control, siendo las MPN de AG+PG las que presentan valores más altos al inicio de la reacción. Esto sugiere que los FF que van a desarrollar las MPN interactúan con la superficie de Ti inmediatamente después de la inmersión de dicho sustrato. Similar comportamiento se describió en el Capítulo 4 para las NPe autoensambladas de TOH y Carv.

Los registros de las muestras de Ti sumergidas en las soluciones que contienen PG que conducen a la formación de Ti-MPN-PG (curva roja) y Ti-MPN-AG+PG (curva verde) mostraron inicialmente un rápido aumento el OCP asociado a la rápida adsorción de las redes fenólicas sobre la superficie metálica llegando a un máximo dentro de los primeros segundos. Este aumento original es seguido por una marcada disminución posterior para alcanzar un valor de OCP casi constante que podría atribuirse a la mayor estabilidad de la superficie en coincidencia con sistemas similares [234]. Estos resultados están de acuerdo con los de la espectrometría UV-visible obtenida durante la formación de las MPN de PG, donde entre 0 y 30 minutos de reacción se detectaron picos de absorbancia intermedios con referencia al PG+Tris. Esto indicaría que en dicho período las moléculas de PG interactúan entre sí y con el Mg^{2+} para cubrir la superficie de Ti con la MPN. Consecuentemente, el pico de potencial que muestra el registro de OCP podría relacionarse con la oxidación de las moléculas de PG para formar la MPN y la adhesión a la superficie de Ti formando una película protectora. A partir de este momento, tanto los espectros UV-visible como el valor de OCP se mantienen constantes, indicando que las MPN de PG se encuentran ya formadas y eventualmente podrían aumentar su espesor y/o permitir la formación de mayor cantidad de óxido metálico [153,234,235].

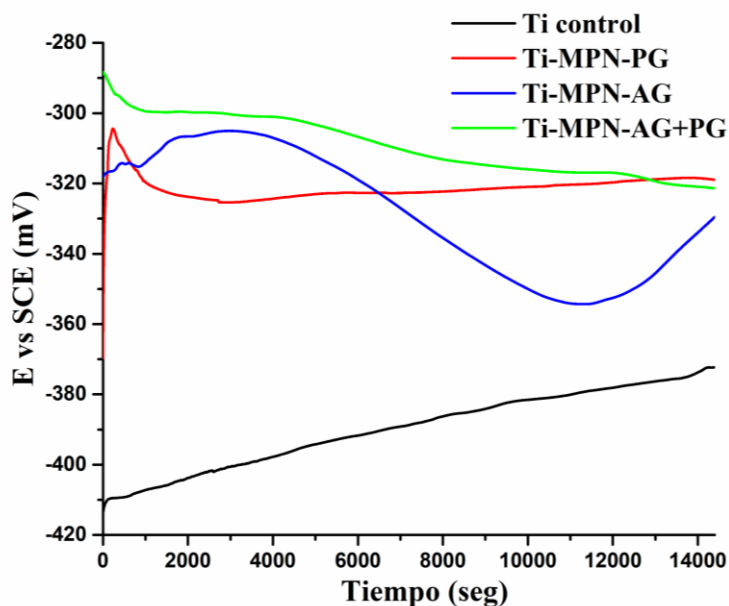


Figura 5.11. Determinación de la variación del OCP durante la formación de las MPN. Para las muestras de MPN se utilizó como electrolito la solución buffer 0,1 M Tris-HCl + MgCl₂ + FF correspondiente. Para el Ti control se utilizó la misma solución, pero sin FF.

Las muestras que corresponden a la formación de Ti-MPN-AG (curva azul) presentan una curva de variación del OCP en forma de “S” acostada. Primero se produce un incremento del OCP más lento que en el caso del PG, en forma de campana, hasta los 6000 s (~1,7 h). Luego desciende el potencial hacia valores más negativos hasta los 12.000 s (3 h) donde nuevamente el OCP experimenta una elevación hacia valores más positivos hasta finalizar la reacción. En el seguimiento de la reacción por UV-visible, se determinó que las MPN de AG no presentan signos de formación desde $t = 0$ hasta las primeras 2 h de reacción. En el registro de OCP se experimenta un incremento de potencial lento en forma de campana indicaría que los procesos de oxidación de las moléculas de AG para conformar la MPN sobre la superficie de Ti son mucho más lentos que cuando se utilizan las soluciones contienen PG.

Finalmente, se puede concluir que las muestras que conducen al desarrollo de Ti-MPN-AG+PG (curva verde) parecen combinar el efecto del PG inicial, formando un pico en el comienzo, y, al final, experimentan un descenso constante del OCP durante todo el proceso tal como el caso del AG, pero más leve por la influencia del PG.

Los espectros ATR-FTIR permitieron constatar que las diferentes MPN presentan similares mecanismos de polimerización, pero a través de los disímiles registros de OCP, se ha podido deducir que la cinética de formación de las MPN es diferente en cada caso

y que el PG, el AG y la mezcla de AG+PG interaccionan de distinta forma sobre la superficie de Ti para formar las MPN.

Es interesante tener en cuenta que el registro de OCP para el desarrollo de Ti-MPN-PG presenta una curva típica de estabilización del OCP en el tiempo durante el proceso de formación del recubrimiento sobre el Ti, lo cual está reportado en diversos trabajos para diferentes tipos de películas [236,237]. En cambio, en presencia de AG, mientras se forman Ti-MPN-AG y Ti-MPN-AG+PG, en la mayor parte del tiempo el OCP disminuye. Este comportamiento está de acuerdo con lo descrito por Paik *et al.* [238] y Brett *et al.* [239] para coberturas de diferentes tioles desarrollados sobre oro. Dichos autores, explican que la disminución del potencial podría atribuirse a la transferencia de electrones desde las moléculas (tioles) hacia la superficie metálica durante la formación de MPN. La transferencia de electrones durante la desprotonación del AG (debido al pH alcalino de la solución de formación de las MPN) con la consecuente liberación de electrones en la superficie del metal sería por lo tanto la causante del descenso de los valores de OCP observados durante la formación de la MPN de AG (ver Figura 5.10 y Figura 6.7-B del Capítulo 6). Asimismo, se ha reportado [240] que el AG tiene baja capacidad de adsorberse sobre superficies de aleaciones de Ti y que para la formación de una película protectora sería necesaria, además de la desprotonación de los grupos carboxílicos, la presencia de iones metálicos.

De esta forma, si bien las reacciones que tienen lugar en la superficie de Ti entre las MPN en desarrollo y el TiO₂ son complejas, el registro del OCP puede ser un recurso útil para detectar diferencias en la formación de las MPN, que por espectroscopía ATR-FTIR no son fácilmente detectables. A partir de los resultados obtenidos de OCP es posible concluir que las MPN interactúan y se desarrollan de diferentes formas sobre la superficie de Ti, dando lugar, tal como se reporta en las Secciones siguientes, a MPN con diferentes características fisicoquímicas y biológicas.

5.3.3.2 Registros de curvas de polarización: voltamperometría cíclica y curvas de Tafel

Para intentar deducir diferencias en las interacciones en la interfaz metal-MPN/solución, entre las diferentes MPN, se procedió a estudiar el comportamiento electroquímico de las mismas por voltamperometría cíclica (Figura 5.12).

Primer ciclo de voltamperometría cíclica:

Tal como se describió en el Capítulo 4, para el Ti control durante el primer ciclo (curva negra, Figura 5.12-A) se registra un aumento pronunciado de la densidad de corriente a partir de potenciales mayores a 0,5 V debido a la formación y/o crecimiento del TiO₂ sobre la superficie del Ti. En el caso de las muestras con MPN se detecta que el aumento de la corriente ocurre a potenciales más catódicos en relación con el Ti control.

Para las muestras de Ti-MPN-PG (Figura 5.12-A, curva roja) dicho incremento de la corriente se produce a partir de valores de potencial mayores a 0,12 V, finalizando el barrido en sentido anódico con valores de densidad de corriente significativamente más altos que las demás muestras. Esto se podría atribuir a la electro-oxidación de la MPN de PG presente sobre la superficie de Ti junto con la formación de óxido a partir de 0,5 V. Seguidamente, durante el barrido en sentido catódico del primer ciclo, las muestras de Ti-MPN-PG presentan valores de corriente positivos y menores a los correspondientes anódicos entre 1,4 V y 2,0 V para dicha muestra, ya que continuaría la oxidación de componentes de la MPN en ese rango de potenciales durante el barrido en sentido inverso. Asimismo, los valores de corriente en el límite catódico son considerablemente mayores que los registrados para el resto de las muestras estudiadas. Durante el primer ciclo, las muestras de Ti-MPN-AG y Ti-MPN-AG+PG (curva azul y verde respectivamente de la Figura 5.12-A) experimentan un aumento de la corriente a partir de potenciales mayores a 0,25 V lo cual evidencia la presencia y oxidación de las MPN sobre la superficie de Ti. Sin embargo, a diferencia de Ti-MPN-PG, estas muestras finalizan el barrido anódico con corrientes menores a las del Ti control. Esto podría atribuirse a que las MPN-AG y MPN-AG+PG se electro-oxidarían en menor medida que las MPN-PG y que en presencia de dichas MPN se formarían menores cantidades de óxido de Ti que la registrada en la muestra control.

Segundo ciclo de voltamperometría cíclica

Los voltamperogramas del segundo ciclo se presentan en la Figura 5.12-B. Como puede observarse, la superficie del Ti control se encuentra casi totalmente pasivada por el TiO₂ formado durante el primer ciclo y no admiten formación de óxido adicional. Asimismo, las muestras de Ti-MPN-AG y Ti-MPN-AG+PG también mantienen la corriente en valores cercanos a cero durante todo el ciclo, lo cual indica que los componentes de Ti-MPN-AG y Ti-MPN-AG+PG no se oxidan luego del primer ciclo. En

cambio, las muestras de Ti-MPN-PG presentan valores de corriente anódica elevados en relación con las demás muestras en el rango de potencial entre 1,5 V a 2 V (tanto durante el barrido de sentido anódico como en el catódico) indicando que aún existe oxidación de los componentes de Ti-MPN-PG. Finalmente, durante el barrido en sentido catódico, las muestras de Ti control, Ti-MPN-AG y Ti-MPN-AG+PG presentan valores cercanos a cero y, cerca del límite catódico revelan diferente reactividad de las distintas muestras en la zona de reacción del hidrógeno.

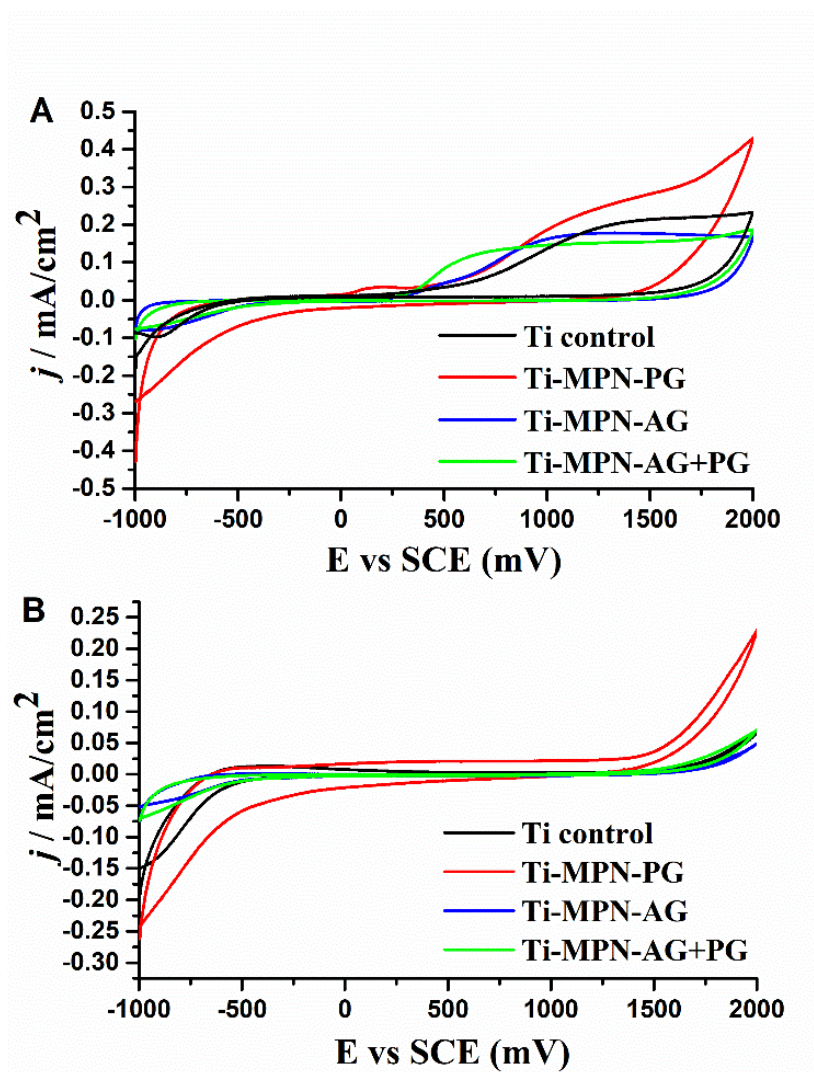


Figura 5.12. Voltamperogramas obtenidos en 5 mM de KCl para las MPN desarrolladas sobre Ti. A) primer ciclo y B) segundo ciclo.

Curvas de Tafel:

Las curvas de Tafel permitieron detectar importantes cambios de los parámetros electroquímicos en presencia de MPN (Figura 5.13). A diferencia de las NPe

autoensambladas de TOH y Carv descritas en el Capítulo 4, donde los valores de E_{corr} se desplazaban levemente respecto al Ti control, las muestras con MPN producen el corrimiento del E_{corr} a valores marcadamente más positivos (anódicos) que el Ti control, alcanzando valores hasta 500mV más positivos que el mismo (Tabla 5.1). Estos resultados indican que las MPN desarrolladas sobre Ti presentan acción protectora.

En concordancia con nuestros resultados, Chung *et al.* [241] demostraron que en presencia de un extracto fenólico obtenido de hojas de *Chaenomeles sinensis* (cerezo o membrillero japones) el registro del OCP sobre superficies de acero aumenta hacia valores más positivos de potencial y también desplaza los valores de E_{corr} hacia valores más positivos o anódicos. Esto se debe a que los FF del extracto retrasan la disolución anódica del acero a medida que se van adsorbiendo en la superficie, ejerciendo acción protectora. Similar proceso puede ocurrir durante la formación de las MPN sobre Ti, donde el OCP aumenta en presencia de AG o PG (con relación al Ti control sin FF) debido a la adsorción de las MPN sobre la superficie de Ti y desplaza los valores de E_{corr} hacia valores más anódicos.

Tabla 5.1. Valores de E_{corr} y i_{corr} obtenidos a partir de curvas de Tafel.

Muestras	E_{corr} (mV)	i_{corr} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
Ti control	-598 ± 4	38 ± 5
Ti-MPN-PG	$-176 \pm 5^*$	28 ± 2
Ti-MPN-AG	$25 \pm 4^*$	40 ± 4
Ti-MPN-AG+PG	$17 \pm 7^*$	18 ± 2

*indica diferencias significativas con Ti control ($p < 0,01$)

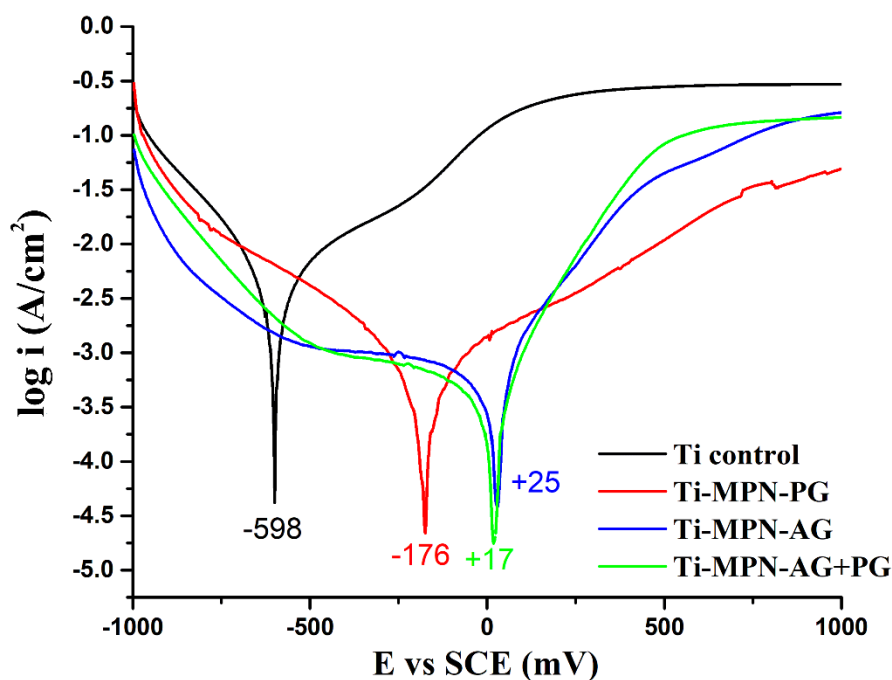


Figura 5.13. Curvas de Tafel obtenidas en 5 mM de KCl para las MPN desarrolladas sobre Ti. Los valores de E_{corr} (mV) están indicados en cada curva.

Análisis de los productos obtenidos a partir de PA

Con el objetivo de comprobar la mayor o menor susceptibilidad a la oxidación de las MPN durante el barrido anódico, se realizaron espectros ATR-FTIR luego de someter a las MPN a una PA desde -1 V a 2 V (Figura 5.14). En primer lugar, se reveló que las MPN son altamente perturbadas por la PA produciendo una reducción drástica de las señales de los grupos -OH en comparación a los espectros de las MPN realizado con muestras sin PA (Figura 5.9). Esto indicaría que los grupos -OH fueron oxidados durante la PA. Similares resultados se obtuvieron cuando se polimerizaron diferentes FF sobre Mg y Cu [67,141–143,242]. Además, entre las muestras ensayadas, las de Ti-MPN-PG-PA mostraron ser las más afectadas durante la PA, ya que no se detectaron vibraciones relacionadas al anillo fenólico y solo se evidenciaron señales de grupos éteres (1248 y 1043 cm^{-1}) y una señal del estiramiento del grupo C-O a 1150 cm^{-1} .

Por otro lado, las muestras de Ti-MPN-AG-PA y Ti-MPN-AG+PG-PA presentaron espectros similares. Las vibraciones del anillo fenólico se detectaron por las señales comprendidas entre 1550 y 1460 cm^{-1} . Las contribuciones de los grupos éteres se revelaron en las señales de 1245 y 1050 cm^{-1} . Finalmente, en estas muestras se detectaron señales a 1652 y 1648 cm^{-1} (para Ti-MPN-AG-PA y Ti-MPN-AG+PG-PA).

respectivamente) que han sido reportadas para la formación de grupos de tipo quinona durante la polimerización del AG [222].

Los ensayos de PA fueron útiles para confirmar la distinta naturaleza de las MPN formadas. Los espectros ATR-FTIR luego de la PA confirmarían que, si bien al ser oxidadas todas las MPN forman grupos éteres, solo en el caso de las MPN-AG y MPN-AG+PG, la oxidación puede conducir a la formación de quinonas probablemente asociado a la presencia de AG [243]. Por otro lado, en línea con los resultados obtenidos para Ti-MPN-PG-PA se ha reportado que la electro-oxidación de PG se distingue por la formación de productos con pesos moleculares menores que un dipolímero [244].

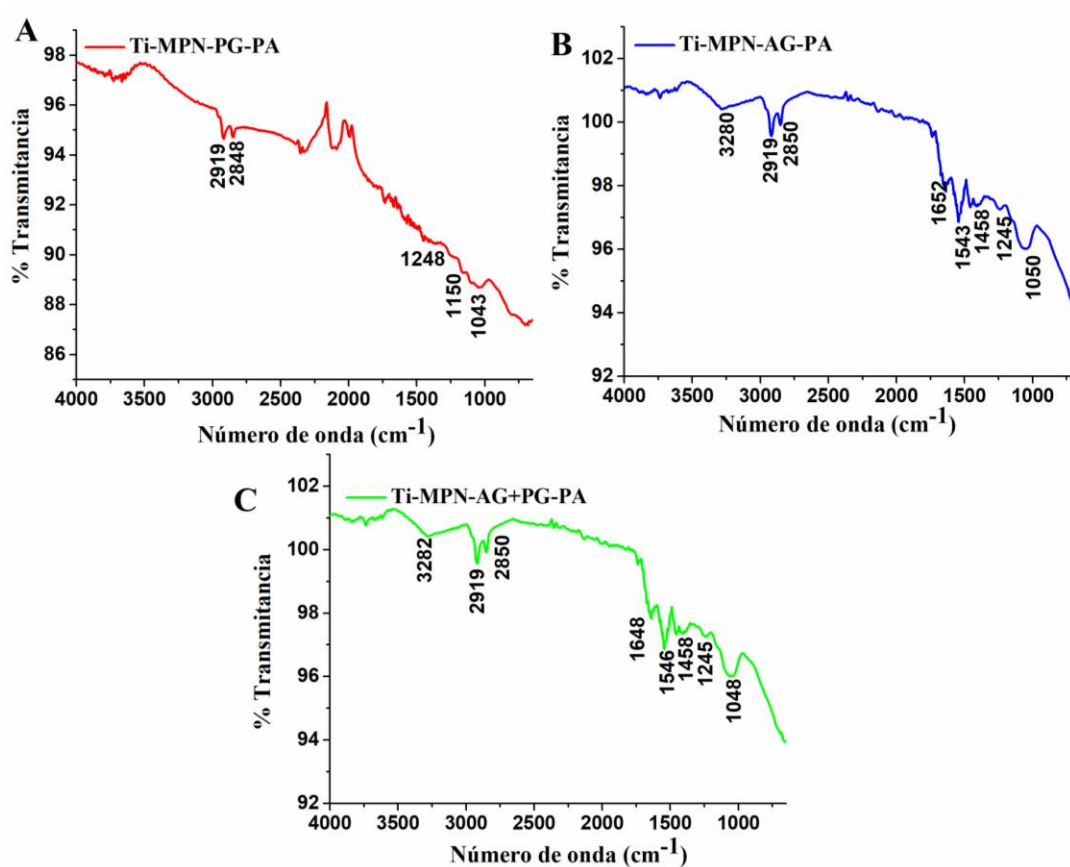


Figura 5.14. Espectros ATR-FTIR obtenidos luego de la PA. A) Ti-MPN-PG-PA, B) Ti-MPN-AG-PA y C) Ti-MPN-AG+PG-PA.

El comportamiento observado en los estudios electroquímicos (voltamperometría cíclica, curvas de Tafel, PA) así como el análisis de los productos de oxidación luego de la PA por ATR-FTIR confirman que las MPN desarrolladas sobre Ti presentan diferentes propiedades fisicoquímicas entre sí, así como distinta reactividad. Asimismo, interactúan con el TiO₂ de forma disímil, como sugerían los resultados del registro del OCP durante

su proceso de formación. Sin embargo, las MPN-AG y MPN-AG+PG mostraron propiedades fisicoquímicas más similares en cuanto a su comportamiento electroquímico y los productos de oxidación formados luego de la PA, que con las MPN-PG.

5.3.4 Caracterización por AFM

5.3.4.1 *Análisis de imágenes y perfiles a 45x45 μm^2*

Con el propósito de evaluar diferencias en la formación de las MPN, se tomaron imágenes AFM a dos escalas de análisis: 45x45 y 5x5 μm^2 y se evaluaron las topografías observadas.

En la Figura 5.15 se muestran las imágenes obtenidas a 45x45 μm^2 y en la Figura 5.16 los perfiles topográficos tomados en cada muestra (identificados por colores de las líneas en cada imagen de la Figura 5.15). En el caso del Ti control, como se describió anteriormente en el Capítulo 4, se observó una topografía altamente rugosa (Figura 5.15-A) con un perfil nanoestructurado de forma aleatoria a lo largo de toda la sección transversal (Figura 5.16-A). En cambio, las muestras de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG (Figura 5.15-B y C respectivamente) revelaron una topografía más suave y homogénea a lo largo de toda la superficie, lo cual indica que las MPN-PG y MPN-AG cubren toda la superficie de Ti alisándola y produciendo una película continua. Los perfiles para Ti-MPN-AG permiten detectar una mayor variación en la topografía de la cobertura formada que los perfiles obtenidos con las muestras de Ti-MPN-PG (Figura 5.16-C y B respectivamente), lo que sugiere que las MPN-PG desarrolladas sobre Ti son más lisas y homogéneas. Por el contrario, las muestras de Ti-MPN-AG+PG revelaron la presencia de grandes depósitos de MPN (con aspecto de precipitados o depósitos particulados de tamaños micrométricos) distribuidos en diferentes zonas de la superficie de Ti (Figura 5.15-D, línea purpura) junto con áreas descubiertas o con una película delgada y conformal de MPN-AG+PG (Figura 5.15-D, línea fucsia). El perfil topográfico a lo largo de toda la muestra de Ti-MPN-AG+PG (Figura 5.16-D) reveló cambios abruptos en la rugosidad entre las zonas con depósitos de MPN y las zonas descubiertas o conformales. Estas últimas presentaron una topografía nanoestructurada similar a la de Ti control (Figura 5.16-E) y las zonas con depósitos de MPN alcanzaron alturas (medidas por el R_{max} del perfil) entre 1 a 1,3 μm (Figura 5.16-F).

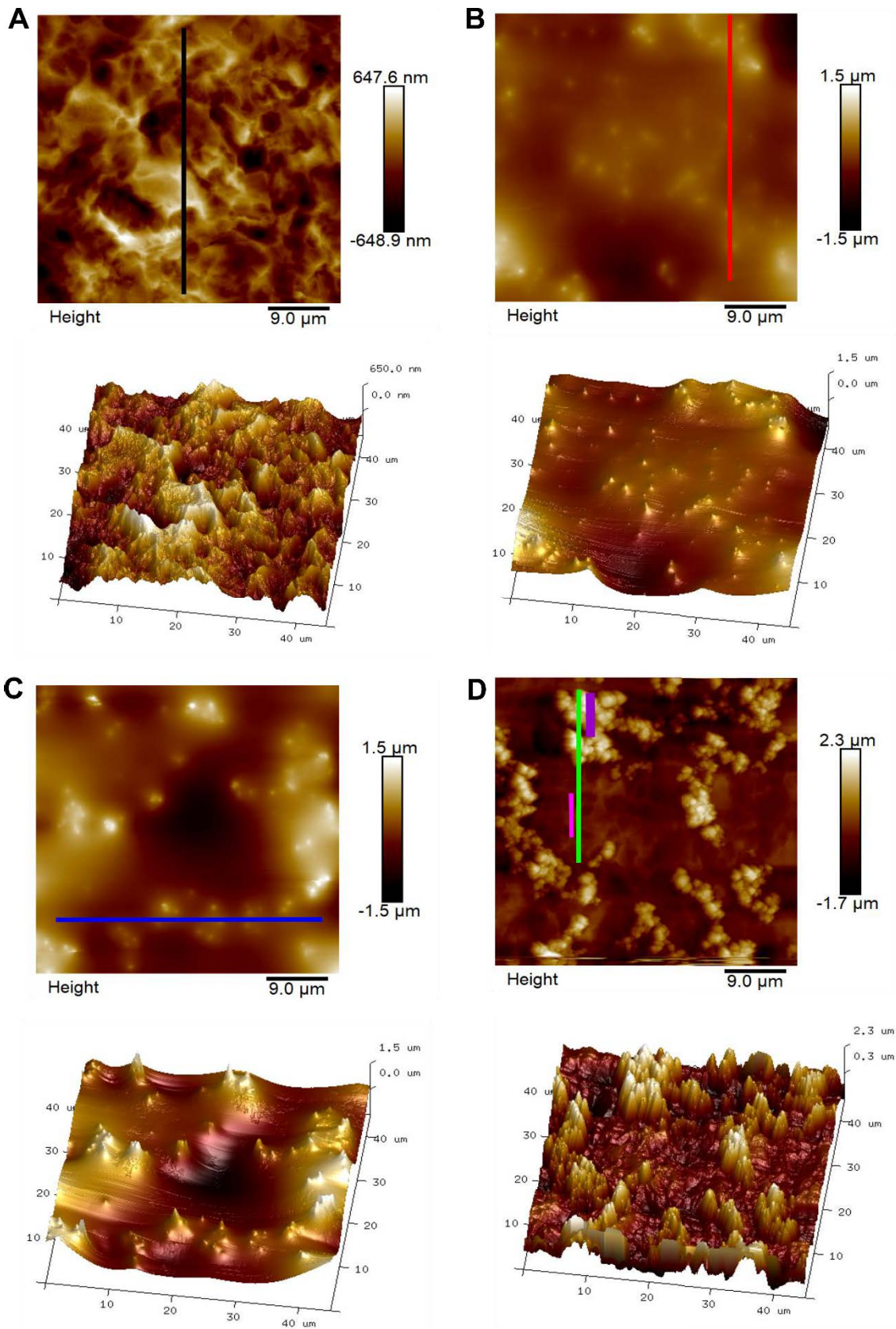


Figura 5.15. Imágenes AFM 2 D (arriba) y 3 D (abajo) obtenidas a escala de $45 \times 45 \mu\text{m}^2$ para A) Ti control, B) Ti-MPN-PG, C) Ti-MPN-AG y D) Ti-MPN-AG+PG. Las líneas de colores indican los diferentes perfiles analizados y representados en la Figura 5.16 según corresponda.

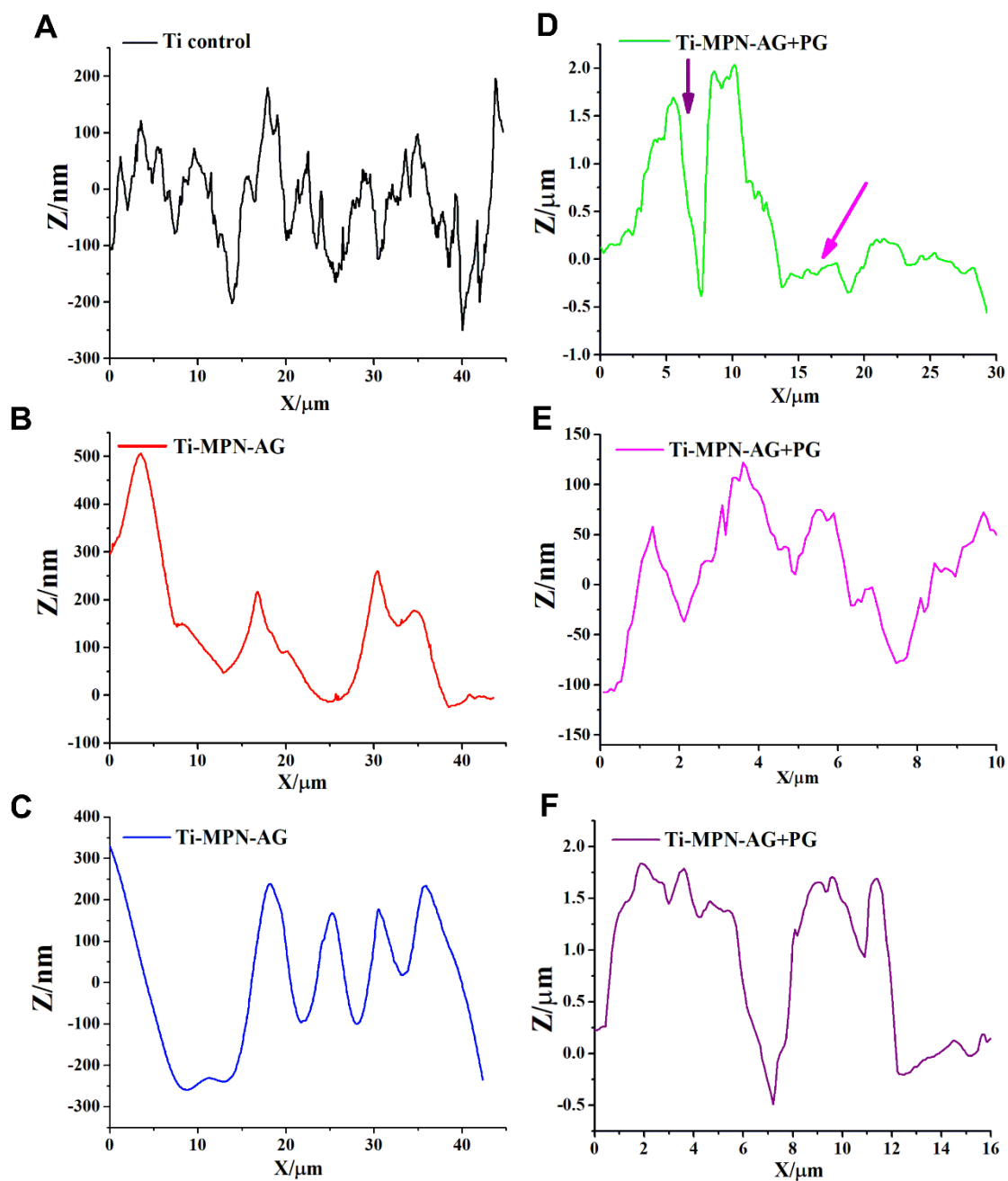


Figura 5.16. Perfiles topográficos derivados de las imágenes AFM de la Figura 5.15. A) Ti control, B) Ti-MPN-PG, C) Ti-MPN-AG, D) Ti-MPN-AG+PG, E) ampliación del perfil de Ti-MPN-AG+PG en la zona conformal señalado con línea fucsia en la imagen 5.15-D y con flecha fucsia en el perfil 5.16-D, y F) ampliación del perfil de Ti-MPN-AG+PG en la zona con depósitos de MPN señalados con línea purpura en la imagen 5.15-D y con flecha purpura en el perfil 5.16-D.

5.3.4.2 *Análisis de los perfiles y parámetros de rugosidad en imágenes de 5x5 μm^2*

Los resultados obtenidos por AFM en imágenes de 5x5 μm^2 se presentan en la Figura 5.17 y el análisis derivado de los perfiles topográficos en la Figura 5.18. Nuevamente, los resultados indican que los discos de Ti control exhibieron una topografía rugosa (Figura 5.17-A) con un perfil nanoestructurado aleatoriamente (Figura 5.18-A). Por otra parte, las muestras de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG revelaron una superficie completamente recubierta por las MPN (Figura 5.17-B y C respectivamente). Los perfiles topográficos para Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG muestran que las MPN tapizan la superficie de Ti rellenando los valles (Figura 5.18-B y C). Los parámetros de rugosidad R_a , R_q , R_{max} y R_{isad} determinados para Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG disminuyen considerablemente en comparación con el Ti control, indicando que la topografía de la muestra se vuelve más lisa en presencia de las MPN de AG y PG (Tabla 5.2). Los valores de S_{ku} también disminuyen hacia valores cercanos a 2 (es decir, menores de 3) y los valores S_{sk} se vuelven negativos para Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG, lo cual indica que en presencia de estas MPN la superficie de Ti presenta una topografía suavizada con poca presencia de valles (finos o agudos) y de picos (redondeados y poco prominentes). Todos estos resultados, permiten inferir que las MPN de AG y PG se adhieren en la superficie de Ti cubriendo los valles para formar una película que cubre la superficie del Ti, alisándolo.

Por otro lado, las muestras de Ti-MPN-AG+PG mostraron, nuevamente, zonas elevadas y recubiertas por MPN y áreas sin cubrir o con una capa muy delgada de la película que se deposita de manera conformal a la superficie (Figura 5.17-D). Cabe mencionar que en la imagen 3D de la Figura 5.17-D se observan ciertos artefactos característicos de una alta interacción entre la punta y la muestra (forma triangular en los cúmulos de la MPN-AG+PG, señalado con flecha amarilla) que condujeron a la salida de régimen del microscopio provocando la ruptura de la punta. Los perfiles trazados en ambas zonas revelan que las MPN-AG+PG depositadas sobre Ti alcanzan espesores de 1 a 1,6 μm (Figura 5.18-D), mientras que las zonas sin MPN presentan un perfil similar al Ti control (Figura 5.18-E). Como era de esperar a partir de la morfología topográfica de las muestras de Ti-MPN-AG+PG, los parámetros de rugosidad R_a , R_q , R_{max} y R_{isad} calculados para estas superficies, aumentan considerablemente tanto en relación con el Ti control como con las muestras de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG. Además, los valores de S_{ku} son mayores a 3 ($3,3 \pm 0,8$) y la S_{sk} toma valores altamente positivos ($1,2 \pm 0,3$),

siendo negativos los de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG, lo cual indica que en las muestras de Ti-MPN-AG+PG hay predominio de picos altos y valles profundos. Estos resultados sugieren que las MPN de AG+PG se depositan sobre los picos presentes en la superficie de Ti provocando un aumento de sus alturas que condujeron a valores mayores que el Ti control en los parámetros de rugosidad medidos (Tabla 5.2), revelándose también en los perfiles correspondientes a las barras señaladas en la imagen (Figura 5.18-D). Por lo contrario, las imágenes de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG muestran que las MPN se adhieren recubriendo los valles y disminuyendo la agudeza de los picos, formando películas que disminuyen la rugosidad y alisan la superficie de Ti.

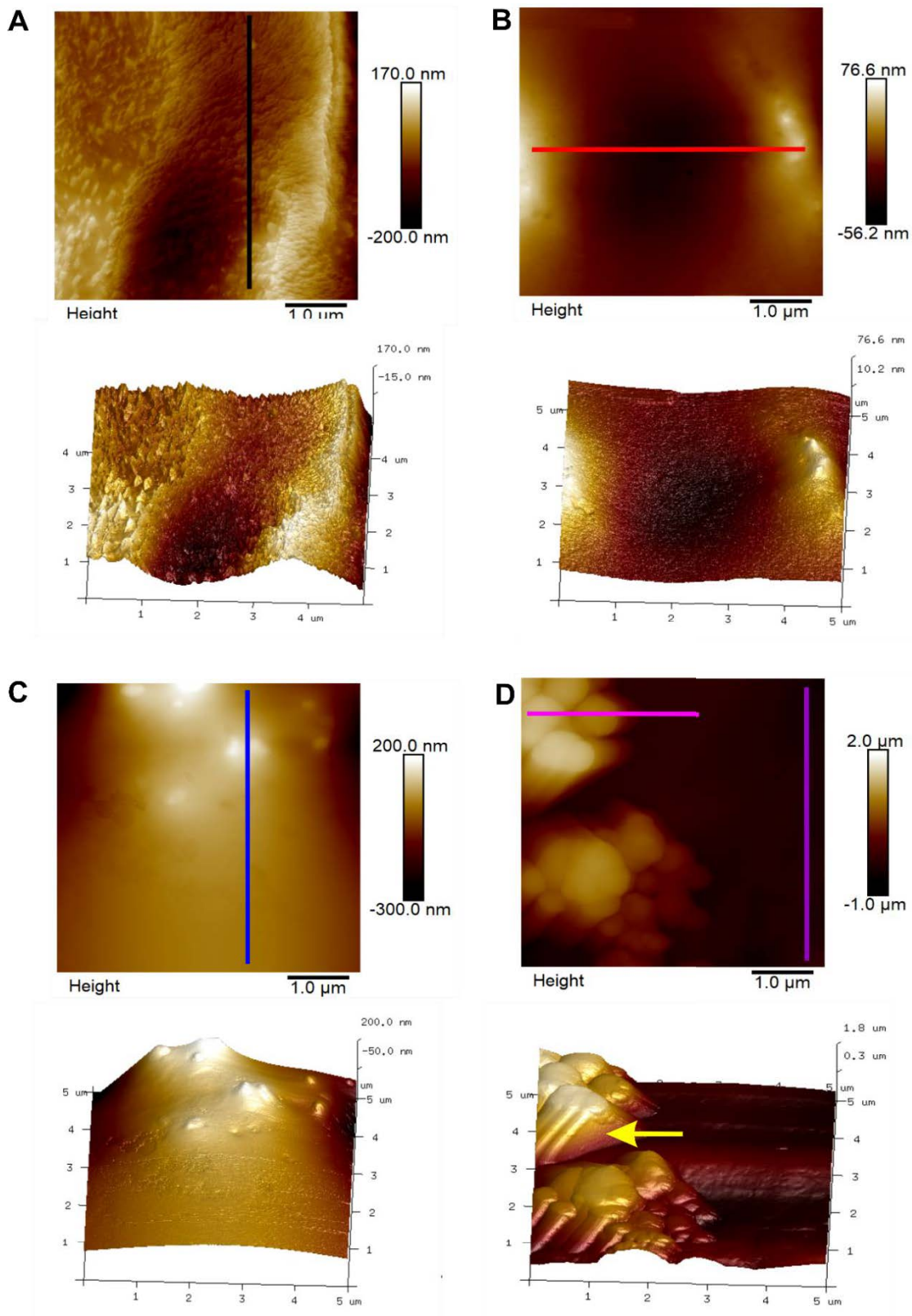


Figura 5.17. Imágenes AFM en 2 D y 3 D obtenidas a escala de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ para A) Ti control, B) Ti-MPN-PG, C) Ti-MPN-AG y D) Ti-MPN-AG+PG. Las líneas de colores indican los diferentes perfiles analizados y representados en la Figura 5.18 según corresponda. La flecha amarilla señala efecto de la punta.

Tabla 5.2. Parámetros de rugosidad obtenidos en imágenes AFM en escala 5x5 μm^2 .

Parámetros	Ti control	Ti-MPN-PG	Ti-MPN-AG	Ti-MPN-AG+PG
R_a (nm)	44 ± 5	15 ± 4 *	20 ± 6 *	100 ± 20 *, b
R_q (nm)	55 ± 7	19 ± 5 *	28 ± 5 *, a	150 ± 30 *, b
R_{max} (nm)	340 ± 10	110 ± 20 *	150 ± 20 *, a	980 ± 140 *, b
R_{isad} (%)	16 ± 3	0,26 ± 0,15 *	1,5 ± 0,3 *, a	25 ± 5 *, b
S_{ku}	2,8 ± 0,3	2,2 ± 0,2 *	2,3 ± 0,4 *	3,3 ± 0,8 *, b
S_{sk}	0,25 ± 0,12	- 0,55 ± 0,13 *	-0,6 ± 0,2 *	1,2 ± 0,3 *, b

* indica diferencias con el Ti control, *a* indica diferencias significativas entre Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG, *b* indica diferencias de las muestras de Ti-MPN-AG+PG con Ti-MPN-AG y Ti-MPN-PG ($p < 0,01$).

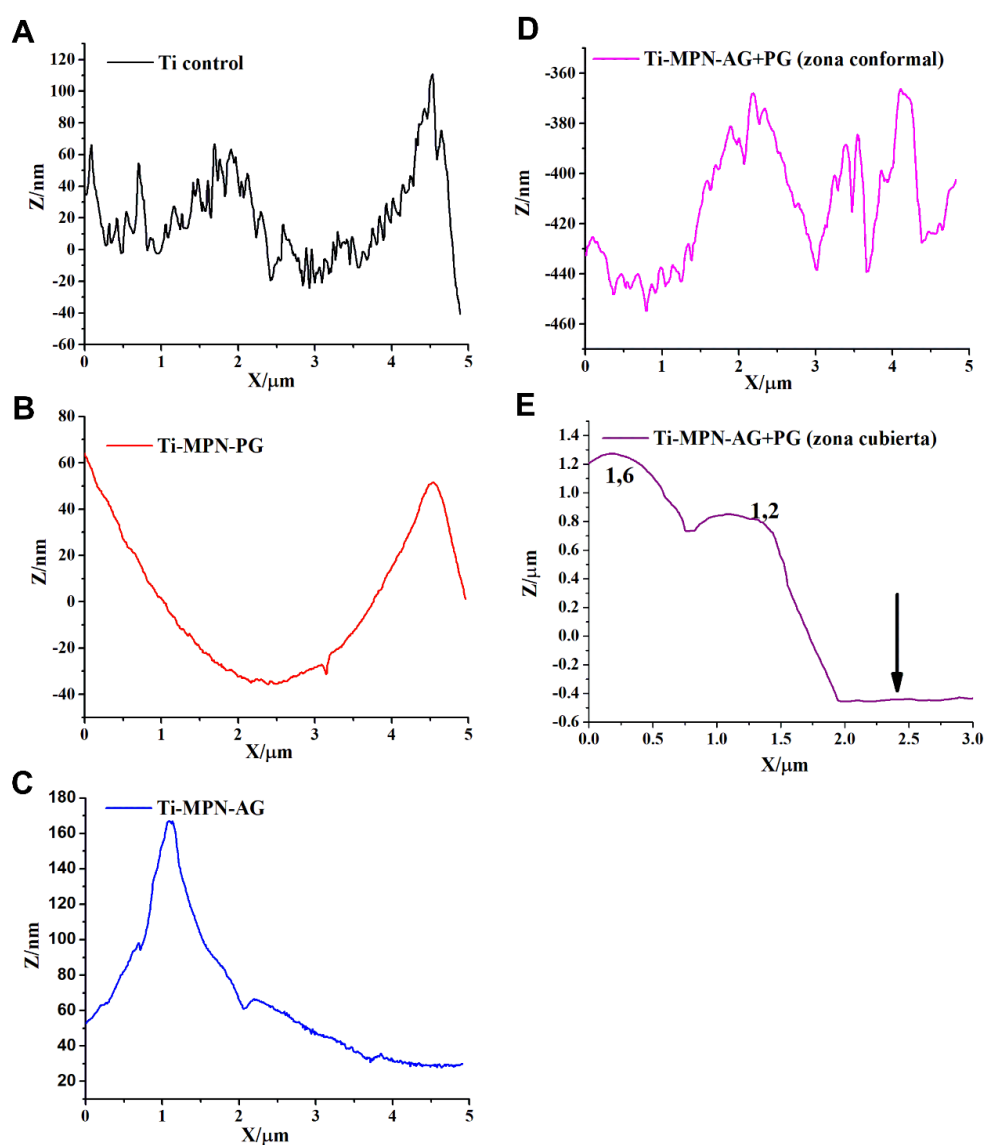


Figura 5.18. Perfiles topográficos derivados de las imágenes AFM de la Figura 5.17. A) Ti control, B) Ti-MPN-PG, C) Ti-MPN-AG, D) Ti-MPN-AG+PG zona con depósitos de MPN (la flecha indica el valor de referencia igual a 0 nm) y E) Ti-MPN-AG+PG zona “descubierta” o sin MPN.

En las muestras de Ti-MPN-AG+PG se pudo estimar el espesor de los depósitos de las MPN tomando valores aproximados de 1,2 a 1,6 μm , calculados en el perfil de la Figura 5.18-E. En el caso de las MPN de AG y PG que recubren toda la superficie, para hacer una estimación del espesor de las MPN desarrolladas se trazó una línea con una aguja de jeringa sobre la superficie de Ti con el objetivo de remover la MPN y se tomaron imágenes AFM sobre la misma (Figura 5.19). El valor estimado de los espesores de las MPN se calculó tomando la diferencia de altura entre las flechas indicadas en la Figura 5.19. En el caso de Ti-MPN-PG la punta presentó gran interacción con la MPN, por lo cual la imagen tuvo que ser finalizada antes de tiempo (Figura 5.19-A). Estas muestras presentaron un espesor de 1200 nm aproximadamente (Figura 5.19-C, perfil rojo). En cambio, las muestras de Ti-MPN-AG exhibieron espesores más altos desde 1000 a 1500 nm (Figura 5.19-B y C).

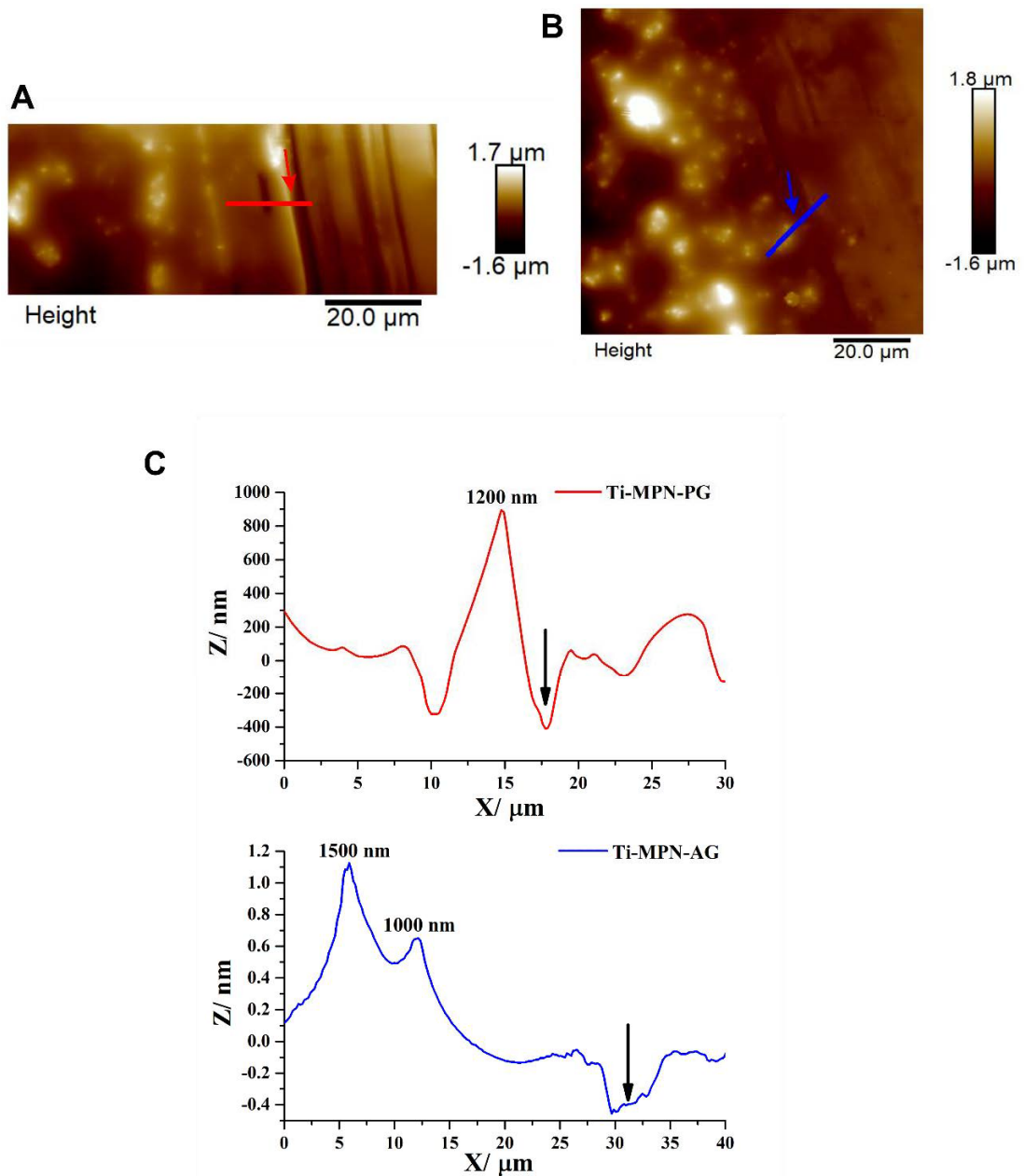


Figura 5.19. Imágenes AFM 2 D obtenidas a $90 \times 90 \mu\text{m}^2$ para A) Ti-MPN-PG y B) Ti-MPN-AG. C) Perfiles topográficos para cada muestra acorde al color indicado en cada imagen.

La flecha indica el punto de referencia para cada medida.

Los resultados de AFM demuestran que las MPN desarrolladas por NEC sobre Ti forman NPe con topografías muy diferentes, acordes con los distintos resultados obtenidos en los registros de OCP. Las imágenes de AFM de Ti-MPN-PG muestran una topografía más lisa y homogénea que el resto de las MPN estudiadas que se corresponde con el registro de OCP estable a lo largo de las 4 h de formación de las MPN. En contraste, las imágenes AFM de Ti-MPN-AG+PG revelaron poco recubrimiento de la superficie de Ti por las MPN que no desarrollaron una película continua, sino que formaron grandes

depósitos de MPN en zonas aleatorias. Durante la formación de las mismas se observó una caída del OCP durante todo el período de desarrollo. Por último, las muestras de Ti-MPN-AG presentaron películas con valores de rugosidad más altos y espesores más variables que las Ti-MPN-PG. El desarrollo de estas coberturas está asociada a una curva de OCP en forma de “S” acostada que muestra una distinta cinética de formación que las que contienen PG.

5.3.5 Estabilidad y liberación de las MPN

5.3.5.1 Evaluación de las películas mediante AFM y espectroscopía UV-visible luego de la inmersión en PBS

Con el propósito de evaluar la estabilidad de las MPN adheridas sobre la superficie de Ti y la posible liberación de sus componentes, se sumergieron las muestras en PBS y se colocaron en la estufa de cultivo a 37°C durante 24 h. Seguidamente se volvieron a tomar imágenes AFM para evaluar los cambios en la estructura de las MPN y en la topografía de las películas (Figura 5.20). Las muestras de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG no presentaron modificaciones en la estructura lisa y continua de las MPN formadas en la superficie de Ti (Figura 5.20-A y B, respectivamente). Estos resultados sugieren que los recubrimientos de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG son estables en soluciones con pH y fuerza iónica similares a los valores fisiológicos y que se adhieren fuertemente a la superficie de Ti. Por el contrario, sobre las muestras de Ti-MPN-AG+PG no se detectaron las MPN depositadas sobre la superficie y la topografía fue similar al Ti control (Figura 5.20-C y D). Estos resultados sugieren que las MPN-AG+PG se adhieren débilmente a la superficie de Ti y no son estables en presencia de soluciones de PBS, ya que los grandes depósitos de MPN se desprendieron.

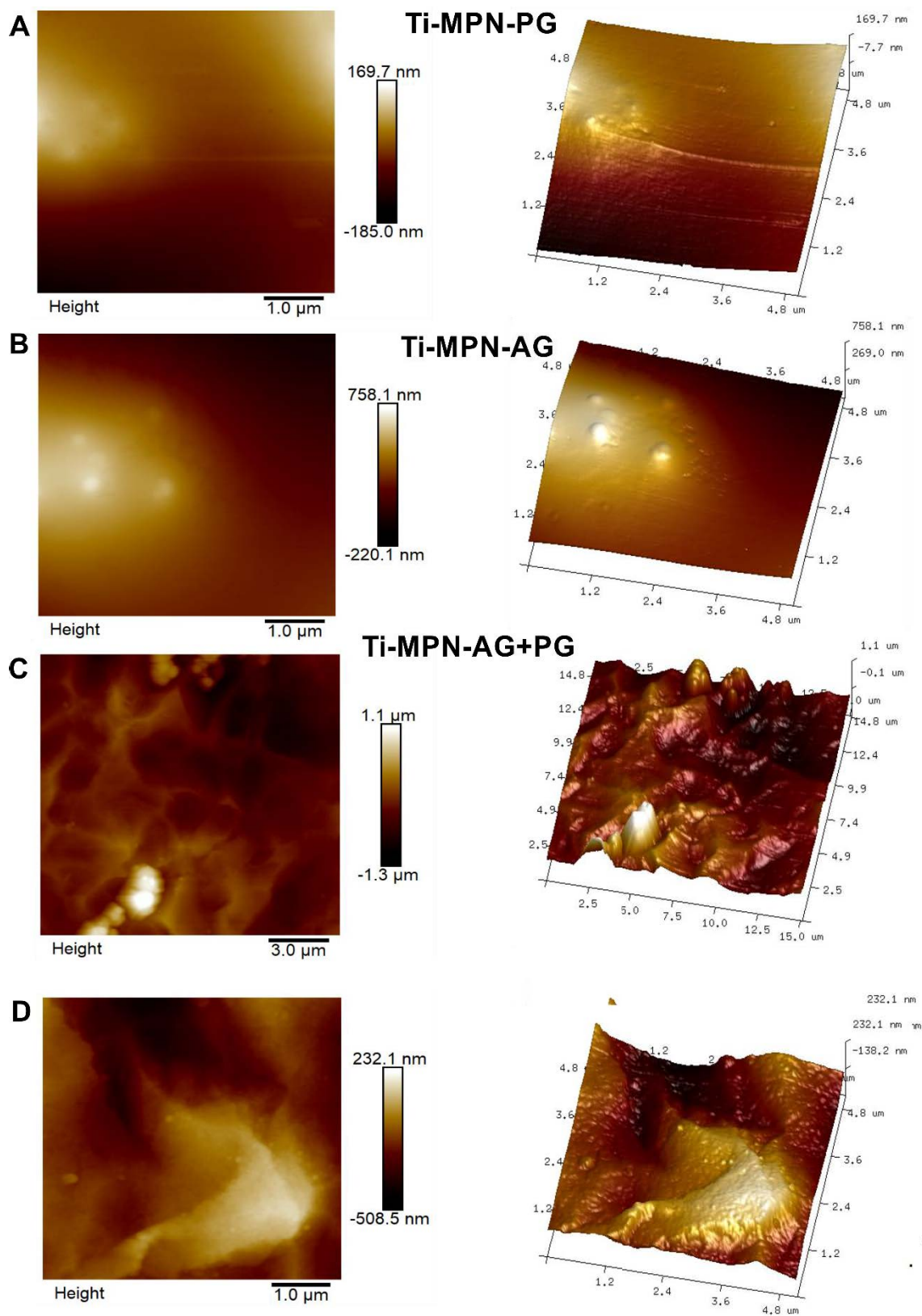


Figura 5.20. Imágenes AFM 2D y 3D obtenidas luego de sumergir las muestras en PBS por 24 h. A) Ti-MPN-PG ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$), B) Ti-MPN-AG ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$), C) Ti-MPN-AG+PG ($15 \times 15 \mu\text{m}^2$) y D) Ti-MPN-AG+PG ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$).

Para determinar los productos de liberación de las muestras de Ti-MPN-AG+PG luego de su inmersión en PBS, se tomaron espectros UV-visibles de 200 a 700 nm a diferentes tiempos de exposición (Figura 5.21). Los resultados revelaron que no hay liberación de moléculas individuales de PG o AG, ya que los espectros obtenidos desde 2 h hasta los 5 días presentaron las mismas señales de absorbancia a 260, 326 y 423 nm que las determinadas para las MPN-AG+PG ya formadas. Por lo tanto, es posible inferir que las MPN-AG+PG no liberan sus componentes individuales (AG o PG) sino que se desprenden de la superficie en forma de redes (MPN-AG+PG). Este comportamiento es diferente al observado para NPe de TOH y Carv donde los productos de liberación coincidían con las señales de moléculas de TOH y Carv en estado puro o libre. Además, se obtuvieron espectros con similares valores de absorbancia a lo largo del tiempo de exposición (2 h a 5 días), indicando que el desprendimiento de las redes MPN-AG+PG ocurre durante las primeras 2 h de exposición en PBS.

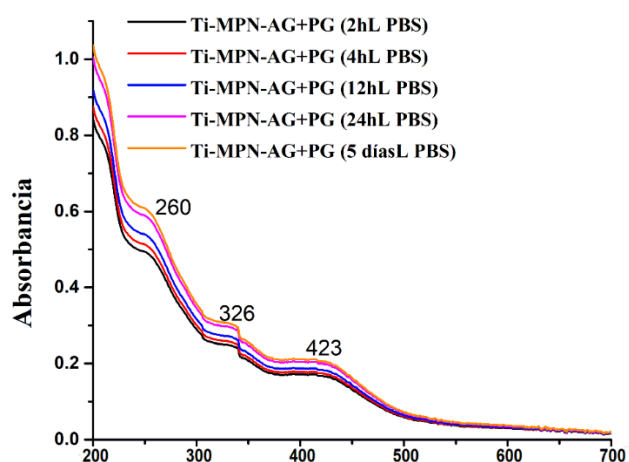


Figura 5.21. Espectros UV-visible de los productos de liberación de Ti-MPN-AG+PG en PBS. Todos los espectros corresponden a una dilución 1/10 de cada muestra tomada luego del período indicado.

También se tomaron espectros UV-visible para las muestras de Ti-MPN-AG y Ti-MPN-PG en el mismo periodo de tiempo de incubación en PBS (2 h a 5 días) y no se obtuvieron señales de absorbancia que indicaran liberación de las MPN ni de sus FF correspondientes (los espectros mostraron absorbancia constante cercana a cero, resultados no mostrados).

5.3.5.2 Respuesta electroquímica luego de la inmersión de las muestras en PBS

Como se informó anteriormente, todas las MPN estudiadas producían un desplazamiento considerable del valor de E_{corr} en relación con el Ti control, lo que permitía identificar la presencia de las MPN sobre la superficie de Ti. Con el propósito de identificar cambios en las MPN-AG+PG luego de la incubación en PBS, se realizaron curvas de Tafel a 2 y 24 h (Figura 5.22-A). Los resultados revelaron que las muestras de Ti-MPN-AG+PG luego de 2 y 24 h de incubación en PBS son similares al Ti control y sus valores de E_{corr} coinciden. Una vez más, estos resultados sugieren que las MPN-AG+PG se han liberado completamente desde la superficie de Ti al medio acuoso, indicando que la adhesión de estas MPN sobre la superficie de Ti es débil y poco duradera. En contraste y a modo de ejemplo, en la Figura 5.22-B se presentan las curvas de Tafel de las muestras Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG luego de 24 h de incubación en PBS donde puede observarse que no hay cambios significativos en las curvas obtenidas ni en el valor de E_{corr} en comparación a las MPN recién desarrolladas (comparar con la Figura 5.13).

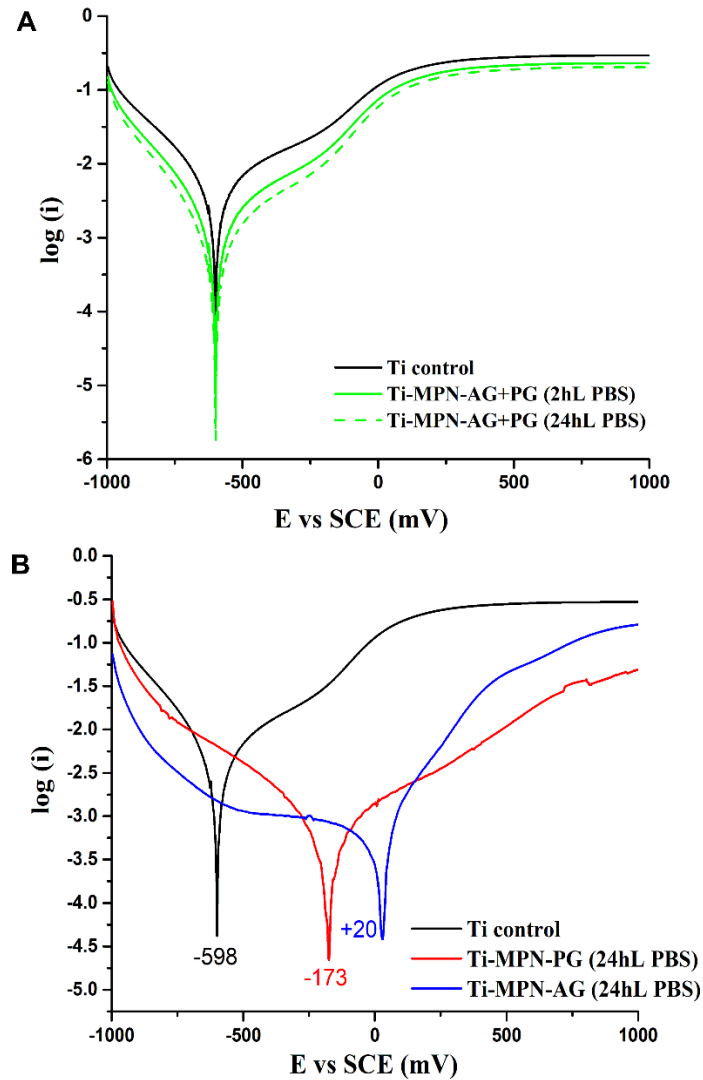


Figura 5.22. Curvas de Tafel obtenidas luego de incubación en PBS a 37°C. A) Ti-MPN-AG+PG y B) Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG.

5.3.5.3 Grado de estabilidad de las diferentes MPN

Todos los resultados presentados indican que Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG forman recubrimientos adheridos de forma estable sobre la superficie de Ti que no se desprenden cuando son sumergidas en soluciones de PBS. Esta estabilidad resulta útil para la posterior adhesión de NP_{Ag} sobre las muestras de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG, lo cual será abordado en el Capítulo 7. Resultados similares fueron reportados para MPN de AT y Fe³⁺ desarrolladas sobre sustratos de cuarzo y silicio donde se comprobó que las MPN se adhieren de forma estable, sin desprenderse, cuando son sometidas a variaciones de pH (entre 6 y 8) y tampoco se ven afectadas cuando son sometidas a concentraciones crecientes de NaCl de (0 a 4 M) [245]. Además, la estabilidad de unión entre las MPN y

los sustratos ensayados sólo se vio afectada a pH ácidos (entre 1 y 5) [245], indicando que las MPN de AT son estables a pH fisiológicos, tal como se demostró para las muestras de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG cuando fueron sumergidas en soluciones de PBS. Similar comportamiento frente al pH fue descrito para otras MPN adheridas sobre diferentes sustratos [68,246]. Por lo tanto, la estabilidad de las MPN a pH fisiológico hace atractiva su utilización en aplicaciones biomédicas.

Por el contrario, las Ti-MPN-AG+PG no presentaron una unión estable con la superficie de Ti, ya que luego de sumergir las muestras de Ti-MPN-AG+PG en PBS los depósitos particulados de las MPN se desprendieron en su totalidad de la superficie de Ti.

5.3.6 Determinación del ángulo de contacto

Los resultados de las medidas de hidrofiliidad a través del ángulo de contacto se presentan en la Figura 5.23 donde se observa que el Ti control presenta un ángulo de $64^{\circ} \pm 3^{\circ}$. Las muestras de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG disminuyen el ángulo de contacto a $36^{\circ} \pm 4^{\circ}$ y $44^{\circ} \pm 4^{\circ}$, respectivamente. Por el contrario, las muestras de Ti-MPN-AG+PG presentan un ángulo similar al Ti control ($58^{\circ} \pm 6^{\circ}$). Estos resultados revelan que Ti-MPN-AG y en mayor medida Ti-MPN-PG modifican la superficie de Ti volviéndola más hidrofílica.

La disminución del ángulo de contacto y por consiguiente la obtención de superficies más hidrofílicas en presencia de recubrimientos de MPN se reportó también para MPN desarrolladas sobre diversos sustratos [221,245,247]. En coincidencia con dichos resultados la mayor hidrofiliidad de las superficies de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG puede explicarse por los cambios químicos en la superficie de Ti debidos a la presencia sobre la superficie metálica de grupos -OH del PG y AG, respectivamente, comprobados por espectroscopía ATR-FTIR. Estos grupos funcionales pueden interactuar mediante enlaces de puente de hidrógeno con las moléculas de agua del medio reteniendo mayor cantidad de agua en comparación a superficies de Ti descubiertas [233,248]. Se ha sugerido que la hidrofiliidad de la superficie puede favorecer la adhesión y proliferación celular [247,249]. De esta forma, las superficies de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG podrían mejorar la citocompatibilidad, lo cual se analiza en la Sección siguiente.

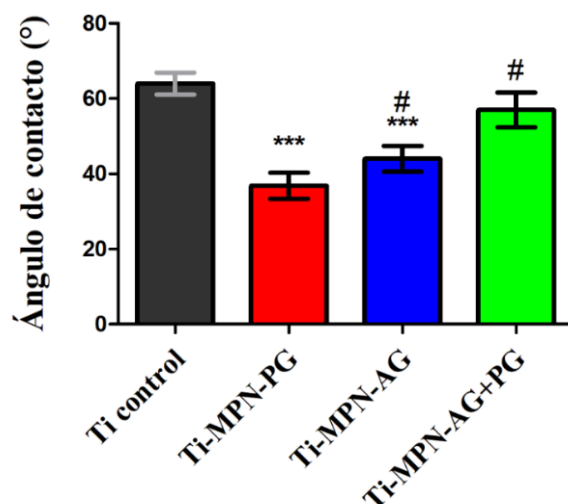


Figura 5.23. Determinación del ángulo de contacto para las diferentes MPN desarrolladas sobre Ti. *** indica diferencias significativas con el Ti control y # indica diferencias significativas con las muestras de Ti-MPN-PG ($p < 0,01$).

5.3.7 Citocompatibilidad y actividad osteogénica de las MPN

Se evaluó la citocompatibilidad de las MPN desarrolladas sobre Ti en líneas celulares pre-osteoblásticas (MC3T3-E1) y fibroblásticas (L929) de ratón. Para dicho fin, se sembraron células sobre las muestras de Ti control, Ti-MPN-PG, Ti-MPN-AG y Ti-MPN-AG+PG y se incubaron por 7 días para cuantificar la adhesión y proliferación celular por tinción con naranja de acridina. Si bien se demostró que las MPN-AG+PG se desprenden de la superficie de Ti, se utilizaron muestras de Ti-MPN-AG+PG con fines comparativos.

En primer lugar, se puede observar (Figura 5.24-A) que, en el período evaluado, las superficies con MPN muestran una citocompatibilidad similar a la que se observa en Ti control con células fibroblásticas (L929). Por el contrario, la proliferación de células pre-osteoblásticas sobre las muestras de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG se incrementa significativamente a partir del día 2 de incubación, finalizando a los 7 días con un área cubierta de células un 50% mayor que la correspondiente al Ti control (Figura 5.24-B). Las muestras de Ti-MPN-AG+PG, en cambio, no incrementaron la proliferación de células pre-osteoblásticas y mantuvieron niveles similares de adhesión que el Ti control, como era de esperarse.

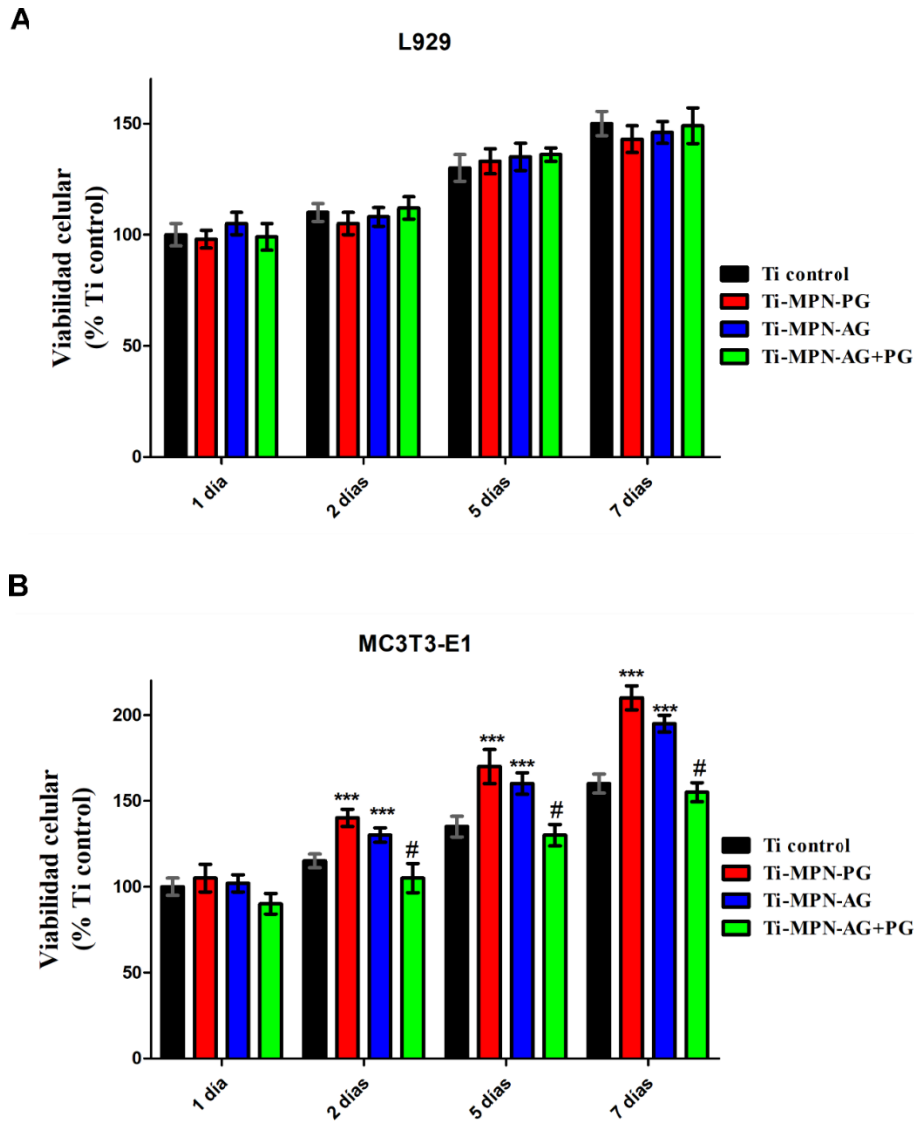


Figura 5.24. Citocompatibilidad de las MPN desarrolladas sobre Ti luego de 7 días de incubación. A) Línea fibroblástica L929 y B) Línea pre-osteoblástica MC3T3-E1. *** indica diferencias significativas con el Ti control y # indica diferencias de las muestras de Ti-MPN+AG+PG con Ti-MPN-AG y Ti-MPN-PG ($p < 0,01$).

Trabajos previos [249,250] han demostrado que, cuando se utiliza otro ion, tal como es el caso de MPN de AG y TA desarrolladas con iones Fe^{3+} , se incrementa la proliferación de células osteoblásticas y, además, aumenta la producción de marcadores osteogénicos, favoreciendo la oseointegración tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos animales de laboratorio. Los resultados de la Figura 5.24 demostraron que cuando se utiliza Mg^{2+} , como es el caso de las superficies de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG, se incrementa la proliferación de células pre-osteoblásticas, aumentando la citocompatibilidad de las superficies. Para confirmarlo, se procedió a determinar la

producción de marcadores osteogénicos (FAI, colágeno tipo I y depósitos de Ca^{2+}) luego de 15 y 21 días de diferenciación de células MC3T3-E1 (Figura 5.25). Los resultados revelan que las muestras de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG duplican la producción de FAI y de proteínas tras 15 días de incubación, y también duplican la producción de colágeno, depósitos de Ca^{2+} y proteínas tras 21 días de incubación en comparación con el Ti control y las muestras de Ti-MPN-AG+PG. Dado a que el aumento en la producción de FAI, colágeno y calcio es similar al aumento de proteínas, se puede inferir que las superficies de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG incrementan la producción de dichos marcadores osteogénicos debido a un aumento en el número de células adheridas sobre Ti, lo cual se observó también en el incremento de la proliferación de estas superficies con células pre-osteoblásticas. Estos resultados permiten inferir que las MPN de AG y PG desarrolladas con Mg^{2+} presentan propiedades osteogénicas que podrían favorecer y/o acelerar el proceso de oseointegración de los materiales de Ti, al igual que las MPN desarrolladas con otros iones reportados en bibliografía [251].

Las propiedades fisicoquímicas de la superficie condicionan fuertemente la adhesión y diferenciación de las células [252]. Las muestras de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG presentaron superficies mucho más hidrofílicas que las de Ti control e incrementaron la proliferación celular y la producción de marcadores osteogénicos en células pre-osteoblásticas. Por otra parte, este aumento en la citocompatibilidad y en la diferenciación osteogénica de las superficies de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG también puede ser explicada por la presencia del AG y PG. Se ha demostrado en condiciones *in vitro* que el AG y polifenoles presentes en extractos de té incrementan la osteogénesis promoviendo la diferenciación celular de células osteoblásticas asociada al aumento en la producción de proteínas y marcadores celulares específicos de maduración osteoblástica (vías de señalización RunX2/Bmp2 y Wnt/ β catenina) [250,253,254]. Por lo tanto, el aumento en la proliferación celular de células pre-osteoblásticas y su consecuente aumento en la producción de marcadores osteogénicos en las superficies de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG pueden ser explicados por los cambios fisicoquímicos que dichas MPN producen en la hidrofiliidad y por la presencia misma de estos FF que presentan actividad osteogénica propia.

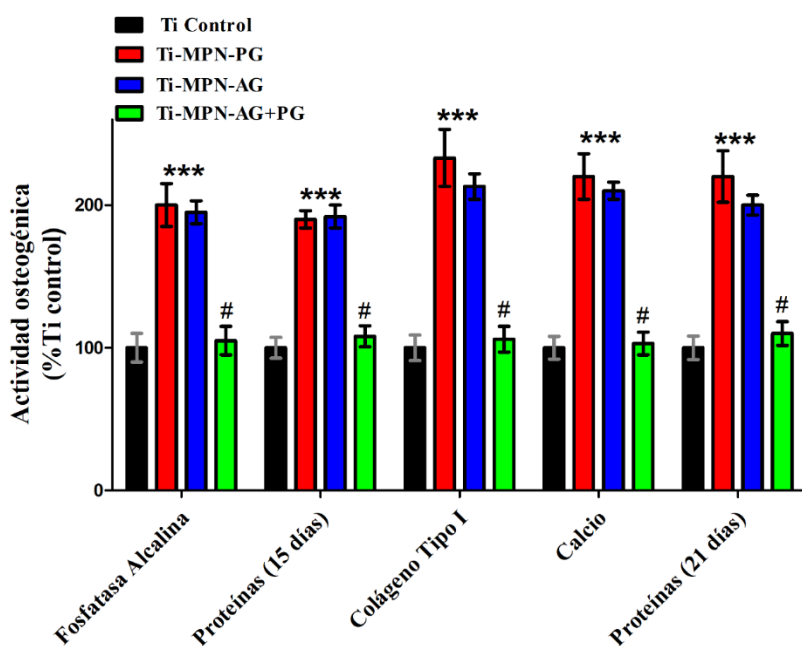


Figura 5.25. Determinación de la actividad osteogénica de las MPN desarrolladas sobre Ti luego de 15 (FAI) y 21 días de diferenciación (Colágeno y calcio) de células pre-osteoblásticas. *** indica diferencias significativas con el Ti control y # indica diferencias significativas de las muestras de Ti-MPN+AG+PG con respecto a Ti-MPN-AG y Ti-MPN-PG ($p < 0,01$).

5.3.8 Actividad antimicrobiana de las MPN

5.3.8.1 Recuento de las bacterias adheridas: colonización inicial de la superficie

La actividad antimicrobiana de las MPN contra *S. aureus* se determinó mediante el recuento en placa de UFCs a 3 h para evaluar su influencia en el proceso de colonización inicial de la superficie de Ti (Figura 5.26-A). Si bien se demostró anteriormente que las MPN-AG+PG se desprenden completamente de la superficie de Ti, se midió la actividad antimicrobiana con fines comparativos. Los resultados demostraron que las muestras de Ti-MPN-PG, Ti-MPN-AG y Ti-MPN-AG+PG no reducen la adhesión bacteriana tras 3 h de incubación. Estos resultados concuerdan con los datos reportados acerca de la actividad antimicrobiana del AG y PG los cuales no fueron efectivos aún a altas concentraciones ($> 1024 \mu\text{g/mL}$) [255]. Por lo tanto, las bacterias pueden colonizar la superficie de Ti en presencia de las MPN, a diferencia de las NPe de TOH y Carv que, tal como se analizó en el Capítulo 4, eran capaces de erradicar las bacterias de la superficie.

Asimismo, se determinó la actividad antimicrobiana de las MPN sobre el desarrollo de *biofilms* tempranos de *S. aureus* tras 24 h de incubación (Figura 5.26-B). El recuento en placa de UFCs reveló que las muestras de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG reducen levemente (un orden de magnitud) la cantidad de bacterias adheridas sobre Ti en relación con el Ti control y las muestras de Ti-MPN-AG+PG. Lo cual indica actividades antimicrobiana y antiadherente pobres de las MPN-AG y PG.

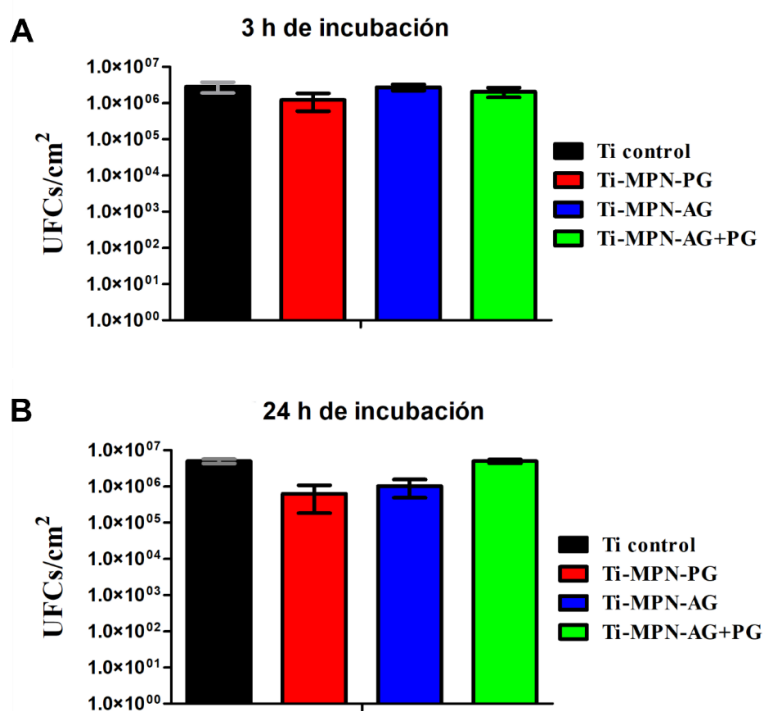


Figura 5.26. Determinación por recuento de UFCs de la actividad antimicrobiana contra *S. aureus* de las MPN desarrolladas sobre Ti. A) Evaluación de la colonización inicial de la superficie luego de 3 h de cultivo y B) Desarrollo de *biofilms* luego de 24 h de cultivo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras.

5.3.8.2 Evaluación del área colonizada. Efecto antibiofilm

Con el propósito de conocer el estado fisiológico y la estructura de los *biofilms* formados, se realizó la tinción Live/Dead sobre las diferentes muestras a 3 y 24 h de incubación con *S. aureus* (Figura 5.27). Los resultados revelan que tras 3 h de incubación las bacterias presentes sobre todas las muestras se encuentran vivas y adheridas en forma individual sobre las MPN. No se detectaron bacterias muertas en ninguna de las superficies ensayadas. Estos resultados coinciden con el recuento en placa de UFCs realizados para el mismo tiempo de cultivo.

Tras 24 h de cultivo, nuevamente, todas las bacterias detectadas se encontraban vivas. Además, se observó el desarrollo de *biofilms* en las muestras de Ti control y Ti-MPN-AG+PG y una mayor superficie cubierta por bacterias a 24 h que en el caso del ensayo de 3 h para el mismo tipo de muestras (Tabla 5.3). Las imágenes indican que en los casos de Ti control y Ti-MPN-AG+PG tras 24 h de incubación, las bacterias proliferaron y formaron *biofilms*. Sin embargo, en las superficies de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG se observó que las bacterias adheridas no proliferaron sobre la superficie y, por lo tanto, no desarrollaron *biofilms*. En la Tabla 5.3 se resumen los porcentajes de áreas cubiertas por bacterias vivas calculados para cada muestra en función del Ti control a 3 h. Para las muestras Ti control y Ti-MPN-AG+PG se pudo constatar que luego de 24 h de cultivo, se desarrollan *biofilms* que quintuplican el área cubierta por bacterias con relación al Ti control a 3 h de incubación. En cambio, las muestras de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG mantienen similar porcentaje de adhesión de bacterias a 3 y 24 h, indicando que dichas superficies presentan actividad antibiofilm. Es decir, que si bien no presentan efecto bactericida (no producen la muerte de las bacterias adheridas), las superficies de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG no permiten la proliferación de las bacterias adheridas que conduciría al desarrollo posterior del biofilm. Similares efectos antiadherentes y antibiofilm han sido reportados para diversas MPN y NPe de FF [38,256–258].

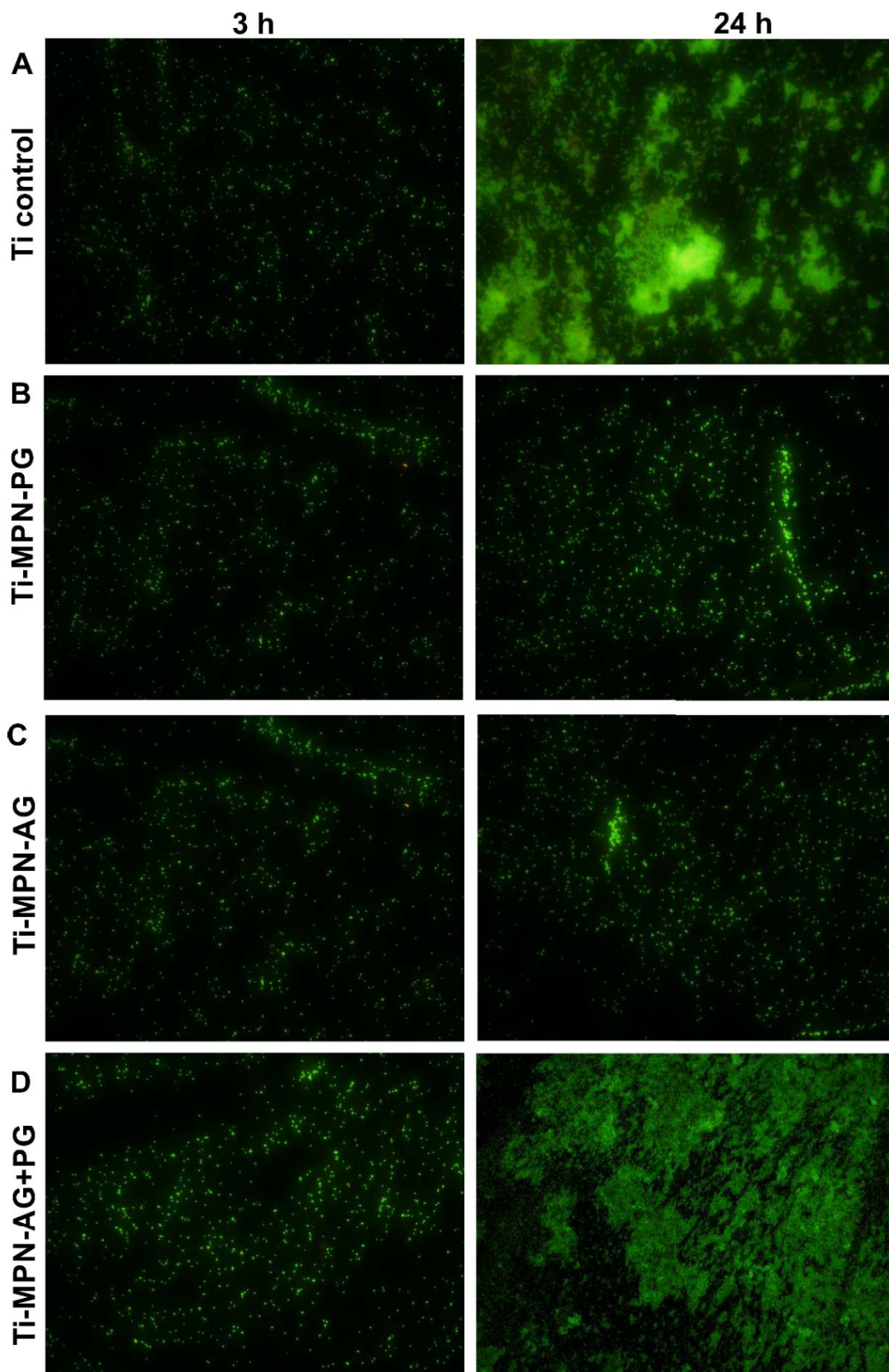


Figura 5.27. Tinción Live/Dead para las muestras A) Ti control, B) Ti-MPN-PG, C) Ti-MPN-AG y D) Ti-MPN-AG+PG tras 3 y 24 h de incubación con *S. aureus*.

Tabla 5.3. Determinación del porcentaje de área correspondiente a bacterias adheridas tras 3 h y 24 h de incubación con *S. aureus* (Live/Dead). Los resultados se expresan como % del área cubierta por bacterias en relación con el Ti control a 3 h.

Muestras	3 h (%)	24 h (%)
Ti control	100 ± 4	500 ± 30 ***
Ti-MPN-PG	102 ± 5	110 ± 6
Ti-MPN-AG	103 ± 4	115 ± 8
Ti-MPN-AG+PG	98 ± 7	470 ± 30***

*** indica diferencias significativas con el Ti control a 3 h (p<0,01).

5.3.8.3 Evaluación de la producción de EPS

Con el objeto de completar la investigación sobre la formación de *biofilms* sobre las diferentes superficies en estudio, se evaluó el efecto de las MPN sobre la producción de EPS tras 24 h de incubación con *S. aureus* (Figura 5.28). En sintonía con los resultados obtenidos mediante la tinción Live/Dead, las muestras de Ti control y Ti-MPN-AG+PG presentaron gran producción de EPS sobre la superficie de Ti (Figura 5.28-A y D respectivamente), lo que es indicativo de la formación *biofilms* sobre dichas superficies. En cambio, el desarrollo de EPS en las muestras de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG fue menor (un 70% menos) que las muestras Ti control (Tabla 5.4). Estos resultados revelan que las Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG que cubren en forma continua la superficie impide que las bacterias puedan producir EPS sobre la misma, reduciendo su capacidad de producir biofilm. Se ha informado que EGCG y polifenoles presentes en extractos de té verde presentan actividad antibiofilm por interferir fuertemente en el desarrollo del EPS de diversas cepas bacterianas [259]. Dichos FF interfieren en el ensamblaje de los diversos componentes del EPS (proteínas, polímeros, ADN, etc) impidiendo de esta forma la formación de la película condicionante, del propio EPS y, como consecuencia, las bacterias no pueden desarrollar *biofilms* [260]. Además, al igual que el TOH, se ha reportado que el AG inhibe la producción de PIA en *S. aureus*, componente esencial para la formación del EPS [261].

Por otra parte, el AG, EGCG, AT y otros polifenoles presentes en hojas de té verde presentan actividad anti-*quorum sensing* inhibiendo la proliferación bacteriana y la formación de *biofilms* [262–264]. Asimismo, se ha reportado que el PG tiene propiedades anti-*quorum sensing* sobre *E. coli* y *S. aureus* inhibiendo la producción de EPS y la formación de *biofilms* [265]. También se informó que dicho FF reduce la formación de biofilm de *S. aureus* y *S. epidermis* por estrés oxidativo como consecuencia del incremento de ROS [266]. Por último, el AG y PG en estado puro (libre) presentan acción

disruptiva de la membrana bacteriana de *S. aureus* interactuando con las glicoproteínas y peptidoglucano, provocando la lisis celular [267,268]. De esta forma, al igual que el TOH y Carv, el AG y PG en estado puro son agentes antimicrobianos *multi-targets* afectando la viabilidad bacteriana y la formación de *biofilms* por diferentes vías. Sin embargo, dicha acción se reduce cuando estos compuestos forman MPN. Por ese motivo las superficies de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG no presentan acción de muerte sobre *S. aureus*. A diferencia de las superficies de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv donde había liberación de TOH y Carv puro (Capítulo 4), el PG y el AG no se liberarían desde las superficies de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG, respectivamente, por lo cual no podrían ejercer acción bactericida.

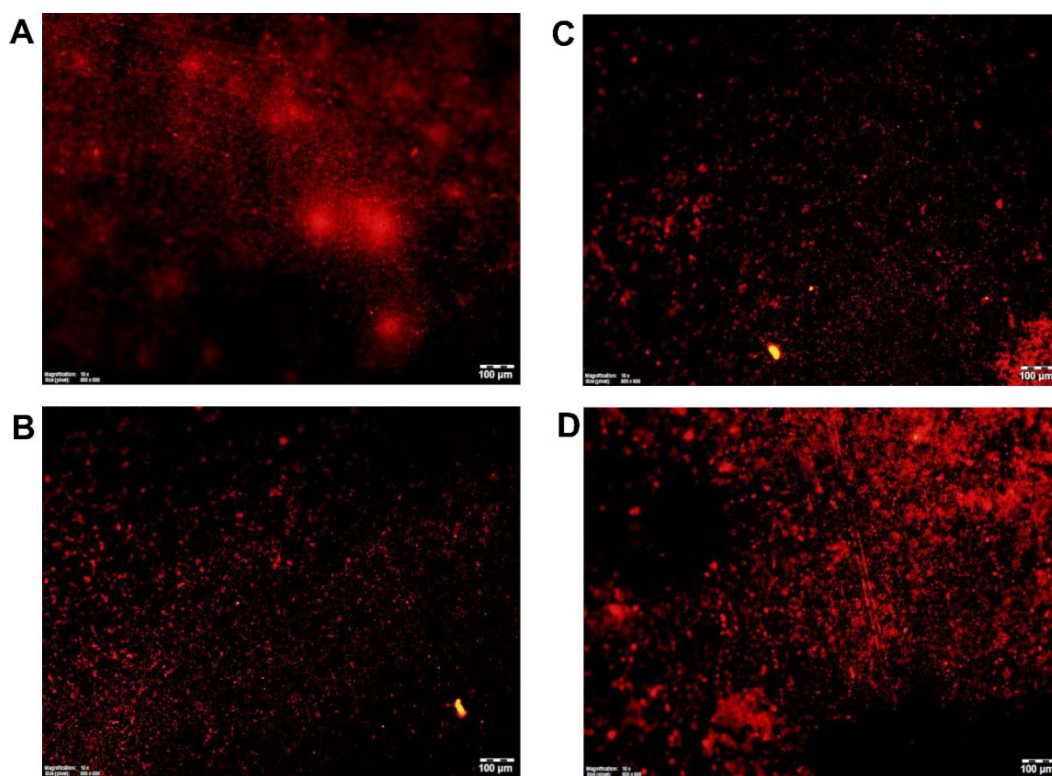


Figura 5.28. Tinción Sypro Ruby para la determinación de la producción de EPS tras 24 h de cultivo con *S. aureus* de: A) Ti control, B) Ti-MPN-PG, C) Ti-MPN-AG y D) Ti-MPN-AG+PG.

Tabla 5.4. Determinación de la producción de EPS tras 24 h de incubación con *S. aureus*. Los resultados se expresan en función del Ti control.

<i>Muestras</i>	<i>EPS (%)</i>
Ti control	100 ± 10
Ti-MPN-PG	35 ± 6 ***
Ti-MPN-AG	33 ± 8 ***
Ti-MPN-AG+PG	98 ± 5

*** indica diferencias significativas con el Ti control ($p < 0,01$).

Por lo tanto, los resultados confirman que las muestras de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG no tienen efecto bactericida, pero confieren propiedades antibiofilm a la superficie de Ti, ya que disminuyen la producción del EPS y, en consecuencia, el posterior desarrollo del *biofilms*. Este efecto, de moderado impacto cuantitativo, es de suma importancia en relación con la acción de los antibióticos tal como se verá en la próxima sección.

5.3.8.4 Evaluación de posible efecto sinérgico en la acción antimicrobiana de MPN + antibiótico

Como se indicó en la introducción (Capítulo 1), la producción de EPS constituye un mecanismo de resistencia y protección de los *biofilms* contra agentes antimicrobianos, como los antibióticos, debido a que reducen la penetración de éstos hacia el interior del biofilm. Por lo tanto, las muestras de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG pueden sensibilizar a las bacterias adheridas en su superficie a la acción de antibióticos, ya que inhiben la producción del EPS. Para evaluar posibles efectos sinérgicos entre Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG y antibióticos, se realizaron ensayos de recuento en placa de UFCs utilizando amikacina, antibiótico ampliamente utilizado para tratar infecciones nosocomiales y de materiales implantables. Primeramente, se incubaron las muestras de Ti control, Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG durante 24 h para favorecer la formación del biofilm sobre dichas superficies. Luego, se retiró el medio de cultivo y se adicionó medio fresco con una concentración de 5 mg/mL de amikacina y se incubaron 24 h más para evaluar el posible efecto antimicrobiano sinérgico entre las MPN y el antibiótico (Figura 5.29). Los resultados arrojaron que en presencia de amikacina las muestras de Ti sin MPN reducen en aproximadamente 2 órdenes la cantidad de bacterias presentes en el biofilm temprano desarrollado comparado con el biofilm desarrollado sobre Ti sin amikacina en el medio acuoso. Sin embargo, en las muestras de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG con amikacina la cantidad de UFCs disminuyen en 5 órdenes de magnitud en comparación a dichas superficies sin tratamiento antibiótico y 4 órdenes en comparación al Ti control con

amikacina. Efectos sinérgicos similares se encontraron en ensayos de PG puro + amikacina en cultivos de *Chromobacterium violaceum* [265].

Los resultados de la tinción Live/Dead concuerdan con los anteriores. Puede observarse (Figura 5.30) que la mayoría de las bacterias están vivas sobre la superficie del Ti control luego del tratamiento con amikacina (Figura 5.30-A). En cambio, para las muestras de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG, se observa que la gran mayoría de las bacterias están muertas por la acción combinada entre las MPN y el antibiótico (Figura 5.30-B y C, respectivamente), siendo el proceso mixto más efectivo que cada tratamiento por separado. Por lo tanto, los resultados demuestran que hay un efecto sinérgico entre las MPN y la acción de la amikacina.

Como se pudo observar en los resultados anteriores, las muestras de Ti control desarrollan un biofilm prominente tras 24 h de cultivo con *S. aureus*, con gran producción de EPS. Cuando estas muestras son sometidas al tratamiento con amikacina, dicho antibiótico no puede ejercer plenamente su acción antimicrobiana debido a la presencia del biofilm y de abundante EPS protector que impide su llegada hacia las bacterias del interior del biofilm. Como consecuencia, la acción bactericida de la amikacina se ve bloqueada y sólo reduce en 2 órdenes de magnitud las UFCs desarrolladas en el biofilm sobre el Ti control. Por lo contrario, las muestras de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG al impedir la producción del EPS, dejan a las bacterias adheridas más expuestas a la acción de la amikacina. Como consecuencia de la importante acción antibiofilm de las Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG, dicho antibiótico puede ejercer su acción bactericida reduciendo en 5 órdenes de magnitud las UFCs desarrolladas sobre Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG. Finalmente, se puede concluir que los efectos sinérgicos entre las MPN-PG y MPN-AG con la amikacina constituyen un prometedor tratamiento preventivo para impedir la formación de *biofilms* sobre materiales implantables de Ti.

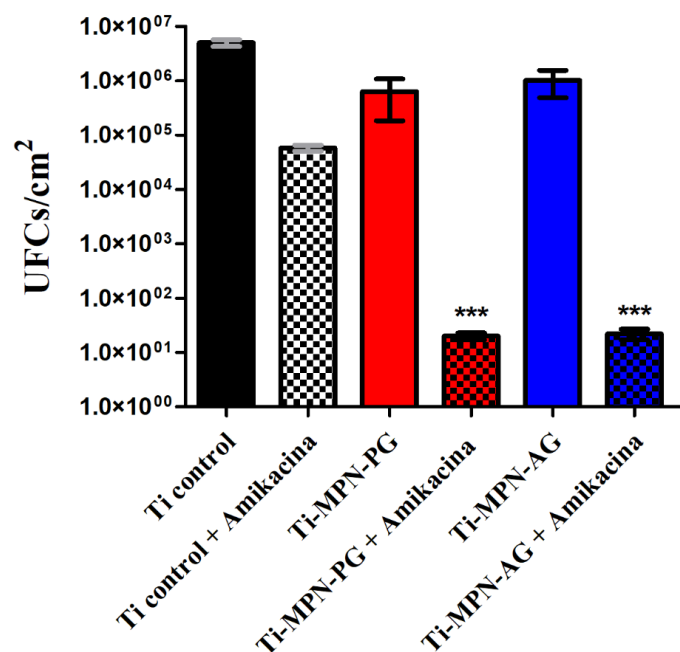


Figura 5.29. Efectos antimicrobianos sinérgicos entre Ti-MPN-PG + amikacina y Ti-MPN-AG + amikacina. *** indican diferencias significativas con el Ti control + amikacina ($p < 0,01$).

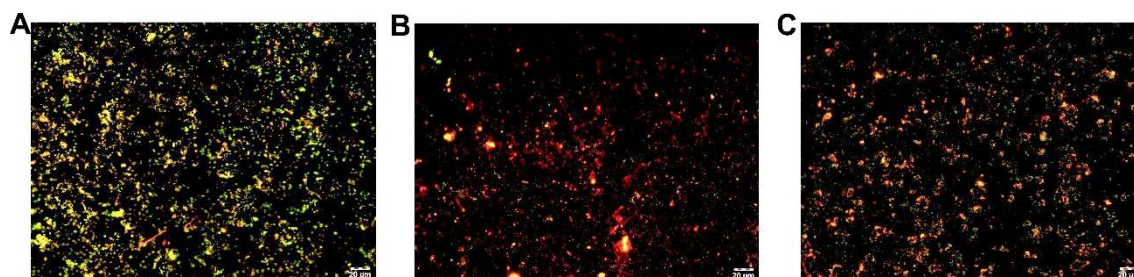


Figura 5.30. Tinción Live/Dead luego del tratamiento con amikacina para A) Ti control + amikacina, B) Ti-MPN-PG + amikacina y C) Ti-MPN-AG + amikacina. Bacterias verdes o amarillas: vivas; bacterias rojas: muertas

5.4 Conclusiones

A través de los resultados presentados en este Capítulo se concluye que es posible desarrollar MPN de AG y PG coordinados mediante iones Mg^{2+} por procedimientos NEC simples, en solución, que involucran fenómenos espontáneos de autooxidación y polimerización del AG o PG para formar MPN estables y altamente adhesivas sobre la superficie Ti.

La formación de las MPN es fácilmente detectable por cambios de color de la solución de síntesis en el tiempo verificados a través de espectroscopía UV-visible. La presencia de las MPN de PG y AG fue sencillamente identificada por el cambio de color

anaranjado a rojo intenso en la solución de síntesis y por máximos de absorbancia a 404 y 423 nm, respectivamente, obtenidos por espectroscopía UV-visible. Asimismo, el proceso de formación de las MPN puede ser detectado por cambios en el valor del OCP a lo largo del tiempo de síntesis. Cada MPN presentó registros de OCP muy diferentes entre sí, que muestran que el proceso de ensamblado/polimerización de las MPN sobre la superficie de Ti es complejo y muy particular para cada FF. Esto fue confirmado por imágenes AFM donde se observó que las MPN adheridas sobre Ti presentaron diferentes estructuras, parámetros de rugosidad y topografías. Las MPN obtenidas con PG y AG produjeron recubrimientos lisos, continuos y estables sobre toda la superficie de Ti, con topografías más lisas y características más hidrofílicas que las muestras de Ti control. En cambio, las MPN desarrolladas con mezclas de AG+PG dieron como resultado depósitos particulados de gran tamaño ($> 1 \mu\text{m}$) distribuidos aleatoriamente sobre la superficie de Ti que no modificaron la hidrofílicidad con relación al Ti control.

Las MPN presentaron similares grupos funcionales revelados por espectroscopía ATR-FTIR debido a la similitud estructural del AG y PG. Las señales obtenidas indican que los grupos -OH de dichas moléculas se oxidan a grupos éteres y polimerizan formando redes o MPN y que dichos grupos interactúan con el TiO_2 mediante la formación de enlaces tipo puente de hidrógeno.

La estabilidad de la unión de las MPN a la superficie de Ti fue evaluada mediante liberación de productos en PBS y por imágenes AFM. No se detectaron productos de liberación a partir de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG mediante mediciones en UV-visible ni se observaron modificaciones topográficas de las películas desarrolladas, indicando que forman recubrimientos estables y altamente adheridos sobre el Ti. Por el contrario, las MPN-AG+PG presentaron una unión débil a la superficie de Ti, ya que luego de 24 h de incubación en PBS se detectó que los depósitos particulados de esta MPN se desprendían por completo. Además, no se identificaron por espectroscopía UV-visible productos de liberación de AG y PG puros y libres, sino que los máximos de absorbancia se correspondieron con los obtenidos para la formación de las MPN-AG+PG. Estos resultados indican que una vez que los FF polimerizan para formar las redes, no se liberan de forma individual, sino que es la red completa la que se desprende al medio acuoso.

Es de destacar que las muestras de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG aumentan la citocompatibilidad de la superficie de Ti con células pre-osteoblásticas, duplicando la proliferación de las mismas y los parámetros de actividad osteogénica en relación con el

Ti control. Estos resultados sugieren una mejora del proceso de oseointegración evaluado en condiciones *in vitro* para el Ti modificado con recubrimientos de MPN-PG o MPN-AG. Este aumento en la citocompatibilidad y en la actividad osteogénica puede explicarse por efectos combinados principalmente entre el aumento considerable de la hidrofiliidad de la superficie y la presencia en las redes de AG y PG con efectos osteogénicos propios y conocidos.

Finalmente, a diferencia de las NPe autoensambladas de TOH y Carv, las superficies de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG presentan baja actividad bactericida contra *S. aureus*. Esto puede deberse a que las MPN no liberan AG o PG puro al medio. Sin embargo, se demostró que las muestras de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG exhiben actividad antibiofilm, ya que impiden que las bacterias adheridas sobre su superficie produzcan EPS suficiente para el posterior desarrollo del biofilm. Este efecto permite inducir una acción antimicrobiana sinérgica con amikacina, ya que las MPN, al reducir la producción de EPS y su consecuente acción protectora, expone a las bacterias adheridas a la acción del antibiótico llegando con muy bajo porcentaje de supervivencia.

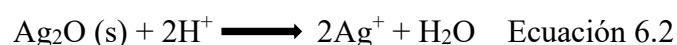
Por último, la estabilidad de la adhesión de las MPN-PG y MPN-AG a la superficie de Ti, junto con su actividad antibiofilm, hacen interesante su funcionalización con NPaAg. Estas NPa fueron desarrolladas también por NEC, tal como se describirá en el Capítulo 6, con el objetivo de inmovilizarlas sobre las MPN (Capítulo 7), para aumentar el efecto antimicrobiano gracias a la acción bactericida de las NPaAg.

Capítulo 6: Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por métodos ecocompatibles formadas a partir de ácido gálico puro o de extracto de té verde.

6.1 Introducción general

Entre las NPa con propiedades antimicrobianas, las NPAG son las más utilizadas para combatir bacterias resistentes a agentes antimicrobianos tradicionales y la formación de *biofilms*. Esto se debe a que dichas NPa pueden afectar la viabilidad bacteriana por diferentes mecanismos de acción, como se abordara en más detalle en la Sección 6.3.5. La capacidad bactericida de las NPAG es ampliamente reconocida y constatada en numerosos reportes tanto para bacterias Gram negativas como Gram positivas [85,269–271] y también se ha reportado actividad antifúngica y antiviral [272–275].

La alta efectividad bactericida de las NPAG se debe principalmente a su gran capacidad de liberar al medio iones Ag^+ (eficaces agentes antimicrobianos) dada su alta relación superficie/volumen. Por esos motivos las NPAG de menores tamaños muestran mayor interacción con el entorno y elevado nivel de penetración, así como alto grado de toxicidad [271,276]. Dicha capacidad de liberar iones Ag^+ al medio es el principal mecanismo, aunque no el único, que explica la actividad antimicrobiana de las NPAG. Esto se debe a que, en medio acuoso neutro, las NPAG se encuentran parcialmente oxidadas (Ecuación 6.1) formando una delgada capa de 1-2 nm de óxido de plata en su superficie que se disuelve liberando iones Ag^+ tal como indica la Ecuación 6.2 [277,278]:



En el presente trabajo se sintetizaron NPAG por NEC que implica, tal como se detalló en el Capítulo 1, evitar el uso de reactivos tóxicos/contaminantes, mediante la utilización como estabilizantes y agentes reductores al AG (NPAGAG) y a un extracto natural de té verde (NPAGTV). Las NPAG obtenidas fueron caracterizadas fisicoquímicamente a través de TEM, DLS, espectroscopías FTIR, UV-visible e ICP-OES y luego se evaluó la actividad antimicrobiana de las mismas contra las bacterias *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. Asimismo, se determinó la citocompatibilidad de las NPAGAG y NPAGTV en líneas celulares fibroblásticas y pre-osteoblásticas.

6.2 Materiales y métodos

6.2.1 Síntesis ecocompatible de nanopartículas de plata utilizando ácido gálico

La obtención de NPaAgAG se realizó a partir de la modificación y puesta a punto de diferentes protocolos previamente reportados [279–281]:

1. Se preparó una solución de AgNO₃ (8 mM) y otra de AG (4 mM).
2. Se mezclaron en un vaso de precipitado 1 mL de AgNO₃ (8 mM) con 0,5 mL de AG (4 mM) llevando a un volumen final de 20 mL con el agregado de agua Milli-Q.
3. Se ajustó el pH de la solución a 10 con agregado de 10 µL de NaOH 1M.
4. Se mantuvo la reacción a temperatura ambiente durante 48 h y en agitación magnética (500 rpm).
5. Una vez finalizada la síntesis, las NPaAgAG obtenidas fueron purificadas por diálisis.
6. Las NPaAgAG se conservaron en heladera a 4°C.

6.2.2 Síntesis ecocompatible de nanopartículas de plata utilizando extracto de té verde

En primer lugar, se obtuvo un extracto de té verde (ExTV) utilizando las hojas de un té verde comercial estilo *ban cha* marca Jesper producido en la provincia de Misiones, Argentina. Se seleccionó dicha marca debido a que provee las hojas del té tal cual son obtenidas desde las ramas del arbusto de té (Figura 6.1-A). El té verde estilo *ban cha* se diferencia de los demás tipos de té verde debido a que se obtiene con las ramas y hojas más gruesas del arbusto de *Camellia sinensis* que se dejan madurar/secar por 2 o 3 años de forma natural, obteniéndose un té no fermentado y ligeramente más alcalino con contenidos bajos de cafeína y purina [282].

Por otra parte, se ha reportado que los principales componentes de té verde en general son el AG y diferentes tipos de FF derivados del AG, como el AT, catequinas (EGCG, principalmente), taninos y otros [283,284]. Se sabe que estos FF presentan un poder reductor apropiado para la síntesis de NPa metálicas. Los extractos de té verde son extensamente utilizados para la obtención vía NEC de NPa de Ag, Au, Cu, otras [285–288].

El ExTV se obtuvo de la siguiente manera:

1. Se extrajeron las hojas del té y se colocó 1 g de hojas trituradas (Figura 6.1-B) en un vaso de precipitado con 20 mL de agua Milli-Q.
2. Se llevo a ebullición por 5 minutos y se dejó enfriar por otros 20 minutos.
3. Luego se filtró la solución para separar las hojas de té del ExTV obtenido. Se obtuvieron aproximadamente 15 mL finales de ExTV, el cual presentó una coloración verde-amarilla (Figura 6.1-C).
4. Para purificar el ExTV obtenido y eliminar precipitados de materia orgánica, se filtró la solución del ExTV con un filtro de 0,1 μm y posteriormente se centrifugó en un tubo falcón de 15 mL durante 1 h a 17.000g. Luego de la centrifugación, se separó el sobrenadante (ExTV) del *pellet* y se obtuvo finalmente el ExTV purificado a partir del cual se obtuvieron las NPaAgTV.

La síntesis de las NPaAgTV se realizó a partir del mismo protocolo de síntesis de las NPaAgAG, pero reemplazando los 0,5 mL de AG (4 mM) por 1 mL de ExTV y ajustándose el pH a 10 con el agregado de 25 μL de NaOH 1 M. Se requirió mayor cantidad de NaOH que en el caso de AG para llevar el pH a 10 debido a que el ExTV presenta diversos FF (pK_a AT = 4,4; pK_a EGCG = 7,6; pK_a galo-catequina = 8,4, pK_a epigalo-catequina = 7,7) de mayor pK_a que el AG puro (pK_a = 4). La relación entre la concentración de AgNO_3 y los diferentes extractos naturales utilizados para la elaboración de las NPaAg no es reportada habitualmente y es difícil de calcular debido a la presencia, en porcentajes variables, de múltiples tipos de FF en dichos extractos, y/o a los diferentes tipos de síntesis llevadas a cabo. En el presente trabajo se optimizó el proceso, utilizando una relación 1:1 en volumen de ExTV y de la solución de AgNO_3 , encontrándose mejores resultados en cuanto a la reproducibilidad de la síntesis, el tamaño de las NPaAgTV y su estabilidad durante el almacenamiento.



Figura 6.1. Obtención del ExTV. A) Se muestran dos imágenes de hojas del té verde comercial utilizado, B) Hojas separadas y trituradas para la elaboración del ExTV y C) ExTV obtenido de coloración verde-amarilla.

6.2.3 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de plata obtenidas

Las diferentes NP_{Ag} sintetizadas por NEC fueron caracterizadas fisicoquímicamente por espectroscopía UV-visible. Posteriormente se realizaron los siguientes análisis:

1. Se determinó la concentración total de NP_{Ag} obtenidas por espectroscopía ICP-OES.

2. Se estimaron los tamaños promedio por imágenes S-TEM y por DLS. Se evaluó la estabilidad de las NP_{Ag} obtenidas sometiendo a las mismas a soluciones de mayor fuerza iónica (PBS, con concentraciones de sales y pH similares a la condición fisiológica) y determinando el diámetro hidrodinámico resultante por DLS.

3. Se evaluó la presencia de grupos funcionales en el *capping* de las NPa por espectroscopía FTIR.

6.2.4 Actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata

La actividad antimicrobiana de las NPaAgAG y NPaAgTV se determinó sobre bacterias planctónicas de cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* a través del cálculo de la CMI y CMB tal como se describió en el Capítulo 3.

La actividad antimicrobiana de las NPaAgAG y NPaAgTV contra bacterias sésiles (*biofilms*) se determinó sobre la superficie de materiales de Ti modificados superficialmente sobre las que se inmovilizaron las NPaAg, cuyos resultados se abordan en el Capítulo 7.

6.2.5 Citocompatibilidad de las nanopartículas de plata

La citocompatibilidad de las NPaAgAG y NPaAgTV se determinó en líneas celulares fibroblásticas y pre-osteoblásticas a través de las técnicas de reducción de MTT y ensayo de RN, acorde a lo descrito en Capítulo 3.

La viabilidad celular se determinó por tinción con naranja de acridina. Para esto se sembraron 100.000 células en cada pocillo de una placa de 6-well y se adicionó medio de cultivo con diferentes concentraciones de las NPaAg. Se incubaron las placas durante 24 h a 37°C y posteriormente se calculó el área cubierta por células.

En todos los casos, como grupo control se utilizaron células sin tratamiento, es decir, sin la presencia de NPa.

6.2.6 Análisis estadísticos

Todos los ensayos presentados en este Capítulo fueron realizados al menos por triplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA (test de Bonferroni) previamente confirmada la normalidad de los datos con un nivel de confianza del 95%.

6.3 Resultados y discusión

6.3.1 Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de plata obtenidas

6.3.1.1 Espectros UV-Visibles de las nanopartículas de plata

Las suspensiones de las NPaAg obtenidas fueron caracterizadas por espectroscopia UV-visible desde 250 a 700 nm en dos tiempos: i) inmediatamente después de ser sintetizadas y dializadas y ii) luego de estar almacenadas en heladera a 4°C por un tiempo mayor a 6 meses y menor a 12 meses (NPaAgAG frescas y NPaAgAG >6 meses, respectivamente). Las dispersiones de NPaAgAG mostraron coloración amarilla intensa, con un pH final después de la diálisis de $7,15 \pm 0,15$ y el espectro obtenido por UV-visible (Figura 6.2-A) presentó un máximo de absorbancia a 400 nm. Luego de su almacenamiento por más de 6 meses, se observó que el máximo de absorbancia se desplazó ligeramente hacia valores más altos (404 nm), lo cual sugiere una probable y leve formación de aglomerados de las NPaAgAG. Sin embargo, estos resultados indican que dichas NPa se mantienen estables durante su almacenamiento en la heladera.

Por otra parte, las NPaAgTV presentaron una coloración amarillo-anaranjado, un pH final de $7,40 \pm 0,30$ y su espectro UV-visible (Figura 6.2-B) presentó un máximo de absorbancia a 418 nm. Con posterioridad a los 6 meses de almacenamiento en heladera, mostraron un desplazamiento del máximo de absorbancia a 422 nm indicando una posible formación de aglomerados. Pudo inferirse nuevamente que, tal como las NPaAgAG, las NPaAgTV se mantuvieron estables durante su almacenamiento.

También se tomaron espectros UV-visibles para el AG y el ExTV a pH = 10 (Figura 6.3). El AG mostro máximos de absorbancia a 210 y 260 nm, mientras que el ExTV presentó máximos de absorbancia a 205 y 286 nm. Otros autores han reportado máximos de absorbancia entre 280-320 nm para ExTV y para catequinas [289,290]. Por lo tanto, el máximo de absorbancia a 286 nm puede atribuirse a la presencia de las catequinas, principales FF presentes en ExTV [284].

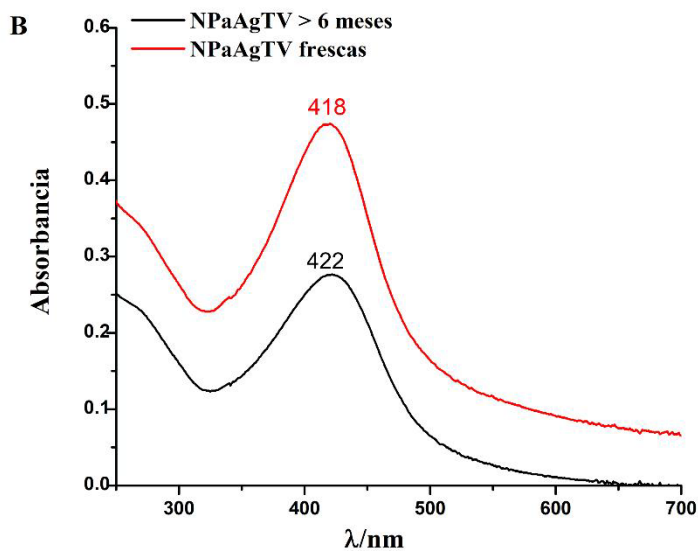
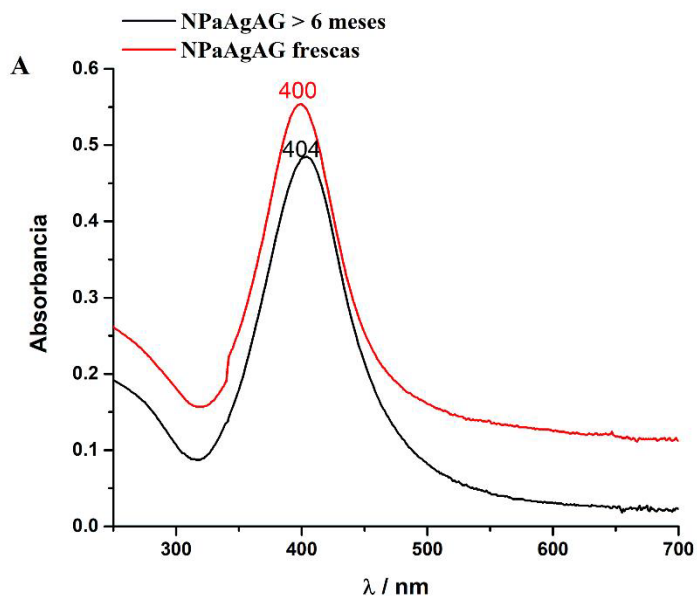


Figura 6.2. Espectros UV-visible de la dispersión de las NPa recién sintetizadas y luego de 6 meses de almacenamiento en heladera a 4°C. (A) Espectro correspondiente a las nanopartículas sintetizadas con ácido gálico (NPaAgAG); a la derecha se muestra una fotografía de la suspensión de las NPaAgAG; (B) Espectro correspondiente a las nanopartículas sintetizadas con extracto de té verde (NPaAgTV); a la derecha se muestra una fotografía de la suspensión de las NPaAgTV.

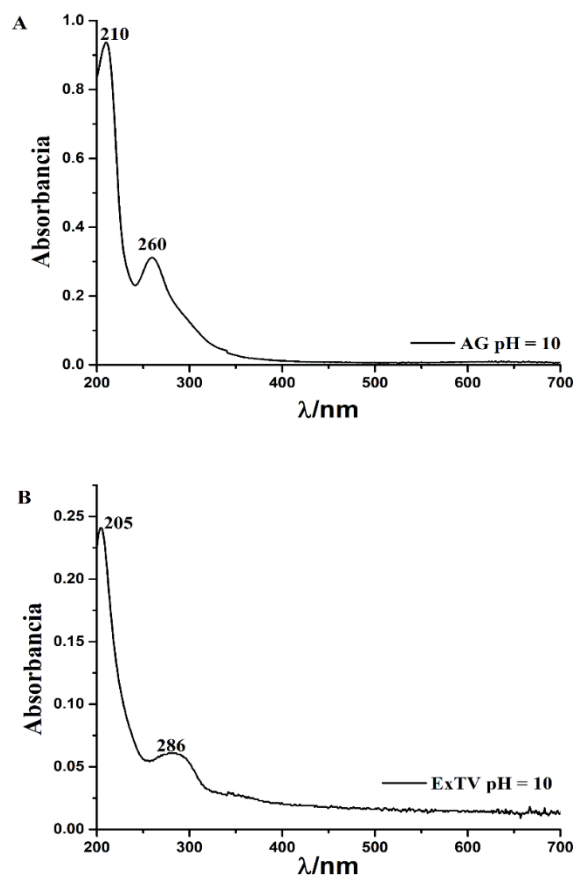


Figura 6.3. Espectros UV-visibles a pH = 10 para A) AG puro en agua y B) ExTV.

6.3.1.2 Determinación de la concentración de Ag por ICP-OES y construcción de curvas de calibración UV-visible

Una vez sintetizadas y purificadas, se determinó el rendimiento de la reacción y se calculó la cantidad de Ag total por medio de la técnica de ICP-OES. Para esto, 1 mL de cada una de las suspensiones de las NPaAgAG y NPaAgTV fueron tratados con HNO₃ al 2% para disolver las NPa (Ag⁰) a iones Ag⁺. Dichas muestras se enviaron a la Unidad Plapimu-Laseisic (UPL), dependiente de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP y de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC-PBA), para determinar la cantidad de Ag total. Los resultados se resumen en la Tabla 6.1. La concentración de Ag obtenida para NPaAgAG fue de 41,3±0,4 µg/mL, con un rendimiento de reacción de aproximadamente 96%, es decir, que el 96% de los iones Ag⁺ disponibles al inicio de la síntesis (provenientes del AgNO₃) fueron reducidos a NPaAgAG. Para las NPaAgTV, el rendimiento de la reacción fue algo menor (86% aproximadamente) y la concentración de Ag total fue de 37,1±0,3 µg/mL. Los resultados

de eficiencia son comparables y aún superiores a los reportados en literatura con protocolos similares pero que incluyen pasos con calentamiento [280]. Por lo tanto, los resultados confirman que el AG y el ExTV son excelentes agentes reductores.

Tabla 6.1. Determinación de la concentración de Ag total en las NPaAg sintetizadas por NEC.

	NPaAgAG	NPaAgTV
[Ag⁺] inicial (µg/mL) proveniente del AgNO₃	43,2 ± 0,2	43,1 ± 0,3
[Ag⁺] final (µg/mL) determinada por ICP-OES	41,3 ± 0,4	37,1 ± 0,3
Rendimiento de la reacción (%)	95,6 ± 1,3	86,0 ± 1,2

A partir de los resultados de ICP-OES, se construyeron curvas de concentración total de Ag versus absorbancia para ambas NPaAg, acorde a trabajos previos [291,292]. Las NPaAgAG mostraron una relación lineal en el rango de concentraciones de Ag total de 0 a 40 µg/mL con R² de 0,9938 (Figura 6.4). Por otro lado, las NPaAgTV presentaron relación lineal en el rango de 0 a 30 µg/mL con R² de 0,9982 (Figura 6.5). Estas curvas de calibración fueron utilizadas para estimar, cuando fue necesario, las concentraciones de Ag para cada NPa en ensayos posteriores.

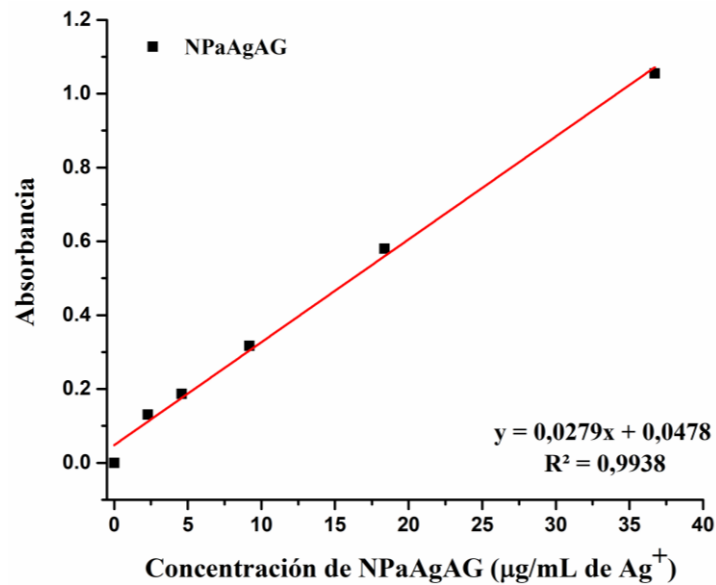


Figura 6.4. Curva de concentración versus absorbancia (400 nm) para las NPaAgAG.

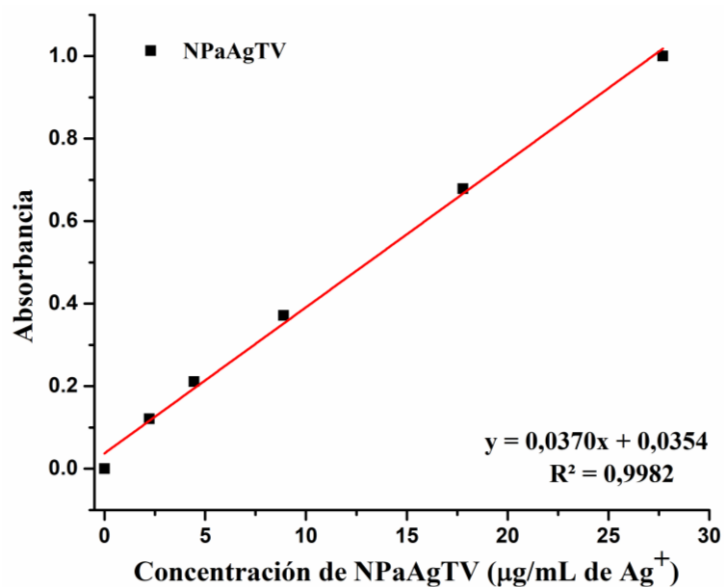


Figura 6.5. Curva de concentración versus absorbancia (418 nm) para las NPaAgTV.

6.3.1.3 *Análisis por ATR-FTIR del recubrimiento orgánico de las nanopartículas*

Para determinar la presencia del *capping* de AG y de ExTV en las NPaAgAG y NPaAgTV, respectivamente, se vertió gota a gota y se secó la suspensión de cada NPa y el ExTV sobre polvo de KBr y se analizó la presencia de grupos funcionales por ATR-FTIR.

En la Figura 6.6 se muestran los espectros FTIR para las NPaAgAG y para el AG de forma comparativa. Como se explicó en el Capítulo 5, el espectro obtenido para el AG puro (Figura 6.6-A) presentó, para los grupos -OH, una señal amplia a 3268 cm^{-1} y varias señales débiles entre $3000\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$. El -OH del grupo carboxilo reveló contribuciones a 3493 y 1696 cm^{-1} . Las señales del grupo ácido (-COOH) se detectaron a 1538 y 1200 cm^{-1} y el pico del grupo -C=O dentro grupo ácido se identificó a 1610 cm^{-1} . El estiramiento del grupo C-O se reveló por las contribuciones a 1307 y 1022 cm^{-1} . Finalmente, las vibraciones del anillo fenólico presentaron señales a 1421 , 866 , 766 y 731 cm^{-1} . En las NPaAgAG (Figura 6.6-B) se detectó una señal amplia a 3396 cm^{-1} y varias contribuciones débiles entre $3000\text{-}2650\text{ cm}^{-1}$ correspondientes a los grupos -OH del AG, lo cual coincide con otras síntesis de NPa con AG [293]. El desplazamiento y la amplitud del pico a 3396 cm^{-1} indica que hay gran interacción entre las moléculas de AG que desarrollan el *capping* mediante formación de enlaces de tipo puente de hidrógeno [294]. Por otra parte, el pico del grupo -C=O dentro grupo ácido se identificó a 1604 cm^{-1} y la señal del grupo ácido desprotonado (COO^-) se encontró a 1382 cm^{-1} , indicando la presencia del grupo carboxilo en el recubrimiento de las NPaAgAG. En el Capítulo 5, el grupo COO^- fue identificado en señales de 1392 cm^{-1} para la MPN de AG depositada sobre Ti y se indicó que otros autores [222,231,232] reportaron esta señal en la región de $1390\text{-}1380\text{ cm}^{-1}$ para diferentes coberturas de AG. Además, la contribución de este grupo desprotonado también fue reportada para el *capping* de NPa de Ag y de Au sintetizadas por NEC utilizando AG como agente reductor en señales de 1384 y 1387 cm^{-1} respectivamente [293]. Los picos a 1351 cm^{-1} y 765 cm^{-1} se corresponden con la vibración de C-O y el anillo fenólico, respectivamente [295]. Todos estos resultados indican que el AG forma un recubrimiento sobre las NPaAg en el cual las moléculas de AG interactúan entre sí mediante enlaces de puente de hidrógeno, sin indicios de polimerización, y donde el grupo COO^- estaría disponible en la superficie de las NPaAgAG. Esta presencia sugiere la posibilidad de que las NPaAgAG se puedan adherir sobre sustratos de Ti, ya que trabajos previos han indicado la importancia de la presencia del grupo funcional COO^- en el *capping* de NPaAg para su inmovilización sobre Ti [296,297].

En la Figura 6.7 se esquematiza una posible representación del recubrimiento de las NPaAgAG obtenidas por NEC. Se sabe que a pH cercanos a 10 el AG se encuentra parcialmente desprotonado con dos cargas negativas (Figura 6.7-B) sugiriendo que las NPaAgAG presentan carga neta negativa, tal como ha sido reportado por otros autores

para NPa sintetizadas con AG en pH alcalino [88,235,280,281]. Los resultados ATR-FTIR sugieren que los grupos COO^- estarían libres sobre la superficie de las NPaAgAG y que los grupos $-\text{OH}$ interactuarían entre sí por puente hidrógeno (líneas rojas, Figura 6.7-A), además las moléculas de AG podrían interactuar directamente con la NPaAg posiblemente mediante interacciones electroestáticas (línea verde, Figura 6.7-A). Otros autores han propuesto similares mecanismos de formación para NPaAgAG obtenidas a partir de otros protocolos [222].

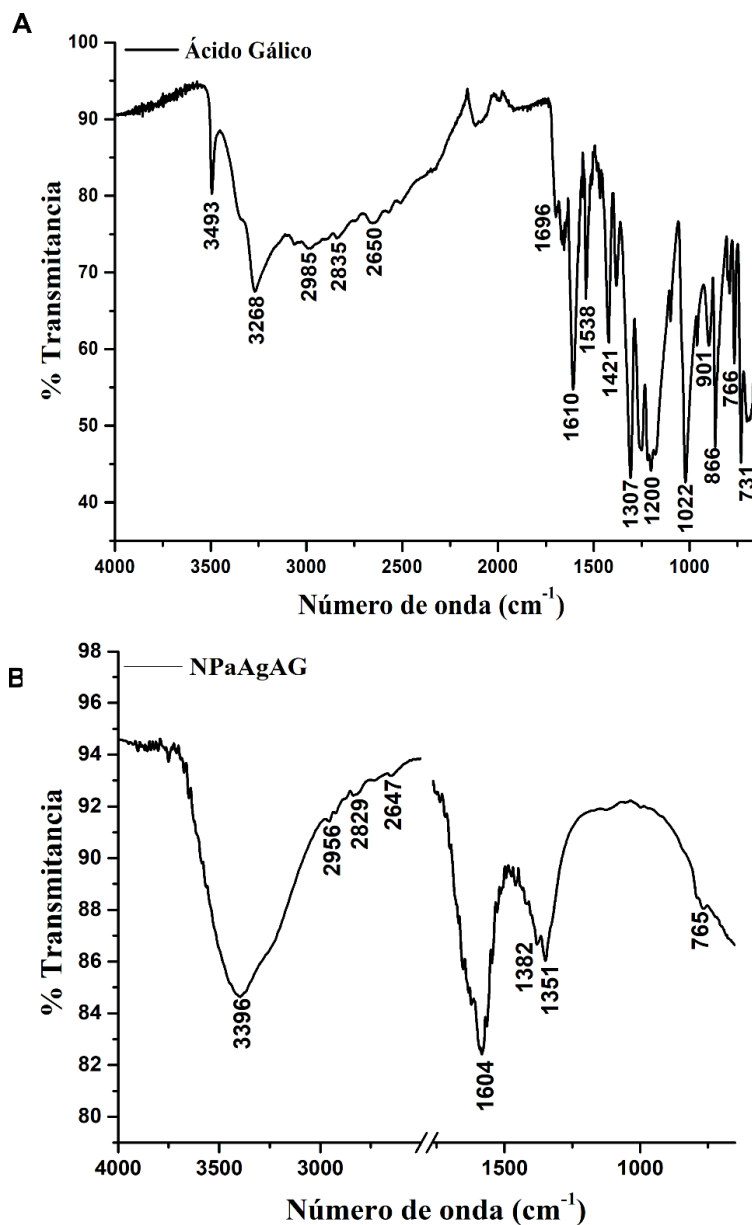


Figura 6.6. Espectros FTIR obtenidos para: A) AG puro y B) NPaAgAG.

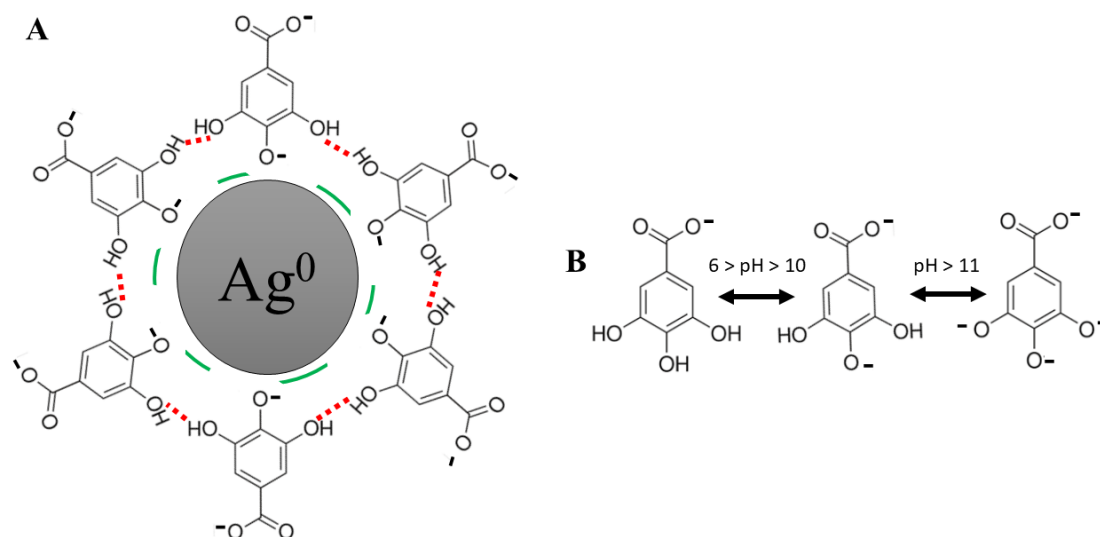


Figura 6.7. A) Esquemización de posibles interacciones intermoleculares en el *capping* de las NPaAgAG. Las líneas rojas indican interacciones de tipo puente de hidrógeno entre las moléculas de AG que forman el *capping* y las líneas verdes la interacción de las moléculas de AG con la NPa. B) Desprotonación del AG según el pH: a valores cercanos a $\text{pH}=10$ conduce a dos cargas negativas y a $\text{pH}>11$ se encuentra totalmente desprotonado. Esquema adaptado a partir de [222,298].

Los espectros ATR-FTIR para el ExTV y las NPaAgTV se presentan en la Figura 6.8. El ExTV (puro y sin alcalinizar) reveló la fuerte presencia de grupos -OH a través de una señal amplia a 3395 cm^{-1} y una débil a 2648 , lo cual coincide con análisis FTIR realizados por otros autores para otros ExTV [299,300]. La fuerte transmitancia asociada a 3395 cm^{-1} indica la abundancia de interacciones de tipo puente hidrógeno entre los numerosos grupos -OH de los diferentes FF que componen el ExTV. La señal de 1615 cm^{-1} está asociada a la vibración del doble enlace del anillo fenólico, sin embargo, en el caso del AG, catequinas, AT y sus diferentes derivados esta señal esta atribuida al grupo -C=O del grupo carboxilo y es identificatoria y característica para señales de EGCG [301]. Además, la señal de 1408 cm^{-1} es atribuida a la flexión fuera del plano de grupos C-OH de EGCG y AT. Por otra parte, las contribuciones comprendidas entre $1100\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ han sido asociadas a los grupos C-O del anillo de glucosa del AT y de EGCG [290,301,302], y también han sido reportadas para otros ExTV [299,300].

Los resultados FTIR del ExTV confirman la presencia de grupos funcionales correspondientes a catequinas, taninos y sus derivados que coinciden con los reportados en bibliografía [290,302,303]. Muchos trabajos sustentan que los ExTV se componen principalmente de polifenoles de estructura molecular grande como catequinas,

epicatequinas y AT y que el FF simple más abundante es el AG (ver Figura 6.9) [283,284,302,304,305].

En el caso de las NPaAgTV (Figura 6.8-B), el espectro ATR-FTIR presentó señales de grupos -OH a través de picos en 3405, 2956, 2920 y 2648 cm^{-1} , lo cual coincide con otras síntesis de NPaAg con ExTV [289,299,300,306]. La banda amplia a 3405 cm^{-1} indica la gran interacción de estos grupos mediante enlaces puente de hidrógeno entre las diferentes moléculas de FF que conforman el *capping* de las NPaAgTV. El grupo C=O del carboxilo de las catequinas y AT fue identificado a 1620 cm^{-1} , mientras que el doble enlace fenólico se detectó a 1571 cm^{-1} , como ha sido reportado para taninos [301,302]. La señal de 1395 cm^{-1} coincide con señales correspondientes al grupo carboxilo desprotonado, lo cual indica que, en las NPaAgTV al igual que en las NPaAgAG, este grupo se encuentra disponible en la superficie de las NPa sintetizadas con ExTV, lo cual podría favorecer su adhesión sobre sustratos de Ti, tal como se evaluará en el próximo Capítulo. Esta señal del grupo COO^- no fue identificada en el ExTV puro, sugiriendo que la alcalinización de este extracto durante la síntesis de las NPaAgTV puede provocar la desprotonación y la carga neta negativa de los FF que componen el ExTV. Finalmente, las contribuciones comprendidas entre 1100-1000 cm^{-1} han sido asociadas a los grupos C-O del AT y de catequinas, como EGCG, las cuales también se presentan en el ExTV puro. Además, el pico para el C-O también ha sido reportado en dicha región para NPaAg sintetizadas con ExTV por otros autores [289,299,300]. Algunos investigadores han sugerido que los picos entre 1050-1040 cm^{-1} pueden ser atribuidos a grupos éteres que se pueden formar durante la síntesis por la polimerización de los FF presentes en el ExTV para formar el *capping* de las NPaAgTV [306]. Además, como se mencionó en Capítulos anteriores, las señales comprendidas en dicha región (1050-1040 cm^{-1}) están fuertemente asociadas a la formación de grupos éteres cuando diferentes FF polimerizan sobre Ti, Cu y otros sustratos.

Resumiendo, los resultados expuestos arriba muestran que el *capping* de las NPaAgTV presenta contribuciones de i) grupos -OH de diferentes FF del ExTV que interactúan entre sí por enlaces puente de hidrógeno, ii) grupo funcional COO^- , iii) señales típicas de EGCG y AT (1620, 1571 y 1073 cm^{-1}) y iv) posible polimerización de los FF del ExTV por enlaces éteres (1045 cm^{-1}). No se encontraron señales características del AG, pero sí de catequinas y AT, lo cual sugiere que el *capping* de las NPaAgTV se conforma principalmente a partir de estos últimos FF. Asimismo, debido al mayor tamaño

de los FF que componen el ExTV es posible pensar que el recubrimiento de las NPaAgTV puede ser de un espesor variable y tal vez mayor que el de las NPaAgAG. El posible *capping* para las NPaAgTV se esquematiza de forma resumida en la Figura 6.10.

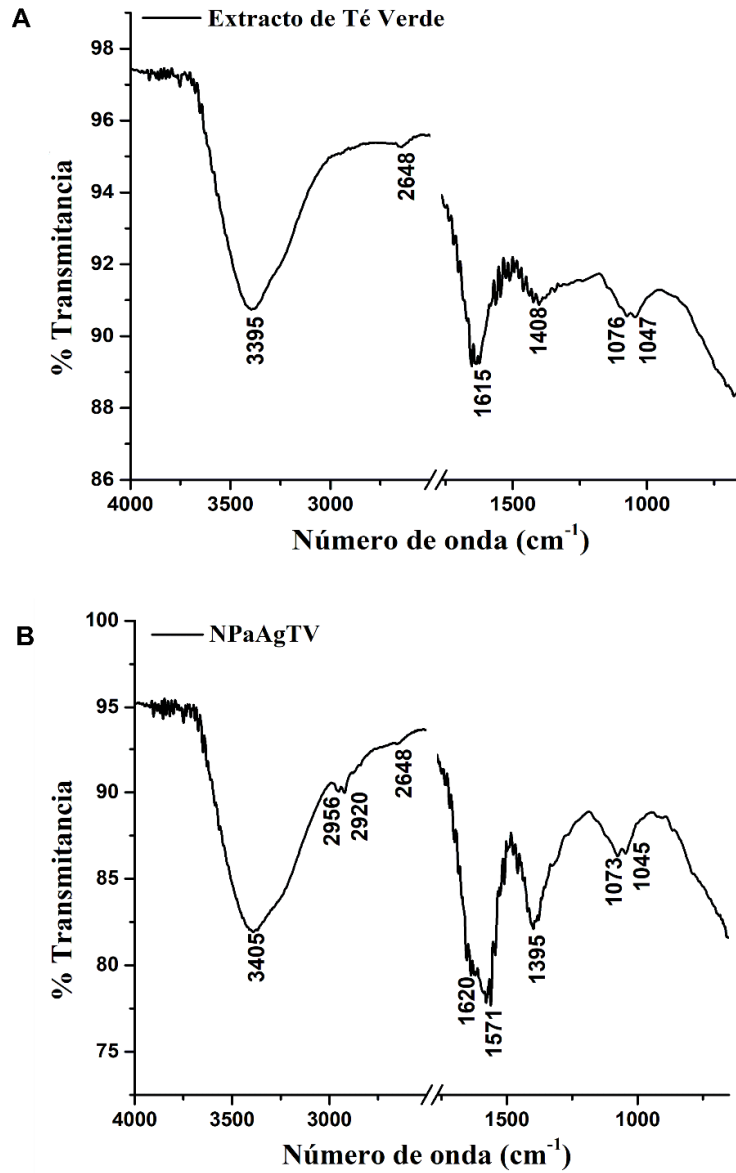


Figura 6.8. Espectros FTIR obtenidos para: A) ExTV puro y B) NPaAgTV.

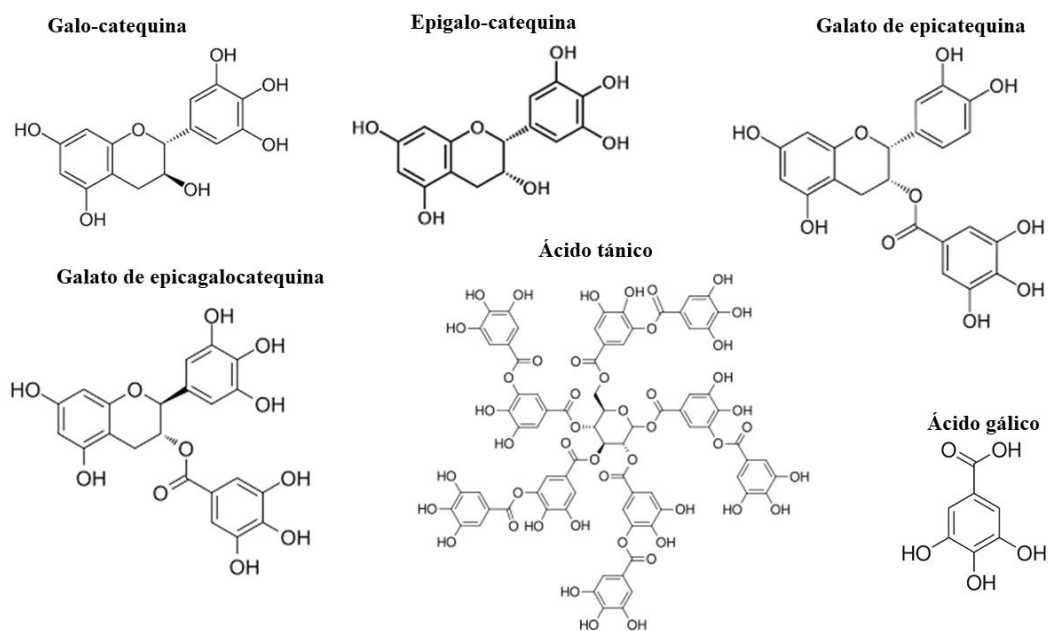


Figura 6.9. Estructuras moleculares de los principales fenoles presentes en extractos de té verde.

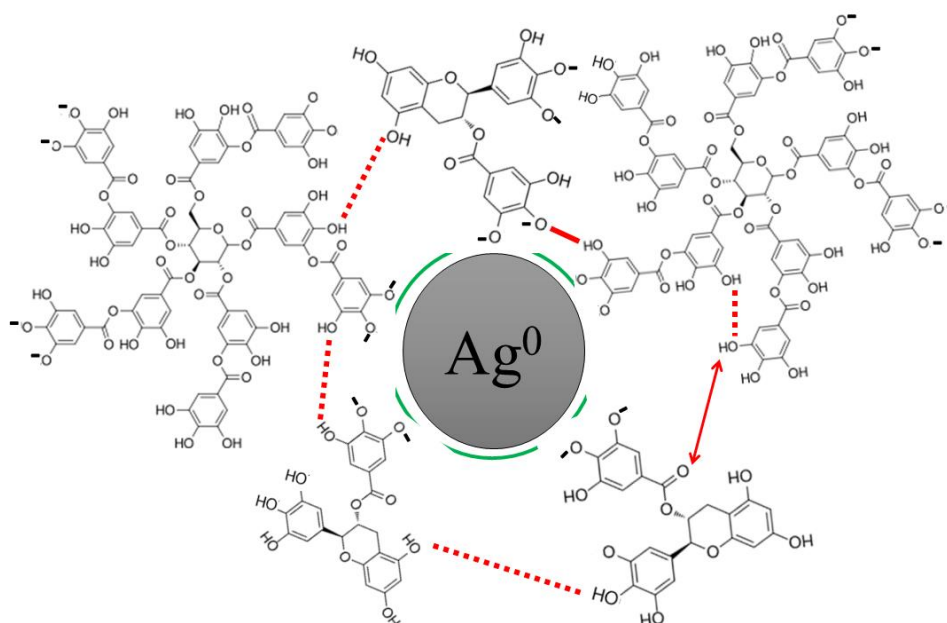


Figura 6.10. Esquematación de posibles interacciones intermoleculares en el *capping* de las NP_aAgTV. Las líneas rojas indican los diferentes tipos de interacciones tipo puente de hidrógeno entre las moléculas de FF que forman el *capping* y las líneas verdes la interacción de los diferentes FF con la NP_a.

6.3.2 Estimación de tamaños y distribución de poblaciones de las NPa por S-TEM y DLS. Influencia de la temperatura y fuerza iónica del medio

6.3.2.1 Estimaciones de tamaños y distribución de poblaciones de las NPaAgAG y NPaAgTV por S-TEM

El tamaño promedio y la distribución de las poblaciones de las NPaAg obtenidas por NEC fueron estimados por imágenes S-TEM y por determinación del diámetro hidrodinámico utilizando DLS.

En la Figura 6.11 se muestran imágenes S-TEM y el análisis estadístico para la distribución de tamaños de las NPaAgAG. Dichas NPa presentaron forma cuasi-esférica y se encontraron en forma individual sin presencia de aglomerados (Figura 6.11-A, B y C). El análisis de distribución de frecuencias de tamaño presentó una población mayoritaria (X_1) con un tamaño promedio de $17,5 \pm 0,5$ nm y otra población pequeña de mayor tamaño (X_2) de $42,5 \pm 0,5$ nm (Figura 6.11-D). En el histograma obtenido se observa una gran polidispersidad de tamaños para las NPaAgAG donde el mínimo fue de 2 nm y el máximo de 75 nm. La mediana (valor intermedio que separa la mitad de los valores mayores y la mitad de los valores menores del conjunto de datos analizados) arrojó un valor de $18,6 \pm 0,5$ nm, similar al tamaño promedio de X_1 , lo cual sugiere que esta población X_1 es la más representativa de la muestra. En la Figura 6.11-E se presenta la curva de probabilidad acumulada para la distribución de tamaños de las NPaAgAG en la cual se comprueba que las NPa con tamaños de hasta 25 nm representan el 78% de la muestra y, en consecuencia, las NPa con tamaños entre 25 y 80 nm representan solo el 22%.

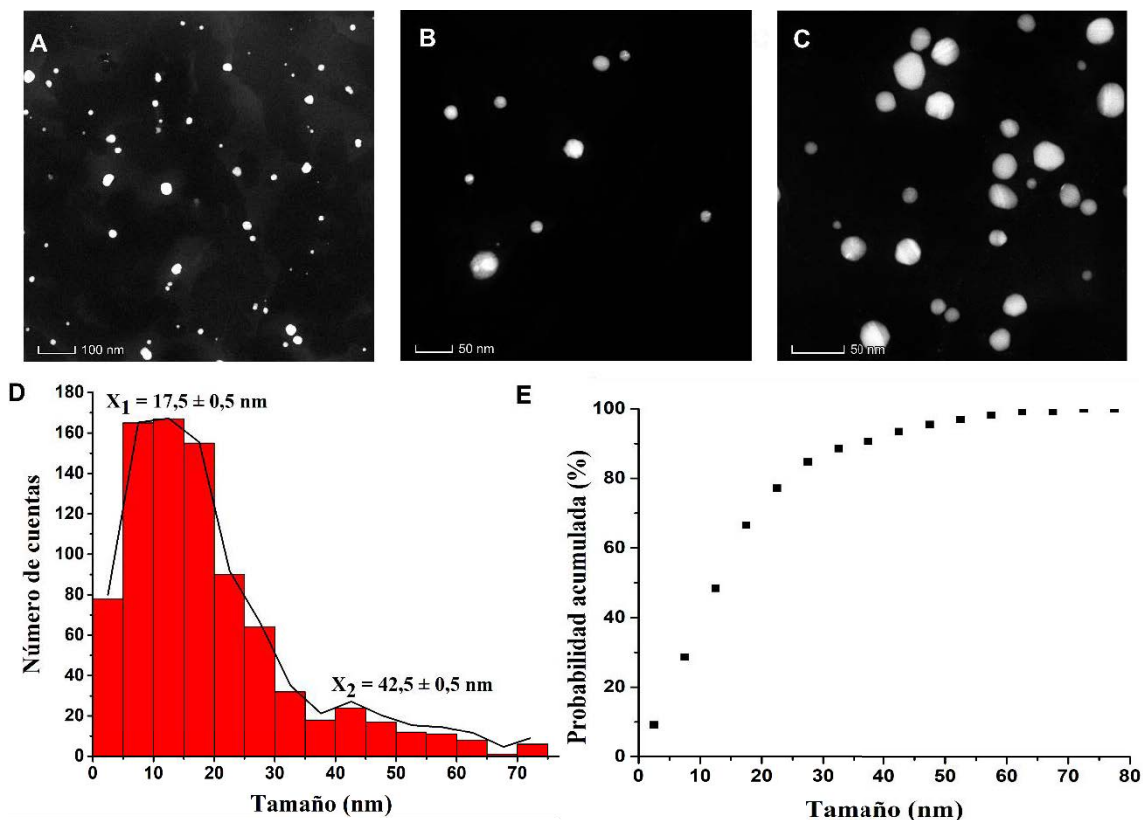


Figura 6.11. Análisis S-TEM de las NPaAgAG. A, B, C) Imágenes S-TEM a diferentes escalas de estudio donde se presentan las NPaAgAG monodispersas, tal como fueron encontradas, sin presencia de aglomerados D) Histograma de distribución de tamaños para las NPaAgAG y E) Diagrama de probabilidad acumulada del tamaño de las NPaAgAG.

Por otra parte, las NPaAgTV mostraron NPa individuales sin presencia de aglomerados en todas las imágenes analizadas y con forma cuasi-esférica (Figura 6.12-A, B y C). El análisis de distribución de tamaños mostró un histograma con una única población definida de diámetro promedio de $9,2 \pm 0,3$ nm (Figura 6.12-D). Además, la síntesis con ExTV produjo una menor polidispersidad de tamaños para las NPaAgTV, en comparación a las NPa sintetizadas con AG, con un mínimo de 2 nm y un máximo de 27,5 nm. La mediana arrojó un valor de $8,8 \pm 0,6$ nm resaltando la proximidad y, por lo tanto, representatividad del promedio calculado. En sintonía, la curva de probabilidad acumulada indica que las NPaAgTV con tamaños de hasta 12,5 nm representan el 88% de la muestra (Figura 6.12-E). Por lo tanto, al comparar estos resultados con los de la síntesis con AG, puede observarse que la síntesis con ExTV conduce a una distribución de tamaños menos polidispersa, con un promedio más controlado y menor que 10 nm.

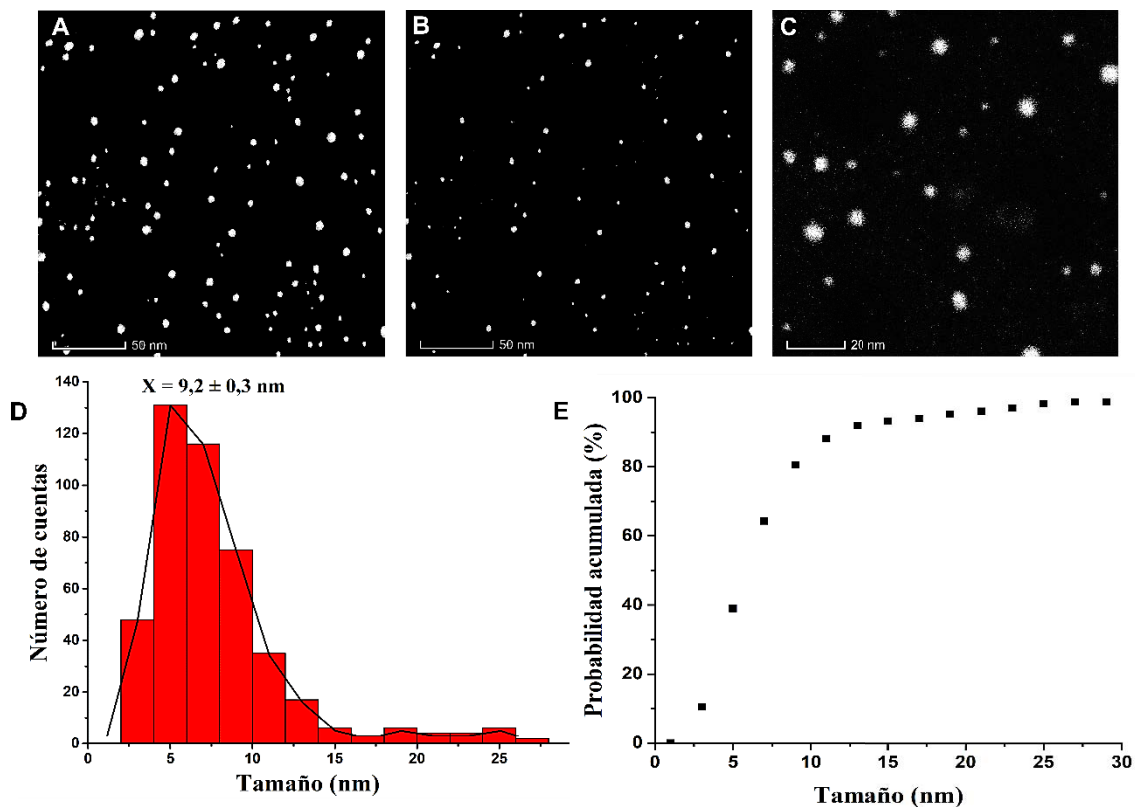


Figura 6.12. Análisis S-TEM de las NPaAgTV. A, B, C) Imágenes S-TEM a diferentes escalas de estudio donde se presentan las NPaAgTV monodispersas, tal como fueron encontradas, sin presencia de aglomerados; D) Histograma de distribución de tamaños para las NPaAgTV y E) Diagrama de probabilidad acumulada del tamaño de las NPaAgTV.

6.3.2.2 Estimaciones de tamaños y distribución de poblaciones de las NPaAgAG y NPaAgTV por DLS. Efecto del almacenamiento

El tamaño hidrodinámico promedio determinado por DLS se obtuvo a temperatura ambiente (25°C) y a 37°C luego de incubar las suspensiones de las NPaAgAG y NPaAgTV frescas por 24 h en estufa de cultivo. Se evaluó también el efecto del almacenamiento en heladera a 4° C de las NPaAgAG y NPaAgTV en suspensiones guardadas entre 6 y 12 meses (denominados de aquí en adelante NPaAgAG > 6 meses y NPaAgTV > 6 meses, respectivamente).

En la Figura 6.13 se muestran los gráficos con los valores promedio obtenidos para las NPaAgAG y NPaAgAG > 6 meses en medidas de intensidad y volumen obtenidas a partir de DLS. Los tamaños de diámetro hidrodinámico asociados se resumen en la Tabla 6.2. Al igual que los resultados obtenidos por S-TEM, las medidas con NPaAgAG

frescas revelaron dos poblaciones determinadas por intensidad y volumen a las dos temperaturas evaluadas (Figura 6.13 A y B). La primera o X_1 con un tamaño promedio de 23 ± 4 nm y de 22 ± 4 nm determinados por intensidad y volumen a 25°C , respectivamente. En forma similar, la segunda población X_2 reveló valores de 130 ± 20 y 130 ± 30 nm determinados por intensidad y volumen, respectivamente. Asimismo, de los valores obtenidos por volumen (Tabla 6.2) se puede conocer que la población X_1 de 22 ± 4 nm corresponde el 96% de la muestra, mientras que la población X_2 de 130 ± 30 nm solo el 4%. Estos resultados coinciden con los obtenidos por TEM a través del gráfico de probabilidad acumulada, donde la población X_1 es la más representativa y mayoritaria de la muestra de NP_{Ag}AG. El índice que determina la polidispersidad de la muestra por DLS, PDI (por sus siglas en inglés, *Poly-dispersity Index*), arrojó un valor promedio de $0,41\pm 0,1$ para las NP_{Ag}AG frescas a 25°C , indicando que la suspensión de NP_{Ag} es polidispersa, ya que valores mayores a 0,3 indican polidispersidad [307]. Esto se comprobó en el histograma de tamaños obtenidos mediante S-TEM para dichas NP_{Ag} donde se encontró un amplio rango de tamaño de partículas desde 2 a 75 nm. Cuando las NP_{Ag}AG frescas fueron incubadas a 37°C por 24 h se observó que los valores del diámetro hidrodinámico no cambiaron sustancialmente en relación con las mismas muestras medidas a 25°C , lo cual indica que las NP_{Ag}AG frescas no sufren cambios significativos por la modificación de la temperatura (ver Figuras 6.13 A y B y valores de Tabla 6.2).

Las suspensiones de NP_{Ag}AG >6 meses de almacenamiento no mostraron alteraciones significativas en los valores del índice de PDI y tampoco en los tamaños hidrodinámicos determinados por intensidad a 25°C y 37°C (ver Figura 6.13-C y valores de Tabla 6.2). Para los datos de volumen, se observa que el valor promedio determinado aumenta ligeramente cuando las NP_{Ag}AG >6 meses de almacenamiento fueron incubadas a 37°C . No obstante, puede concluirse que las NP_{Ag}AG permanecen estables, mostrando solo alteraciones leves, luego de periodos de tiempo de almacenamiento en heladera mayores a 6 meses.

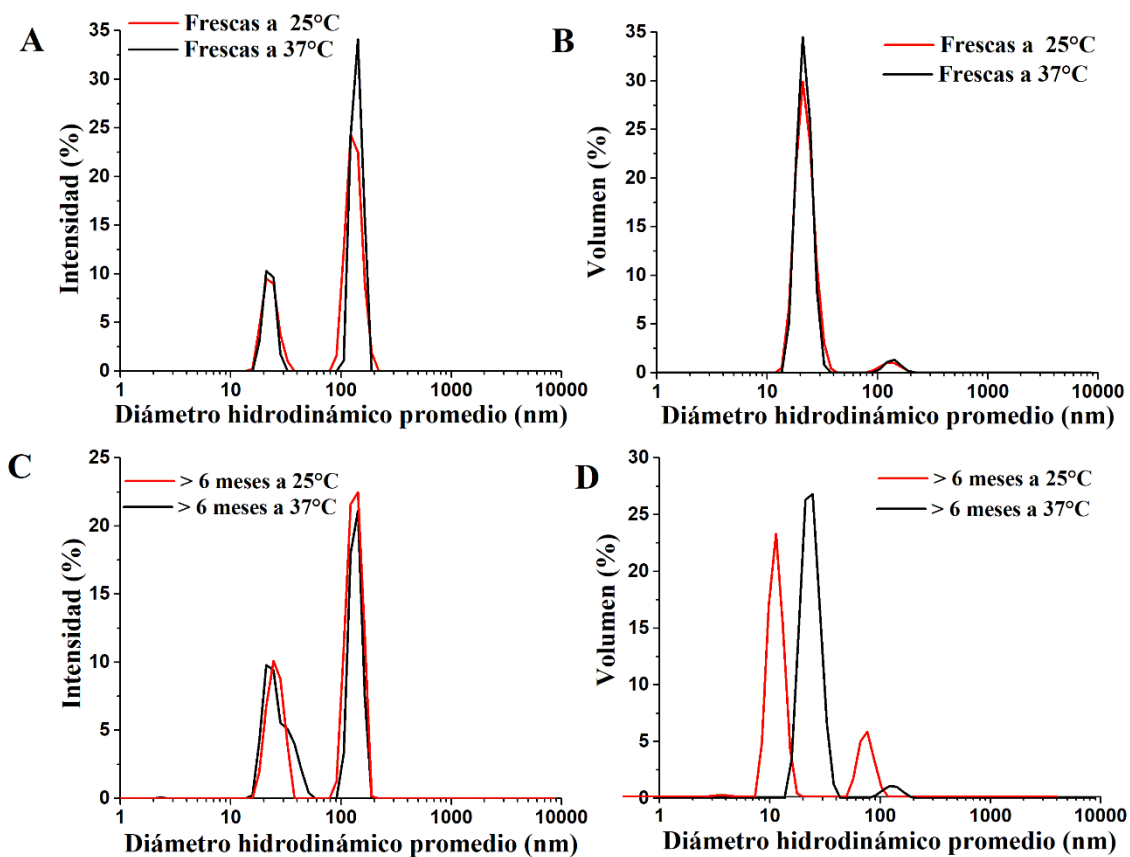


Figura 6.13. Diámetro hidrodinámico promedio para las NPaAgAG frescas (A y B) y luego de > 6 meses de almacenamiento (C y D) determinados por intensidad (A y C) y volumen (B y D) a 25 y 37°C.

En el caso de las NPaAgTV frescas, las medidas de intensidad y volumen arrojaron valores para dos poblaciones de NPa (Figura 6.14-A y B), a diferencia del histograma obtenido por TEM donde se identifica solo una población mayoritaria. El tamaño de la primera población X_1 correspondió a $12,4 \pm 1,1$ y 11 ± 2 nm, valores asociados a intensidad y volumen respectivamente, en medidas a 25°C; mientras que los correspondientes a la población X_2 fueron de 130 ± 20 y 120 ± 20 nm por intensidad y volumen, respectivamente (Tabla 6.2). Sin embargo, a través de los valores obtenidos por volumen se puede inferir que la población X_1 de 11 ± 2 nm representa casi el 99% de muestra, mientras que la población X_2 solo el 1%. Estos resultados sugieren que la presencia de NPa grandes y de aglomerados es mínima en las NPaAgTV y que la muestra sería monodispersa. Además, el índice PDI arrojó un valor promedio de $0,20 \pm 0,05$, menor a 0,3, lo cual indica que la muestra es monodispersa o con baja polidispersidad tal como se puede comprobar en el histograma obtenido por imágenes S-TEM y en los valores de volumen obtenidos por DLS. Al mismo tiempo, al comparar las medidas para las

NPaAgTV frescas a 25°C y 37°C no revelaron cambios en los valores de tamaño hidrodinámico ni en el índice de polidispersidad, lo que indica que estas NPa no son afectadas por la temperatura en el rango estudiado (ver Tabla 6.2).

Asimismo, las NPaAgTV >6 meses de almacenamiento en heladera no mostraron cambios significativos en los valores de intensidad, volumen y polidispersidad en relación con las NPa frescas (Figura 6.14-C y D). Sin embargo, se detectó un incremento de la representatividad de la población X₂ determinada por volumen que pasó del 1% (en las NPaAgTV frescas) al 5% (Tabla 6.2) para las almacenadas (>6 meses), indicando que el almacenamiento incrementa levemente el proceso de aglomeración de las NPaAgTV. Resumiendo, los resultados indican que las NPa sintetizadas con ExTV mantienen su estabilidad a lo largo del tiempo de almacenaje y sus tamaños no se ven afectados por el cambio de temperatura.

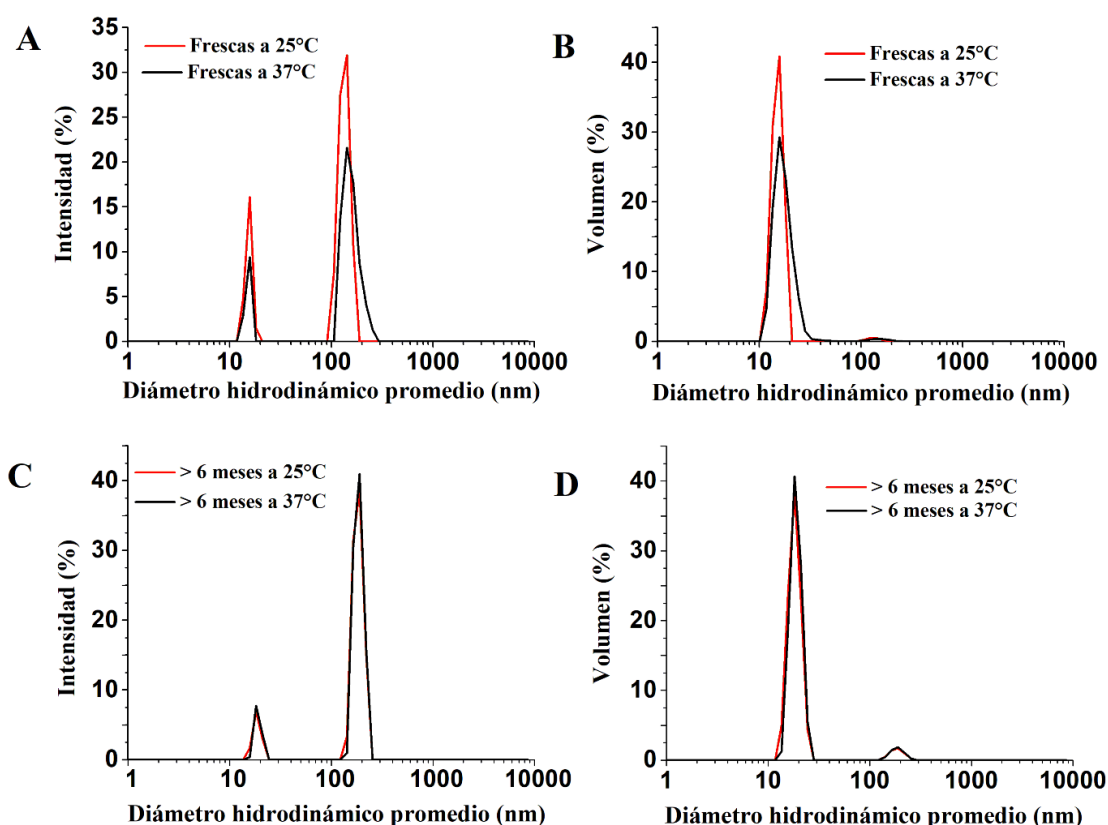


Figura 6.14. Diámetro hidrodinámico promedio para las NPaAgTV frescas y luego de > 6 meses de almacenamiento determinados por intensidad (A y C) y volumen (B y D) a 25 y 37°C.

Tabla 6.2. Tamaños estimados por DLS (intensidad y volumen) para las suspensiones de las NPaAgAG y NPaAgTV a 25 y 37°C. X₁= población 1, X₂= población 2. En los valores determinados por volumen se indica entre paréntesis el porcentaje (%) que representa cada población dentro de la medida obtenida. Todos los resultados son expresados como el valor promedio ± desviación estándar.

Diámetro hidrodinámico promedio determinado por:	NPaAgAG frescas		NPaAgAG > 6 meses		NPaAgTV frescas		NPaAgTV > 6 meses	
	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂
Intensidad a 25°C (nm)	23±4	130±20	25±4	130±20	12,4±1,1	130±20	16±4	150±20
Intensidad a 37°C (nm)	22±3	140±20	27±7	140±20	12,5±1,7	140±30	15±2	160±20
Volumen a 25°C (nm)	22±4	130±30	25±5	130±20	11±2	120±20	15±3	150±30
(% de cada población)	(96,0 ±0,8)	(4,0 ±0,2)	(94,1 ±1,2)	(6,0 ±0,8)	(98,5 ±0,8)	(1,5 ±0,2)	(95,0 ±0,8)	(5,0 ±0,2)
Volumen a 37°C (nm)	22±3	140±20	40±5	140±30	12±2	145±40	15±3 (160±30
(% de cada población)	(96,0 ±0,8)	(4,0 ±0,2)	(97,2 ±0,8)	(3,8 ±0,2)	(98,2 ±1,8)	(2,8 ±0,1)	95,0 ±0,4)	(5,1 ±0,6)
PDI a 25°C	0,41±0,07		0,43±0,15		0,20±0,05		0,21±0,06	
PDI a 37°C	0,42±0,20		0,45±0,35		0,22±0,06		0,23±0,08	

Las NPaAgAG revelaron valores de diámetro hidrodinámico más altos en caso de la población X₂ que los obtenidos por imágenes S-TEM y el histograma derivado. Por el análisis de imágenes, el tamaño de la población X₂ presentó un valor promedio de 42,5

nm, mientras que los valores de intensidad y volumen fueron de 130 nm aproximadamente (3 veces más). En el histograma de las NPaAgAG obtenido a partir de S-TEM puede observarse que la población X_2 es pequeña y poco definida. Además, de la curva de probabilidad acumulada puede notarse que las NPaAgAG comprendidas en el rango de 35-50 nm (X_2) representan aproximadamente el 6%, mientras que las NPa de 50-75 nm corresponden al 4% de la muestra analizada. Estos datos obtenidos de las imágenes S-TEM muestran que la cantidad de NPa de entre 35-75 nm es solo 10%, aproximadamente. Cabe mencionar que los resultados de los cálculos de la distribución de intensidad basadas en medidas DLS se obtienen a partir varios supuestos, entre ellos que todas las partículas son esféricas y homogéneas y, en consecuencia, una pequeña agregación de partículas puede dominar la distribución [112]. Por lo tanto, un efecto para el 10% de partículas puede ser poco significativo para ser discriminado por medidas de DLS por lo que los diámetros hidrodinámicos de una pequeña agregación de partículas pueden dominar la distribución y, probablemente los valores de X_2 obtenidos por esta técnica deriven de pequeñas aglomeraciones de las NPa lo cual arroja valores de diámetros hidrodinámicos de 130 nm aproximadamente, 3 veces mayores que los vistos por TEM para la población X_2 .

En el caso particular de las NPaAgTV, no se detectó la presencia de aglomerados ni de una segunda población en el histograma en las imágenes de TEM. Los valores de PDI y los de volumen sugieren que la muestra puede considerarse monodispersa y que la población X_2 obtenida por DLS es poco representativa o despreciable, ya que representa menos del 2% (ver Tabla 6.2 y Figura 6.12-D)

6.3.2.3 Estabilidad de las NPaAg en medios biológicos simulados

Con el propósito de analizar la estabilidad de las NPaAgAG y NPaAgTV a una fuerza iónica y pH similares a los de los sistemas biológicos, se colocaron suspensiones de estas NPa en PBS (fuerza iónica >100mM) y se incubaron en estufa a 37°C por 24 h. Luego, se determinó el diámetro hidrodinámico por DLS con el objeto de realizar un análisis cualitativo de los cambios observados. Las NPaAgAG frescas en PBS presentaron un valor de PDI similar a las NPaAgAG frescas sin tratamiento con PBS. Además, se reveló un incremento del r diámetro hidrodinámico de la población X_1 (con valores 30 ± 8 y 25 ± 7 nm determinados por intensidad y volumen, respectivamente) pero no se presentaron cambios en los datos obtenidos para la población X_2 (Figura 6.15-A y

Tabla 6.3). Estos resultados sugieren que las NPaAgAG frescas sufren un leve proceso de aglomeración en la población X_1 en respuesta a la fuerza iónica de soluciones de PBS, pero sin percibirse otros cambios sustanciales. Por lo contrario, las NPaAgAG >6 meses de almacenamiento presentan mayor desestabilización en respuesta a la fuerza iónica del PBS. Por un lado, la población X_1 de estas muestras sufre un incremento del tamaño hidrodinámico similar a las NPaAgAG frescas en PBS, pero también un incremento en la población X_2 y un aumento considerable del PDI (Tabla 6.3). Estos resultados indican que las NPaAgAG > 6 meses de almacenamiento son más susceptibles a la variación de la fuerza iónica que las NPaAgAG frescas.

Por otra parte, a través de un análisis cualitativo podemos inferir que las NPaAgTV frescas en PBS sufren procesos de aglomeración que duplican el tamaño hidrodinámico de la población X_1 en relación con las NPaAgTV frescas a 37°C pero sin tratamiento en PBS (Figura 6.15-B y Tabla 6.3). Asimismo, la población X_2 reduce su tamaño hidrodinámico (20 nm en estas condiciones). Estos resultados sugieren que, en respuesta a la mayor fuerza iónica, las NPaAgTV frescas podrían formar pequeños aglomerados de NPa (ya que el diámetro hidrodinámico se duplica) y que las NPa que pasan a formar estos acúmulos provendrían de la pequeña población X_2 . Por otro lado, las NPaAgTV > 6 meses de almacenamiento sufren cambios más drásticos en respuesta a la fuerza iónica del PBS. En primer lugar, el valor del tamaño hidrodinámico nuevamente se duplica para X_1 y los valores de X_2 se ven duplicados en relación con las NPaAgTV frescas en PBS y también incrementa la representatividad de esta población (5% del total de la muestra). Asimismo, el índice PDI toma un valor de $0,57 \pm 0,05$ (casi 3 veces más grande que el PDI determinado para NPaAgTV frescas en PBS). Todos estos resultados indican que las NPaAgTV con tiempos mayores a 6 meses de almacenamiento son más susceptibles que las NPaAgTV frescas al aumento de la fuerza iónica experimentado en soluciones de PBS, la cual incrementa considerablemente la polidispersidad y los tamaños promedios de las NPa.

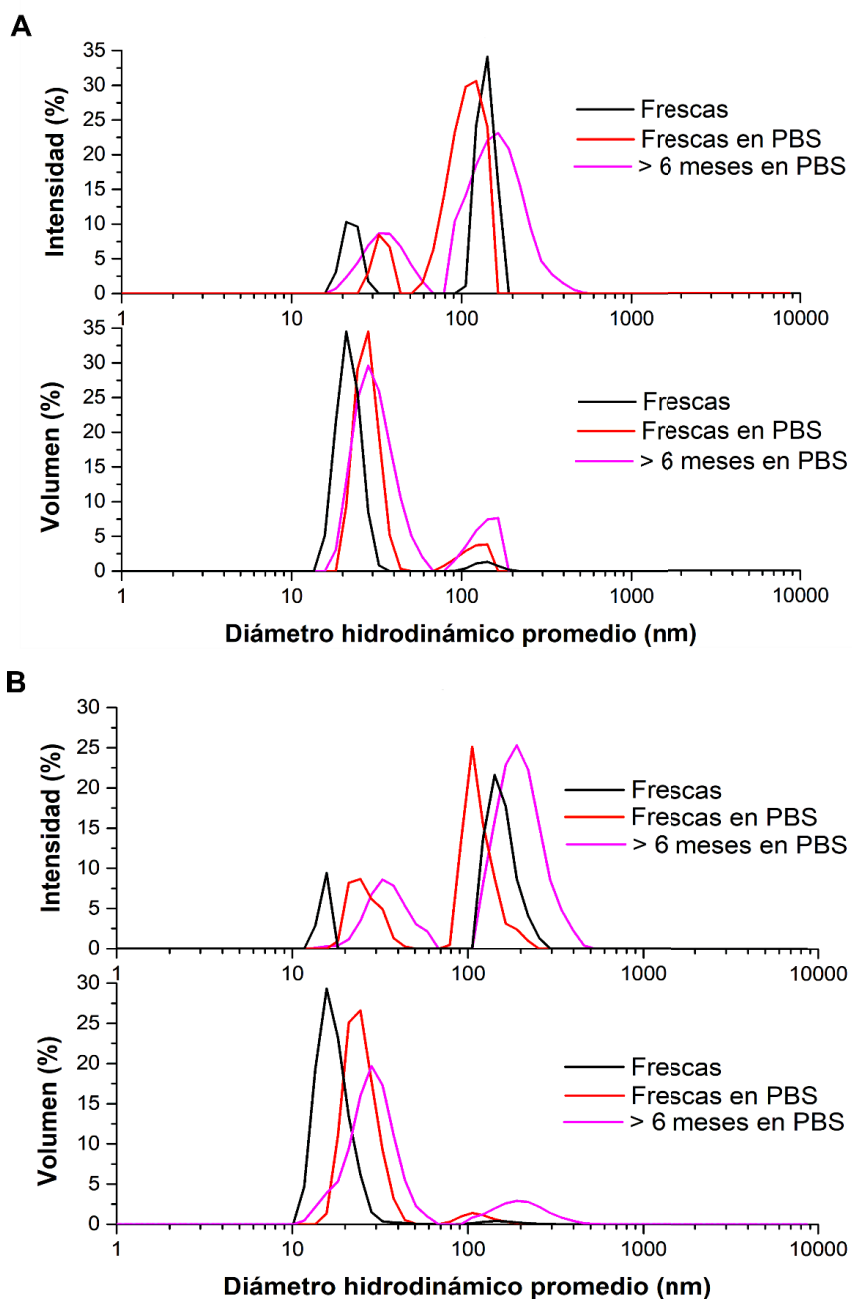


Figura 6.15. Estabilidad y respuesta de suspensiones de A) NPaAgAG y B) NPaAgTV. Las NPa fueron incubadas durante 24 h a 37°C en soluciones de diferente fuerza iónica: Frescas en la suspensión original de síntesis, Frescas en PBS y > 6 meses de incubación en PBS.

Tabla 6.3. Tamaños estimados por DLS para las suspensiones de las NPaAgAG y NPaAgTV luego de 24 h de incubación a 37°C en PBS (pH= 7,4). X₁= población 1, X₂= población 2. Para los valores determinados por volumen se indican entre paréntesis (%) el porcentaje que representa cada población dentro de la medida obtenida. Todos los resultados son expresados como el valor promedio ± desviación estándar.

Muestra	Diámetro hidrodinámico promedio determinado por:				Índice de polidispersidad promedio (PDI)
	Intensidad (nm)		Volumen (nm) (%)		
	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂	
NPaAgAG frescas	30±8	130±30	25±7 (93,5±0,6)	130±20 (6,5±0,4)	0,41±0,05
NPaAgAG > 6 meses	35±7	145± 20*	30±5 (93,3±0,3)	140±40* (7,7±0,7)	0,58±0,1*
NPaAgTV frescas	25±5	110±40	24±6 (98,4±0,6)	120±30 (2,6±0,4)	0,23±0,03
NPaAgTV > 6 meses	40±10*	200±60*	30±10 (95,3±0,8)	210±70* (5,7±0,2)	0,57±0,05*

* indica diferencias significativas entre las NPa frescas y las NPa > 6 meses de almacenamiento

6.3.3 Ensayos antimicrobianos

Para evaluar la actividad antimicrobiana de las NPa obtenidas por NEC en este trabajo se determinó también la CMI y CMB utilizando concentraciones crecientes de dichas NPaAg (de 0,15 a 75 µg/mL) contra cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. Una vez transcurridas las 24 h de incubación, se leyó la absorbancia a 600 nm en lector de placas y se determinó la CMI como la mínima concentración a la cual no había crecimiento visible de bacterias en placas y además no se detectaba cambio en la absorbancia. Para determinar la CMB se plaquearon todas las concentraciones para las que se midió baja absorbancia con el propósito de determinar en qué concentración mínima se lograba la muerte del 99,9% del inóculo inicial (ver protocolos del Capítulo 3).

Los resultados de CMI y CMB para cada NPa se resumen en la Tabla 6.4. En el caso de *S. aureus* y *P. aeruginosa* no se encontraron diferencias en el efecto antimicrobiano entre las NPaAgAG y NPaAgTV, ya que ambas NPa presentaron la misma CMI y CMB para cada cepa. Cabe destacar que *S. aureus* fue la cepa que mayor

susceptibilidad presentó frente a ambas NPa, ya que el crecimiento se inhibió con una CMI de 1,2 $\mu\text{g/mL}$ (NPAGAG o NPAGTV). En cambio, para *P. aeruginosa* la CMI fue de 2,35 $\mu\text{g/mL}$ para ambas NPa (el doble que para *S. aureus*). Sin embargo, la CMB para ambas cepas bacterianas coincidió en 4,7 $\mu\text{g/mL}$ (NPAGAG o NPAGTV). El menor efecto inhibitorio de las NPa contra *P. aeruginosa* puede deberse a que estas bacterias producen gran cantidad de EPS de consistencia gelatinosa de forma más rápida que la cepa *S. aureus*, por lo cual se requiere mayores concentraciones de iones Ag^+ que difundan a través de la matriz polimérica para inhibir su desarrollo rápidamente.

La cepa de *K. pneumoniae* reveló un comportamiento diferencial tanto respecto a las otras cepas estudiadas como también frente a la actividad antimicrobiana de cada NPAG. En primer lugar, el valor más alto de CMI para esta cepa respecto de *S. aureus* y *P. aeruginosa* indica una menor susceptibilidad a la acción de las NPAG. Cabe destacar que la cepa de *K. pneumoniae* ensayada es una bacteria multiresistente a agentes antimicrobianos y es de esperarse una mayor resistencia. Las NPAGAG mostraron para *K. pneumoniae* una CMI = CMB = 9,4 $\mu\text{g/mL}$, mientras que en el caso de las NPAGTV el valor obtenido fue 4,7 $\mu\text{g/mL}$ indicando que las NPa sintetizadas con ExTV presentan mayor efecto bactericida que las NPAGAG contra esta bacteria.

Tabla 6.4. Resultados de la CMI y CMB obtenidos para las NPAGAG y NPAGTV.

Cepa	NPAGAG		NPAGTV	
	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	CMB ($\mu\text{g/mL}$)	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	CMB ($\mu\text{g/mL}$)
<i>S. aureus</i>	1,2 \pm 0,1	4,7 \pm 0,3	1,2 \pm 0,1	4,7 \pm 0,3
<i>P. aeruginosa</i>	2,35 \pm 0,25	4,7 \pm 0,3	2,35 \pm 0,25	4,7 \pm 0,3
<i>K. pneumoniae</i>	9,4 \pm 1,2	9,4 \pm 1,2	4,7 \pm 0,3	4,7 \pm 0,3

También se evaluó cualitativamente la capacidad de liberación de iones Ag^+ de las NPAGAG y NPAGTV en medios de cultivos de agar mediante ensayos de halo de inhibición. Primeramente, se inoculó 100 μL de una suspensión con $\sim 10^8$ UFCs/mL de cada cepa estudiada sobre agar-agar solidificado en placa de Petri. Luego, se retiró con sacabocado 5 mm de agar-agar en el centro de placa y se sembraron 100 μL de suspensión de 5 o 10 $\mu\text{g/mL}$ de cada NPa, es decir masas de 0,5 μg y 1 μg de NPa respectivamente en el centro de la placa. Tras 24 h de incubación en estufa de cultivo, se procedió a determinar el halo de inhibición midiendo el diámetro de difusión de las NPAG y de los iones Ag^+ . Los resultados se resumen en la Tabla 6.5.

Se pudo comprobar que las NPaAgAG y NPaAgTV no presentaron halo de inhibición evidente para una masa de NPa de 0,5 μg (100 μL de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), lo cual indica que las NPaAg y los iones Ag^+ que han difundido en la superficie del agar no llegaron a alcanzar niveles suficientes para ejercer acción antimicrobiana. En cambio, para una masa de NPa de 1 μg (100 μL de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se encontraron halos de inhibición de ambas NPaAg para todas las cepas estudiadas revelando que se alcanzaban valores capaces de ejercer inhibición del crecimiento bacteriano (valores cercanos a la CMI en dichas regiones). Los halos fueron ligeramente más grandes para las NPaAgTV, mostrando, en coincidencia con otros autores [308,309], que el tamaño más pequeño de estas NPa podrían acelerar o aumentar el proceso de liberación de iones Ag^+ y su difusión en medios de cultivos de agar. Asimismo, la presencia de los FF componentes del TV puede ejercer un efecto adicional [299]. En la Figura 6.16 se muestran algunos ejemplos de los halos encontrados.

Tabla 6.5. Halo de inhibición de las NPaAgAG y NPaAgTV.

Cepa	NPaAgAG		NPaAgTV	
	100 μL de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 μL de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 μL de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 μL de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
<i>S. aureus</i>	Sin halo	13,4 \pm 0,6 mm	Sin halo	15 \pm 0,5 mm
<i>P. aeruginosa</i>	Sin halo	12 \pm 0,8 mm	Sin halo	14 \pm 1 mm
<i>K. pneumoniae</i>	Sin halo	13 \pm 0,7 mm	Sin halo	13,8 \pm 0,7 mm

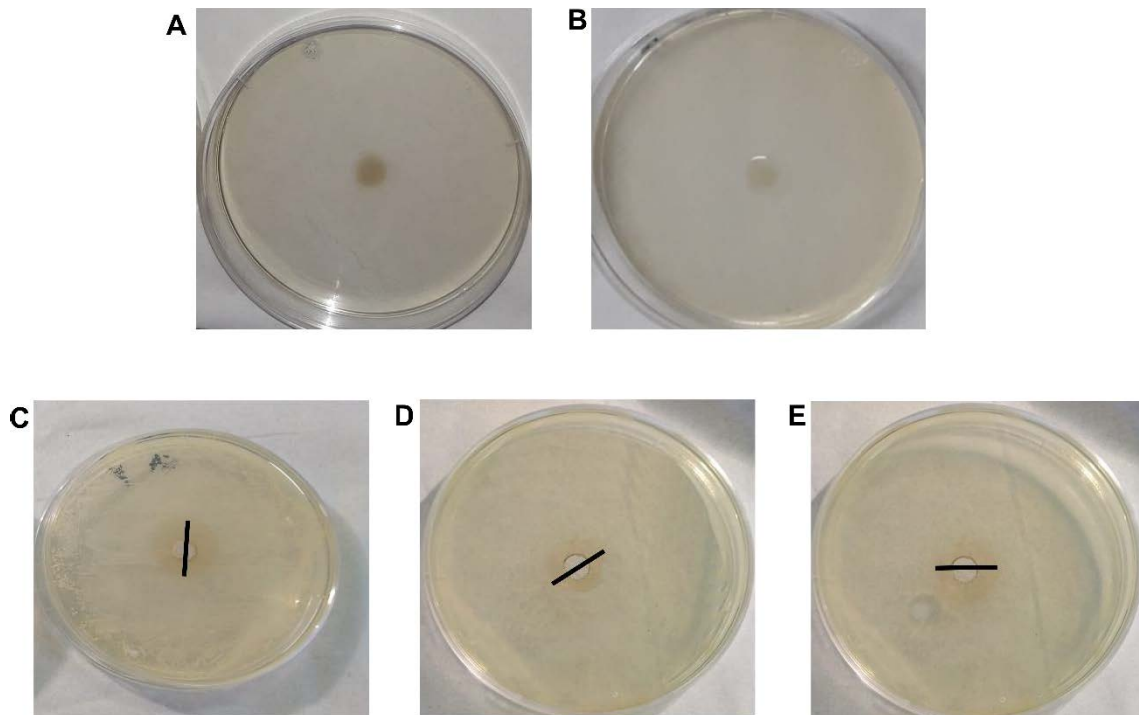


Figura 6.16. Halos de inhibición obtenidos inoculando 100 μL de solución de 5 $\mu\text{g/mL}$ o 10 $\mu\text{g/mL}$ de NP de Ag. A) NPaAgTV (5 $\mu\text{g/mL}$) contra *S. aureus* (sin halo), B) NPaAgAG (5 $\mu\text{g/mL}$) contra *S. aureus* (sin halo), C) NPaAgTV (10 $\mu\text{g/mL}$) contra *P. aeruginosa*, D) NPaAgAG (10 $\mu\text{g/mL}$) contra *P. aeruginosa* y E) NPaAgTV (10 $\mu\text{g/mL}$) contra *K. pneumoniae*. La barra negra indica el diámetro de inhibición.

6.3.4 Ensayos de citocompatibilidad y citotoxicidad celular

La citocompatibilidad y citotoxicidad celular de las NPaAgAG y NPaAgTV fue evaluada a través de diferentes ensayos (MTT, RN, tinción con naranja de acridina) en rangos de concentraciones de Ag total de 5 a 80 $\mu\text{g/mL}$. Se seleccionaron valores más altos que la CMB con el propósito de evaluar si las células eucariotas (fibroblastos y preosteoblastos) se ven afectadas por las concentraciones de Ag total que inhiben el crecimiento de las bacterias.

6.3.4.1 Reducción de MTT

La actividad mitocondrial se determinó por ensayos de reducción de MTT, acorde a los protocolos descritos en el Capítulo 3. Las NPaAgAG presentaron citotoxicidad a partir de concentraciones mayores a 20 $\mu\text{g/mL}$, tanto para células fibroblásticas como preosteoblásticas (Figura 6.17-A y B, respectivamente). En el caso de células preosteoblásticas, la viabilidad celular cae drásticamente a partir de concentraciones de 20

$\mu\text{g/mL}$, mientras que en células L929 la disminución de la viabilidad celular es progresiva y acorde a curvas típicas de dosis-respuesta de agentes citotóxicos.

Para las NPaAgTV se revelaron resultados similares, con disminución de la citocompatibilidad a partir de concentraciones mayores a $20 \mu\text{g/mL}$. Nuevamente, las células pre-osteoblásticas fueron más susceptibles a la acción citotóxica de las NPa, ya que la viabilidad celular cae drásticamente con concentraciones de $20 \mu\text{g/mL}$, al igual que en el caso de las NPaAgAG (Figura 6.17-C y D)

Un dato ampliamente utilizado para evaluar la citotoxicidad de compuestos o reactivos es el valor de la tasa EC50 (por sus siglas en inglés, *effective concentration 50*) que se define como la concentración del agente que provoca la reducción del 50% de la viabilidad celular. A partir de los datos de la Figura 6.16, se resumen en la Tabla 6.6 los valores de EC50 determinados por ensayo de MTT. Como puede verse, las células fibroblásticas L929 presentan mayor EC50 y, por lo tanto, son más resistentes a los efectos citotóxicos de las NPa en suspensión.

Tabla 6.6 Valores de la EC50 obtenidos para las NPaAgAG y NPaAgTV en el ensayo de reducción de MTT.

Línea celular	NPaAgAG	NPaAgTV
L929	20-40 $\mu\text{g/mL}$	20-40 $\mu\text{g/mL}$
MC3T3-E1	> 10 $\mu\text{g/mL}$	> 10 $\mu\text{g/mL}$

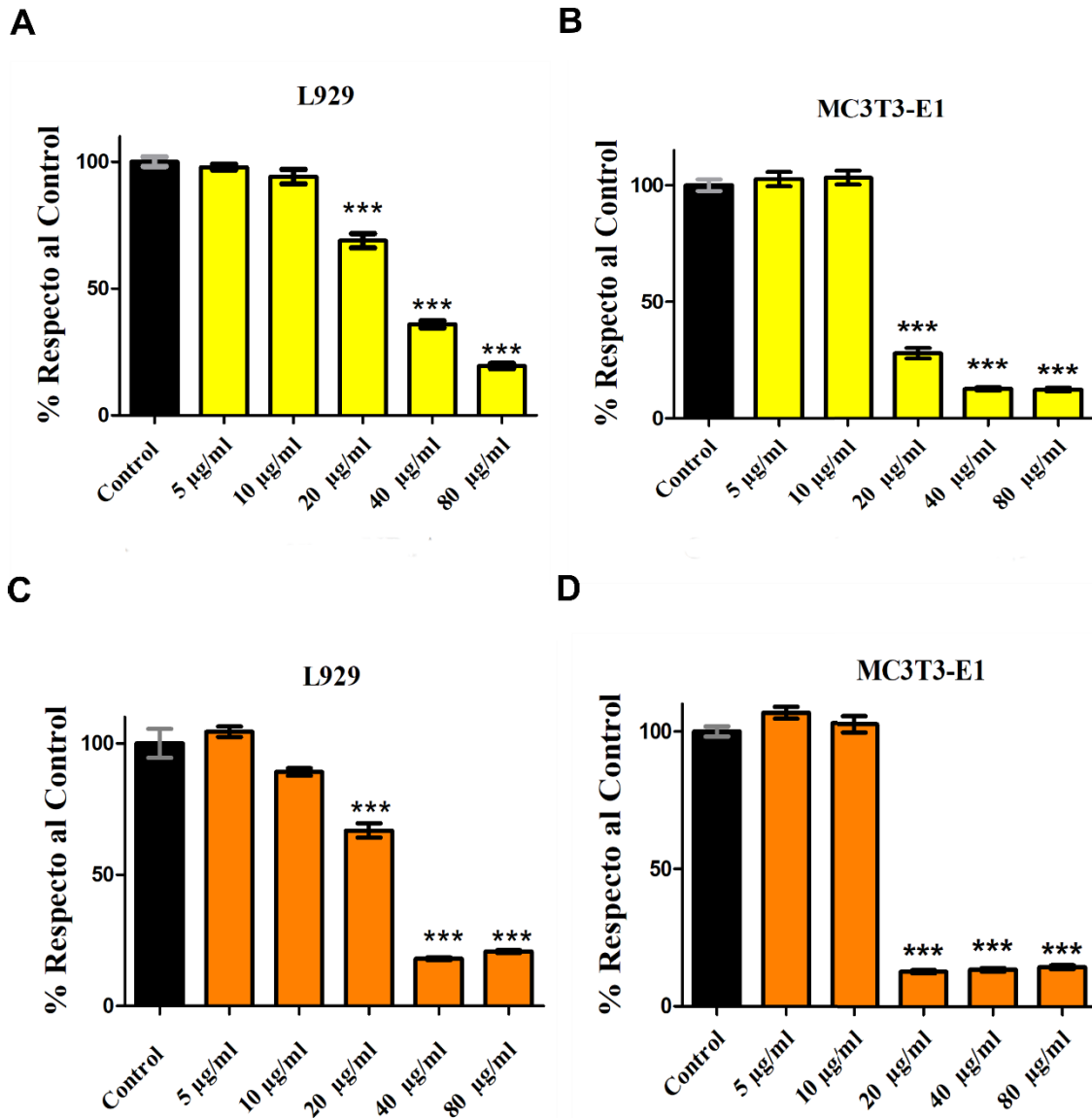


Figura 6.17. Citotoxicidad determinada por disminución de la actividad mitocondrial a través del ensayo de reducción de MTT. A y B) NPAGAG, C y D) NPAGTV. *** indica diferencias con el control de células ($p < 0,01$).

6.3.4.2 Reducción de RN

La citotoxicidad de las NPAG sintetizadas por NEC se determinó también mediante el ensayo de reducción de RN que permite estimar la viabilidad celular evaluando la actividad lisosomal, acorde a lo explicado en el Capítulo 3.

Las NPAGAG revelaron similares efectos citotóxicos para células fibroblásticas y pre-osteoblásticas donde a partir de 20 µg/mL se reduce la actividad lisosomal significativamente en relación con el control de células sin NPa (Figura 6.18-A y B). En el caso de las NPAGTV, se observa que la actividad se mantiene hasta concentraciones

de 40 $\mu\text{g/mL}$ para células fibroblásticas, mientras que para células pre-osteoblásticas disminuye considerablemente a partir de 20 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 6.18-C y D). Estos resultados sugieren que las células pre-osteoblásticas son más susceptibles a la acción citotóxica de estas NPa.

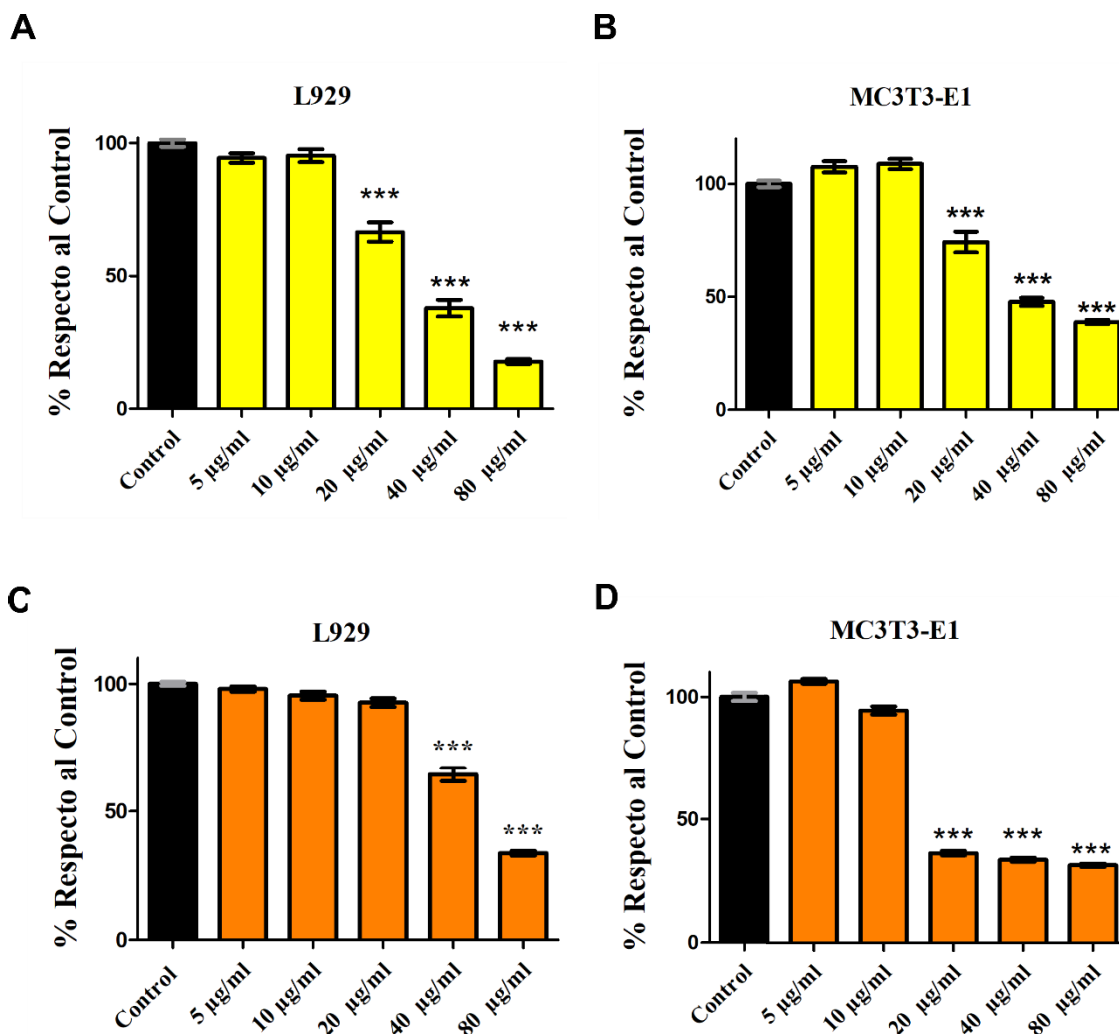


Figura 6.18. Citotoxicidad determinada por disminución de la actividad lisosomal a través del ensayo de reducción de RN. A y B) NPaAgAG, C y D) NPaAgTV. *** indica diferencias con el control de células ($p < 0,01$).

En la Tabla 6.7 se resumen los valores calculados de EC50 para las NPaAgAG y NPaAgTV. Al igual que los resultados de MTT, las células MC3T3-E1 mostraron mayor sensibilidad a la acción citotóxica de las NPaAgTV. Sin embargo, ambas NPaAg revelaron mayores valores de EC50 por RN que los correspondientes a MTT. Esto indicaría, que las NPaAg obtenidas por NEC presentan mayores niveles de citotoxicidad a nivel mitocondrial que a nivel lisosomal.

Tabla 6.7 Valores de la EC50 obtenidos para las NPaAgAG y NPaAgTV en el ensayo de reducción de RN.

Línea celular	NPaAgAG	NPaAgTV
L929	20-40 µg/mL	40-80 µg/mL
MC3T3-E1	20-40 µg/mL	> 20 µg/mL

6.3.4.3 Viabilidad celular por tinción con naranja de acridina

Finalmente, se evaluó la citocompatibilidad de las NPaAgAG y NPaAgTV a través de la tinción con naranja de acridina. Para esto, se sembraron 100.000 células en cada pocillo de una placa de 6 wells y se incubaron por 24 h para su crecimiento. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se adicionó en cada uno una concentración de NPaAg de 5, 10, 20, 40 o 80 µg/mL disueltos en medio de cultivo DMEM. Como control, se utilizaron células sin tratamiento con NPaAg. Tras 24 h de cultivo se revelaron los ensayos y se calculó el área cubierta por células, tal como fue descrito en el Capítulo 3.

Los resultados del ensayo de tinción con naranja de acridina revelaron que, en forma similar a los ensayos previos, las NPaAgAG disminuyeron la viabilidad celular a partir de concentraciones de 20 µg/mL en células fibroblásticas, mientras que para células pre-osteoblásticas la viabilidad se redujo a partir de 40 µg/mL (Figura 6.19-A y B, respectivamente). Por otro parte, las células L929 mostraron una disminución progresiva de la viabilidad celular con el aumento de las concentraciones de las NPaAgAG acorde a las típicas curvas de dosis-respuesta. En cambio, las células pre-osteoblásticas mantuvieron la viabilidad celular hasta 20 µg/mL, pero a partir de concentraciones de 40 µg/mL la viabilidad cayó drásticamente a valores cercanos a cero, ya que no se encontraron células viables adheridas sobre el well de la placa multipocillo. Esto indicaría que las NPaAgAG a concentraciones mayores de 20 µg/mL producen la muerte y desprendimiento completo de las células pre-osteoblásticas, revelando, en coincidencia con otros ensayos de citotoxicidad, que estas células son más susceptibles a la acción citotóxica de las NPaAgAG que las células fibroblásticas.

En el caso de las NPAGTV se observó una disminución de la viabilidad progresiva de las células fibroblásticas con el aumento de la concentración de las NPA (Figura 6.19-C), similar a lo observado con NPAGAG para estas mismas células. En cambio, para las células pre-osteoblásticas se observa una disminución de la viabilidad celular de 50% aproximadamente para concentraciones de 20 µg/mL y, al igual que las NPAGAG, a partir de 40 µg/mL se produce la muerte y desprendimiento completo de las células pre-osteoblásticas (Figura 6.19-D).

En la Tabla 6.8 se resumen los valores de EC50 determinados por tinción con naranja de acridina. Los resultados muestran que las NPAG obtenidas por NEC son citocompatibles hasta concentraciones menores que 20 µg/mL.

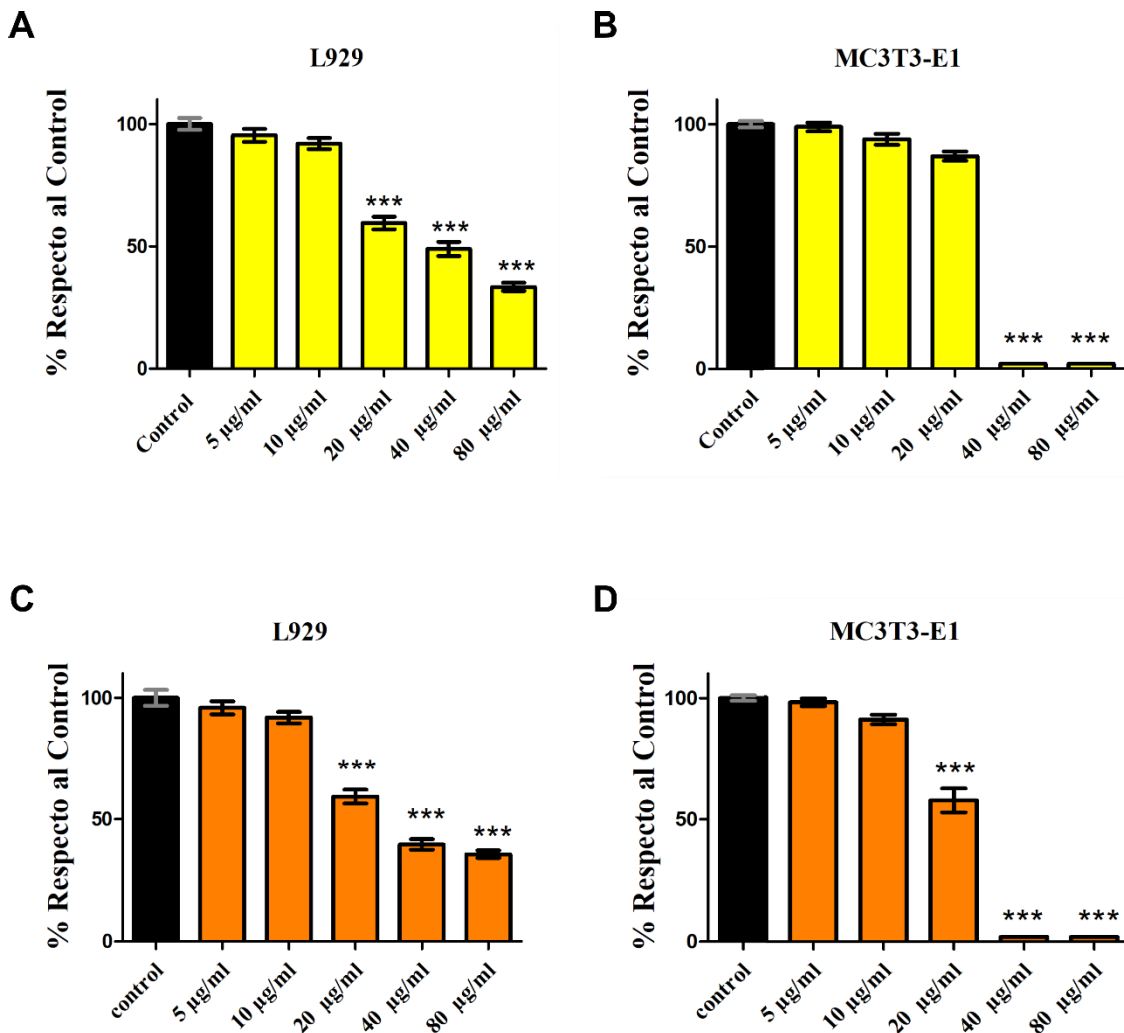


Figura 6.19. Citocompatibilidad determinada por tinción con naranja de acridina A y B) NPAGAG, C y D) NPAGTV. *** indica diferencias con el control de células ($p < 0,01$).

Tabla 6.8 Valores de la EC50 obtenidos para las NPaAgAG y NPaAgTV en los ensayos de tinción con naranja de acridina.

Línea celular	NPaAgAG	NPaAgTV
L929	20 µg/mL	20 µg/mL
MC3T3-E1	> 20 µg/mL	20 µg/mL

6.3.4.4 Comparación de los resultados de citotoxicidad evaluada por distintos métodos

A partir de los resultados obtenidos por reducción de MTT y RN y de viabilidad con naranja de acridina se puede concluir que las NPaAgAG y NPaAgTV son citocompatibles hasta concentraciones más elevadas que las toleradas por las bacterias (CMB). Los resultados mostraron que, mientras que con concentraciones de 5 µg/mL (para *S. aureus S. aureus* y *P. aeruginosa*) o de 10 µg/mL (para *K. pneumoniae*) se alcanza un efecto bactericida (CMB), para producir una disminución similar de la viabilidad celular se requieren concentraciones de NPaAg mayores a 20 µg/mL para producir la muerte del 50% o más de las células fibroblásticas y pre-osteoblásticas. Por lo tanto, las NPaAg sintetizadas en este trabajo presentan buena citocompatibilidad para tolerar las CMI capaces de erradicar las bacterias y combatir infecciones bacterianas en sistemas biológicos.

6.3.5 Análisis comparativo de las características fisicoquímicas de las NPaAgTV y NPaAgAG, su acción antimicrobiana y su citocompatibilidad evaluada en células fibroblásticas y pre-osteoblásticas

Los resultados obtenidos por TEM y DLS permiten concluir que las NPa sintetizadas por NEC son estables por periodos largos de tiempo, manteniendo su tamaño nanométrico y sin sufrir procesos considerables de aglomeración durante su almacenamiento. Además, las NPaAgAG y NPaAgTV frescas no sufren grandes cambios en respuesta a la fuerza iónica de soluciones de PBS, manteniendo su polidispersidad inicial y tamaño. En cambio, las suspensiones de ambas NPa almacenadas por tiempos mayores a 6 meses han mostrado que son susceptibles a los cambios de fuerza iónica y composición del medio, experimentando procesos de aglomeración y aumento

considerable de la polidispersidad en PBS. Por ese motivo sería aconsejable almacenarlas en el medio original.

Como se mencionó en el apartado 6.1, la liberación de los iones Ag^+ es el principal, aunque no el único, mecanismo antimicrobiano propuesto para la actividad biocida de las NPaAg. Se ha demostrado que cuando las NPaAg se encuentran a pH neutro, como el fisiológico, el óxido de plata Ag_2O superficial, que se forma espontáneamente sobre la superficie de las NPaAg (ver Ecuación 6.1 y 6.2), conforma grupos Ag-OH que, por ligera acidificación del medio, pueden protonarse formando grupos Ag-OH_2 , favoreciendo la liberación de iones Ag^+ [310,311]. Algunos autores consideran que el mecanismo antimicrobiano está basado en la difusión y fácil penetración de estos cationes en la membrana bacteriana produciendo daño celular por estrés oxidativo y aumentando la producción de ROS que dañan organelas, proteínas y lípidos intracelulares y el ADN microbiano [312]. Es decir, que los iones Ag^+ alteran e impiden el correcto funcionamiento metabólico de las bacterias provocando su muerte o lisis celular.

Sin embargo, algunos investigadores también consideran otras alternativas para interpretar los mecanismos antimicrobianos de las NPaAg, como por ejemplo [309,313]: 1) su adhesión a la membrana plasmática de las bacterias alterando su permeabilidad o incluso provocando la disrupción de la misma, 2) internalización de las NPaAg dentro del citoplasma bacteriano ocasionando la interrupción del metabolismo normal por interacción con proteínas intracelulares y ADN microbiano, y 3) cambios en las vías de señalización celular que provocan apoptosis y muerte celular. Por lo tanto, la acción antimicrobiana de las NPaAg podría ser *multi-target* y afectar la viabilidad bacteriana por diferentes vías, lo cual, a su vez, dificultaría el desarrollo de mecanismos de resistencia microbiana. Sin embargo, se ha reportado que en condiciones específicas y particulares (como por ejemplo, el crecimiento repetitivo de un mismo cultivo bacteriano expuesto a NPaAg o el crecimiento de un cultivo con concentraciones inferiores a la CMI de determinadas NPaAg, entre otros) ciertas cepas bacterianas pueden desarrollar mecanismos de resistencia microbiana a NPaAg por incremento de la producción de proteínas que atrapan y/o agregan las NPaAg reduciendo o eliminando su acción bactericida [314,315].

La actividad antimicrobiana de las NPAG ha sido ampliamente demostrada tanto para cepas Gram negativas como Gram positivas. La técnica más empleada para evaluar la capacidad antimicrobiana de NPAG contra bacterias planctónicas es la determinación de la CMI y CMB, ya que son técnicas estandarizadas, reproducibles y comparables para diferentes agentes antimicrobianos. En la bibliografía se ha informado una amplia variedad y rangos de valores de CMI y CMB para diferentes tipos de NPAG, ya que en definitiva el valor de estos parámetros depende del tamaño, forma, carga, dispersidad, aglomeración, recubrimiento o *capping* de las NPAG y de su capacidad de liberar iones Ag^+ [269]. A modo de ejemplo de la variabilidad de resultados obtenidos se ha reportado que NPAG de 9-16 nm de diámetro y recubiertas por PVP obtenidas por síntesis química tradicionales presentaron una CMB de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* [316] mientras que NPAG de 5-8 nm también recubiertas con PVP revelaron una CMB de 60 y 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente [317].

En el caso de las NPAG sintetizadas por NEC, Martínez-Castañón *et al.* [318] determinaron la CMI de NPAG de tres tamaños (7, 29 y 89 nm) y los valores encontrados fueron desde 6,25 a 11,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *E. coli* y desde 7,5 a 33,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *S. aureus*; siendo los valores de la CMI más bajos para las NPAG más pequeñas lo cual indica la importancia del tamaño en la acción bactericida. Kim *et al.* [280] emplearon NPAG de 8 nm promedio y encontraron que la CMI para *E. coli* fue de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *S. aureus*. Por otra parte, Rolim *et al.* [306] sintetizaron NPAGTV de 5 nm promedio y determinaron que la CMI fue igual que la CMB resultando valores notablemente altos (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para *S. aureus* y *K. pneumoniae* y valores de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *P. aeruginosa*. En contraposición, Sun *et al.* [300] obtuvieron NPAGTV de 20 nm promedio con alta actividad antimicrobiana para *E. coli* ya que la CMI y CMB fue de 1,56 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Nuestros resultados, arrojaron valores de CMI y CMB inferiores (ver Tabla 6.6) a los valores generalmente informados para NPAG obtenidas tanto por métodos tradicionales como por procedimientos NEC. Sin embargo, es importante destacar que los valores de CMI y CMB pueden variar dependiendo del método empleado, la cepa analizada, el medio de cultivo empleado y, lo más importante, de la naturaleza propia e individual de cada NPAG [271,314,319].

Por otra parte, en los ensayos con la cepa de *K. pneumoniae* (conocida por ser multiresistente) se observó que el tamaño de las NPAG podría influir en la acción bactericida determinada por CMI y CMB, ya que los valores de CMI y CMB obtenidos

para NPAGTV fueron la mitad que los observados para las NPAGAG (cuyo tamaño promedio es casi el doble que las NPAGTV) (ver Tabla 6.6). Por otra parte, siendo la CMI = CMB puede inferirse que inicialmente la cepa de *K. pneumoniae* es más resistente a la acción de las NPA, cualquiera sea el mecanismo involucrado, que las otras cepas; pero que una vez que se logra el efecto inhibitorio también se alcanza inmediatamente el efecto bactericida dada la mayor concentración del agente antimicrobiano. Además, el menor tamaño y por lo tanto mayor superficie expuesta, podría conducir a una mayor liberación de los FF componentes del TV que podrían contribuir a la acción bactericida de los iones. En cambio, en cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa* (cepas que no presentan multiresistencia) los valores de CMI y CMB fueron coincidentes para NPAGTV y NPAGAG (ver Tabla 6.6). Existe un gran acuerdo que la mayor actividad antimicrobiana de las NPA pequeñas se asocia a dos motivos: i) primero a que pueden penetrar la membrana bacteriana y alojarse dentro del citoplasma interfiriendo con funciones vitales, y ii) segundo a que su menor tamaño aumenta la relación superficie/volumen favoreciendo la liberación de iones Ag^+ que aumentan la generación de daño por incrementos de ROS [320]. A modo de ejemplos, Skomorokhova *et al.* [321] demostraron que NPAG de 10, 20 y 75 nm presentan una relación lineal decreciente del poder bactericida contra *E. coli* para mayores tamaños de NPAG. En concordancia, Korshed *et al.* [308] reportaron que NPAG de 19 nm presentan mayores niveles de producción de ROS que NPAG de 47nm, provocando mayor daño celular contra *E. coli*. Por lo tanto, es posible inferir que las NPAGAG y NPAGTV sintetizadas en el presente Trabajo de Tesis afecten la viabilidad de las bacterias estudiadas por diferentes vías y mecanismos, generando la muerte por: i) liberación de iones Ag^+ , ii) incremento de ROS, iii) penetración de la membrana bacteriana, entre otros.

En cuanto a la citotoxicidad en células eucariotas, NPAGAG y NPAGTV presentaron niveles de toxicidad más bajos en células fibroblásticas y pre-osteoblásticas de ratón en comparación a las cepas bacterianas ensayadas. Se han reportado resultados similares para NPAG de 27 nm que presentaron alta toxicidad en cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, pero no se encontraron efectos tóxicos significativos en líneas celulares endoteliales humanas [309]. En sintonía, Korshed *et al.* [308] sintetizaron NPAG con alta actividad antimicrobiana contra *E. coli*, sin presentar efectos tóxicos en células epiteliales y fibroblásticas humanas a las concentraciones ensayadas. Sin embargo, la citocompatibilidad dependería del período de incubación testado ya que hay

estudios que demuestran que en células osteoblásticas y mesenquimales humanas la citotoxicidad de las NP_{Ag} comienza a manifestarse luego de 7 días de incubación para concentraciones de 25 µg/mL o de 21 días para concentraciones de 10 µg/mL [322]. Asimismo, Albers *et al.* encontraron efectos citotóxicos en osteoblastos a concentraciones de 5 µg/mL luego de 72 h de incubación [323].

La menor toxicidad de las NP_{Ag} en células eucariotas con respecto a las bacterias puede deberse a que las primeras presentan mecanismos de detoxificación más avanzados que las bacterias, ya que cuentan con organelas específicas (lisosomas y sistemas de endomembranas) capaces de internalizar las NP_{Ag} y descomponerlas. Además, las células eucariotas presentan el ADN protegido en el núcleo, por lo cual la interacción de las NP_{Ag} o de los iones Ag⁺ con el ADN es más baja, en comparación a las bacterias cuyo ADN se encuentra libre dentro del citoplasma [324]. Esta particularidad es muy importante ya que permitiría combatir las infecciones utilizando valores de CMB que son inferiores a los niveles tóxicos para las células eucariotas.

6.4 Conclusiones

A partir de los resultados presentados en este Capítulo se puede concluir que es posible obtener NP_{Ag} de tamaño nanométricos estables en el tiempo (> 6 meses) empleando procedimientos NEC.

La síntesis con AG produjo una suspensión de NP_{Ag}AG de coloración amarilla intensa con una banda de resonancia de plasmones a 400 nm, una población principal con tamaño promedio de 17,5 nm (>88% de las NP_{Ag} de la muestra) y una segunda población pequeña de mayor tamaño (valor promedio de 42,5 nm). El histograma de frecuencias derivado de las mediciones por S-TEM muestra que la síntesis de NP_{Ag}AG da lugar a una población polidispersa con un rango de NP_{Ag} medidas por S-TEM de 2 a 75 nm. El análisis por DLS también mostró polidispersidad y dos poblaciones principales. El rendimiento de reacción determinada por ICP-OES fue de 96%. La composición del *capping* de AG fue investigada por ATR-FTIR y presentó señales características de este FF y se detectó la presencia del grupo COO⁻.

La síntesis con ExTV mostró suspensiones de NP_{Ag}TV de coloración amarillo-anaranjada con una banda de resonancia de plasmones a 418 nm. A través de mediciones por S-TEM se determinó el histograma de frecuencias con una única población de un tamaño promedio de 9 nm. Estos resultados, junto al valor del PDI (~ 0,20) y el histograma de frecuencia, sugieren que la síntesis con ExTV produce una población de

NPaAgTV monodispersa y con menor rango de tamaños (2 a 27 nm) y un menor rendimiento de reacción (86% medido por ICP-OES) que las NPaAgAG. El *capping* de las NPaAgTV reveló señales por ATR-FTIR características de catequinas y taninos, principales componentes de ExTV. Además, se detectó la presencia del grupo COO⁻, al igual que en el caso de las NPaAgAG.

Las NPaAgAG y NPaAgTV mostraron estabilidad durante su almacenamiento en heladera hasta periodos de 6 a 12 meses, sin que se afecte significativamente su tamaño promedio determinado por DLS. Asimismo, las suspensiones frescas de estas NPaAg se vieron poco desestabilizadas por la fuerza iónica de soluciones de PBS, sin embargo, se observó que las suspensiones con un tiempo de almacenamiento mayor a 6 meses se vieron afectadas en el tamaño promedio y polidispersidad determinadas por DLS.

Ambas NPaAg sintetizadas por NEC mostraron alta actividad antimicrobiana determinada por CMI y CMB donde con concentraciones de menores a 5 µg/mL se logra efecto bactericida para todas las cepas estudiadas. Además, las NPaAgAG y NPaAgTV fueron citocompatibles hasta concentraciones menores a 20 µg/mL, indicando que utilizando concentraciones > 5 µg/mL (CMI) y <20 µg/mL (citotoxicidad) se pueden combatir posibles procesos infecciosos de bacterias planctónicas.

Finalmente, las NPaAgAG y NPaAgTV presentan características fisicoquímicas (tamaño nanométrico y presencia del grupo COO⁻ en el *capping*) y antimicrobianas (bajas dosis para producir inhibición o muerte bacteriana) que las convierten en promisorias para la evaluación de su adhesión sobre Ti (previa funcionalización con fitocompuestos) y conferirles actividad antimicrobiana con el fin de combatir o prevenir procesos infecciosos. Este desarrollo se describirá en el próximo Capítulo.

Capítulo 7: Inmovilización de las nanopartículas de plata sobre la superficie de materiales de Ti modificados superficialmente.

7.1 Introducción general

La combinación de dos o más nanoproducos con actividades antimicrobianas sinérgicas es una estrategia novedosa para desarrollar superficies multifuncionales que prevengan la adhesión y crecimiento de bacterias, combatiendo la formación de *biofilms*. La relevancia de estas superficies radica en el hecho de combinar la acción antimicrobiana de dos agentes con el objetivo de atacar a las bacterias sésiles en diferentes niveles metabólicos (a nivel de membrana, ADN, *quorum sensing*, producción de EPS, etc) [34].

En la fabricación de superficies multifuncionales se incluyen diferentes combinaciones de agentes antimicrobianos, como por ejemplo NPa+NPe, NPa+antibióticos, NPa + fotosensibilizadores, péptidos y proteínas antimicrobianas, etc. Se han reportado superficies multifuncionalizadas de Ti que combinan NPa con antibióticos (ampicilina y vancomicina y NPaAg inmovilizadas), con efectos antimicrobianos sinérgicos contra *S. aureus* [325,326]. Asimismo, hidrogeles de poliacrilamida cargados con ampicilina o NPaAg mostraron una importante actividad bactericida contra dicha bacteria [327] Por otra parte, hidrogeles de quitosano con deposición *in-situ* de NPaAg confirieron propiedades antimicrobianas contra *S. aureus* y *E. coli* adheridos a superficies de Ti [328].

La utilización de péptidos, proteínas o biopolímeros antimicrobianos y citocompatibles, pueden conferir a los materiales de Ti otras propiedades biológicas interesantes, como aumento de la biocompatibilidad y/o actividad osteogénica. Recientemente se han reportado superficies de Ti multipropósito tales como NPe de 2 péptidos antimicrobianos [329] recubrimientos de polidopamina+NPaAg [330] y las funcionalizadas con lactoferrina+NPaAg que, además de propiedades antimicrobianas, presentan oseointegración mejorada [57].

Como se demostró en el Capítulo 5, las MPN desarrolladas sobre materiales de Ti presentan actividad antibiofilm. Se ha informado previamente que, algunos sistemas, también pueden presentar propiedades osteogénicas *in vitro* e *in vivo* [249]. Asimismo, se ha reportado el desarrollo de sistemas de MPN de AT+Fe³⁺ con inmovilización de NPaAg obtenidas por síntesis tradicionales para recubrimientos de fibras de madera para

aplicaciones ambientales [331] y sobre diferentes fibras textiles para usos industriales [209].

En el Capítulo 5 se demostró que las muestras de Ti-MPN-AG y Ti-MPN-PG presentan actividad antiadherente y antibiofilm, es decir que, si bien no muestran características biocidas, inhiben la adhesión de las bacterias y reducen la producción de EPS impidiendo la formación posterior del biofilm. Las bacterias adheridas, al estar aisladas entre sí y sin suficiente EPS que las proteja, son más susceptibles a la acción de otros agentes antimicrobianos. Por otra parte, en dicho Capítulo se demostró que, cuando se combina la acción antibiofilm de Ti-MPN-AG o Ti-MPN-PG con un antibiótico como la amikacina, se observa una actividad antimicrobiana sinérgica capaz de reducir en 5 órdenes de magnitud la cantidad de UFCs/cm² prácticamente eliminando el biofilm formado. En el presente Capítulo se pretende lograr la erradicación de los *biofilms*, para ello se utilizará como posibles agentes antimicrobianos sinérgicos a las NPaAgAG o NPaAgTV inmovilizadas sobre las superficies de Ti-MPN-AG o Ti-MPN-PG y se investigará su eficacia antibiofilm y antibacteriana, así como su potencial poder erradicador de bacterias. Se describe por lo tanto el desarrollo de dichas superficies multifuncionalizadas de Ti que combinan la formación las MPN (Capítulo 5) con la posterior inmovilización de NPaAgAG y NPaAgTV (Capítulo 6). De esta forma, se evaluará el desarrollo de un novedoso sistema mixto entre NPe y NPa obtenido completamente por NEC.

7.2 Materiales y métodos

7.2.1 Preparación de las muestras

Se utilizaron muestras de Ti control, Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG obtenidas como se describió en el Capítulo 5. En algunos casos y con fines comparativos, las muestras de Ti control fueron pulidas a espejo empleando sucesivamente papeles abrasivos P320, P400, P600, P1000, P1500 y P2500 y luego pulidas con una suspensión de sílice coloidal.

7.2.2 Adhesión de las nanopartículas de plata sobre la superficie de Ti

La caracterización de las muestras de Ti-MPN-AG y Ti-MPN-PG fue descrita en el Capítulo 5, donde se demostró que son estables y están fuertemente adheridas sobre

Ti. Sobre dicho sistema se inmovilizaron NPaAgAG y NPaAgTV preparadas según lo reportado en el Capítulo 6.

Para inmovilizar las NPaAgAG y NPaAgTV sobre Ti-MPN-AG y Ti-MPN-PG se colocaron las muestras en *wells* dentro de una placa de 24 pocillos y en cada uno de ellos se adicionó 1 mL de las suspensiones de las NPaAgAG y NPaAgTV con una concentración de aproximadamente 20 µg/mL, manteniendo la placa multipocillo cerrada y a temperatura ambiente por 3 h, siguiendo la metodología recientemente reportada para sistemas similares [48,57,332]. Finalizado dicho período, las muestras con NPaAgAG o NPaAgTV inmovilizadas sobre las superficies de Ti-MPN-AG (Ti-MPN-AG+NPaAgAG y Ti-MPN-AG+NPaAgTV, respectivamente) y Ti-MPN-PG (Ti-MPN-PG+NPaAgAG y Ti-MPN-PG+NPaAgTV, respectivamente) fueron lavadas en agua Milli-Q para eliminar aquellas NPa que no estuvieran fuertemente adheridas. También se evaluó la adherencia sobre Ti control de las NPaAgAG y NPaAgTV (Ti+NPaAgAG y Ti+NPaAgTV) con fines comparativos.

7.2.3 Caracterización fisicoquímica

La inmovilización de las NPaAgAG y NPaAgTV sobre las diferentes superficies fue evaluada por AFM. Además, se investigó la estabilidad de la unión de las NPa a la superficie sumergiendo las muestras Ti-MPN-PG+NPaAgAG, Ti-MPN-PG+NPaAgTV, Ti-MPN-AG+NPaAgAG y Ti-MPN-AG+NPaAgTV en sendas soluciones de PBS por 24 h. Cumplido dicho período se volvieron a tomar imágenes AFM para comprobar si las NPa seguían adheridas sobre la superficie y se tomaron espectros UV-visible de las soluciones de PBS para detectar posibles NPa liberadas.

Se evaluó la hidrofiliidad de las superficies resultantes a través de medidas del ángulo de contacto en forma similar a lo descrito en Capítulos previos.

7.2.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana

Se estudió la actividad antimicrobiana de las diferentes superficies contra *S. aureus* a 3 h y 24 h de incubación para evaluar la colonización inicial y la posible formación de biofilm temprano respectivamente sobre las superficies modificadas. Se utilizó medio GMP para evitar interferencias en la acción antimicrobiana de las NPaAg y se empleó el protocolo de ensayo descrito en la Sección 3.3.5 del Capítulo 3. La

actividad antimicrobiana fue evaluada por recuento en placa de UFCs, tinción Live/Dead y cuantificación de la producción de EPS por tinción Sypro Ruby.

7.2.5 Citocompatibilidad celular y actividad osteogénica

Para determinar la citocompatibilidad de las muestras obtenidas, se determinó el área cubierta por células fibroblásticas (L929) y pre-osteoblásticas (MC3T3-E1) por tinción con naranja de acridina luego de 1, 2, 5 y 7 días de incubación. También se determinó la actividad osteogénica de las superficies en estudio a través de la cuantificación de producción de FAI, colágeno tipo I y mineralización por depósitos de calcio tal como se detalla en el Capítulo 3 (Sección 3.2).

7.2.6 Análisis estadísticos

Todos los ensayos presentados en este Capítulo fueron realizados al menos por triplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA (test de Bonferroni) previamente confirmada la normalidad de los datos con un nivel de confianza del 95%.

7.3 Resultados y discusión

7.3.1 Caracterización fisicoquímica de las superficies de Ti con NPaAg

7.3.1.1 Estudio de la adhesión de las NPaAg sobre superficies de Ti por AFM.

En primer lugar, se evaluó la inmovilización de las NPaAgAG y NPaAgTV (con periodos de almacenamiento menor a 6 meses) sobre materiales de Ti control con el propósito de determinar la interacción de las NPa con el TiO₂. Como se describió en capítulos anteriores, las muestras de Ti control presentan una topografía nanoestructurada altamente rugosa en la cual se pudo detectar la presencia de NPaAgAG (Figura 7.1-A) y NPaAgTV (Figura 7.1-D). Tanto sobre las muestras de Ti+NPaAgAG como sobre las de Ti+NPaAgTV se encontró después de 3 h una baja cantidad de NPa, adheridas en forma individual sobre la superficie metálica y se observaron también aglomerados. Con fines comparativos se evaluó la inmovilización de las NPaAg sobre Ti empleando muestras de Ti control pulido a espejo (Ti control-PE). En este caso se observó muy poca adhesión de dichas NPa después de 3 h, las mismas se encontraban aisladas o bien formando pequeños aglomerados (Figura 7.1-B y C). Por otra parte, la adhesión de NPaAgTV también fue

escasa sobre el Ti control-PE, y se observaron principalmente aglomerados con un aspecto o forma similar a un “coliflor” (Figura 7.1-E y F). Estos resultados sugieren que ambas NPaAg tienen baja afinidad para inmovilizarse sobre la superficie de Ti. Además, las NPaAgAG tienden a adherirse de forma solitaria, mientras que las NPaAgTV lo hacen principalmente en forma de aglomerados. En ese sentido, la formación de aglomerados reduce la relación superficie/volumen y, por lo tanto, disminuye la capacidad de liberación de iones Ag^+ por parte de las NPaAg. Este comportamiento ya ha sido reportado por otros autores [48] y se ha visto que la presencia de diferentes coberturas revierte esta situación, permitiendo incrementar la cantidad de NPaAg inmovilizadas sobre Ti y, a la vez, favorecer su adhesión en forma aislada [49,51].

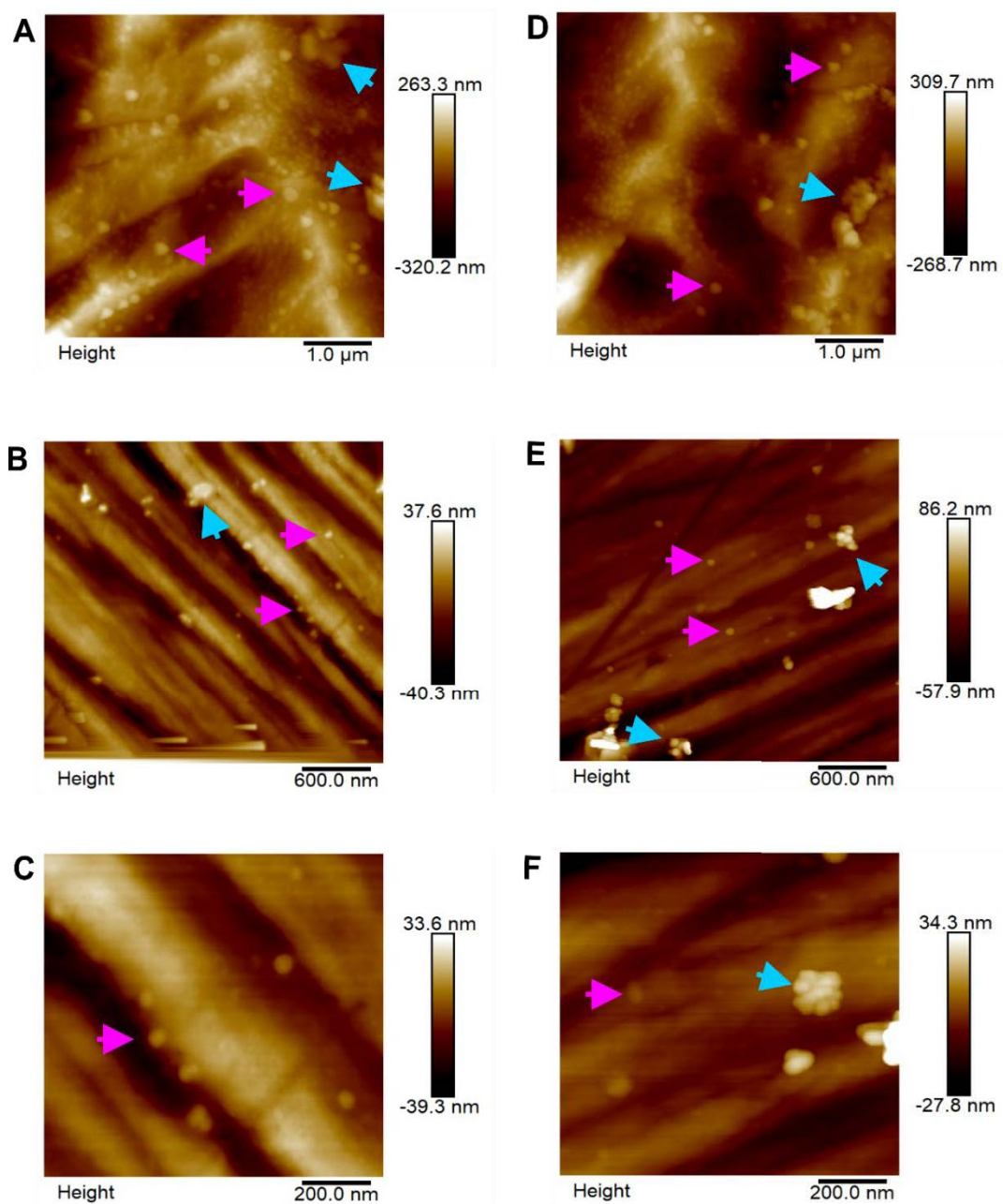


Figura 7.1. Imágenes AFM para: A) Ti control + NPaAgAG (5x5 μm²), B) Ti control-PE + NPaAgAG (3x3 μm²), C) Ti control-PE + NPaAgAG (1x1 μm²), D) Ti control + NPaAgTV (5x5 μm²), E) Ti control-PE + NPaAgTV (3x3 μm²) y F) Ti control-PE + NPaAgTV (1x1 μm²). Las flechas fucsias indican NPa aisladas y las flechas celestes indican aglomerados.

Para aumentar la cantidad y la proporción de NPaAg inmovilizadas en forma aislada sobre la superficie de Ti, se desarrollaron MPN de AG y PG sobre la superficie metálica y luego se inmovilizaron sobre ellas las NPaAgAG y NPaAgTV.

Inmovilización de NP_aAgAG sobre Ti-MPN-PG (Ti-MPN-PG+NP_aAgAG):

Como se describió en el Capítulo 5, las muestras de Ti-MPN-PG presentan una topografía más lisa y homogénea que el control gracias al desarrollo de la MPN. En la Figura 7.2 se muestran las imágenes AFM obtenidas para las muestras de Ti-MPN-PG+NP_aAgAG. En primer lugar, puede observarse que la cantidad de NP_aAgAG adheridas sobre la superficie de Ti aumenta considerablemente en comparación al Ti control (Figura 7.2-A). Además, dichas NP_a se encuentran adheridas de forma aislada (no se detectaron aglomerados) y se distribuyen en forma homogénea sobre toda la superficie de Ti-MPN-PG (Figura 7.2-A y B). Por lo tanto, la presencia de la película de MPN-PG desarrollada sobre Ti aumenta considerablemente la capacidad de inmovilizar NP_aAgAG sobre su superficie.

Por otra parte, se evaluó si la inmovilización de las NP_aAgAG era estable sobre las muestras de Ti-MPN-PG sumergiendo el sistema Ti-MPN-PG+NP_aAgAG en PBS por 24 h y volviendo luego a tomar imágenes AFM para observar posibles cambios. Se comprobó, en imágenes a distintas escalas, que la adhesión de las NP_aAgAG se mantiene luego de 24 h de inmersión en PBS (Figuras 7.2-C y D, respectivamente). Estos resultados indican que la inmovilización de las NP_aAgAG sobre muestras de Ti-MPN-PG es fuerte y estable. También se tomaron espectros UV-visible de las soluciones de PBS luego de 24 h de inmersión de las muestras de Ti-MPN-PG+NP_aAgAG (resultados no mostrados) y no se encontró señal o máximo de absorbancia correspondiente a las NP_aAgAG, reforzando la idea que la adhesión de las NP_aAgAG sobre Ti-MPN-PG es estable y que estas NP_a no se desprenden de la superficie en las condiciones ensayadas.

En las imágenes AFM de 1,7x1,7 μm^2 (Figura 7.2-B) se observa que las NP_aAgAG se encuentran inmovilizadas sobre la superficie de Ti-MPN-PG en forma aislada, dejando espacios libres de NP_a sobre la MPN. Además, a esta escala se pudo medir el tamaño de las NP_aAgAG inmovilizadas sobre Ti-MPN-PG a través de los perfiles presentados en la Figura 7.2-E. Los valores de altura se corresponden con los tamaños de las NP_a medidos mediante DLS y TEM, indicando que las NP_aAgAG son cuasi esféricas, donde los tamaños de las NP_a halladas sobre Ti-MPN-PG se encuentran entre 18 y 45 nm, acorde a la polidispersidad de estas NP_a.

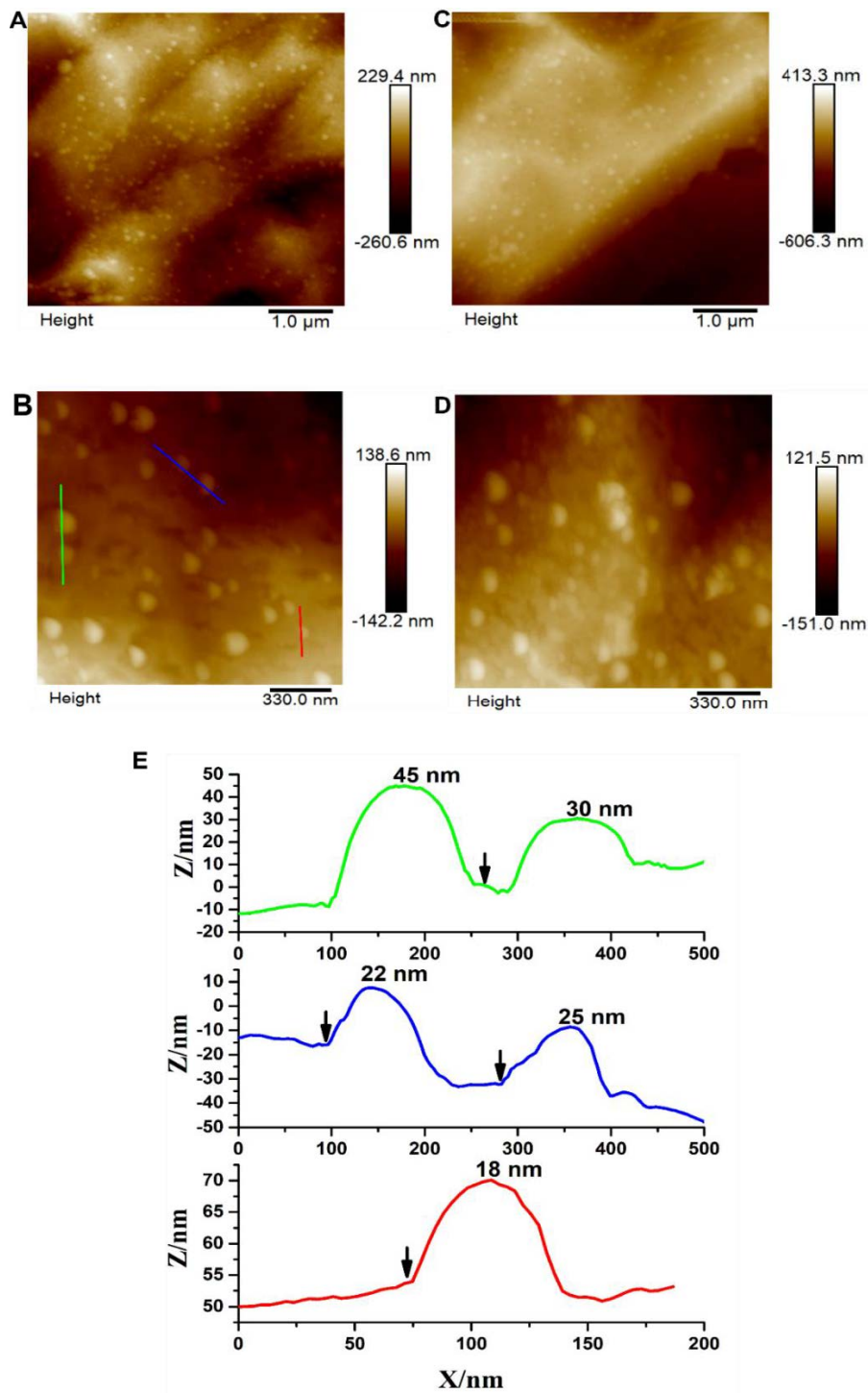


Figura 7.2. Imágenes AFM para las muestras en distintas escalas para Ti-MPN-PG+NPaAgAG:

A) ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$), B) ($1,7 \times 1,7 \mu\text{m}^2$); y para Ti-MPN-PG+NPaAgAG tras 24 h en PBS: C) ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$), D) ($1,7 \times 1,7 \mu\text{m}^2$). E) Perfiles verde, azul y rojo de las NPaAgAG señaladas con flechas de los respectivos colores en la imagen B. Las flechas negras indican el punto de referencia para el valor de la altura indicada en cada perfil.

Inmovilización de NP_aAgTV sobre Ti-MPN-PG (Ti-MPN-PG+NP_aAgTV):

En el caso de las NP_aAgTV se observó que las mismas se depositan recubriendo toda la superficie de Ti-MPN-PG y en mayor proporción que las NP_aAgAG, (Figura 7.3-A). El caso de las NP_aAgTV adheridas se detecta gran superposición lo cual dificulta su individualización de forma precisa, a diferencia de lo observado para el caso de Ti-MPN-PG+NP_aAgAG (Figura 7.2-B). Estos resultados indican una mayor afinidad entre la superficie de Ti-MPN-PG y las NP_aAgTV y sugieren que las NP_a se depositan unas sobre las otras. Luego de 24 h de inmersión de las muestras Ti-MPN-PG+NP_aAgTV en PBS se constató que no hay cambios en la topografía ni en el grado de adhesión de las NP_aAgTV (Figura 7.3-C y D), lo cual confirma que la unión de estas NP_a sobre la superficie de Ti-MPN-PG es estable.

A diferencias de las muestras de Ti-MPN-PG+NP_aAgAG, sobre la superficie de Ti-MPN-PG no se observan espacios libres de NP_aAgTV en escalas de análisis de 1,7x1,7 μm^2 , indicando que las NP_aAgTV tapizan toda la superficie de estudio (Figura 7.3-B y D). En el perfil topográfico tomado se encontraron NP_aAgTV de 10 a 25 nm (Figura 7.3-E), acorde al histograma de la distribución de frecuencias de tamaño para estas NP_a (ver Figura 6.12) También es importante mencionar que, aun en la escala 1,7x1,7 μm^2 , es difícil individualizar las NP_aAgTV (especialmente las de tamaños inferiores a 10 nm) por la gran cantidad de NP_a que tapizan la superficie de Ti-MPN-PG.

Todos estos resultados sugieren que las NP_aAgTV presentan mayor afinidad que las NP_aAgAG para adherirse sobre Ti-MPN-PG. Esta mayor afinidad podría deberse a los componentes del *capping* de las NP_aAgTV ya que el mismo presentó señales de diferentes FF (catequinas y taninos) que componen el ExTV, mientras que las NP_aAgAG solo presentan señales del AG. De forma que las NP_aAgTV podrían interactuar con la Ti-MPN-PG a través de los diversos grupos funcionales de los FF, mientras que las NP_aAgAG solo podrían interactuar a través de grupos $-\text{COO}^-$ y grupos $-\text{OH}$ del AG. Por otra parte, diversos autores han reportado que *cappings* de diferentes NP_a desarrolladas con extractos de polifenoles, con presencia de ECGC y TA, tienen efectos adhesivos tanto para unirse entre ellas como a diferentes sustratos [84,333] lo cual, considerando la variedad de componentes del ExTV, podría explicar la gran adherencia de las NP_aAgTV sobre Ti-MPN-PG.

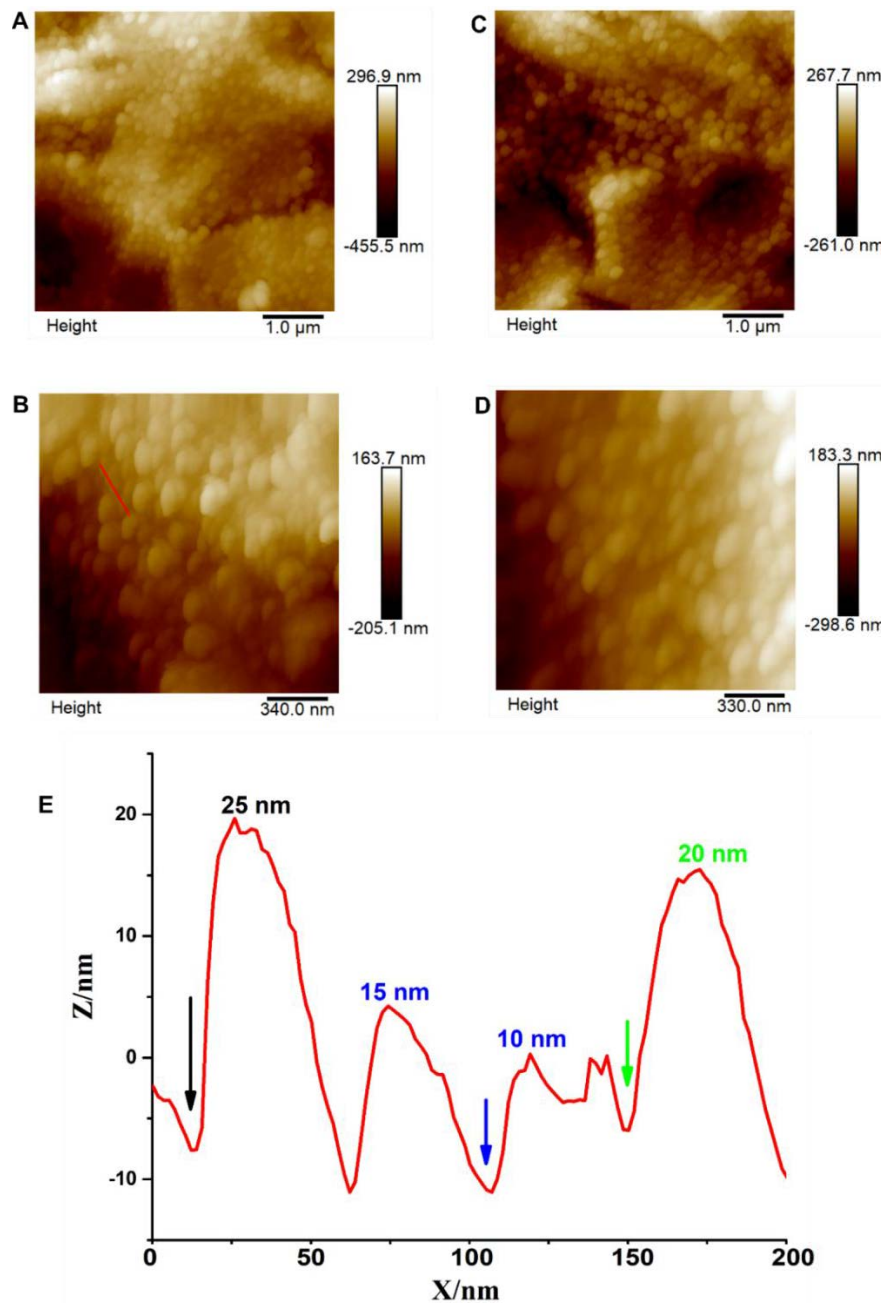


Figura 7.3. Imágenes AFM en diferentes escalas para las muestras Ti-MPN-PG+NPaAgTV: A) ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$), B) ($1,7 \times 1,7 \mu\text{m}^2$), y para Ti-MPN-PG+NPaAgTV tras 24 h en PBS: C) ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$), D) ($1,7 \times 1,7 \mu\text{m}^2$). E) Perfil de las NPaAgTV señaladas línea roja en B. Las flechas de colores negro, azul y verde indican el punto de referencia para cada medida reportada en los picos acorde a cada color.

Finalmente, la inmovilización de las NPaAgAG y NPaAgTV sobre la superficie de Ti-MPN-PG también pudo ser detectada por cambios en los parámetros de rugosidad R_a , R_q y R_{max} (Tabla 7.1). En presencia de las NPa, el valor de dichos parámetros aumenta

considerablemente respecto a la superficie Ti-MPN-PG, siendo mayor el efecto para las NPaAgTV.

Tabla 7.1. Parámetros de rugosidad obtenidos de imágenes AFM de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$. Los datos correspondientes a Ti-MPN-PG provienen de la Tabla 5.2 del Capítulo 5.

Parámetros	Ti-MPN-PG	Ti-MPN-PG+NPaAgAG	Ti-MPN-PG+NPaAgTV
R_a (nm)	22 ± 4	39 ± 4 *	50 ± 6 * <i>a</i>
R_q (nm)	30 ± 5	48 ± 5 *	72 ± 5 *, <i>a</i>
R_{max} (nm)	150 ± 20	160 ± 20 *	180 ± 20 *, <i>a</i>

* indica diferencias significativas con Ti-MPN-PG y *a* indica diferencias entre Ti-MPN-PG+NPaAgTV y Ti-MPN-PG+NPaAgAG ($p < 0,01$).

Inmovilización de NPaAgAG sobre Ti-MPN-AG (Ti-MPN-AG+NPaAgAG):

Las NPaAgAG también se depositaron sobre superficies de Ti-MPN-AG (Ti-MPN-AG+NPaAgAG). Como puede observarse en las Figuras 7.4-A y B dichas NPa se adhieren sobre Ti-MPN-AG, principalmente formando grandes aglomerados aislados sobre su superficie (flechas turquesas Figura 7.4-A) y con pocas NPa aisladas (flecha fucsia); a diferencia de las muestras de Ti-MPN-PG donde se observó gran adhesión de estas NPa y de forma aislada.

En imágenes de $1,7 \times 1,7 \mu\text{m}^2$ se pudo medir el tamaño de las NPaAgAG solitarias y usando los perfiles topográficos se determinó el tamaño de los aglomerados (Figura 7.4-E). Las pocas NPa individuales visibles presentaron tamaños aproximados de 20 nm (flecha verde en Figura 7.4-B y perfil verde en 7.4-E), acorde al diámetro promedio calculado por TEM. Mientras que los aglomerados formados durante la inmovilización de las NPaAgAG alcanzaron alturas variables desde 60 a 100 nm (línea roja en Figura 7.4-B y perfil rojo en 7.4-E).

Luego de 24 h de inmersión en soluciones de PBS, se detectó una disminución de la cantidad de NPaAgAG depositadas sobre Ti-MPN-AG (Figura 7.4-C y D). Se calculó el área cubierta por NPa con el software Image ProPlus en las imágenes A, B, C y D de la Figura 7.4 y dicho cálculo reveló que luego de 24 h en PBS el área cubierta por NPa disminuye ~20% en imágenes de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ (Figuras 7.4-A y C) y un ~ 35% en imágenes de $1,7 \times 1,7 \mu\text{m}^2$ (Figuras 7.4-B y D). También se tomaron espectros UV-visible de las soluciones de PBS y se reveló la presencia de las NPaAgAG por la aparición de una banda

de plasmones a 400 nm (Figura 7.5). Estos resultados sugieren que la unión entre las NPaAgAG y la superficie de muestras de Ti-MPN-AG es débil y conduce a la liberación de NPaAgAG desde la superficie al medio.

Los cambios en los parámetros de rugosidad, resumidos en la Tabla 7.2, también permitieron detectar la presencia de las NPaAgAG sobre Ti-MPN-AG. Como se puede notar, en presencia de las NPa los parámetros de las muestras de Ti-MPN-AG+NPaAgAG aumentan en comparación a las muestras sin NPa (Ti-MPN-AG). Por otra parte, el desprendimiento de las NPaAgAG también se ve reflejado en el cambio de los parámetros de rugosidad de las muestras de Ti-MPN-AG+NPaAgAG que disminuyeron después de la inmersión en PBS.

Todos estos resultados sugieren que las NPaAgAG presentan menor afinidad para adherirse sobre las superficies de muestras de Ti-MPN-AG, en comparación a la observada en el caso de las superficies de Ti-MPN-PG.

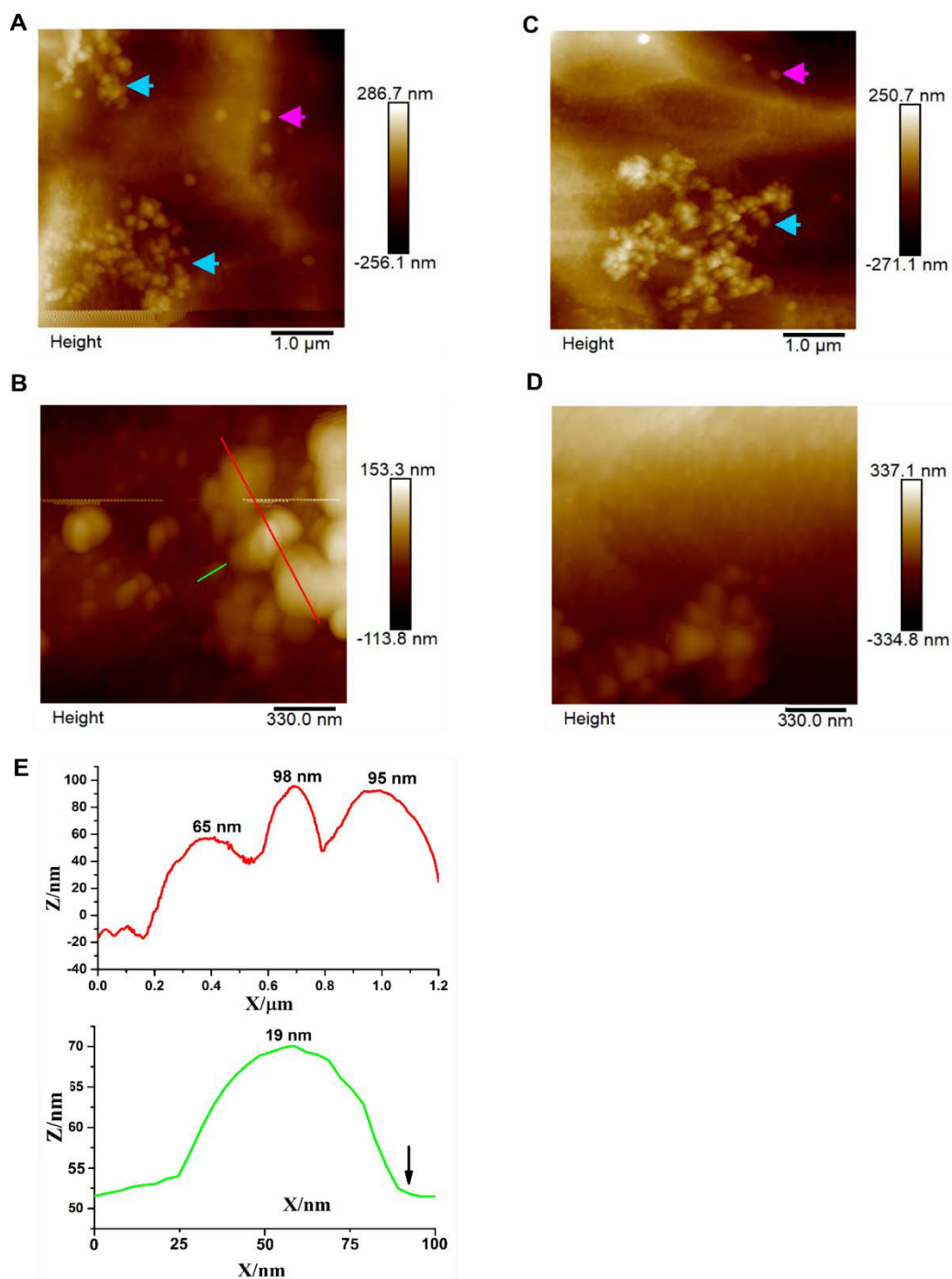


Figura 7.4. Imágenes AFM de las muestras Ti-MPN-AG+NPaAgAG: A) ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) y B) ($1,7 \times 1,7 \mu\text{m}^2$) donde las flechas turquesas señalan aglomerados y las flechas fucsias NPa individuales; para Ti-MPN-AG+NPaAgAG tras 24 h en PBS: C) ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$), D) ($1,7 \times 1,7 \mu\text{m}^2$). E) Perfiles de las NPaAgAG señaladas con flecha verde (NPaAgAG solitaria) y barra roja (aglomerado) en B según el color indicado. Las flechas negras indican el punto de referencia para cada medida indicada en el pico correspondiente

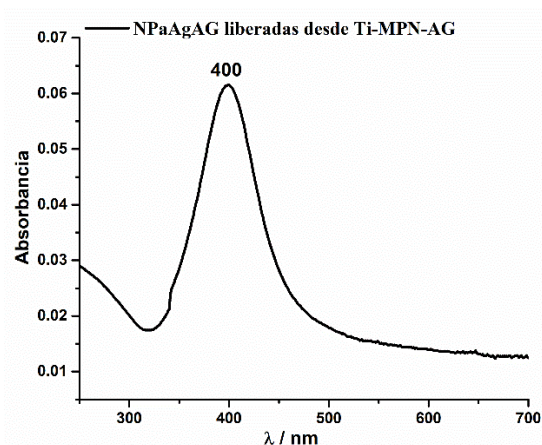


Figura 7.5. Liberación de NPaAgAG desde superficies de Ti-MPN-AG detectada por espectroscopía UV-Visible.

Inmovilización de NPaAgTV sobre Ti-MPN-AG (Ti-MPN-AG+NPaAgTV):

Se pudo observar que la adhesión sobre la superficie de Ti-MPN-AG de las NPaAgTV es mayor que las NPaAgAG, pero menor que la observada para las superficies de Ti-MPN-PG (Figura 7.6-A). Luego de 24 h de inmersión en PBS, se detectó una pérdida drástica de la cantidad de NPaAgTV adheridas sobre Ti-MPN-AG (Figura 7.6-B y C). Con fines comparativos se calcularon los porcentajes de área cubierta por NPaAgTV antes y después de la inmersión en PBS y se determinó que las muestras de Ti-MPN-AG+NPaAgTV disminuyen dicha área en aproximadamente un 80% respecto a las muestras no sumergidas en dicho medio. Paralelamente, se detectó la presencia de NPaAgTV en las soluciones de PBS por la aparición de una banda a 418 nm determinada por espectroscopía UV-visible (Figura 7.7). Todos estos resultados indican una pobre estabilidad en la unión entre las NPaAgTV y Ti-MPN-AG, a diferencia de los resultados obtenidos para estas mismas NPa sobre superficies de Ti-MPN-PG.

Tal como se evaluó previamente para otros sistemas, la adhesión de las NPaAgTV pudo revelarse también por cambios en los parámetros de rugosidad (Tabla 7.2). Se observó que la rugosidad de las muestras de Ti-MPN-AG+NPaAgTV aumenta en relación con Ti-MPN-AG indicando la presencia de las NPa sobre la superficie. Sin embargo, tras 24 h de inmersión en PBS los parámetros de rugosidad de las muestras de Ti-MPN-AG+NPaAgTV disminuyen, alcanzando valores similares a Ti-MPN-AG. En concordancia con los resultados descritos previamente estos datos sugieren también que las NPaAgTV se desprenden luego de la inmersión en PBS, reforzando la idea de que la estabilidad de unión de estas NPa sobre superficies de Ti-MPN-AG es baja.

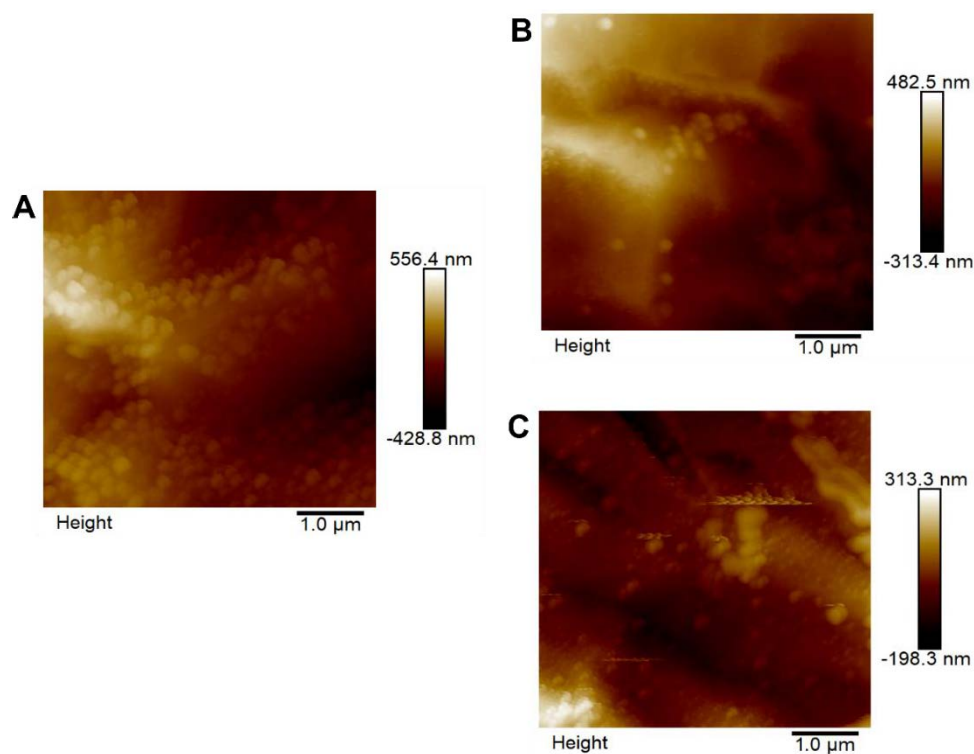


Figura 7.6. Imágenes AFM correspondientes a: A) muestras Ti-MPN-AG+NPaAgTV ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) y B) y C) Ti-MPN-AG+NPaAgTV tras 24 h en PBS ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$).

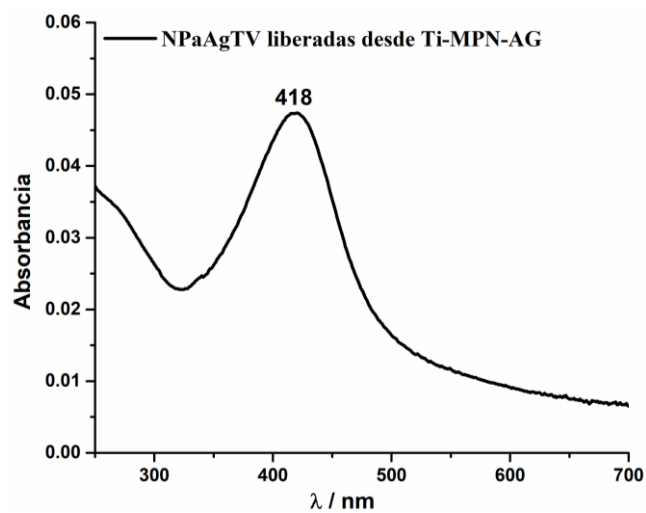


Figura 7.7. Liberación de NPaAgTV desde superficies de Ti-MPN-AG detectadas por espectroscopía UV-Visible.

Tabla 7.2. Parámetros de rugosidad obtenidos en imágenes AFM de 5x5 μm^2 . Los datos para Ti-MPN-AG provienen de la Tabla 5.2 del Capítulo 5.

Parámetros	Ti-MPN-AG	Ti-MPN-AG +NPAGAG	Ti-MPN-AG +NPAGAG en PBS	Ti-MPN-AG +NPAGTV	Ti-MPN-AG +NPAGTV en PBS
R_a (nm)	29 ± 6	60 ± 10*	40 ± 7	65 ± 9*	35 ± 5 <i>a</i>
R_q (nm)	40 ± 5	80 ± 10*	60 ± 8*	80 ± 10*	50 ± 10* <i>a</i>
R_{max} (nm)	180 ± 20	300 ± 30*	240 ± 30*	310 ± 30 *	210 ± 30 <i>a</i>

* indica diferencias significativas con Ti-MPN-AG y *a* indica diferencias entre Ti-MPN-AG+NPAGTV y Ti-MPN-AG+NPAGAG ($p < 0,01$).

Todos los resultados presentados indican que las NPAGAG y NPAGTV presentan una menor afinidad para adherirse sobre superficies de Ti-MPN-AG y que la unión es más lábil que la correspondiente a la inmovilización de ambas NPA sobre superficies de Ti-MPN-PG. Estas diferencias podrían deberse a repulsiones electrostáticas, ya que en el Capítulo 5 se demostró por espectros ATR-FTIR que las superficies de Ti-MPN-AG presentan señales del grupo COO^- , al igual que el *capping* de las NPAGAG y NPAGTV (espectros FTIR del Capítulo 6). De forma que es probable que la presencia de grupos COO^- tanto en las NPA como en superficies de Ti-MPN-AG produzcan dichas repulsiones que no permitan una unión estable entre ambas [334]. En el caso de las superficies de Ti-MPN-PG, este grupo no se encuentra presente debido a que el PG no presenta grupo carboxilo. De esta forma, la presencia de grupos COO^- solo en el *capping* de las NPAGAG y NPAGTV favorecería una unión estable y fuerte sobre muestras de Ti-MPN-PG, como ha sido informado por otros autores para NPAAG citratadas y adsorbidas sobre superficies modificadas de Ti [48,49,332].

7.3.1.2 Determinación del ángulo de contacto

En el Capítulo 5 se determinó que la presencia de las MPN de PG y AG cambia drásticamente el ángulo de contacto del Ti, reduciéndolo en 30° y 20° respectivamente. Estos resultados indican que las MPN vuelven más hidrofílicas las superficies de Ti. Para evaluar si la adhesión de NPAGAG o NPAGTV presenta cambios en la hidrofílicidad de las superficies de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG se determinó el ángulo de contacto para

estas muestras. Además, a modo de comparación, también se evaluó el ángulo de contacto para muestras de Ti control con NPa (Ti+NPaAgAG y Ti+NPaAgTV). Todos los resultados se muestran en la Figura 7.8.

En primer lugar, puede notarse que la adhesión de las NPaAgAG y NPaAgTV no cambian el ángulo de contacto en las muestras Ti+NPaAgAG y Ti+NPaAgTV en comparación al Ti control sin NPa. Las medidas realizadas con las muestras de Ti-MPN-PG revelaron que, en presencia de las NPaAgAG, el ángulo de contacto baja levemente, mientras que para las NPaAgTV el ángulo decrece significativamente a valores cercanos a 29° (casi 10° menos que Ti-MPN-PG). Por lo tanto, en presencia de NPaAgTV las superficies de Ti-MPN-PG se vuelven ligeramente más hidrofílicas. El descenso del ángulo de contacto también fue reportado para superficies de Ti modificadas con lactoferrina o con lactoferrina+NPaAg de 15 nm donde se observó que el mismo disminuye en aproximadamente 23° y 44°, respectivamente [49]. Además, similar comportamiento se demostró para superficies de Ti funcionalizadas con polilisina y polilisina+NPaAg [51]. Asimismo, Hajdu *et al.* [335] depositaron NPaAg de 60, 96, 149 y 368 nm sobre superficies de Ti grado II y demostraron que el tamaño de las NPa influye en el ángulo de contacto resultante: a menor tamaño de NPa menor ángulo de contacto y, por lo tanto, mayor hidrofiliidad de la superficie. De esta forma, sería posible atribuir la diferencia en el ángulo de contacto determinado para Ti-MPN-PG+NPaAgTV y Ti-MPN-PG+NPaAgAG al menor tamaño de las NPaAgTV.

Además, como se detalló en el Capítulo 5, y en concordancia con resultados previos, la exposición de grupos -OH del AG sobre la superficie de materiales de Ti aumenta la hidrofiliidad de la superficie (determinada por ángulo de contacto) debido a que los grupos -OH expuestos pueden interactuar con las moléculas de agua del medio [233]. Esto también fue sugerido para recubrimientos en Ti con extractos fenólicos de uva [248]. De esta forma, la disminución del ángulo de contacto en las muestras Ti-MPN-PG+NPaAgTV y Ti-MPN-PG+NPaAgAG también podría deberse al aumento de la rugosidad producida por la presencia de las NPa (ya que en dichas muestras aumentan los valores de R_a en comparación a Ti-MPN-PG) y también podría relacionarse con la presencia en superficie de grupos -OH provenientes de la MPN y del *capping* de las NPaAg (cuya presencia se ha demostrado por espectroscopia ATR-FTIR en los Capítulos 5 y 6).

Finalmente, en el caso de las muestras de Ti-MPN-AG el ángulo de contacto no se ve modificado en presencia de ninguna de las NPaAg. Estos resultados indican que la adhesión de las NPa no modifica la hidrofiliicidad de las superficies de Ti-MPN-AG, lo cual es coherente con los resultados de AFM donde se comprobó que las NPaAg sintetizadas por NEC se adhieren en pequeña proporción, de forma lábil y que se desprenden de la superficie.

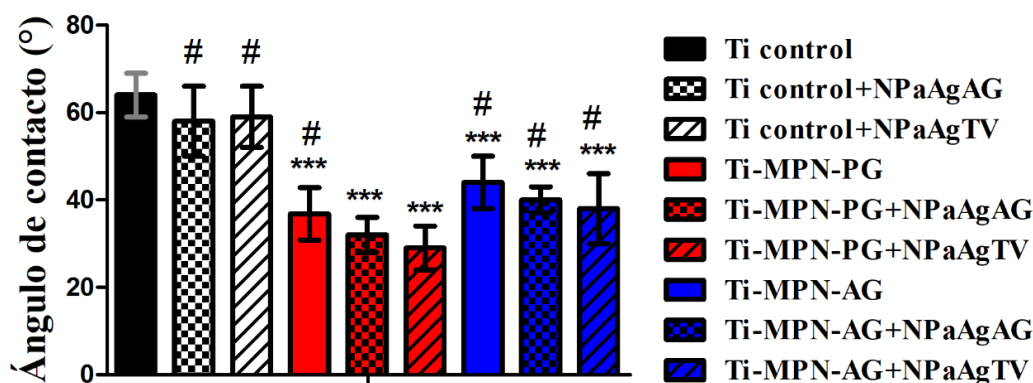


Figura 7.8. Determinación del ángulo de contacto para las superficies funcionalizadas con NPaAgAG y NPaAgTV. *** indica diferencias significativas con el control correspondiente y # indica diferencias significativas con las muestras de Ti-MPN-PG+NPaAgTV ($p < 0,01$).

7.3.2 Actividad antimicrobiana de las superficies de Ti funcionalizadas con NPaAg

La actividad antimicrobiana de las superficies de Ti modificadas con MPN y con NPaAg se determinó por ensayos a 3 y 24 h de incubación con *S. aureus* en medio GMP (ver protocolos Capítulo 3.3.5).

Luego de 3 h de incubación, las muestras presentaron valores similares de UFCs/cm² correspondientes a las bacterias adheridas en Ti control sin NPaAg y con NPaAg (Ti+NPaAgAG y Ti+NPaAgTV), lo cual indica que no hay efecto antimicrobiano en las superficies control debido a la escasa cantidad de NPaAg adheridas sobre su superficie (Figura 7.9). En el caso de los sistemas que incluyen MPN (Ti-MPN-PG+NPaAgAG, Ti-MPN-PG+NPaAgTV, Ti-MPN-AG+NPaAgAG y Ti-MPN-AG+NPaAgTV) se observa una leve reducción de microorganismos de 1 orden de magnitud en relación con los controles de Ti con y sin NPaAgAG o NPaAgTV. Estos resultados indican que las NPaAg depositadas sobre las superficies de Ti-MPN-PG y Ti-

MPN-AG disminuyen ligeramente la adhesión inicial de las bacterias sobre dichas superficies, pero las diferencias no son estadísticamente significativas.

Sin embargo, tras 24 h de incubación (evaluación de *biofilms* tempranos) las diferentes NPa inmovilizadas sobre Ti-MPN-PG ejercen una importante actividad biocida e inhiben parcialmente la formación de *biofilms* de *S. aureus*, mientras que las NPa adheridas sobre Ti-MPN-AG no presentan acción antibiofilm. En la Figura 7.10 puede observarse que las muestras de Ti-MPN-PG+NPaAgAG reducen en 3 órdenes de magnitud las UFCs/cm² en comparación al Ti control y Ti-MPN-PG, por lo tanto, dicha superficie presenta actividad bactericida contra *S. aureus*. Además, las NPaAgAG tienen un efecto antimicrobiano sinérgico con la Ti-MPN-PG. Como se mencionó en el Capítulo 5, las superficies de Ti-MPN-PG tienen efecto antibiofilm y reduce la cantidad de EPS producido, exponiendo entonces a las bacterias adheridas menos protegidas a la acción de agentes antimicrobianos, en este caso, a las NPaAgAG. Este efecto bactericida sinérgico en las superficies de Ti-MPN-PG+NPaAgTV es mayor que el de las muestras Ti-MPN-PG+NPaAgAG, ya que reduce en 4 órdenes de magnitud el número de UFCs/cm² respecto con el Ti control (Figura 7.10 barras rojas). Estos resultados son coherentes con las imágenes AFM, ya que se observó que, sobre Ti-MPN-PG+NPaAgTV, la adhesión de NPa es mayor en comparación a las muestras de Ti-MPN-PG+NPaAgAG. Por lo tanto, se puede concluir que ambas NPaAg presentan efectos bactericidas sinérgicos con Ti-MPN-PG suficientes para prevenir y combatir la formación de *biofilms* tempranos de *S. aureus* sobre Ti, siendo los efectos más importantes en el caso de Ti-MPN-PG+NPaAgTV.

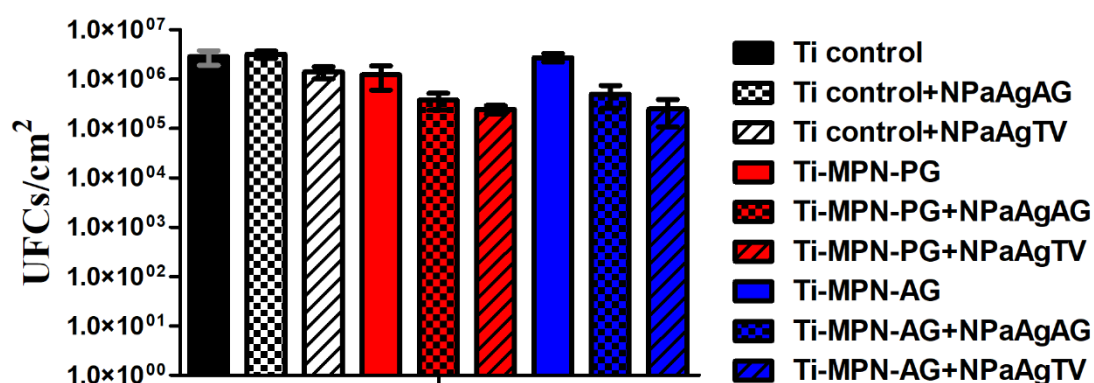


Figura 7.9. Colonización inicial de *S. aureus* (3 h de incubación en caldo nutritivo) sobre las diferentes superficies de Ti modificadas según se indica en la Figura. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

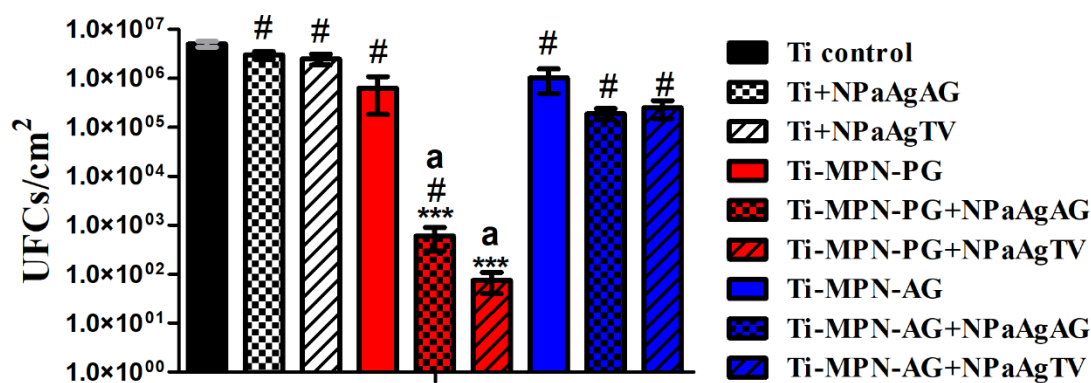


Figura 7.10. Efecto antimicrobiano sobre el desarrollo de *biofilms* tempranos (24 h de incubación en medio GMP) de *S. aureus* sobre las diferentes superficies de Ti modificadas según se indica en la figura. *** indica diferencias significativas con Ti control, a indica diferencias significativas con Ti-MPN-PG y # indica diferencias significativas con Ti-MPN-PG+NP aAgTV ($p < 0,01$).

En el caso de las muestras de Ti-MPN-AG+NP aAgAG y Ti-MPN-AG+NP aAgTV (Figura 7.10 barras azules) se observa que la cantidad de UFCs/cm² se reduce en 1 orden de magnitud en relación con las mismas muestras sin NPa y que la acción antimicrobiana de las diferentes NPa tras 24 h de incubación es similar a la obtenida inicialmente (a 3 h, Figura 7.9). Estos resultados están de acuerdo con lo observado por imágenes AFM donde se comprobó que las NP aAgAG y NP aAgTV se adhieren pobremente sobre la superficie de Ti-MPN-AG y se liberaban desde la superficie al medio por la labilidad de la unión. La relativamente baja cantidad de NPa sobre la superficie parece no ser suficiente para disminuir la viabilidad de las bacterias adheridas.

A partir de estos resultados, se puede concluir que las superficies Ti-MPN-PG+NP aAgAG y Ti-MPN-PG+NP aAgTV presentan una mayor actividad antimicrobiana debido a la estabilidad de la unión entre las MPN y las NP aAgAG y NP aAgTV. En cambio, en las muestras de Ti-MPN-AG la poca adhesión de las NP aAg y la falta de estabilidad en la unión de las NPa con la MPN-AG traen como consecuencia la falta de efectos antimicrobianos sinérgicos entre la MPN y las NP aAg adheridas. Además, como las NP aAg se desprenden y se liberan desde la superficie al medio, el efecto antibiofilm de las NPa se pierde y sólo se observa el efecto antiadherente de la superficie de Ti-MPN-AG que logra reducir un orden de magnitud la adhesión bacteriana tras 24 h de incubación, tal como se explicó en el Capítulo 5.

Debido a que las superficies de Ti-MPN-PG con NPaAgAG o NPaAgTV son las que presentan actividad bactericida, se evaluó además su efecto antibiofilm por tinción Live/Dead y Sypro Ruby para determinar el estado fisiológico de las bacterias adheridas y la producción de EPS, respectivamente.

En la Figura 7.11 pueden observarse las imágenes obtenidas luego de los ensayos de tinción Live/Dead a 3 y 24 h de cultivo con *S. aureus*. Por un lado, las muestras de Ti control presentaron una importante adhesión de bacterias vivas en forma individual después de 3 h (no se detectaron bacterias muertas). Luego de 24 h se observaron que las bacterias adheridas estaban vivas y, además, desarrollaron microcolonias bacterianas que indican que se ha formado un biofilm temprano sobre la superficie de Ti (Figura 7.11-A). Similares resultados se obtuvieron para las muestras de Ti control con NPaAgAG y NPaAgTV (imágenes no mostradas), en concordancia con los resultados de recuento en placa de viables donde el desarrollo de UFCs sobre estas superficies fue similar al Ti control (ver Tabla 7.4).

Las muestras de Ti-MPN-PG, en cambio, presentan efecto antibiofilm, es decir las bacterias adheridas en su superficie están vivas y aisladas (sin presencia de bacterias muertas), pero sin posibilidad de desarrollar colonias (Figura 7.11-B). Por otra parte, las muestras de Ti-MPN-PG+NPaAgAG también revelaron que las bacterias adheridas estaban en forma aislada, similar a Ti-MPN-PG (sin NPa), sin evidencias de desarrollo de biofilm temprano (Figura 7.11-C). Sin embargo, a diferencia de Ti-MPN-PG, se detectó que solo el 40% de las bacterias adheridas estaban vivas y el 60% muertas (Tabla 7.4), indicando que en presencia de las NPaAgAG hay efecto combinado (MPN-PG + NPaAgAG) ejerciendo acción antibiofilm y bactericida. Finalmente, cuando se utilizaron superficies con NPaAgTV (Ti-MPN-PG+NPaAgTV) se encontró un porcentaje de área cubierta por bacterias muertas cercano al 80% (Tabla 7.4), coincidente con la mayor reducción de UFCs/cm² determinada por el ensayo de recuento en placa de viables. Estos resultados evidencian que las NPaAgTV presentan mayor efecto bactericida que las NPaAgAG que podría atribuirse a dos motivos: la mayor adhesión de estas NPa sobre la superficie de Ti-MPN-PG (demostrado por imágenes AFM) y el menor tamaño de las NPaAgTV, con mayor relación superficie/volumen que permitiría mayor liberación de iones Ag⁺.

Por último, se evaluó la producción de EPS cuyos resultados se presentan en la Figura 7.12 y en la Tabla 7.5. En las muestras de Ti control, las bacterias adheridas producen gran cantidad de EPS para desarrollar el biofilm temprano (Figura 7.12-A). En el caso de Ti-MPN-PG, como se demostró anteriormente, las bacterias producen poco EPS, cercano al 35% con relación al Ti control, debido a las propiedades antibiofilm de dicha superficie. Con la adición de las NPaAgAG sobre Ti-MPN-PG, la producción del EPS desciende al 15% en relación con el Ti control y a la mitad comparado con las muestras de Ti-MPN-PG (sin NPa). Para el caso de las muestras con NPaAgTV se produce una reducción aun mayor del EPS en relación con el Ti control y con Ti-MPN-PG. Estos resultados confirman efectos sinérgicos entre la superficie de Ti-MPN-PG y las diferentes NPaAg que conducen a la reducción de la producción de EPS con la consecuente inhibición de la formación de *biofilms* sobre superficies de Ti.

Como se explicó en el Capítulo 5, las superficies de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG tienen pobre acción bactericida contra *S. aureus* posiblemente asociado a la escasa liberación de moléculas de PG y AG, ya que se ha demostrado que dichos FF en estado libre disrumen la membrana bacteriana de *S. aureus* provocando su muerte [267,268]. Sin embargo, conservan acción antibiofilm debido a que la presencia de AG y PG en la MPN podría intervenir en el *quorum sensing* provocando la reducción de la producción de EPS y del biofilm [262–265]. De esta forma, las superficies de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG al impedir la formación de EPS dejan más susceptibles a las bacterias para la acción antimicrobiana de otros agentes bactericidas. En este caso, nuestros resultados demuestran que las superficies de Ti-MPN-PG presentan acción sinérgica con las NPaAgAG y NPaAgTV permitiendo que estas ejerzan su acción antimicrobiana contra *S. aureus*. Efectos sinérgicos similares se han reportado para otros tipos de sistemas de MPN combinadas con NPaAg [209,331].

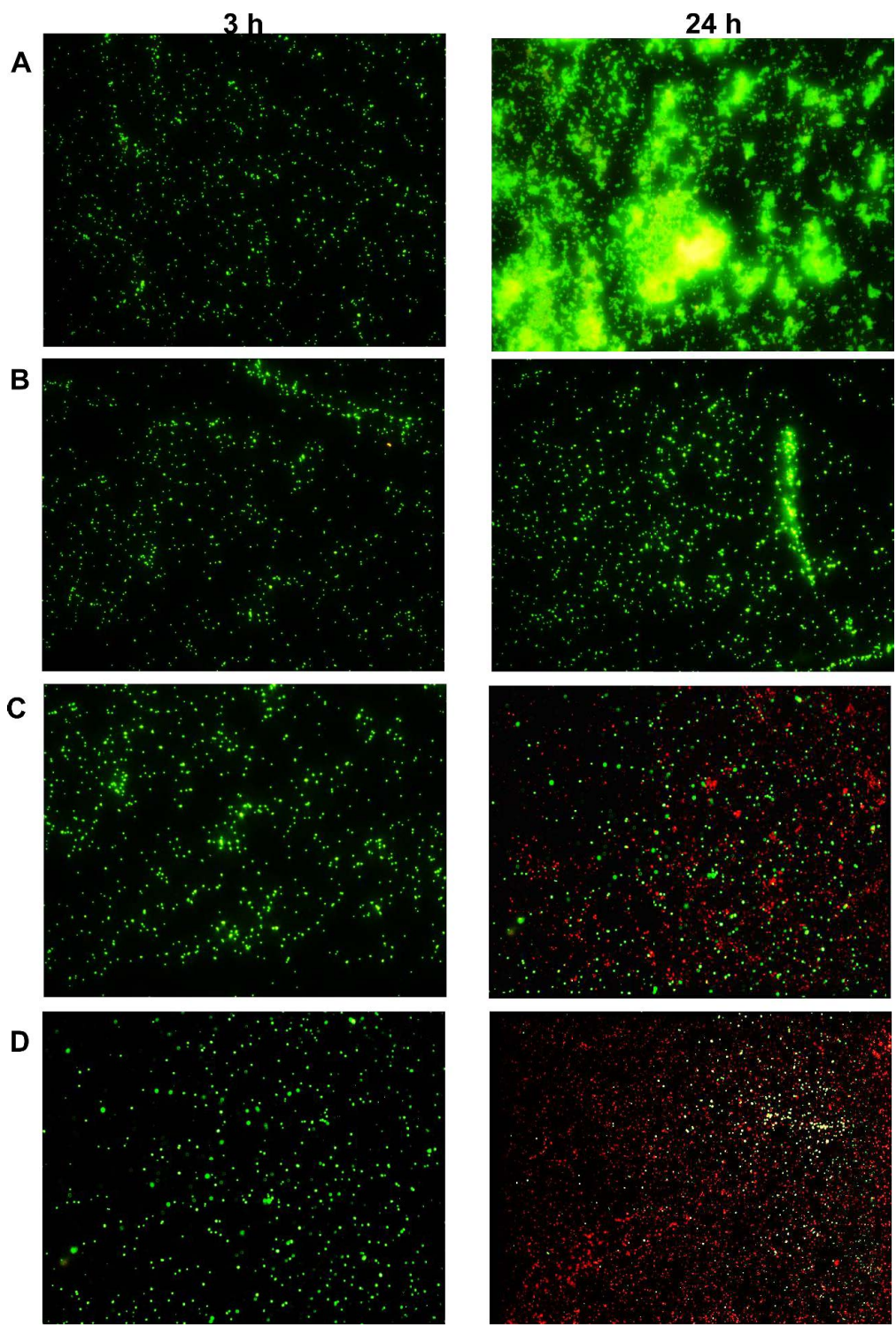


Figura 7.11. Tinción Live/Dead luego de 3 y 24 h de exposición a *S. aureus* de las muestras A) Ti control, B) Ti-MPN-PG, C) Ti-MPN-PG+NPaAgAG y D) Ti-MPN-PG+NPaAgTV.

Tabla 7.4. Determinación del área cubierta por bacterias vivas y/o muertas sobre cada superficie estudiada por tinción Live/Dead tras 3 y 24 h de incubación con *S. aureus*.

Muestras	3 h (%)		24 h (%)	
	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas
Ti control	100	-	100	-
Ti+NPaAgAG	100	-	100	-
Ti+NPaAgTV	100	-	100	-
Ti-MPN-PG	100	-	100	-
Ti-MPN-PG+NPaAgAG	100	-	40 ± 8***, ^a	60 ± 2
Ti-MPN-PG+NPaAgTV	100	-	20 ± 5***, ^a	80 ± 5

*** indica diferencias significativas con el Ti control y ^a indica diferencias significativas con Ti-MPN-PG (p<0,01).

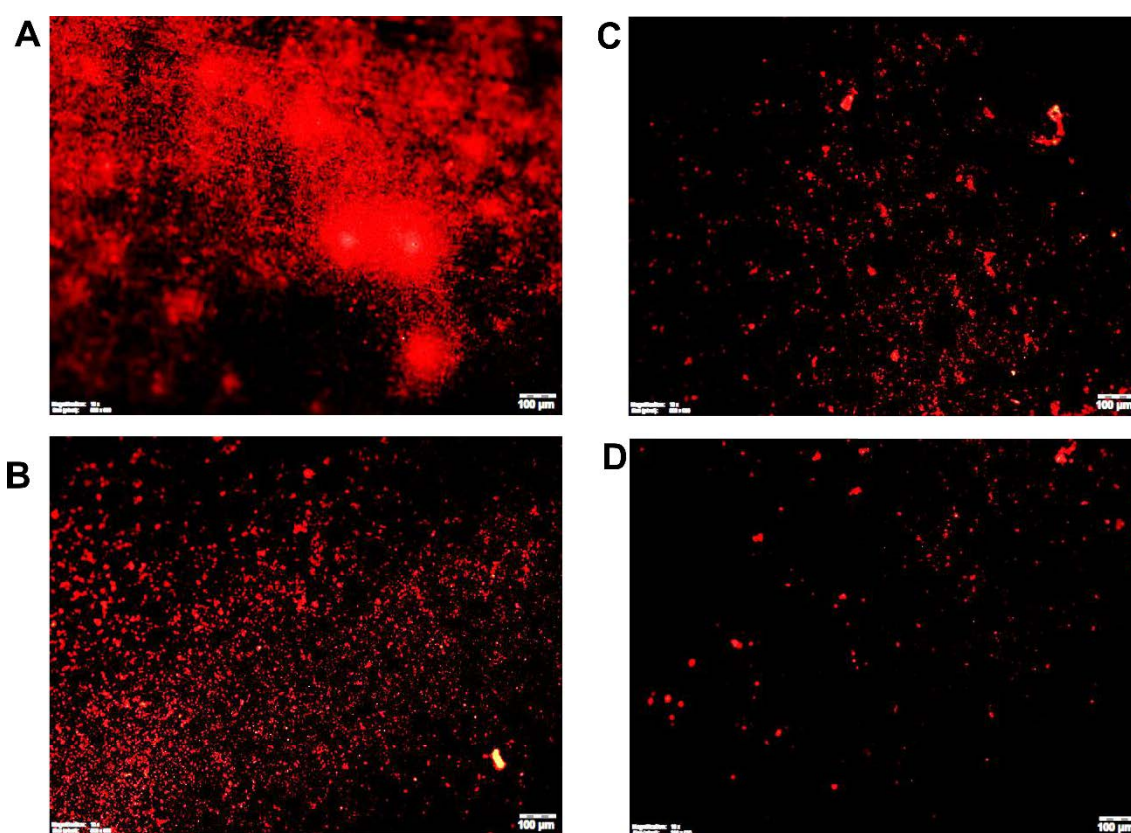


Figura 7.12. Tinción Sypro Ruby para la determinación de la producción de EPS tras 24 h de incubación con *S. aureus* sobre: A) Ti control, B) Ti-MPN-PG, C) Ti-MPN-PG+NPaAgAG y D) Ti-MPN-PG+NPaAgTV.

Tabla 7.5. Determinación de la producción de EPS tras 24 h de incubación en medio GMP con *S. aureus*. Los resultados se expresan como % respecto del valor del Ti control.

Muestras	EPS (%)
Ti control	100 ± 10
Ti-MPN-PG	35 ± 6 ***
Ti-MPN-PG+NPaAgAG	15 ± 4 ***
Ti-MPN-PG+NPaAgTV	8 ± 2 ***

. *** indica diferencias significativas con el Ti control ($p < 0,01$).

7.3.3 Análisis de la citocompatibilidad y actividad osteogénica de las superficies de Ti funcionalizadas con NPaAg

En el Capítulo 5 se demostró que las superficies de Ti-MPN-AG y Ti-MPN-PG incrementaban la citocompatibilidad con células pre-osteoblásticas y la producción de marcadores de actividad osteogénica, favoreciendo el proceso de oseointegración del Ti en condiciones *in vitro*. Esto podría vincularse al aumento de la hidrofiliidad de las superficies de Ti-MPN-AG y Ti-MPN-PG y también a la naturaleza química de las MPN, ya que se ha demostrado MPN de AG y TA presentan actividad osteogénica [247,249,250,253,254]. En esta sección, se evalúa si la presencia de las NPaAgAG o NPaAgTV produce cambios en la citocompatibilidad y actividad osteogénica de las superficies de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG.

En la Figura 7.13 se presentan los resultados de viabilidad celular a 7 días de incubación de las muestras con células fibroblásticas. Se observa un incremento en la adhesión celular en el tiempo sin diferencias significativas entre las muestras estudiadas en períodos iguales. Estos resultados indican que las MPN y las NPaAg no interfieren significativamente con la citocompatibilidad del Ti con células fibroblásticas.

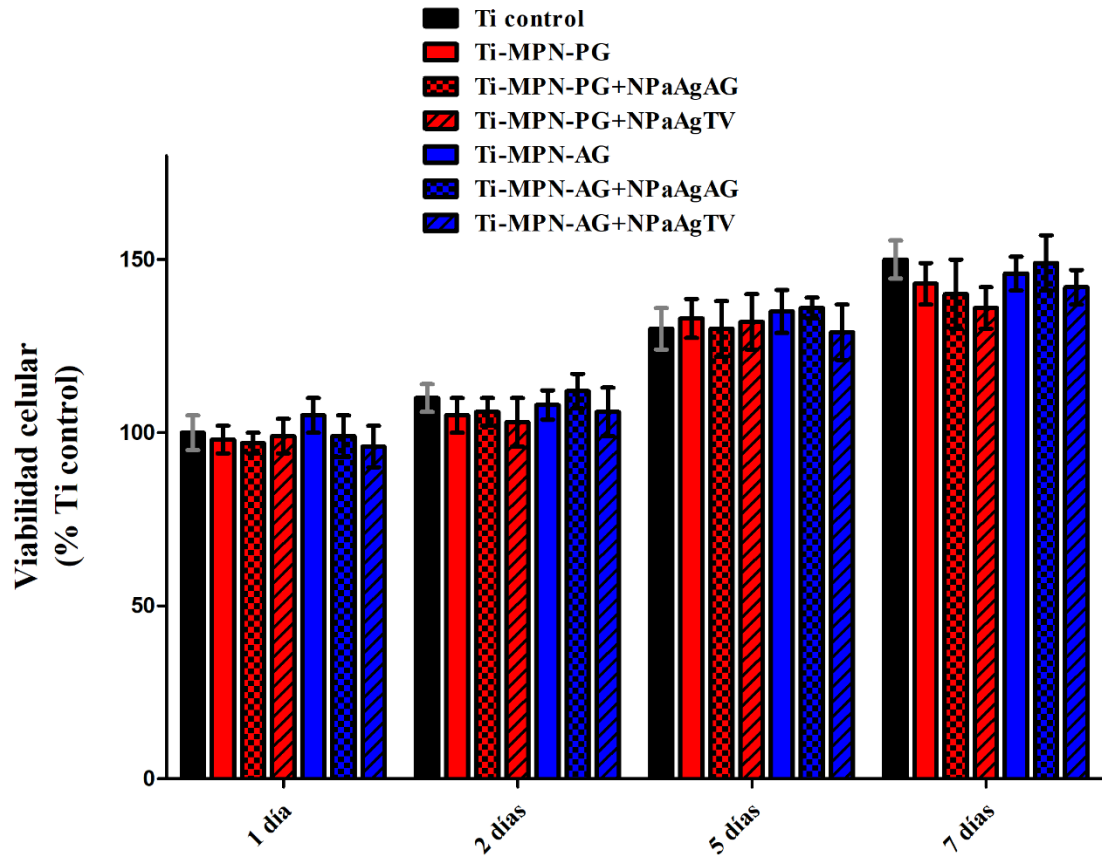


Figura 7.13. Viabilidad y proliferación celular de células fibroblásticas L929 adheridas sobre distintas superficies determinadas por tinción con naranja de acridina luego de 1 a 7 días de incubación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras.

Por lo contrario, las muestras de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG con ambas NP aAg incrementan la viabilidad de las células pre-osteoblásticas demostrando que las NP aAgAG y NP aAgTV (Figura 7.14 barras azules y rojas) no interfieren de forma significativa en el incremento de la citocompatibilidad observado para las superficies de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG. Por lo tanto, las NP aAg no presentan efectos citotóxicos en células fibroblásticas y pre-osteoblásticas que afecten la viabilidad celular. Resultados similares se han encontrado para NP aAg sintetizadas por vías tradicionales y depositadas sobre materiales de Ti [57,332,336].

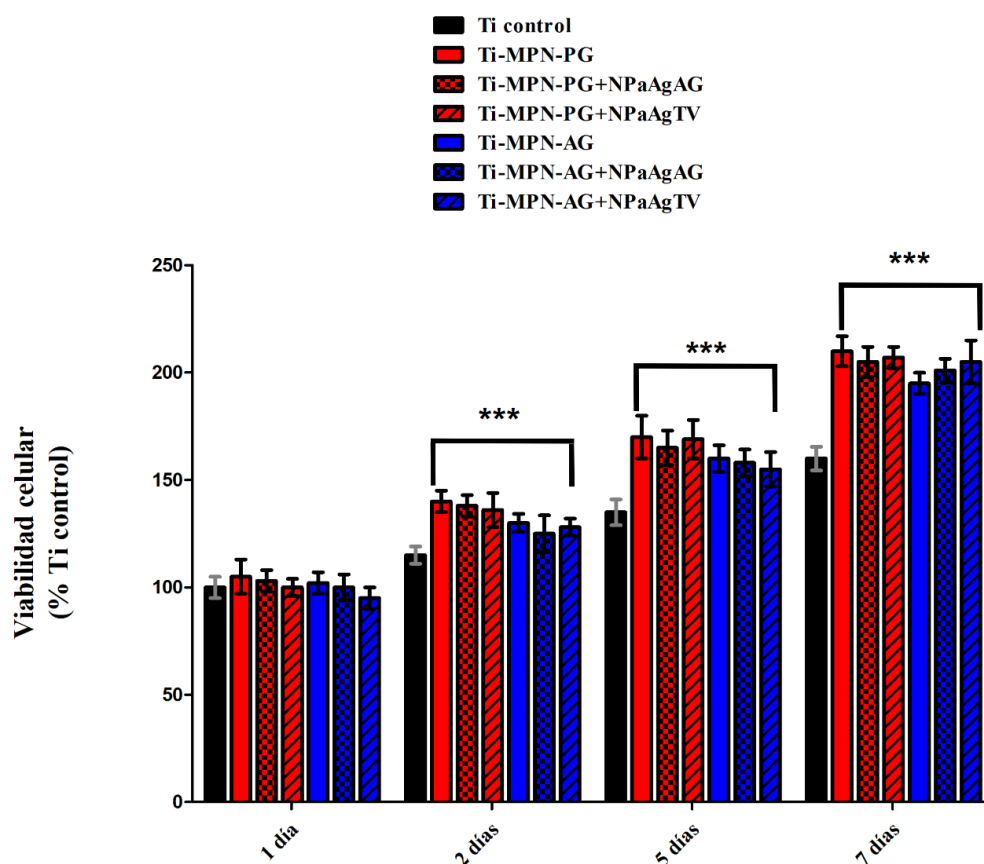


Figura 7.14. Viabilidad y proliferación celular de células pre-osteoblásticas MC3T3-E1 adheridas sobre distintas superficies, determinadas por tinción con naranja de acridina luego de 1, 2, 5 y 7 días de incubación. *** indica diferencias significativas con el Ti control ($p < 0,01$).

Para evaluar el efecto de las muestras de Ti-MPN-PG+NPaAgAG, Ti-MPN-PG+NPaAgTV, Ti-MPN-AG+NPaAgAG y Ti-MPN-AG+NPaAgTV sobre la diferenciación osteogénica, se incubaron dichas muestras por 15 y 21 días con células MC3T3-E1 en medio osteogénico. Luego de 15 días de incubación pudo observarse (Figura 7.15) que las superficies de Ti-MPN-PG+NPaAgAG, Ti-MPN-PG+NPaAgTV, Ti-MPN-AG+NPaAgAG y Ti-MPN-AG+NPaAgTV mantienen la producción de FAI en niveles similares a los revelados en las muestras de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG (duplicando los encontrados para Ti control), indicando que la presencia de las NPa no altera el incremento de la producción de FAI que, tal como se mostró en el Capítulo 5, se produce sobre las superficies de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG respecto del Ti control. Como se explicó en dicho Capítulo, los niveles de FAI alcanzados con Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG son similares a los niveles de producción de proteínas, lo cual indica que el incremento en la producción de FAI se debe al aumento y proliferación de células sobre dichas superficies.

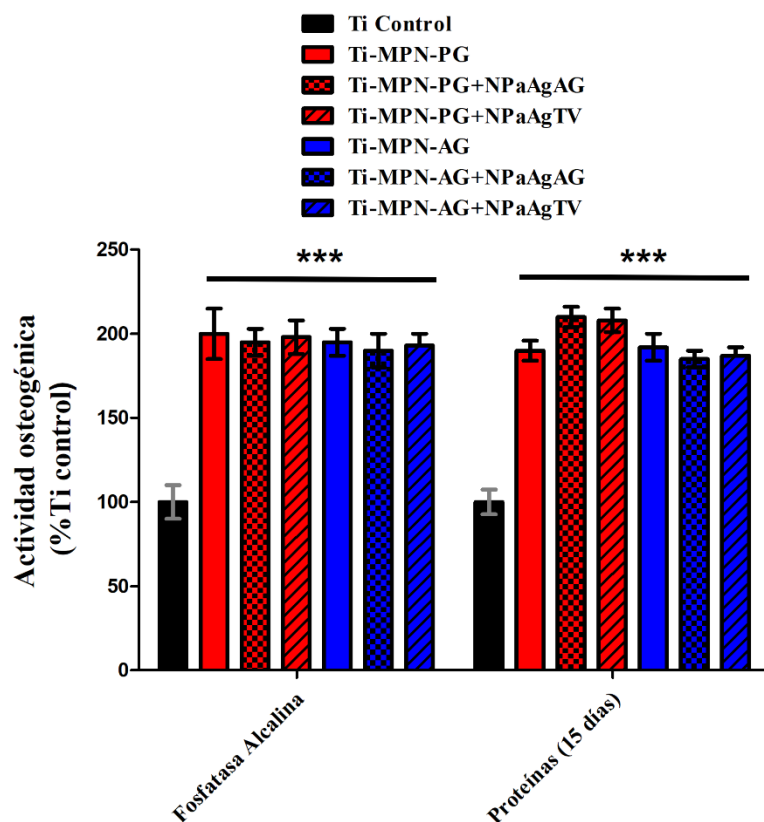


Figura 7.15. Determinación de la producción de fosfatasa alcalina (FAI) y proteínas tras 15 días de diferenciación de células pre-osteoblásticas MC3T3-E1 adheridas sobre distintas superficies.

*** indica diferencias significativas con el Ti control ($p < 0,01$).

Asimismo, tras 21 días de incubación, las muestras ensayadas presentaron similar producción de colágeno tipo I y de depósitos de calcio (Figura 7.16). En las muestras de Ti-MPN-PG+NPaAgAG y Ti-MPN-PG+NPaAgTV se observa una leve disminución en la producción de calcio y colágeno, pero que no llega a ser estadísticamente diferente a las muestras de Ti-MPN-PG (Figura 7.16, barras rojas). Nuevamente, el aumento en la producción de calcio y colágeno es acompañado por el mismo nivel de incremento en la cantidad de proteínas, por lo cual, el incremento de la actividad osteogénica corresponde al aumento de la proliferación de células sobre superficies de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG.

Todos los resultados presentados en esta Sección confirman que las NPaAg inmovilizadas sobre superficies de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG no alteran la citocompatibilidad ni la actividad osteogénica. En el caso particular de Ti-MPN-PG+NPaAgAG y Ti-MPN-PG+NPaAgTV se obtienen superficies multifuncionales, ya que por una parte presentan actividad bactericida contra *S. aureus*, reduciendo la

posibilidad de formación de biofilm sobre materiales de Ti y, por otra parte, incrementan la citocompatibilidad y la proliferación de osteoblastos con el consecuente incremento de la actividad osteogénica favoreciendo el proceso de oseointegración.

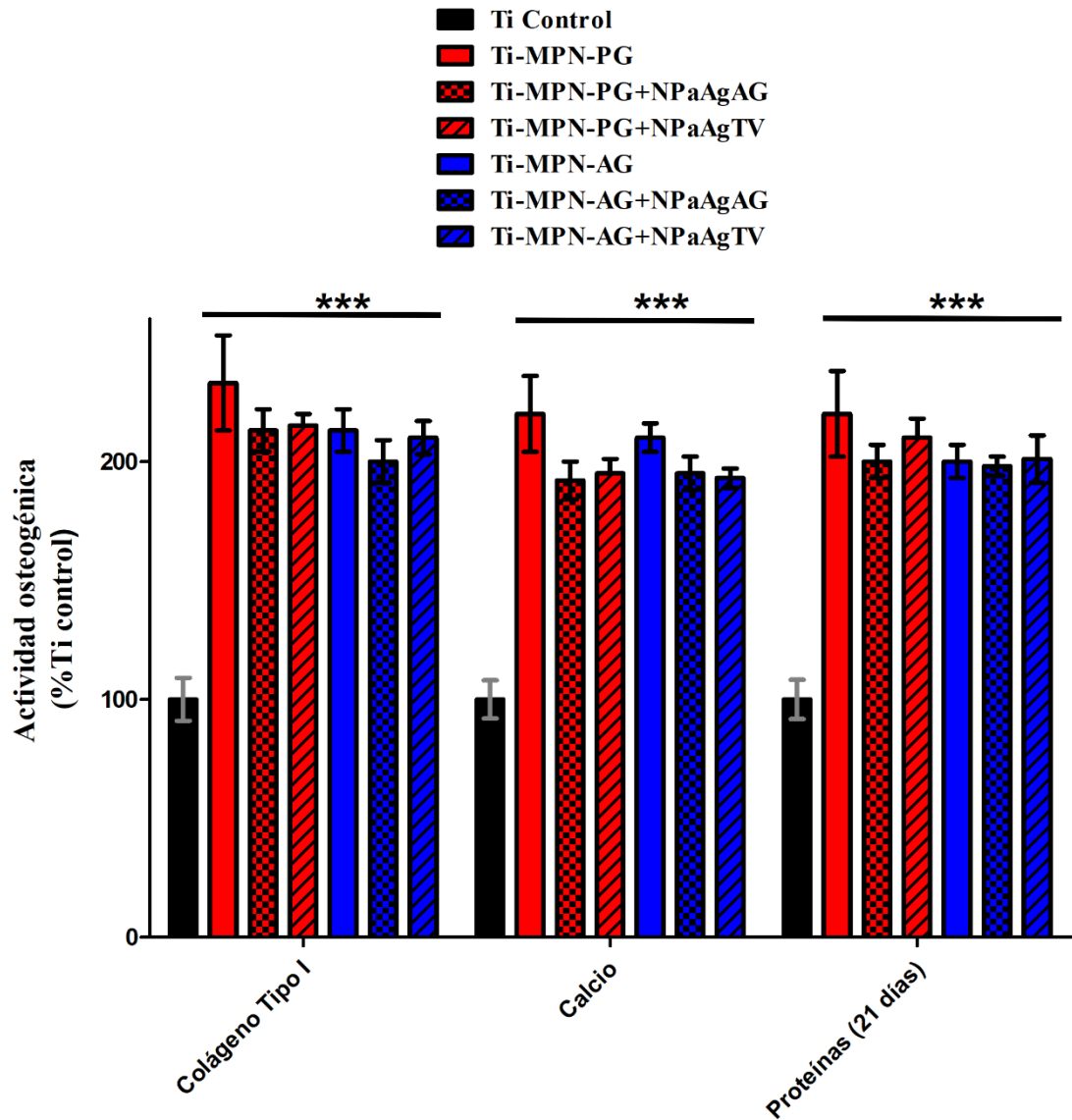


Figura 7.16. Determinación de la producción de colágeno tipo I, depósitos de calcio y proteínas tras 21 días de diferenciación de células pre-osteoblásticas MC3T3-E1 adheridas sobre distintas superficies. *** indica diferencias significativas con el Ti control ($p < 0,01$).

7.4 Conclusiones

A partir de los resultados presentados en este Capítulo, se puede concluir que es posible adherir NPaAg sobre superficies de Ti modificadas mediante el desarrollo de

MPN. Este procedimiento permite obtener superficies combinadas/mixtas con varias funciones de interés en medicina mediante procedimientos NEC.

Las NPaAgAG y NPaAgTV se adhieren escasamente sobre el TiO₂ de las superficies de Ti control. Sin embargo, en este trabajo se comprobó que las películas de MPN desarrolladas recubren la superficie de Ti e incrementan notablemente la inmovilización de NPa.

Las NPaAgAG presentaron un comportamiento diferencial en lo referente a su inmovilización sobre superficies con las diferentes MPN ensayadas. En las muestras de Ti-MPN-PG estas NPaAg se inmovilizaron y permanecieron estables, principalmente en forma aislada dejando espacios libres entre ellas y áreas libres de NPa sobre la cobertura MPN-PG desarrollada sobre Ti. Por el contrario, en superficies de Ti-MPN-AG las NPaAgAG se adhirieron escasamente formando principalmente aglomerados aislados sobre la MPN-AG. Además, la adherencia fue débil, ya que tras 24 h de inmersión en soluciones de PBS se desprendió gran cantidad de NPaAgAG de la superficie de Ti-MPN-AG liberándose en el medio acuoso.

Las NPaAgTV también presentaron un comportamiento distintivo respecto a su inmovilización sobre Ti-MPN-PG o Ti-MPN-AG. Sobre superficies de Ti-MPN-PG constituyeron uniones fuertes y estables y se unieron abundantemente, tapizando totalmente la película de MPN-PG, donde fue difícil individualizarlas a través de AFM. En cambio, sobre superficies de Ti-MPN-AG las NPaAgTV se adhirieron en menor proporción y más débilmente por lo que, luego de 24 h de inmersión en PBS, gran parte de estas NPa se desprendieron y liberaron en la solución. Estos resultados indican que la unión de dichas NPaAg sobre Ti-MPN-AG es lábil y poco duradera.

La falta de la estabilidad en la unión de las NPaAgAG y NPaAgTV sobre superficies de Ti-MPN-AG puede ser atribuida a repulsiones electrostáticas entre la MPN desarrolladas y el *capping* de dichas NPa. Los espectros ATR-FTIR reportados en los capítulos anteriores mostraron que tanto Ti-MPN-AG como las NPaAgTV y NPaAgAG presentan señales del grupo funcional COO⁻ en superficie, lo cual puede dificultar la estabilidad de la unión de estas NPa sobre Ti-MPN-AG por repulsiones electrostáticas.

La presencia de las NPaAg sobre superficies de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG pudo ser detectada por cambios en los parámetros de rugosidad y del ángulo de contacto. El aumento de los parámetros de rugosidad superficial de las muestras de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG se relacionaría el aumento de la hidrofiliidad y con la adhesión de las NPa. El

ángulo de contacto de Ti-MPN-AG disminuye, aunque en forma no estadísticamente significativa, en presencia de las NPaAg. Sin embargo, las muestras de Ti-MPN-PG+NPaAgTV muestran un ángulo significativamente menor (disminución de 10°) probablemente relacionado con la gran cantidad de NPaAgTV adheridas en su superficie.

Las NPaAgAG y NPaAgTV mostraron efectos antimicrobianos sinérgicos sobre superficies de Ti-MPN-PG, ya que la presencia de dichas NPa confiere a esa superficie actividad bactericida y antibiofilm contra *S. aureus*. En cambio, en superficies de Ti-MPN-AG no se observan efectos antimicrobianos adicionales por la presencia de las NPaAg, ya que las mismas se encuentran escasamente adheridas y/o aglomeradas y se desprenden fácilmente de la superficie al medio, lo cual impide que ejerzan su actividad antimicrobiana sobre la superficie de Ti.

Cabe destacar que las NPaAgAG y NPaAgTV inmovilizadas sobre Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG no alteran su citocompatibilidad con células fibroblásticas y pre-osteoblásticas. Tampoco interfieren en la actividad osteogénica, manteniéndose el incremento de actividad observado para las superficies de Ti-MPN-PG y Ti-MPN-AG.

Finalmente, se puede concluir que las superficies de Ti-MPN-PG con NPaAgAG o NPaAgTV adheridas son superficies multifuncionales con un futuro promisorio para su utilización en materiales implantables a base de Ti, ya que presentan acción bactericida impidiendo o reduciendo la capacidad de *S. aureus* de adherirse y formar *biofilms* y, a la vez, de acuerdo con ensayos *in vitro*, confieren un incremento en la citocompatibilidad y de la proliferación de osteoblastos, con el consecuente incremento de la actividad osteogénica, favoreciendo el proceso de oseointegración.

Parte IV:
Conclusiones
generales y
apéndices

Conclusiones generales

La hipótesis que motivó el presente trabajo de Tesis Doctoral establece que es posible desarrollar NPe y NPa citocompatibles y con efecto antimicrobiano por metodologías NEC que permitan reducir los efectos adversos para la salud y el medio ambiente que se producen a partir de las tecnologías tradicionales. Los resultados expuestos en los Capítulos 4, 5, 6 y 7 permitieron comprobar la validez de dicha hipótesis. Se lograron desarrollar diferentes NPe por diversos procedimientos (NPe autoensambladas de TOH y Carv, y MPN de PG, AG y AG+PG) y dos tipos de NPaAg utilizando extractos naturales (ExTV) o componentes puros (AG) con distintas propiedades fisicoquímicas y respuestas biológicas. Todos estos nanoproductos fueron obtenidos a través de procedimientos simples y sin la utilización de agentes tóxicos y/o contaminantes (NEC). Seguidamente se resumen las conclusiones obtenidas luego de la evaluación de las propiedades fisicoquímicas, así como la respuesta biológica de los sistemas estudiados.

Propiedades fisicoquímicas de las nanopelículas desarrolladas sobre Ti:

Se demostró que las NPe desarrolladas presentan estructuras y composiciones diversas. Las Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv se adsorben formando parches aislados sobre la superficie del Ti, modificando levemente la topografía rugosa de la superficie metálica. Por otra parte, las películas Ti-MPN-AG y Ti-MPN-PG desarrolladas utilizando AG o PG junto con iones Mg^{2+} dan lugar a MPN continuas y homogéneas que recubren toda la superficie de Ti, alisando marcadamente la topografía del metal. A diferencia de lo detectado en el caso Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv, que presentan liberación de los componentes activos (Carv y TOH) durante 10 días en soluciones de PBS, no se detectó liberación de AG o PG desde las superficies de Ti-MPN-AG y Ti-MPN-PG, respectivamente. Se pudo concluir, por lo tanto, que los recubrimientos obtenidos por MPN son más estables y se unen fuertemente a la superficie de Ti sin liberar productos al medio ni degradarse.

Los resultados obtenidos por ATR-FTIR mostraron que las Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv se forman por autooxidación parcial de los grupos -OH para formar grupos cetónicos (-C=O). En comparación con dichas películas, las MPN se desarrollan sobre la superficie de Ti mediante un mayor grado de oxidación de los grupos -OH formando enlaces de tipo éteres (-C-O-C-), con un nivel más alto de polimerización de los FF (AG

y PG) para formar estas coberturas. Además, las superficies de Ti-MPN-AG y Ti-MPN-PG revelaron un marcado incremento de la hidrofiliidad respecto del Ti. Por lo contrario, las superficies de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv no modificaron la mojabilidad de la superficie de Ti. Estas diferencias podrían estar ligadas a la mayor cobertura de la superficie y alta presencia de grupos -OH que presentan las distintas películas con MPN, que modifica notablemente las propiedades superficiales y aumenta considerablemente la hidrofiliidad con importantes consecuencias a nivel biológico.

Por técnicas electroquímicas (registros de OCP y voltamperometría cíclica) se lograron monitorear los cambios en las variables electroquímicas durante y posteriores al proceso de formación de las películas (Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv; Ti-MPN-AG y Ti-MPN-PG) detectándose notables diferencias entre las respuestas obtenidas. Mientras las superficies de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv no producen cambios significativos en los valores de E_{corr} , las muestras con MPN producen considerables desplazamientos anódicos de dicho parámetro, sugiriendo que las superficies con Ti-MPN-AG o Ti-MPN-PG son más protectoras.

Actividad antimicrobiana de las diferentes nanopelículas formadas sobre Ti:

Las superficies modificadas con Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv, no obstante su heterogeneidad superficial, demostraron ser superficies bactericidas (con poder erradicador) y excelentes alternativas para combatir y prevenir infecciones de *S. aureus* en implantes de Ti, ya que confieren a la superficie de dicho biomaterial actividad bactericida por hasta 48 h. Esto se debe a que se liberan moléculas de TOH y Carv puros desde las superficies de Ti-NPeTOH y Ti-NPeCarv, respectivamente, las cuales presentan un gran efecto antimicrobiano ocasionando daño por diversas vías (*multi-target*: membrana bacteriana, *quorum sensing*, formación de EPS, producción de ROS, etc). En cambio, las MPN presentes en las superficies de Ti-MPN-AG y Ti-MPN-PG no mostraron acción bactericida. Esto puede deberse a que no se detectó por espectroscopía UV-visible liberación de AG o PG puro desde dichas superficies al medio circundante. Sin embargo, se comprobó que las superficies de Ti-MPN-AG y Ti-MPN-PG exhiben propiedades antibiofilm, ya que no permiten que las bacterias adheridas proliferen y produzcan EPS sobre la superficie de Ti. En consecuencia, se reducen ampliamente las posibilidades de *S. aureus* de formar un biofilm y se restringe también la posibilidad de infección del material implantado, favoreciendo así la acción de agentes antimicrobianos

tradicionales (antibióticos) debido al aislamiento de las bacterias adheridas. De hecho, los beneficios de las características antibiofilm de las superficies de Ti-MPN-AG y de Ti-MPN-PG se revelaron en la importante actividad bactericida sinérgica con amikacina, logrando prácticamente la eliminación de los *biofilms* de *S. aureus* sobre superficies de Ti.

Citocompatibilidad y propiedades osteogénicas de las diferentes nanopelículas formadas sobre Ti:

Las superficies de Ti-NPeTOH exhibieron un incremento en la citocompatibilidad con células pre-osteoblásticas aumentando, asimismo, la producción de marcadores osteogénicos que favorecen los procesos de oseointegración. Además, dicha superficie redujo la afinidad del Ti por células fibroblásticas, dificultando entonces las posibilidades de encapsulamiento del implante de Ti por formación de tejido conectivo. Por lo tanto, se puede concluir que las superficies de Ti-NPeTOH presentan carácter multifuncional, ya que impiden la colonización bacteriana por *S. aureus* del Ti por 48 h y, asimismo, mejoran la citocompatibilidad y la oseointegración *in vitro*. En cambio, las superficies de Ti-NPeCarv presentaron menor citocompatibilidad con dichas células, reduciendo la producción de marcadores osteogénicos. Cabe destacar que, si bien dichas superficies incrementan la proliferación de células fibroblásticas sobre Ti, lo cual podría favorecer la encapsulación y posterior rechazo de implantes ortopédicos, dicho efecto podría ser de utilidad para ciertas aplicaciones dentales.

Por otra parte, las superficies de Ti-MPN-AG y Ti-MPN-PG aumentaron la proliferación de células pre-osteoblásticas sobre Ti, incrementando su citocompatibilidad y la producción de marcadores osteogénicos. Por lo tanto, se puede concluir que dichas superficies son multifuncionales y de gran utilidad para aplicaciones médicas, ya que presentan acción antibiofilm y a la vez propiedades osteogénicas.

Características fisicoquímicas y respuesta biológica de las nanopartículas de plata obtenidas por NEC:

Se pudo demostrar que tanto el AG puro como el ExTV producido en el laboratorio son excelentes agentes reductores de iones Ag^+ permitiendo obtener NP_{Ag} de tamaños nanométricos, estables en solución por periodos mayores a 6 meses, con gran poder antimicrobiano contra bacterias planctónicas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *K.*

pneumoniae y adecuada citocompatibilidad con células fibroblásticas y pre-osteoblásticas.

Las NPaAgAG presentaron una distribución bimodal con una población mayoritaria (80%) de tamaño promedio de 17 nm y una segunda población (20%) de 42 nm calculadas por imágenes S-TEM. En cambio, las NPaAgTV presentaron una única población mayoritaria de tamaño promedio de 9 nm que representa el 90% de las NPa analizadas. Sin embargo, utilizando DLS se identificaron dos poblaciones: una de 12 nm (98% de representatividad) y una pequeña fracción de aglomerados de 120 nm (2%). Ambas NPa presentaron un recubrimiento con señales FTIR típicas del AG (NPaAgAG) o de los FF presentes en el ExTV (NPaAgTV), lo cual indica que dichos FF no solo actúan como agentes reductores sino también como agentes estabilizadores y formadores del *capping*.

Ambas NPa sintetizadas por NEC presentaron gran poder bactericida contra bacterias planctónicas, ya que se requirieron concentraciones menores a 5 µg/mL para alcanzar la CMB, excepto en *K. pneumoniae* donde las NPaAgAG producen la CMB a concentraciones de aproximadamente 10 µg/mL. Por otra parte, la citocompatibilidad con células fibroblásticas y pre-osteoblásticas de las NPaAgAG y NPaAgTV no se vio comprometida hasta concentraciones mayores de 20 µg/mL, lo cual indica que se pueden utilizar dichas NPa a bajas concentraciones para combatir bacterias sin producir efectos citotóxicos relevantes en células eucariotas.

Actividad antimicrobiana sinérgica y osteogénesis de los sistemas mixtos: MPN desarrolladas sobre Ti con NPaAg inmovilizadas sobre las mismas:

Las NPaAg se adhirieron de forma escasa y principalmente aglomeradas sobre superficies de Ti control. Sobre las superficies de Ti-MPN-AG, las NPaAgAG y NPaAgTV tampoco se unieron en forma estable, ya que luego de inmersión en soluciones de PBS las NPaAg se desprendieron de la superficie. Esto podría atribuirse a repulsiones electrostáticas inducidas por la presencia del grupo funcional COO⁻ tanto en las MPN como en el recubrimiento de las NPaAg.

En cambio, sobre superficies de Ti-MPN-PG se comprobó que, tanto NPaAgAG como NPaAgTV fueron capaces de ser inmovilizadas de forma estable, en grandes

cantidades y principalmente en forma aislada. Por lo tanto, la presencia de la MPN-PG incrementó la afinidad de la superficie de Ti para inmovilizar NPaAg.

Por otra parte, sobre superficies de Ti-MPN-PG+NPaAgAG y Ti-MPN-PG+NPaAgTV, se demostraron efectos antimicrobianos sinérgicos contra *biofilms* de *S. aureus*, ya que se logró reducir en 3 y 4 órdenes de magnitud, respectivamente, la cantidad de UFCs desarrolladas sobre Ti-MPN-PG. Finalmente, la presencia de las NPaAgAG y NPaAgTV sobre la superficie de Ti-MPN-PG no afectó la citocompatibilidad ni la osteogénesis aumentada lograda por la presencia de la MPN. De esta forma, se puede concluir que las superficies de Ti-MPN-PG+ NPaAgAG y Ti-MPN-PG+ NPaAgTV son multifuncionales, ya que presentan suficiente acción bactericida para combatir y prevenir la formación de biofilm sobre Ti y, a la vez, incrementan la citocompatibilidad y actividad osteogénica en células pre-osteoblásticas.

Nanoproductos desarrollados a partir de NEC y sus características:

Finalmente, es posible concluir que, a partir de NEC, se pueden desarrollar diferentes productos nanotecnológicos (Ti-NPeTOH, Ti-NPe-Carv, Ti-MPN-AG, Ti-MPN-PG, Ti-MPN-AG+NPaAg, Ti-MPN-PG+NPaAg, NPaAgAG y NPaAgTV) que son fáciles de sintetizar, económicos, reproducibles y escalables, para ser aplicados sobre Ti (y probablemente sobre otros sustratos). Pudo demostrarse que, tanto las NPe como las NPaAg y los sistemas mixtos (NPe + NPaAg) fueron adecuados agentes antimicrobianos que presentaron diferentes grados de eficacia (bactericida /inhibidora de crecimiento) contra las cepas estudiadas logrando, en algunos casos, efectos erradicadores, así como adecuada citocompatibilidad con células fibroblásticas y pre-osteoblásticas y actividad osteogénica.

Apéndice A: Abreviaturas y acrónimos

AFM: microscopía de fuerza atómica

AG: ácido gálico

AT: ácido tánico

ATR: reflexión total atenuada

Carv: carvacrol

CE: contraelectrodo

CMB: concentración mínima bactericida

CMI: concentración mínima inhibitoria

DLS: dispersión dinámica de luz

DO: densidad óptica

E: potencial

E_{corr} : potencial mixto

EGCG: galato de epigallocatequina, por sus siglas en inglés *Epigallocatechin Gallate*

EPS: matriz polimérica extracelular, por sus siglas en inglés *Extracellular Polymeric Substances*

ER: electrodo de referencia

ET: electrodo de trabajo

FAI: Fosfatasa alcalina

FDA: Food and Drug Administration

FF: fitocompuestos fenólicos

FTIR: Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

i_{corr} : densidad de corriente determinada por curvas de Tafel

ICP-OES: espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado por inducción

IR: Espectroscopia infrarroja

MPN: metal phenolic networks o redes metal-fenólicas

NEC: nanotecnologías ecocompatibles

NPa: nanopartícula

NPaAg: nanopartícula de plata

NPaAgAG: nanopartícula de plata sintetizada con ácido gálico

NPaAgTV: nanopartícula de plata sintetizada con extracto de té verde

NPe: nanopelículas

OCP: potencial a circuito abierto, por sus siglas en inglés *Open Circuit Potential*

PG: pirogalol

PVA: polivinilalcohol

PVP: polivinilpirrolidona

R_a: rugosidad promedio

R_{isad}: diferencia en el área superficial de la imagen

R_{max}: máxima altura del perfil

R_q: rugosidad cuadrática media

SCE: electrodo de calomel saturado

S_{ku}: coeficiente de Curtosis

S_{sk}: asimetría en la rugosidad (skewness)

S-TEM: microscopía electrónica de transmisión de barrido TEM: microscopía electrónica de transmisión

Ti-MPN-AG: MPN de AG formada sobre Ti

Ti-MPN-PG: MPN de PG formada sobre Ti

Ti-NPeTOH: NPe de TOH formada sobre Ti

Ti-NPe-Carv: NPe de Carv formada sobre Ti

TOH: timol

UFCs: unidades formadoras de colonias

Apéndice B: Publicaciones y presentaciones a congresos realizadas en el marco del presente trabajo de Tesis.

A) Publicaciones en revistas internacionales:

1. **A. Gonzalez**, A. G. Miñan, C. A. Grillo, E. D. Prieto, P. L. Schilardi and M. A. Fernández Lorenzo de Mele. “Characterization and antimicrobial effect of a bioinspired thymol coating formed on titanium surface by one-step immersion treatment”. *Dental Materials*, Vol. 36, Issue 12, pp. 1495-1507, 2020, ISSN 0109-5641, doi: 10.1016/j.dental.2020.09.006.
2. V. C. Cajiao Checchin, **A. Gonzalez**, M. Bertuola and M. A. Fernández Lorenzo de Mele. “Multifunctional coatings of phenolic phytochemicals of medical interest: Assembly methods and applications”. *Progress in Organic Coating*, Vol.172, pp 107068, 2022, doi.org/10.1016/j.porgcoat.2022.107068. (Review).

B) Capítulos de libro publicados:

1. M. Tosato, M. Bertuola, N. Fagali, V. C. Cajiao Checchin, **A. Gonzalez** & M. A. Fernández Lorenzo de Mele. “Chapter 9. Applications of Volatile (Essential) Oils in Human Health: Biodegradable Biomaterials”. In S. Singh, *Volatile Oils: Production, Composition and Uses*. Nova Science Publishers, 2021.
2. M. Tosato, **A. Gonzalez**, V. C. Cajiao Checchin, M. Bertuola, N. Fagali & M. A. Fernández Lorenzo de Mele. “Chapter 10. Applications of Volatile (Essential) Oils in Human Health: Cosmetic and Dental Applications”. In S. Singh, *Volatile Oils: Production, Composition and Uses*. Nova Science Publishers, 2021.
3. V. C. Cajiao Checchin, **A. Gonzalez**, D. I. Arrieta Gamarra, N. Fagali & M. A. Fernández Lorenzo de Mele. “Chapter 4: Components of essential oils as building blocks of functional materials for nanomedicine. Metal-phenolic networks and self-assembly approaches” In S. Singh, *Pharmacological Aspects of Essential Oils: Current and Future Trends*. Taylor & Francis Group, LLC, 2023.

C) Comunicaciones a congresos nacionales e internacionales:

1. **A. Gonzalez**, E. Prieto, N. Fagali, , P. L. Schilardi, M. A. Fernández Lorenzo de Mele. “Functionalization of Ti surface with metal phenolic networks and green silver nanoparticles: in vitro evaluation of antimicrobial activity and cytocompatibility”. XII Latin-American Congress of Artificial Organs and Biomaterials (COLAOB) 2023. Mar del Plata, INTEMA, 2023.
2. **A. Gonzalez**, N. Fagali, E. Prieto, P. L. Schilardi, M. A. Fernández Lorenzo de Mele. “Estudio comparativo de nanopelículas ecocompatibles de timol y carvacrol adsorbidas sobre titanio. Efecto sobre la matriz polimerica bacteriana y citocompatibilidad”. 20° Congreso Internacional de Materiales SAM CONAMET 2022. Mar del Plata, INTEMA, 2022.
3. **A. Gonzalez**, V. C. Cajiao Checchin, D. Prieto, P. L. Schilardi, M. A. Fernández Lorenzo de Mele. “Nanopelículas de isómeros conformacionales: Comparación de los parámetros de rugosidad”. Libro de actas XXII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. La Plata, Argentina, 2021.
4. **A. Gonzalez**, E. D. Prieto, P. L. Schilardi & M. A. Fernández Lorenzo de Mele. “Caracterización de nanopartículas de plata ecocompatibles y evaluación de la adsorción sobre superficies de titanio”. Libro de resúmenes XX Encuentro de superficies y materiales nanoestructurados. Mar del Plata, INTEMA, 2021.
5. **A. Gonzalez**, M. A. Fernández Lorenzo de Mele and P. L. Schilardi.” Nanotecnologías ecocompatibles para aplicaciones médicas e industriales”. Investigación Joven, vol. 6, no. especial, pp. 70-71, 2019. ISSN: 2314-3991.
6. **A. Gonzalez**, M. Bertuola, N. Fagali, P. L. Schilardi, M. A. Fernández Lorenzo de Mele. “Utilización de nanotecnologías ecocompatibles para el desarrollo de nanopartículas y nanopelículas”. Libro de actas V Jornadas de Investigación, Transferencia y Extensión de la Facultad de Ingeniería. La Plata, Facultad de Ingeniería - UNLP, 2019. ISBN: 978-950-34-1749-2.
7. **A. Gonzalez**, C. A. Grillo, P. L. Schilardi and M. A. Fernández Lorenzo de Mele. “Síntesis ecocompatible de nanopartículas de plata: evaluación de la citotoxicidad”. Libro de resúmenes XIX Encuentro de superficies y materiales nanoestructurados. General San Martín, Instituto Nacional de Tecnología Industrial - INTI, 2019. ISBN 978-950-532-421-7.

8. **A. Gonzalez**, N. Fagali, A. G. Miñán, P. L. Schilardi and M. A. Fernández Lorenzo de Mele. “Adsorción de fitocompuestos fenólicos sobre materiales implantables de titanio: evaluación de la actividad antimicrobiana”. Libro de resúmenes 19º Congreso Internacional de Metalurgia y Materiales CONAMET-SAM. Valdivia-Chile, 2019.
9. **A. Gonzalez**, A. G. Miñán, C. A. Grillo, P. L. Schilardi and M. A. Fernández Lorenzo de Mele, M. “Nanofilms of adsorbed thymol formed on Ti surfaces for biomedical applications. Antimicrobial activity and biocompatibility”. *Medicina*, Vol. 79, Supl. IV, 2019. ISSN 0025-7680 (Impresa) – ISSN 1669-9106 (En línea).

D) Futuras publicaciones:

Actualmente se encuentra finalizado y en proceso de envío el siguiente artículo:

1. **A. Gonzalez**, A.G. Miñán, E. D. Prieto, P. L. Schilardi, F.S. Fagali and M. A. Fernández Lorenzo de Mele. “Self-assembled thymol antimicrobial nanolayers favor osteogenic processes. Comparison with the coatings obtained from its isomer carvacrol”. *Revista: Progress in Organic Coating*.

También se encuentra en estado avanzado de redacción dos artículos con los resultados de los Capítulos 5, 6 y 7 (títulos tentativos):

2. **A. Gonzalez**, A. G. Miñán, E. D. Prieto, P. L. Schilardi, F.S. Fagali and M. A. Fernández Lorenzo de Mele. “Synergistic antimicrobial effects between metal phenolic networks of gallic acid (developed on Ti surface) and amikacin”. Este artículo está basado en los resultados del Capítulo 5.

3. **A. Gonzalez**, F.S. Fagali, E. D. Prieto, P. L. Schilardi and M. A. Fernández Lorenzo de Mele. “Multifunctional Ti surfaces with metal phenolic networks of pyrogallol and “green” silver nanoparticles: bactericidal effect and improved osseointegration”. Este artículo está basado en los resultados de los Capítulos 6 y 7 de la Tesis Doctoral. Resultados parciales fueron presentados y publicados en el congreso internacional XII Latin-American Congress of Artificial Organs and Biomaterials realizado el 12 de diciembre del 2023 en Mar del Plata, Argentina.

Referencias bibliográficas

- [1] B.D. Rattier, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons, Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, *J Clin Eng* 22 (1997). https://journals.lww.com/jcejournal/fulltext/1997/01000/biomaterials_science__an_introduction_to_materials.9.aspx.
- [2] D.M. Brunette, P. Tengvall, M. Textor, P. Thomsen, Titanium in Medicine, (2001). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-56486-4>.
- [3] Bioscience and Bioengineering of Titanium Materials - Yoshiki Oshida - Google Libros, (n.d.). [https://books.google.cl/books?hl=es&lr=&id=bUb_0fKCfY4C&oi=fnd&pg=PP1&dq=Oshida,+Y.+\(2010\).+Bioscience+and+bioengineering+of+titanium+materials.+&ots=AjB9wBUZi0&sig=2O37ZZUsq8bhTWliXD6tpGQueDA#v=onepage&q=Oshida%2C%20Y.%20\(2010\).%20Bioscience%20and%20bioengineering%20of%20titanium%20materials.&f=false](https://books.google.cl/books?hl=es&lr=&id=bUb_0fKCfY4C&oi=fnd&pg=PP1&dq=Oshida,+Y.+(2010).+Bioscience+and+bioengineering+of+titanium+materials.+&ots=AjB9wBUZi0&sig=2O37ZZUsq8bhTWliXD6tpGQueDA#v=onepage&q=Oshida%2C%20Y.%20(2010).%20Bioscience%20and%20bioengineering%20of%20titanium%20materials.&f=false) (accessed January 5, 2024).
- [4] Y.F. Zheng, X.N. Gu, F. Witte, Biodegradable metals, *Materials Science and Engineering: R: Reports* 77 (2014) 1–34. <https://doi.org/10.1016/J.MSER.2014.01.001>.
- [5] G. Welsch, R. Boyer, E.W. Collings, *Materials properties handbook: Titanium alloys*, 2nd ed, ASM International: Materials Park, OH (1998) xxii 1176. https://books.google.com/books/about/Materials_Properties_Handbook.html?hl=es&id=x3rToHWOcD8C (accessed January 5, 2024).
- [6] B367 Standard Specification for Titanium and Titanium Alloy Castings, (n.d.). <https://www.astm.org/b0367-22.html> (accessed June 3, 2024).
- [7] M. Niinomi, Y. Liu, M. Nakai, H. Liu, H. Li, Biomedical titanium alloys with Young's moduli close to that of cortical bone, *Regen Biomater* 3 (2016) 173–185. <https://doi.org/10.1093/RB/RBW016>.
- [8] Y.T. Sul, The significance of the surface properties of oxidized titanium to the bone response: Special emphasis on potential biochemical bonding of oxidized titanium implant, *Biomaterials* 24 (2003) 3893–3907. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00261-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00261-8).

- [9] T. Albrektsson, C. Johansson, Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration, *European Spine Journal* 10 (2001) S96–S101. <https://doi.org/10.1007/s005860100282>.
- [10] P.I. Branemark, Osseointegration and its experimental background, *J Prosthet Dent* 50 (1983) 399–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-3913\(83\)80101-2](https://doi.org/10.1016/S0022-3913(83)80101-2).
- [11] H. Chouirfa, H. Bouloussa, V. Migonney, C. Falentin-Daudré, Review of titanium surface modification techniques and coatings for antibacterial applications, *Acta Biomater* 83 (2019) 37–54. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.10.036>.
- [12] F. Fitzpatrick, H. Humphreys, J.P. O’Gara, The genetics of staphylococcal biofilm formation—will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection?, *Clinical Microbiology and Infection* 11 (2005) 967–973. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2005.01274.X>.
- [13] L. Hall-Stoodley, J.W. Costerton, P. Stoodley, Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases, *Nature Reviews Microbiology* 2004 2:2 2 (2004) 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>.
- [14] Jana. Jass, Susanne. Surman, J.T. Walker, *Medical biofilms : detection, prevention, and control* - Ghent University Library, (2003) 291. https://books.google.com/books/about/Medical_Biofilms.html?hl=es&id=pgQzK9xLwmMC (accessed January 9, 2024).
- [15] Z. Wei, S. Niu, Y. Wei, Y. Liu, Y. Xu, Y. Yang, P. Zhang, Q. Zhou, J.J. Wang, The role of extracellular polymeric substances (EPS) in chemical-degradation of persistent organic pollutants in soil: A review, *Science of the Total Environment* 912 (2024). <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.168877>.
- [16] K.U. Mahto, Vandana, M. Priyadarshane, D.P. Samantaray, S. Das, Bacterial biofilm and extracellular polymeric substances in the treatment of environmental pollutants: Beyond the protective role in survivability, *J Clean Prod* 379 (2022) 134759. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2022.134759>.
- [17] M. Otto, Quorum-sensing control in Staphylococci - A target for antimicrobial drug therapy?, *FEMS Microbiol Lett* 241 (2004) 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.11.016>.

- [18] D.P. Bakker, J.W. Klijnstra, H.J. Busscher, H.C. Van Der Mei, The Effect of Dissolved Organic Carbon on Bacterial Adhesion to Conditioning Films Adsorbed on Glass from Natural Seawater Collected during Different Seasons, *Biofouling* 19 (2003) 391–397. <https://doi.org/10.1080/08927010310001634898>.
- [19] N. Siboni, M. Lidor, E. Kramarsky-Winter, A. Kushmaro, Conditioning film and initial biofilm formation on ceramics tiles in the marine environment, *FEMS Microbiol Lett* 274 (2007) 24–29. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2007.00809.X>.
- [20] J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg, Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections, *Science* (1979) 284 (1999) 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.284.5418.1318>.
- [21] P.L. Phillips, G.S. Schultz, Molecular Mechanisms of Biofilm Infection: Biofilm Virulence Factors, <https://Home.Liebertpub.Com/Wound> 1 (2012) 109–114. <https://doi.org/10.1089/WOUND.2011.0301>.
- [22] F. De Ciencias, C. Diaz, Adherencia y colonización de *Pseudomonas fluorescens* sobre sustratos sólidos: influencia de la topografía y composición química de la superficie, (2011). <https://doi.org/10.35537/10915/2685>.
- [23] L.D. Renner, D.B. Weibel, Physicochemical regulation of biofilm formation, *MRS Bull* 36 (2011) 347–355. <https://doi.org/10.1557/MRS.2011.65>.
- [24] J.K. Oh, Y. Yegin, F. Yang, M. Zhang, J. Li, S. Huang, S. V. Verkhoturov, E.A. Schweikert, K. Perez-Lewis, E.A. Scholar, T.M. Taylor, A. Castillo, L. Cisneros-Zevallos, Y. Min, M. Akbulut, The influence of surface chemistry on the kinetics and thermodynamics of bacterial adhesion, *Scientific Reports* 2018 8:1 8 (2018) 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35343-1>.
- [25] J. Palmer, S. Flint, J. Brooks, Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm, *J Ind Microbiol Biotechnol* 34 (2007) 577–588. <https://doi.org/10.1007/S10295-007-0234-4>.
- [26] E. Vanhaecke, J.P. Remon, M. Moors, F. Raes, D. De Rudder, A. Van Peteghem, Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-L stainless steel:

- role of cell surface hydrophobicity, *Appl Environ Microbiol* 56 (1990) 788–795. <https://doi.org/10.1128/AEM.56.3.788-795.1990>.
- [27] M.M. Gentleman, E. Gentleman, The role of surface free energy in osteoblast–biomaterial interactions, *International Materials Reviews* 59 (2014) 417–429. <https://doi.org/10.1179/1743280414Y.0000000038>.
- [28] C. Díaz, P.L. Schilardi, P.C. Dos Santos Claro, R.C. Salvarezza, M.A. Fernández Lorenzo De Mele, Submicron trenches reduce the *Pseudomonas fluorescens* colonization rate on solid surfaces, *ACS Appl Mater Interfaces* 1 (2009) 136–143. https://doi.org/10.1021/AM8000677/SUPPL_FILE/AM8000677_SI_001.PDF.
- [29] C. Díaz, P. Schilardi, M.F.L. De Mele, Influence of Surface Sub-micropattern on the Adhesion of Pioneer Bacteria on Metals, *Artif Organs* 32 (2008) 292–298. <https://doi.org/10.1111/J.1525-1594.2008.00545.X>.
- [30] S.H. Flint, J.D. Brooks, P.J. Bremer, Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci, *J Food Eng* 43 (2000) 235–242. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(99\)00157-0](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(99)00157-0).
- [31] E. McCafferty, J.P. Wightman, An X-ray photoelectron spectroscopy sputter profile study of the native air-formed oxide film on titanium, *Appl Surf Sci* 143 (1999) 92–100. [https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(98\)00927-1](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(98)00927-1).
- [32] D.J. Gorth, S. Puckett, B. Ercan, T.J. Webster, M. Rahaman, B. Sonny Bal, Decreased bacteria activity on Si₃N₄ surfaces compared with PEEK or titanium, *Int J Nanomedicine* 7 (2012) 4829–4840. <https://doi.org/10.2147/IJN.S35190>.
- [33] A. Miñán, P.L. Schilardi, M. Fernández Lorenzo De Mele, The importance of 2D aggregates on the antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* sessile bacteria, *Materials Science and Engineering: C* 61 (2016) 199–206. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2015.12.034>.
- [34] F. Ghilini, D.E. Pissinis, A. Miñán, P.L. Schilardi, C. Diaz, How Functionalized Surfaces Can Inhibit Bacterial Adhesion and Viability, *ACS Biomater Sci Eng* 5 (2019) 4920–4936. https://doi.org/10.1021/ACSBIOMATERIALS.9B00849/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AB9B00849_0010.GIF.

- [35] I. Fundeanu, H.C. van der Mei, A.J. Schouten, H.J. Busscher, Polyacrylamide brush coatings preventing microbial adhesion to silicone rubber, *Colloids Surf B Biointerfaces* 64 (2008) 297–301. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2008.02.005>.
- [36] B. Dong, H. Jiang, S. Manolache, A.C.L. Wong, F.S. Denes, Plasma-mediated grafting of poly(ethylene glycol) on polyamide and polyester surfaces and evaluation of antifouling ability of modified substrates, *Langmuir* 23 (2007) 7306–7313. <https://doi.org/10.1021/LA0633280/ASSET/IMAGES/MEDIUM/LA0633280N00001.GIF>.
- [37] M. Mu, X. Wang, M. Taylor, A. Castillo, L. Cisneros-Zevallos, M. Akbulut, Y. Min, Multifunctional coatings for mitigating bacterial fouling and contamination, *Colloids and Interface Science Communications* 55 (2023). <https://doi.org/10.1016/J.COLCOM.2023.100717>.
- [38] M. Bertuola, A. Miñán, C.A. Grillo, M.C. Cortizo, M.A. Fernández Lorenzo de Mele, Corrosion protection of AZ31 alloy and constrained bacterial adhesion mediated by a polymeric coating obtained from a phytocompound, *Colloids Surf B Biointerfaces* 172 (2018) 187–196. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2018.08.025>.
- [39] E. Gilabert-Chirivella, R. Pérez-Feito, C. Ribeiro, S. Ribeiro, D.M. Correia, M.L. González-Martín, J.M. Manero, S. Lanceros-Méndez, G.G. Ferrer, J.L. Gómez-Ribelles, Chitosan patterning on titanium implants, *Prog Org Coat* 111 (2017) 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2017.04.027>.
- [40] P.H. Chua, K.G. Neoh, E.T. Kang, W. Wang, Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion, *Biomaterials* 29 (2008) 1412–1421. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2007.12.019>.
- [41] I. Banerjee, R.C. Pangule, R.S. Kane, Antifouling Coatings: Recent Developments in the Design of Surfaces That Prevent Fouling by Proteins, Bacteria, and Marine Organisms, *Advanced Materials* 23 (2011) 690–718. <https://doi.org/10.1002/ADMA.201001215>.

- [42] Q. Yu, Y. Zhang, H. Wang, J. Brash, H. Chen, Anti-fouling bioactive surfaces, *Acta Biomater* 7 (2011) 1550–1557. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2010.12.021>.
- [43] M. Riool, A. de Breij, J.W. Drijfhout, P.H. Nibbering, S.A.J. Zaat, Antimicrobial peptides in biomedical device manufacturing, *Front Chem* AUG (2017) 295492. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2017.00063/BIBTEX>.
- [44] A. Gonzalez, A.G. Miñán, C.A. Grillo, E.D. Prieto, P.L. Schilardi, M.A. Fernández Lorenzo de Mele, Characterization and antimicrobial effect of a bioinspired thymol coating formed on titanium surface by one-step immersion treatment, *Dental Materials* 36 (2020) 1495–1507. <https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2020.09.006>.
- [45] L. Townsend, R.L. Williams, O. Anuforum, M.R. Berwick, F. Halstead, E. Hughes, A. Stamboulis, B. Oppenheim, J. Gough, L. Grover, R.A.H. Scott, M. Webber, A.F.A. Peacock, A. Belli, A. Logan, F. De Cogan, Antimicrobial peptide coatings for hydroxyapatite: electrostatic and covalent attachment of antimicrobial peptides to surfaces, *J R Soc Interface* 14 (2017). <https://doi.org/10.1098/RSIF.2016.0657>.
- [46] S. Geißler, A. Barrantes, P. Tengvall, P.B. Messersmith, H. Tiainen, Deposition Kinetics of Bioinspired Phenolic Coatings on Titanium Surfaces, *Langmuir* 32 (2016) 8050–8060. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b01959>.
- [47] E. De Giglio, M.R. Guascito, L. Sabbatini, G. Zambonin, Electropolymerization of pyrrole on titanium substrates for the future development of new biocompatible surfaces, *Biomaterials* 22 (2001) 2609–2616. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00449-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00449-X).
- [48] C.Y. Flores, C. Diaz, A. Rubert, G.A. Benítez, M.S. Moreno, M.A. Fernández Lorenzo de Mele, R.C. Salvarezza, P.L. Schilardi, C. Vericat, Spontaneous adsorption of silver nanoparticles on Ti/TiO₂ surfaces. Antibacterial effect on *Pseudomonas aeruginosa*, *J Colloid Interface Sci* 350 (2010) 402–408. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2010.06.052>.
- [49] F. Ghilini, N. Fagali, D.E. Pissinis, G. Benítez, P.L. Schilardi, Multifunctional Titanium Surfaces for Orthopedic Implants: Antimicrobial Activity and Enhanced

- Osseointegration, *ACS Appl Bio Mater* 4 (2021) 6451–6461.
<https://doi.org/10.1021/ACSABM.1C00613>.
- [50] T. Parandhaman, P. Choudhary, B. Ramalingam, M. Schmidt, S. Janardhanam, S.K. Das, Antibacterial and Antibiofouling Activities of Antimicrobial Peptide-Functionalized Graphene-Silver Nanocomposites for the Inhibition and Disruption of *Staphylococcus aureus* Biofilms, *ACS Biomater Sci Eng* 7 (2021) 5899–5917.
<https://doi.org/10.1021/ACSBIOMATERIALS.1C01253>.
- [51] F. Ghilini, M.C. Rodríguez González, A.G. Miñán, D. Pissinis, A.H. Creus, R.C. Salvarezza, P.L. Schilardi, Highly Stabilized Nanoparticles on Poly- l -Lysine-Coated Oxidized Metals: A Versatile Platform with Enhanced Antimicrobial Activity, *ACS Appl Mater Interfaces* 10 (2018) 23657–23666.
https://doi.org/10.1021/ACSAMI.8B07529/SUPPL_FILE/AM8B07529_SI_001.PDF.
- [52] R.E. Dávila-Martínez, L.F. Cueto, E.M. Sánchez, Electrochemical deposition of silver nanoparticles on TiO₂/FTO thin films, *Surf Sci* 600 (2006) 3427–3435.
<https://doi.org/10.1016/j.susc.2006.06.041>.
- [53] C. Gaidau, A. Petica, M. Ignat, O. Iordache, L.M. Ditu, M. Ionescu, Enhanced photocatalysts based on Ag-TiO₂ and Ag-N-TiO₂ nanoparticles for multifunctional leather surface coating, *Open Chem* 14 (2016) 383–392.
<https://doi.org/10.1515/chem-2016-0040>.
- [54] G. Yun, S. Pan, T.Y. Wang, J. Guo, J.J. Richardson, F. Caruso, Synthesis of Metal Nanoparticles in Metal-Phenolic Networks: Catalytic and Antimicrobial Applications of Coated Textiles, *Adv Healthc Mater* 7 (2018) 1700934.
<https://doi.org/10.1002/ADHM.201700934>.
- [55] H. Ejima, J.J. Richardson, F. Caruso, Metal-phenolic networks as a versatile platform to engineer nanomaterials and biointerfaces, *Nano Today* 12 (2017) 136–148. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2016.12.012>.
- [56] P. Jiang, Y. Zhu, Y. Wu, Q. Lin, Y. Yu, W. Yu, Y. Huang, Synthesis of flame-retardant, bactericidal, and color-adjusting wood fibers with metal phenolic networks, *Ind Crops Prod* 170 (2021) 113796.
<https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2021.113796>.

- [57] F. Ghilini, N. Fagali, D.E. Pissinis, G. Benítez, P.L. Schilardi, Multifunctional Titanium Surfaces for Orthopedic Implants: Antimicrobial Activity and Enhanced Osseointegration, *ACS Appl Bio Mater* 4 (2021) 6451–6461. https://doi.org/10.1021/ACSABM.1C00613/ASSET/IMAGES/MEDIUM/MT1C00613_0009.GIF.
- [58] E.P. Ivanova, J. Hasan, H.K. Webb, V.K. Truong, G.S. Watson, J.A. Watson, V.A. Baulin, S. Pogodin, J.Y. Wang, M.J. Tobin, C. Löbbe, R.J. Crawford, Natural bactericidal surfaces: Mechanical rupture of *Pseudomonas aeruginosa* cells by cicada wings, *Small* 8 (2012) 2489–2494. <https://doi.org/10.1002/sml.201200528>.
- [59] C.D. Bandara, S. Singh, I.O. Afara, A. Wolff, T. Tesfamichael, K. Ostrikov, A. Oloyede, Bactericidal Effects of Natural Nanotopography of Dragonfly Wing on *Escherichia coli*, *ACS Appl Mater Interfaces* 9 (2017) 6746–6760. https://doi.org/10.1021/ACSAMI.6B13666/SUPPL_FILE/AM6B13666_SI_001.PDF.
- [60] C. Díaz, P.L. Schilardi, P.C. Dos Santos Claro, R.C. Salvarezza, M.A. Fernández Lorenzo De Mele, Submicron trenches reduce the *Pseudomonas fluorescens* colonization rate on solid surfaces, *ACS Appl Mater Interfaces* 1 (2009) 136–143. https://doi.org/10.1021/AM8000677/SUPPL_FILE/AM8000677_SI_001.PDF.
- [61] C. Díaz, R.C. Salvarezza, M.A. Fernández Lorenzo De Mele, P.L. Schilardi, Organization of *Pseudomonas fluorescens* on chemically different nano/microstructured surfaces, *ACS Appl Mater Interfaces* 2 (2010) 2530–2539. https://doi.org/10.1021/AM100313Z/SUPPL_FILE/AM100313Z_SI_001.PDF.
- [62] D.L. Kaiser, W. Nieh, S. Standridge, L. Friedersdorf, C.L. Geraci, F. Kronz, M.A. Meador, B.D. Pate, R.G. Rudnitsky, L.E. Slotter, D.M. Stepp, 2014 National Nanotechnology Initiative Strategic Plan, (2014). http://nano.gov/sites/default/files/pub_resource/2014_nni_strategic_plan.pdf (accessed January 9, 2024).
- [63] M. Gaspar Tosato, M. Bertuola, N.S. Fagali, V.C. Cajiao Checchin, A. Gonzalez, M.A. Fernandez Lorenzo, Applications of Volatile (Essential) Oils in Human Health: Biodegradable Biomaterials, *Volatile Oils: Production, Composition and Uses* (2022).

- [64] M. Gaspar Tosato, A. Gonzalez, V.C. Cajiao Checchin, M. Bertuola, N.S. Fagali, M.A. Fernandez Lorenzo, Applications of Volatile (Essential) Oils in Human Health: Cosmetic and Dental Applications, *Volatile Oils: Production, Composition and Uses* (2022). <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/170955> (accessed June 3, 2024).
- [65] V.C. Cajiao Checchin, A. Gonzalez, M. Bertuola, M.A. Fernández Lorenzo de Mele, Multifunctional coatings of phenolic phytochemicals of medical interest: Assembly methods and applications, *Prog Org Coat* 172 (2022) 107068. <https://doi.org/10.1016/J.PORGCOAT.2022.107068>.
- [66] V.C.C. Checchin, A. Gonzalez, D.I.A. Gamarra, N.S. Fagali, M.A.F.L. de Mele, Components of essential oils as building blocks of functional materials for nanomedicine metal-phenolic networks and self-assembly approaches, *Pharmacological Aspects of Essential Oils: Current and Future Trends* (2023) 55–76. <https://doi.org/10.1201/9781003389774-4/COMPONENTS-ESSENTIAL-OILS-BUILDING-BLOCKS-FUNCTIONAL-MATERIALS-NANOMEDICINE-CAJIAO-CHECCHIN-GONZALEZ-ARRIETA-GAMARRA-FAGALI-FERN>.
- [67] M. Bertuola, C.A. Grillo, M. Fernández Lorenzo de Mele, Reduction of copper ions release by a novel ecofriendly electropolymerized nanolayer obtained from a natural compound (carvacrol), *J Hazard Mater* 313 (2016) 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.086>.
- [68] H. Ejima, J.J. Richardson, K. Liang, J.P. Best, M.P. Van Koevreden, G.K. Such, J. Cui, F. Caruso, One-step assembly of coordination complexes for versatile film and particle engineering, *Science* (1979) 341 (2013) 154–157. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1237265/SUPPL_FILE/EJIMA.SM-CORRECTED.PDF.
- [69] Y. Li, Y. Miao, L. Yang, Y. Zhao, K. Wu, Z. Lu, Z. Hu, J. Guo, Recent Advances in the Development and Antimicrobial Applications of Metal–Phenolic Networks, *Advanced Science* 9 (2022) 2202684. <https://doi.org/10.1002/ADVS.202202684>.

- [70] H. Ejima, J.J. Richardson, F. Caruso, Metal-phenolic networks as a versatile platform to engineer nanomaterials and biointerfaces, *Nano Today* 12 (2017) 136–148. <https://doi.org/10.1016/J.NANTOD.2016.12.012>.
- [71] F. Hu, B. Liu, H. Chu, C. Liu, Z. Li, D. Chen, L. Li, Real-time monitoring of pH-responsive drug release using a metal-phenolic network-functionalized upconversion nanoconstruct, *Nanoscale* 11 (2019) 9201–9206. <https://doi.org/10.1039/c9nr01892a>.
- [72] T. Liu, M. Zhang, W. Liu, X. Zeng, X. Song, X. Yang, X. Zhang, J. Feng, Metal Ion/Tannic Acid Assembly as a Versatile Photothermal Platform in Engineering Multimodal Nanotheranostics for Advanced Applications, *ACS Nano* 12 (2018) 3917–3927. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b01456>.
- [73] W. Xie, Z. Guo, L. Zhao, Y. Wei, Metal-phenolic networks: facile assembled complexes for cancer theranostics, *Theranostics* 11 (2021) 6407–6426. <https://doi.org/10.7150/THNO.58711>.
- [74] B. Onat, S. Ozcubukcu, S. Banerjee, I. Erel-Goktepe, Osteoconductive layer-by-layer films of Poly(4-hydroxy-L-proline ester) (PHPE) and Tannic acid, *Eur Polym J* 103 (2018) 101–115. <https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2018.03.034>.
- [75] C. Chircov, I.I. Miclea, V. Grumezescu, A.M. Grumezescu, Essential oils for bone repair and regeneration—mechanisms and applications, *Materials* 14 (2021). <https://doi.org/10.3390/ma14081867>.
- [76] Y. Zhu, D. Zhou, X. Zan, Q. Ye, S. Sheng, Engineering the surfaces of orthopedic implants with osteogenesis and antioxidants to enhance bone formation in vitro and in vivo, *Colloids Surf B Biointerfaces* 212 (2022). <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2022.112319>.
- [77] S. Yang, Y. Wang, S. Luo, C. Shan, Y. Geng, T. Zhang, S. Sheng, X. Zan, Building polyphenol and gelatin films as implant coating, evaluating from in vitro and in vivo performances, *Colloids Surf B Biointerfaces* 181 (2019) 549–560. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2019.05.058>.
- [78] Q. Tang, X. Zhang, K. Shen, Z. Zhu, Y. Hou, M. Lai, Dual-functionalized titanium for enhancing osteogenic and antibacterial properties, *Colloids and Interface*

- [79] Q. Li, W. Xiao, F. Zhang, Q. Liu, J. Ye, H. Dong, X. Cao, Tannic acid-derived metal-phenolic networks facilitate PCL nanofiber mesh vascularization by promoting the adhesion and spreading of endothelial cells, *J Mater Chem B* 6 (2018) 2734–2738. <https://doi.org/10.1039/c8tb00350e>.
- [80] P. Wang, J. Liu, X. Luo, P. Xiong, S. Gao, J. Yan, Y. Li, Y. Cheng, T. Xi, A tannic acid-modified fluoride pre-treated Mg-Zn-Y-Nd alloy with antioxidant and platelet-repellent functionalities for vascular stent application, *J Mater Chem B* 7 (2019) 7314–7325. <https://doi.org/10.1039/C9TB01587F>.
- [81] Scientific Opinion on the safety evaluation of the active substances, sodium borohydride and palladium acetate for use in active food contact materials, *EFSA Journal* 10 (2012). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2642>.
- [82] A. Syafiuddin, Salmiati, M.R. Salim, A. Beng Hong Kueh, T. Hadibarata, H. Nur, A Review of Silver Nanoparticles: Research Trends, Global Consumption, Synthesis, Properties, and Future Challenges, *Journal of the Chinese Chemical Society* 64 (2017) 732–756. <https://doi.org/10.1002/JCCS.201700067>.
- [83] H.D. Beyene, A.A. Werkneh, H.K. Bezabh, T.G. Ambaye, Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles (AgNPs), a review, *Sustainable Materials and Technologies* 13 (2017) 18–23. <https://doi.org/10.1016/J.SUSMAT.2017.08.001>.
- [84] S.K. Srikar, D.D. Giri, D.B. Pal, P.K. Mishra, S.N. Upadhyay, S.K. Srikar, D.D. Giri, D.B. Pal, P.K. Mishra, S.N. Upadhyay, Green Synthesis of Silver Nanoparticles: A Review, *Green and Sustainable Chemistry* 6 (2016) 34–56. <https://doi.org/10.4236/GSC.2016.61004>.
- [85] S. Ahmed, M. Ahmad, B.L. Swami, S. Ikram, A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise, *J Adv Res* 7 (2016) 17–28. <https://doi.org/10.1016/J.JARE.2015.02.007>.
- [86] M.R. Khan, M.A. Urmi, C. Kamaraj, G. Malafaia, C. Ragavendran, M.M. Rahman, Green synthesis of silver nanoparticles with its bioactivity, toxicity and environmental applications: A comprehensive literature review, *Environ*

- Nanotechnol Monit Manag 20 (2023) 100872.
<https://doi.org/10.1016/J.ENMM.2023.100872>.
- [87] M. Rafique, I. Sadaf, M.S. Rafique, M.B. Tahir, A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications, *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 45 (2017) 1272–1291. <https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1241792>.
- [88] H. Wang, D. Chen, Y. Wei, Y. Chang, J. Zhao, A simple and sensitive assay of gallic acid based on localized surface plasmon resonance light scattering of silver nanoparticles through modified tollens process, *Analytical Sciences* 27 (2011) 937–941. <https://doi.org/10.2116/ANALSCI.27.937/METRICS>.
- [89] S.P. Chandran, M. Chaudhary, R. Pasricha, A. Ahmad, M. Sastry, Synthesis of Gold Nanotriangles and Silver Nanoparticles Using Aloe vera Plant Extract, *Biotechnol Prog* 22 (2006) 577–583. <https://doi.org/10.1021/BP0501423>.
- [90] T. Santhoshkumar, A.A. Rahuman, G. Rajakumar, S. Marimuthu, A. Bagavan, C. Jayaseelan, A.A. Zahir, G. Elango, C. Kamaraj, Synthesis of silver nanoparticles using *Nelumbo nucifera* leaf extract and its larvicidal activity against malaria and filariasis vectors, *Parasitol Res* 108 (2011) 693–702. <https://doi.org/10.1007/S00436-010-2115-4/METRICS>.
- [91] T. Santhoshkumar, A.A. Rahuman, G. Rajakumar, S. Marimuthu, A. Bagavan, C. Jayaseelan, A.A. Zahir, G. Elango, C. Kamaraj, Synthesis of silver nanoparticles using *Nelumbo nucifera* leaf extract and its larvicidal activity against malaria and filariasis vectors, *Parasitol Res* 108 (2011) 693–702. <https://doi.org/10.1007/S00436-010-2115-4/METRICS>.
- [92] T. Elavazhagan, K.D. Arunachalam, Memecylon edule leaf extract mediated green synthesis of silver and gold nanoparticles., *Int J Nanomedicine* 6 (2011) 1265–1278. <https://doi.org/10.2147/IJN.S18347>.
- [93] G. Rajakumar, A. Abdul Rahuman, Larvicidal activity of synthesized silver nanoparticles using *Eclipta prostrata* leaf extract against filariasis and malaria vectors, *Acta Trop* 118 (2011) 196–203. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2011.03.003>.

- [94] J. Kesharwani, K.Y. Yoon, J. Hwang, M. Rai, Phytofabrication of Silver Nanoparticles by Leaf Extract of *Datura metel*: Hypothetical Mechanism Involved in Synthesis, *Journal of Bionanoscience* 3 (2009) 39–44. <https://doi.org/10.1166/JBNS.2009.1008>.
- [95] J.E.G. González, J.C. Mirza-Rosca, Study of the corrosion behavior of titanium and some of its alloys for biomedical and dental implant applications, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 471 (1999) 109–115. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(99\)00260-0](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(99)00260-0).
- [96] E.J. Kelly, Electrochemical Behavior of Titanium, In *Modern Aspects of Electrochemistry*: 14 (1982) 319-424. Boston, MA: Springer US..
- [97] *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications* - Allen J. Bard, Larry R. Faulkner, Henry S. White - Google Libros, (n.d.). <https://books.google.cl/books?hl=es&lr=&id=Sct6EAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR21&dq=Bard,+A.+J.%3B+Faulkner,+L.+R.,+Electrochemical+Methods:+Fundamentals+and+applications.+John+Wiley+%26+Sons,+Inc.:+New+York,+2001.&ots=QV2mteHVTQ&sig=x-g8TfTy06Pws4NGf1c3jYz-gGM#v=onepage&q&f=false> (accessed January 10, 2024).
- [98] J. Viviana, M. Girón, D.: María, E. Vela Co -Directora, R. Vico, UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS DEPARTAMENTO DE QUÍMICA, 2016.
- [99] Badea G E, Caraban A, Sebesan M, Cret P, Setel A, POLARISATION MEASUREMENTS USED FOR CORROSION RATES DETERMINATION, *JOURNAL OF SUSTENABLE ENERGY* 1 (2010).
- [100] L. Barbes, C. Radulescu, C. Stih, L. Barbeş, C. Rădulescu, C. Stih, ATR-FTIR spectrometry characterisation of polymeric materials, 2014. <https://www.researchgate.net/publication/256297992>.
- [101] A. Montano, Fundamentos de la espectroscopía UV-visible moderna, (n.d.). https://www.academia.edu/21932456/Fundamentos_de_la_espectroscop%C3%Aa_Da_UV_visible_moderna (accessed January 10, 2024).

- [102] R.C. Murdock, L. Braydich-Stolle, A.M. Schrand, J.J. Schlager, S.M. Hussain, Characterization of Nanomaterial Dispersion in Solution Prior to In Vitro Exposure Using Dynamic Light Scattering Technique, *Toxicological Sciences* 101 (2008) 239–253. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFM240>.
- [103] K. Okitsu, UV-VIS spectroscopy for characterization of metal nanoparticles formed from reduction of metal ions during ultrasonic irradiation, *UV-VIS and Photoluminescence Spectroscopy for Nanomaterials Characterization* (2013) 151–177. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27594-4_4/COVER.
- [104] D.Y. Kwok, A.W. Neumann, Contact angle measurement and contact angle interpretation, *Adv Colloid Interface Sci* 81 (1999) 167–249. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(98\)00087-6](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(98)00087-6).
- [105] D.A. Skoog, Fj. Holler, S.R. Crouch, *Principios de análisis instrumental*, n.d. www.FreeLibros.me.
- [106] E. Meyer, R. Bennewitz, H.J. Hug, *Scanning Probe Microscopy*, (2021). <https://doi.org/10.1007/978-3-030-37089-3>.
- [107] E.A. López-Guerra, *El microscopio de fuerza atómica: métodos y aplicaciones*, 2014. <https://www.researchgate.net/publication/344291604>.
- [108] E.S. Gadelmawla, M.M. Koura, T.M.A. Maksoud, I.M. Elewa, H.H. Soliman, Roughness parameters, n.d.
- [109] M. Hinojosa, *La rugosidad de las superficies: Topometría*, 2015. <https://www.researchgate.net/publication/279751735>.
- [110] S. Bhattacharjee, DLS and zeta potential – What they are and what they are not?, *Journal of Controlled Release* 235 (2016) 337–351. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.06.017>.
- [111] *Dispersión de luz dinámica: definición de términos comunes - Guíalab*, (n.d.). <https://www.guialab.com.ar/notas-tecnicas/dls> (accessed June 1, 2024).
- [112] J. Rodríguez-Loya, M. Lerma, J.L. Gardea-Torresdey, Dynamic Light Scattering and Its Application to Control Nanoparticle Aggregation in Colloidal Systems: A Review, *Micromachines* 2024, Vol. 15, Page 24 15 (2023) 24. <https://doi.org/10.3390/M15010024>.

- [113] D. Krewski, D. Acosta, M. Andersen, H. Anderson, J.C. Bailar, K. Boekelheide, R. Brent, G. Charnley, V.G. Cheung, S. Green, K.T. Kelsey, N.I. Kerkvliet, A.A. Li, L. McCray, O. Meyer, R.D. Patterson, W. Pennie, R.A. Scala, G.M. Solomon, M. Stephens, J. Yager, L. Zeise, Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 13 (2010) 51–138. <https://doi.org/10.1080/10937404.2010.483176>.
- [114] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods* 65 (1983) 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [115] E. Borenfreund, J.A. Puerner, Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicol Lett* 24 (1985) 119–124. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(85\)90046-3](https://doi.org/10.1016/0378-4274(85)90046-3).
- [116] M. Hayashi, T. Sofuni, M. Ishidate, An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Research Letters* 120 (1983) 241–247. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(83\)90096-9](https://doi.org/10.1016/0165-7992(83)90096-9).
- [117] M.S. Molinuevo, L. Schurman, A.D. McCarthy, A.M. Cortizo, M.J. Tolosa, M.V. Gangoiti, V. Arnol, C. Sedlinsky, Effect of metformin on bone marrow progenitor cell differentiation: In vivo and in vitro studies, *Journal of Bone and Mineral Research* 25 (2010) 211–221. <https://doi.org/10.1359/JBMR.090732>.
- [118] A. Brauer, T. Pohlemann, W. Metzger, Osteogenic differentiation of immature osteoblasts: Interplay of cell culture media and supplements, *Biotechnic & Histochemistry* 91 (2016) 161–169. <https://doi.org/10.3109/10520295.2015.1110254>.
- [119] C.M. Stanford, P.A. Jacobson, E.D. Eanes, L.A. Lembke, R.J. Midura, Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP), *Journal of Biological Chemistry* 270 (1995) 9420–9428. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.16.9420>.
- [120] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72 (1976) 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

- [121] F. Fitzpatrick, H. Humphreys, J.P. O’Gara, The genetics of staphylococcal biofilm formation - Will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection?, *Clinical Microbiology and Infection* 11 (2005) 967–973. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01274.x>.
- [122] S. Periasamy, H.S. Joo, A.C. Duong, T.H.L. Bach, V.Y. Tan, S.S. Chatterjee, G.Y.C. Cheung, M. Otto, How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure, *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (2012) 1281–1286. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115006109>.
- [123] E. Cervantes-García, R. García-González, P. María Salazar-Schettino, Características generales del *Staphylococcus aureus*, 2014. www.medigraphic.com/patologiaclinicawww.medigraphic.org.mx.
- [124] Microbiología e Higiene Alimentaria: Práctica: Tinción de Gram, (n.d.). <https://higienealimentariorsantosmay.blogspot.com/2017/02/practica-tincion-de-gram.html> (accessed January 10, 2024).
- [125] Y.H.E. Mohammed, H.M. Manukumar, K.P. Rakesh, C.S. Karthik, P. Mallu, H.L. Qin, Vision for medicine: *Staphylococcus aureus* biofilm war and unlocking key’s for anti-biofilm drug development, *Microb Pathog* 123 (2018) 339–347. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2018.07.002>.
- [126] T.I. Nicas, R.E.W. Hancock, *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane permeability: isolation of a porin protein F-deficient mutant, *J Bacteriol* 153 (1983) 281–285. <https://doi.org/10.1128/JB.153.1.281-285.1983>.
- [127] J.B. Lyczak, C.L. Cannon, G.B. Pier, Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist, 2000.
- [128] *Pseudomonas* | Good Mood, (n.d.). <https://goodmood-photobooth.com/es/pseudomonas-6/> (accessed January 10, 2024).
- [129] A.B.H. Khalifa, D. Moissenet, H.V. Thien, M. Khedher, Les facteurs de virulence de *pseudomonas aeruginosa*: Mécanismes et modes de régulations, *Ann Biol Clin (Paris)* 69 (2011) 393–403. <https://doi.org/10.1684/abc.2011.0589>.

- [130] E.B.M. Breidenstein, C. de la Fuente-Núñez, R.E.W. Hancock, *Pseudomonas aeruginosa*: All roads lead to resistance, *Trends Microbiol* 19 (2011) 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>.
- [131] B. Li, Y. Zhao, C. Liu, Z. Chen, D. Zhou, Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*, *Future Microbiol* 9 (2014) 1071–1081. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.48>.
- [132] *Klebsiella Pneumoniae Gram Stain / Micro-Lab Mid Term at Auburn University at Montgomery ...*: ·streptococcus pneumoniae ·haemophilus influenzae ·staphylococcus aureus1 ·энтеробактерии: - lenikur, (n.d.). <https://lenikur.blogspot.com/2021/07/klebsiella-pneumoniae-gram-stain-micro.html> (accessed January 10, 2024).
- [133] J. Jagnow, S. Clegg, *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces, *Microbiology (N Y)* 149 (2003) 2397–2405. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26434-0>.
- [134] C. Schroll, K.B. Barken, K.A. Krogfelt, C. Struve, Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation, *BMC Microbiol* 10 (2010). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-179>.
- [135] L.S. Munoz-Price, L. Poirel, R.A. Bonomo, M.J. Schwaber, G.L. Daikos, M. Cormican, G. Cornaglia, J. Garau, M. Gniadkowski, M.K. Hayden, K. Kumarasamy, D.M. Livermore, J.J. Maya, P. Nordmann, J.B. Patel, D.L. Paterson, J. Pitout, M.V. Villegas, H. Wang, N. Woodford, J.P. Quinn, Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases, *Lancet Infect Dis* 13 (2013) 785–796. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70190-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70190-7).
- [136] F. Ghilini, Multifuncionalización de superficies de titanio con nanopartículas de plata y biomoléculas para mejorar el desempeño de dispositivos implantables, (2020). <https://doi.org/10.35537/10915/93242>.
- [137] J.M. Andrews, Determination of minimum inhibitory concentrations, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48 (2001) 5–16. https://doi.org/10.1093/JAC/48.SUPPL_1.5.

- [138] J.M. Schuurmans, A.S. Nuri Hayali, B.B. Koenders, B.H. ter Kuile, Variations in MIC value caused by differences in experimental protocol, *J Microbiol Methods* 79 (2009) 44–47. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.07.017>.
- [139] L.J. V. Piddock, Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria., *Journal of Applied Bacteriology* 68 (1990) 307–318.
- [140] Z. Yuan, Y. Dai, P. Ouyang, T. Rehman, S. Hussain, T. Zhang, Z. Yin, H. Fu, J. Lin, C. He, C. Lv, X. Liang, G. Shu, X. Song, L. Li, Y. Zou, L. Yin, Thymol Inhibits Biofilm Formation, Eliminates Pre-Existing Biofilms, and Enhances Clearance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a Mouse Peritoneal Implant Infection Model, *Microorganisms* 2020, Vol. 8, Page 99 8 (2020) 99. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8010099>.
- [141] M. Bertuola, C.A. Grillo, M. Fernández Lorenzo de Mele, Eradication of burst release of copper ions from copper-bearing IUDs by a phytocompound-based electropolymeric coating, *Mater Lett* 252 (2019) 317–320. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.06.009>.
- [142] M. Bertuola, C.A. Grillo, D.E. Pissinis, E.D. Prieto, M. Fernández Lorenzo de Mele, Is the biocompatibility of copper with polymerized natural coating dependent on the potential selected for the electropolymerization process?, *Colloids Surf B Biointerfaces* 159 (2017) 673–683. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.08.029>.
- [143] M. Bertuola, A. Miñán, C.A. Grillo, M.C. Cortizo, M.A. Fernández Lorenzo de Mele, Corrosion protection of AZ31 alloy and constrained bacterial adhesion mediated by a polymeric coating obtained from a phytocompound, *Colloids Surf B Biointerfaces* 172 (2018) 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.025>.
- [144] M. Bertuola, D.E. Pissinis, A.A. Rubert, E.D. Prieto, M.A. Fernández Lorenzo de Mele, Impact of molecular structure of two natural phenolic isomers on the protective characteristics of electropolymerized nanolayers formed on copper, *Electrochim Acta* 215 (2016) 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.08.100>.

- [145] J.B. Engel, C. Heckler, E.C. Tondo, D.J. Daroit, P. da Silva Malheiros, Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel, *Int J Food Microbiol* 252 (2017) 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.003>.
- [146] H.M. Manukumar, S. Umesha, H.N.N. Kumar, Promising biocidal activity of thymol loaded chitosan silver nanoparticles (T-C@AgNPs) as anti-infective agents against perilous pathogens, *Int J Biol Macromol* 102 (2017) 1257–1265. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.030>.
- [147] M. Ramos, E. Fortunati, M. Peltzer, A. Jimenez, J.M. Kenny, M.C. Garrigós, Characterization and disintegrability under composting conditions of PLA-based nanocomposite films with thymol and silver nanoparticles, *Polym Degrad Stab* 132 (2016) 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.05.015>.
- [148] J. Rúa, P. Del Valle, D. De Arriaga, L. Fernández-Álvarez, M.R. García-Armesto, Combination of Carvacrol and Thymol: Antimicrobial Activity Against *Staphylococcus aureus* and Antioxidant Activity, *Foodborne Pathog Dis* 16 (2019) 622–629. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2594>.
- [149] A. Hartono, M. Djamal, S. Satira, Herman, Ramli, Preparation of PVDF film using deep coating method for biosensor transducer applied, *Proc. of 2013 3rd Int. Conf. on Instrumentation, Communications, Information Technol., and Biomedical Engineering: Science and Technol. for Improvement of Health, Safety, and Environ., ICICI-BME 2013* (2013) 408–411. <https://doi.org/10.1109/ICICI-BME.2013.6698536>.
- [150] A Comparative Study of the Effect of Cellulose-based Deep Coating and Pulp Refining on the Structural and Mechanical Properties of Paper. | BioResources | EBSCOhost, (n.d.). <https://openurl.ebsco.com/EPDB%3Agcd%3A16%3A583904/detailv2?sid=ebsco%3Aplink%3Ascholar&id=ebsco%3Agcd%3A151907799&crl=c> (accessed January 10, 2024).
- [151] I. Lee, N. Loew, W. Tsugawa, K. Ikebukuro, K. Sode, Development of a third-generation glucose sensor based on the open circuit potential for continuous

- glucose monitoring, *Biosens Bioelectron* 124–125 (2019) 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.09.099>.
- [152] Y. Hu, Z. Wang, J. Ai, S. Bu, H. Liu, Preparation of coating on the titanium surface by micro-arc oxidation to improve corrosion resistance, *Coatings* 11 (2021) 1–16. <https://doi.org/10.3390/coatings11020230>.
- [153] Y. Feng, Z. Du, Z. Hu, Effect of Ni Addition on the Corrosion Resistance of NiTi Alloy Coatings on AISI 316L Substrate Prepared by Laser Cladding, *Coatings* 2021, Vol. 11, Page 1139 11 (2021) 1139. <https://doi.org/10.3390/COATINGS11091139>.
- [154] A.N. Gravina, A.A. Rubert, M. Bertuola, M. Fernández Lorenzo de Mele, Bioactivity enhancement of cerium-containing titanium oxide nanotubes. Relationship between surface reactivity and nanostructuring process, *Surf Coat Technol* 378 (2019) 124968. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.124968>.
- [155] V.B. Baez, J.E. Graves, D. Pletcher, The reduction of oxygen on titanium oxide electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 340 (1992) 273–286. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(92\)80303-L](https://doi.org/10.1016/0022-0728(92)80303-L).
- [156] C.C. Chen, W.C. Say, S.J. Hsieh, E.W.G. Diau, A mechanism for the formation of annealed compact oxide layers at the interface between anodic titania nanotube arrays and Ti foil, *Appl Phys A Mater Sci Process* 95 (2009) 889–898. <https://doi.org/10.1007/S00339-009-5093-6/METRICS>.
- [157] A.C.S. Valderrama, G.C.R. De, A.C.S. Valderrama, G.C.R. De, Traceability of Active Compounds of Essential Oils in Antimicrobial Food Packaging Using a Chemometric Method by ATR-FTIR, *Am J Analyt Chem* 8 (2017) 726–741. <https://doi.org/10.4236/AJAC.2017.811053>.
- [158] H. Schulz, R. Quilitzsch, H. Krüger, Rapid evaluation and quantitative analysis of thyme, origano and chamomile essential oils by ATR-IR and NIR spectroscopy, *J Mol Struct* 661–662 (2003) 299–306. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(03\)00517-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(03)00517-9).
- [159] V.C. Friné, A.P. Hector, N.D.S. Manuel, N.D. Estrella, G.J. Antonio, Development and characterization of a biodegradable PLA food packaging hold monoterpene-

- cyclodextrin complexes against *Alternaria alternata*, *Polymers (Basel)* 11 (2019).
<https://doi.org/10.3390/polym11101720>.
- [160] A. Cozzolino, C. Botta, C. Daniel, P. Rizzo, Thymol and Carvacrol: Phenolic Monoterpenes Extracted from the Essential Oil of *Thymus vulgaris* as Natural Antimicrobial Guests of Nanoporous Crystalline Syndiotactic Polystyrene Fibers, *Macromol Symp* 408 (2023) 2200064. <https://doi.org/10.1002/MASY.202200064>.
- [161] E. Mangiacapre, A. Triolo, F. Ramondo, F. Lo Celso, O. Russina, Unveiling the structural organisation of carvacrol through X-ray scattering and molecular Dynamics: A comparative study with liquid thymol, *J Mol Liq* 394 (2024) 123778. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2023.123778>.
- [162] L. Guo, H. Sato, T. Hashimoto, Y. Ozaki, FTIR study on hydrogen-bonding interactions in biodegradable polymer blends of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(4-vinylphenol), *Macromolecules* 43 (2010) 3897–3902. <https://doi.org/10.1021/ma100307m>.
- [163] S.W. Kuo, Hydrogen-bonding in polymer blends, *Journal of Polymer Research* 15 (2008) 459–486. <https://doi.org/10.1007/s10965-008-9192-4>.
- [164] S.-W. Kuo, S.-C. Chan, F.-C. Chang, Miscibility enhancement on the immiscible binary blend of poly(vinyl acetate) and poly(vinyl pyrrolidone) with bisphenol A, *Polymer (Guildf)* 43 (2002) 3653–3660. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(02\)00167-2](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(02)00167-2).
- [165] L. Guo, H. Sato, T. Hashimoto, Y. Ozaki, FTIR study on hydrogen-bonding interactions in biodegradable polymer blends of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(4-vinylphenol), *Macromolecules* 43 (2010) 3897–3902. <https://doi.org/10.1021/ma100307m>.
- [166] S.W. Kuo, Hydrogen-bonding in polymer blends, *Journal of Polymer Research* 15 (2008) 459–486. <https://doi.org/10.1007/s10965-008-9192-4>.
- [167] B. Fei, C. Chen, S. Peng, X. Zhao, X. Wang, L. Dong, FTIR study of poly(propylene carbonate)/bisphenol A blends, *Polym Int* 53 (2004) 2092–2098. <https://doi.org/10.1002/PI.1633>.

- [168] M. Gattrell, D.W. Kirk, A Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study of the Passive Film Produced During Aqueous Acidic Phenol Electro-Oxidation, *J Electrochem Soc* 139 (1992) 2736–2744. <https://doi.org/10.1149/1.2068972>.
- [169] A. Ciszewski, G. Milczarek, Preparation and general properties of chemically modified electrodes based on electrosynthesized thin polymeric films derived from eugenol, *Electroanalysis* 13 (2001) 860–867. [https://doi.org/10.1002/1521-4109\(200106\)13:10<860::AID-ELAN860>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1521-4109(200106)13:10<860::AID-ELAN860>3.0.CO;2-R).
- [170] A.G. Al Lafi, FTIR spectroscopic analysis of ion irradiated poly (ether ether ketone), *Polym Degrad Stab* 105 (2014) 122–133. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2014.04.005>.
- [171] G. Nikolic, S. Zlatkovic, M. Cakic, S. Cakic, C. Lacnjevac, Z. Rajic, Fast Fourier Transform IR Characterization of Epoxy GY Systems Crosslinked with Aliphatic and Cycloaliphatic EH Polyamine Adducts, *Sensors* 2010, Vol. 10, Pages 684-696 10 (2010) 684–696. <https://doi.org/10.3390/S100100684>.
- [172] M. Pham, F. Adami, J. Dubois, An In Situ Multiple Internal Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy Investigation of the Electropolymerization Mechanism of Substituted Phenols on Iron Electrodes, *J Electrochem Soc* 134 (1987) 2166–2169. <https://doi.org/10.1149/1.2100844/XML>.
- [173] H.X. Nguyen, H. Ishida, Molecular analysis of the melting behaviour of poly(aryl-ether-ether-ketone), *Polymer (Guildf)* 27 (1986) 1400–1405. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(86\)90041-8](https://doi.org/10.1016/0032-3861(86)90041-8).
- [174] I. Poljanšek, M. Krajnc, Poljanšek and Krajnc Characterization of Phenol-Formaldehyde Prepolymer Resins, 2005.
- [175] O. Abbas, C. Rebufa, N. Dupuy, J. Kister, FTIR—Multivariate curve resolution monitoring of photo-Fenton degradation of phenolic aqueous solutions: Comparison with HPLC as a reference method, *Talanta* 77 (2008) 200–209. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2008.06.008>.
- [176] M. Ramos, A. Beltrán, M. Peltzer, A.J.M. Valente, M. del C. Garrigós, Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active

- packaging films, *LWT - Food Science and Technology* 58 (2014) 470–477. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2014.04.019>.
- [177] S. Morsch, S. Lyon, P. Greensmith, S.D. Smith, S.R. Gibbon, Mapping water uptake in organic coatings using AFM-IR, *Faraday Discuss* 180 (2015) 527–542. <https://doi.org/10.1039/C4FD00229F>.
- [178] J.B. Engel, C. Heckler, E.C. Tondo, D.J. Daroit, P. da Silva Malheiros, Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel, *Int J Food Microbiol* 252 (2017) 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.003>.
- [179] G. Pelin, C.E. Pelin, A. Stefan, I. Dinca, A. Ficai, E. Andronescu, R. Trusca, Influence of nanometric silicon carbide on phenolic resin composites properties, *Bulletin of Materials Science* 39 (2016) 769–775. <https://doi.org/10.1007/s12034-016-1185-z>.
- [180] L. Guo, Y. Yang, F. Xu, Q. Lan, M. Wei, Y. Wang, Design of gradient nanopores in phenolics for ultrafast water permeation, *Chem Sci* 10 (2019) 2093–2100. <https://doi.org/10.1039/C8SC03012J>.
- [181] L. Guo, M. Steinhart, Y. Yang, L. Zhu, Tailored pore gradient in phenolic membranes for adjustable permselectivity by leveraging different poloxamers, *Sep Purif Technol* 242 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.116818>.
- [182] J. Xu, F. Zhou, B. Ji, R. Pei, N. Xu, The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*, 47 (2008) 174–179. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02407.x>.
- [183] A. Ben Arfa, S. Combes, L. Preziosi-Belloy, N. Gontard, P. Chalier, Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure, *Lett Appl Microbiol* 43 (2006) 149–154. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x>.
- [184] A. Marchese, I.E. Orhan, M. Daglia, R. Barbieri, A. Di Lorenzo, S.F. Nabavi, O. Gortzi, M. Izadi, S.M. Nabavi, Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature, *Food Chem* 210 (2016) 402–414. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.04.111>.

- [185] D. Trombetta, F. Castelli, M.G. Sarpietro, V. Venuti, M. Cristani, C. Daniele, A. Saija, G. Mazzanti, G. Bisignano, Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes, *Antimicrob Agents Chemother* 49 (2005) 2474–2478. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005>.
- [186] M. Walczak, M. Michalska-Sionkowska, B. Kaczmarek, A. Sionkowska, Surface and antibacterial properties of thin films based on collagen and thymol, *Mater Today Commun* 22 (2020) 100949. <https://doi.org/10.1016/J.MTCOMM.2020.100949>.
- [187] A. Ultee, M.H.J. Bennik, R. Moezelaar, The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*, *Appl Environ Microbiol* 68 (2002) 1561–1568. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002>.
- [188] K. Myszka, M.T. Schmidt, M. Majcher, W. Juzwa, M. Olkowicz, K. Czaczyk, Inhibition of quorum sensing-related biofilm of *Pseudomonas fluorescens* KM121 by *Thymus vulgare* essential oil and its major bioactive compounds, *Int Biodeterior Biodegradation* 114 (2016) 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.07.006>.
- [189] K. Kachur, Z. Suntres, The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol, *Crit Rev Food Sci Nutr* 60 (2020) 3042–3053. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1675585>.
- [190] A.A. Vu, S. Bose, Natural Antibiotic Oregano in Hydroxyapatite-Coated Titanium Reduces Osteoclastic Bone Resorption for Orthopedic and Dental Applications, *ACS Appl Mater Interfaces* 12 (2020) 52383–52392. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c14993>.
- [191] M.D. Pereda, M. Reigosa, M. Fernández Lorenzo de Mele, Relationship between radial diffusion of copper ions released from a metal disk and cytotoxic effects. Comparison with results obtained using extracts, *Bioelectrochemistry* 72 (2008) 94–101. <https://doi.org/10.1016/J.BIOELECTHEM.2007.11.008>.
- [192] A. Nostro, A. Marino, G. Ginestra, L. Cellini, M. Di Giulio, G. Bisignano, Effects of adaptation to carvacrol on *Staphylococcus aureus* in the planktonic and biofilm phases, *Biofouling* 33 (2017) 470–480. <https://doi.org/10.1080/08927014.2017.1323080>.

- [193] A. Nostro, R. Scaffaro, L. Botta, A. Filocamo, A. Marino, G. Bisignano, Effect of temperature on the release of carvacrol and cinnamaldehyde incorporated into polymeric systems to control growth and biofilms of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Biofouling* 31 (2015) 639–649. <https://doi.org/10.1080/08927014.2015.1079703>.
- [194] A. Nostro, L. Cellini, V. Zimbalatti, A.R. Blanco, A. Marino, F. Pizzimenti, M. Di Giulio, G. Bisignano, Enhanced activity of carvacrol against biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in an acidic environment, *Apmis* 120 (2012) 967–973. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2012.02928.x>.
- [195] S.A. Burt, V.T.A. Ojo-Fakunle, J. Woertman, E.J.A. Veldhuizen, The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations, *PLoS One* 9 (2014) 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093414>.
- [196] J. Inamuco, A.K.J. Veenendaal, S.A. Burt, J.A. Post, J.L.M. Tjeerdsma-van Bokhoven, H.P. Haagsman, E.J.A. Veldhuizen, Sub-lethal levels of carvacrol reduce *Salmonella Typhimurium* motility and invasion of porcine epithelial cells, *Vet Microbiol* 157 (2012) 200–207. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2011.12.021>.
- [197] L.B. van Alphen, S.A. Burt, A.K.J. Veenendaal, N.M.C. Bleumink-Pluym, J.P.M. van Putten, The Natural Antimicrobial Carvacrol Inhibits *Campylobacter jejuni* Motility and Infection of Epithelial Cells, *PLoS One* 7 (2012) e45343. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0045343>.
- [198] M. Sapkota, L. Li, S.W. Kim, Y. Soh, Thymol inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis in RAW264.7 and BMM cells and LPS-induced bone loss in mice, *Food and Chemical Toxicology* 120 (2018) 418–429. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.032>.
- [199] F. Bouhtit, M. Najar, S. Rahmani, R. Melki, M. Najimi, K. Sadki, N. Boukhatem, J.C. Twizere, N. Meuleman, P. Lewalle, L. Lagneaux, M. Merimi, Bioscreening and pre-clinical evaluation of the impact of bioactive molecules from *Ptychotis verticillata* on the multilineage potential of mesenchymal stromal cells towards

- immune- and inflammation-mediated diseases, *Inflammation Research* 71 (2022) 887–898. <https://doi.org/10.1007/s00011-022-01573-3>.
- [200] F. Bouhtit, M. Najar, D.M. Agha, R. Melki, M. Najimi, K. Sadki, P. Lewalle, A. Hamal, L. Lagneaux, M. Merimi, The biological response of mesenchymal stromal cells to thymol and carvacrol in comparison to their essential oil: An innovative new study, *Food and Chemical Toxicology* 134 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110844>.
- [201] C.W. Chan, I. Hussain, D.G. Waugh, J. Lawrence, H.C. Man, Effect of laser treatment on the attachment and viability of mesenchymal stem cell responses on shape memory NiTi alloy, *Materials Science and Engineering: C* 42 (2014) 254–263. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2014.05.022>.
- [202] N. Marín-Pareja, E. Salvagni, J. Guillem-Martí, C. Aparicio, M.P. Ginebra, Collagen-functionalised titanium surfaces for biological sealing of dental implants: Effect of immobilisation process on fibroblasts response, *Colloids Surf B Biointerfaces* 122 (2014) 601–610. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2014.07.038>.
- [203] X. Miao, D. Wang, L. Xu, J. Wang, D. Zeng, S. Lin, C. Huang, X. Liu, X. Jiang, The response of human osteoblasts, epithelial cells, fibroblasts, macrophages and oral bacteria to nanostructured titanium surfaces: A systematic study, *Int J Nanomedicine* 12 (2017) 1415–1430. <https://doi.org/10.2147/IJN.S126760>.
- [204] T.P. Kunzler, T. Drobek, M. Schuler, N.D. Spencer, Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients, *Biomaterials* 28 (2007) 2175–2182. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2007.01.019>.
- [205] M.F. Tano de la Hoz, M.R. Katunar, A. González, A. Gomez Sanchez, A.O. Díaz, S. Ceré, Effect of anodized zirconium implants on early osseointegration process in adult rats: a histological and histomorphometric study, *Prog Biomater* 8 (2019) 249–260. <https://doi.org/10.1007/s40204-019-00124-0>.
- [206] R.M. Hoerth, M.R. Katunar, A. Gomez Sanchez, J.C. Orellano, S.M. Ceré, W. Wagermaier, J. Ballarre, A comparative study of zirconium and titanium implants

- in rat: Osseointegration and bone material quality, *J Mater Sci Mater Med* 25 (2014) 411–422. <https://doi.org/10.1007/S10856-013-5074-3>/METRICS.
- [207] M.R. Katunar, A. Gomez Sanchez, A. Santos Coquillat, A. Civantos, E. Martinez Campos, J. Ballarre, T. Vico, M. Baca, V. Ramos, S. Cere, In vitro and in vivo characterization of anodised zirconium as a potential material for biomedical applications, *Materials Science and Engineering: C* 75 (2017) 957–968. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2017.02.139>.
- [208] D.P., C.S.J. Tarnow, The single-tooth implant : a minimally invasive approach for anterior and posterior extraction sockets, (No Title) (n.d.). <https://cir.nii.ac.jp/crid/1130003903785567744> (accessed June 3, 2024).
- [209] G. Yun, S. Pan, T.Y. Wang, J. Guo, J.J. Richardson, F. Caruso, Synthesis of Metal Nanoparticles in Metal-Phenolic Networks: Catalytic and Antimicrobial Applications of Coated Textiles, *Adv Healthc Mater* 7 (2018). <https://doi.org/10.1002/adhm.201700934>.
- [210] J. Park, S. Choi, H. Moon, H. Seo, J. Kim, S.P. Hong, B. Lee, E. Kang, J. Lee, D. Ryu, I.S. Choi, Antimicrobial spray nanocoating of supramolecular Fe(III)-tannic acid metal-organic coordination complex: Applications to shoe insoles and fruits, *Sci Rep* 7 (2017) 3–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07257-x>.
- [211] F. Gamna, S. Yamaguchi, A. Cochis, S. Ferraris, A. Kumar, L. Rimondini, S. Spriano, Conferring Antioxidant Activity to an Antibacterial and Bioactive Titanium Surface through the Grafting of a Natural Extract, *Nanomaterials* 13 (2023) 479. <https://doi.org/10.3390/NANO13030479/S1>.
- [212] F. Behboodi-Sadabad, H. Zhang, V. Trouillet, A. Welle, N. Plumeré, P.A. Levkin, UV-Triggered Polymerization, Deposition, and Patterning of Plant Phenolic Compounds, *Adv Funct Mater* 27 (2017). <https://doi.org/10.1002/adfm.201700127>.
- [213] X. Du, L. Li, J. Li, C. Yang, N. Frenkel, A. Welle, S. Heissler, A. Nefedov, M. Grunze, P.A. Levkin, UV-Triggered Dopamine Polymerization: Control of Polymerization, Surface Coating, and Photopatterning, *Advanced Materials* 26 (2014) 8029–8033. <https://doi.org/10.1002/ADMA.201403709>.

- [214] T. Shutava, M. Prouty, D. Kommireddy, Y. Lvov, pH responsive decomposable layer-by-layer nanofilms and capsules on the basis of tannic acid, *Macromolecules* 38 (2005) 2850–2858. <https://doi.org/10.1021/ma047629x>.
- [215] A.R. Boccaccini, S. Keim, R. Ma, Y. Li, I. Zhitomirsky, Electrophoretic deposition of biomaterials, *J R Soc Interface* 7 Suppl 5 (2010). <https://doi.org/10.1098/RSIF.2010.0156.FOCUS>.
- [216] D. Luo, T. Zhang, I. Zhitomirsky, Electrophoretic deposition of tannic acid – polypyrrolidone films and composites, *J Colloid Interface Sci* 469 (2016) 177–183. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2016.02.027>.
- [217] M. Asgari, Y. Yang, S. Yang, Z. Yu, P.K.D.V. Yarlagadda, Y. Xiao, Z. Li, Mg-Phenolic Network Strategy for Enhancing Corrosion Resistance and Osteocompatibility of Degradable Magnesium Alloys, *ACS Omega* 4 (2019) 21931–21944. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02976>.
- [218] H.P. Lee, D.J. Lin, M.L. Yeh, Phenolic modified ceramic coating on biodegradable Mg alloy: The improved corrosion resistance and osteoblast-like cell activity, *Materials* 10 (2017). <https://doi.org/10.3390/ma10070696>.
- [219] S. Geißler, A. Barrantes, P. Tengvall, P.B. Messersmith, H. Tiainen, Deposition Kinetics of Bioinspired Phenolic Coatings on Titanium Surfaces, *Langmuir* 32 (2016) 8050–8060. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b01959>.
- [220] F. Behboodi-Sadabad, H. Zhang, V. Trouillet, A. Welle, N. Plumeré, P.A. Levkin, UV-Triggered Polymerization, Deposition, and Patterning of Plant Phenolic Compounds, *Adv Funct Mater* 27 (2017). <https://doi.org/10.1002/adfm.201700127>.
- [221] X. Zhao, N. Jia, L. Cheng, L. Liu, C. Gao, Metal-polyphenol coordination networks: Towards engineering of antifouling hybrid membranes via in situ assembly, *J Memb Sci* 563 (2018) 435–446. <https://doi.org/10.1016/J.MEMSCI.2018.06.014>.
- [222] I.Y. Tóth, M. Szekeres, R. Turcu, S. Sáringer, E. Illés, D. Nesztor, E. Tombácz, Mechanism of in situ surface polymerization of gallic acid in an environmental-inspired preparation of carboxylated core-shell magnetite nanoparticles, *Langmuir*

https://doi.org/10.1021/LA5038102/SUPPL_FILE/LA5038102_SI_001.PDF.

- [223] W. Xie, Z. Guo, L. Zhao, Y. Wei, Metal-phenolic networks: facile assembled complexes for cancer theranostics, *Theranostics* 11 (2021) 6407. <https://doi.org/10.7150/THNO.58711>.
- [224] H.T. Zheng, H.L. Bui, S. Chakroborty, Y. Wang, C.J. Huang, Pegylated Metal-Phenolic Networks for Antimicrobial and Antifouling Properties, *Langmuir* 35 (2019) 8829–8839. https://doi.org/10.1021/ACS.LANGMUIR.9B01196/SUPPL_FILE/LA9B01196_SI_001.PDF.
- [225] Y. Wen, X. Yang, Y. Li, L. Yan, Y. Zhao, L. Shao, Progress reports of metal-phenolic network engineered membranes for water treatment, *Sep Purif Technol* 320 (2023) 124225. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2023.124225>.
- [226] A. Espina, S. Sanchez-Cortes, Z. Jurašeková, Vibrational Study (Raman, SERS, and IR) of Plant Gallnut Polyphenols Related to the Fabrication of Iron Gall Inks, *Molecules* 27 (2022). <https://doi.org/10.3390/molecules27010279>.
- [227] S. Selvaraj, P. Rajkumar, K. Thirunavukkarasu, S. Gunasekaran, S. Kumaresan, Vibrational (FT-IR and FT-Raman), electronic (UV–vis) and quantum chemical investigations on pyrogallol: A study on benzenetriol dimers, *Vib Spectrosc* 95 (2018) 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2018.01.003>.
- [228] S. Geißler, A. Barrantes, P. Tengvall, P.B. Messersmith, H. Tiainen, Deposition Kinetics of Bioinspired Phenolic Coatings on Titanium Surfaces, *Langmuir* 32 (2016) 8050–8060. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b01959>.
- [229] N. Hirun, S. Dokmaisrijan, V. Tantishaiyakul, Experimental FTIR and theoretical studies of gallic acid–acetonitrile clusters, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 86 (2012) 93–100. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2011.10.009>.
- [230] A. Ricci, K.J. Olejar, G.P. Parpinello, P.A. Kilmartin, A. Versari, Application of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy in the characterization of tannins, *Appl Spectrosc Rev* 50 (2015) 407–442. <https://doi.org/10.1080/05704928.2014.1000461>.

- [231] P.Z. Araujo, P.J. Morando, M.A. Blesa, Interaction of catechol and gallic acid with titanium dioxide in aqueous suspensions. 1. Equilibrium studies, *Langmuir* 21 (2005) 3470–3474. <https://doi.org/10.1021/LA0476985/ASSET/IMAGES/MEDIUM/LA0476985N0001.GIF>.
- [232] D. Singh, M. Singh, M. Rawat, A. Semalty, M. Semalty, *Gallic Acid-Phospholipid Complex: Drug Incorporation and Physicochemical Characterization*, 2011.
- [233] M. Cazzola, S. Ferraris, E. Prenesti, V. Casalegno, S. Spriano, Grafting of gallic acid onto a bioactive Ti6Al4V alloy: A physico-chemical characterization, *Coatings* 9 (2019). <https://doi.org/10.3390/coatings9050302>.
- [234] G. Cheng, W. Zhang, A. Jentys, E.E. Ember, O.Y. Gutiérrez, Y. Liu, J.A. Lercher, Importance of interface open circuit potential on aqueous hydrogenolytic reduction of benzyl alcohol over Pd/C, *Nat Commun* 13 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35554-1>.
- [235] T. Li, L. Liu, B. Zhang, Y. Li, F. Wang, An investigation on the continuous and uniform thin membrane passive film formed on sputtered nanocrystalline stainless steel, *Corros Sci* 104 (2016) 71–83. <https://doi.org/10.1016/J.CORSCI.2015.11.031>.
- [236] Y. Hu, Z. Wang, J. Ai, S. Bu, H. Liu, Preparation of coating on the titanium surface by micro-arc oxidation to improve corrosion resistance, *Coatings* 11 (2021) 1–16. <https://doi.org/10.3390/coatings11020230>.
- [237] M. Ouknin, P. Ponthiaux, J. Costa, L. Majidi, Adsorption Properties and Electrochemical Behavior of *Thymus Willdenowii* Boiss and *Reut* Essential Oil as a Green Inhibitor for Mild Steel Corrosion in 1 M HCl, *Portugaliae Electrochimica Acta* 40 (2022) 1–17. <https://doi.org/10.4152/pea.2022400101>.
- [238] W.K. Paik, S. Eu, K. Lee, S. Chon, M. Kim, Electrochemical reactions in adsorption of organosulfur molecules on gold and silver: Potential dependent adsorption, *Langmuir* 16 (2000) 10198–10205. <https://doi.org/10.1021/la000421u>.

- [239] C.M.A. Brett, S. Kresak, T. Hianik, A.M. Oliveira Brett, Studies on Self-Assembled Alkanethiol Monolayers Formed at Applied Potential on Polycrystalline Gold Electrodes, n.d.
- [240] S. Ferraris, M. Cazzola, G. Ubertalli, E. Prenesti, S. Spriano, Grafting of gallic acid to metallic surfaces, *Appl Surf Sci* 511 (2020) 145615. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2020.145615>.
- [241] I.M. Chung, V. Hemapriya, K. Ponnusamy, N. Arunadevi, S. Chitra, C. Hee-Youn, S.H. Kim, M. Prabakaran, Assessment of Low Carbon Steel Corrosion Inhibition by Eco-Friendly Green *Chaenomeles sinensis* Extract in Acid Medium, *Journal of Electrochemical Science and Technology* 9 (2018) 238–249. <https://doi.org/10.5229/JECST.2018.9.3.238>.
- [242] M. Bertuola, D.E. Pissinis, A.A. Rubert, E.D. Prieto, M.A. Fernández Lorenzo de Mele, Impact of molecular structure of two natural phenolic isomers on the protective characteristics of electropolymerized nanolayers formed on copper, *Electrochim Acta* 215 (2016) 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.08.100>.
- [243] S. Falahi, S. Falahi, M. Zarejousheghani, H. Ehrlich, Y. Joseph, P. Rahimi, Electrochemical Sensing of Gallic Acid in Beverages Using a 3D Bio-Nanocomposite Based on Carbon Nanotubes/Spongins-Atacamite, *Biosensors (Basel)* 13 (2023) 262. <https://doi.org/10.3390/BIOS13020262/S1>.
- [244] S. Mu, C. Chen, Electrochemical oxidation of pyrogallol: Formation and characterization of long-lived oxygen radicals and application to assess the radical scavenging abilities of antioxidants, *Journal of Physical Chemistry B* 116 (2012) 12567–12573. https://doi.org/10.1021/JP3059189/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JP-2012-059189_0010.GIF.
- [245] L. Yang, L. Han, J. Ren, H. Wei, L. Jia, Coating process and stability of metal-polyphenol film, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 484 (2015) 197–205. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2015.07.061>.
- [246] J. Guo, Y. Ping, H. Ejima, K. Alt, M. Meissner, J.J. Richardson, Y. Yan, K. Peter, D. Von Elverfeldt, C.E. Hagemeyer, F. Caruso, Engineering Multifunctional

- Capsules through the Assembly of Metal–Phenolic Networks, *Angewandte Chemie International Edition* 53 (2014) 5546–5551. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201311136>.
- [247] K. Xu, M. Zhou, M. Li, W. Chen, Y. Zhu, K. Cai, Metal-phenolic networks as a promising platform for pH-controlled release of bioactive divalent metal ions, *Appl Surf Sci* 511 (2020) 145569. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2020.145569>.
- [248] C. Reggio, J. Barberi, S. Ferraris, S. Spriano, Functionalization of Ti6Al4V Alloy with Polyphenols: The Role of the Titanium Surface Features and the Addition of Calcium Ions on the Adsorption Mechanism, *Metals* 2023, Vol. 13, Page 1347 13 (2023) 1347. <https://doi.org/10.3390/MET13081347>.
- [249] K. Xu, C. Mu, C. Zhang, S. Deng, S. Lin, L. Zheng, W. Chen, Q. Zhang, Antioxidative and antibacterial gallium (III)-phenolic coating for enhanced osseointegration of titanium implants via pro-osteogenesis and inhibiting osteoclastogenesis, *Biomaterials* 301 (2023) 122268. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2023.122268>.
- [250] Y. Oh, C.B. Ahn, M.P.C.K. Marasinghe, J.Y. Je, Insertion of gallic acid onto chitosan promotes the differentiation of osteoblasts from murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Int J Biol Macromol* 183 (2021) 1410–1418. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.05.122>.
- [251] J. Liu, Y. Shi, Y. Zhao, Y. Liu, X. Yang, K. Li, W. Zhao, J. Han, J. Li, S. Ge, J. Liu, Y. Shi, Y. Zhao, Y. Liu, X. Yang, K. Li, W. Zhao, J. Li, S. Ge, J. Han, A Multifunctional Metal–Phenolic Nanocoating on Bone Implants for Enhanced Osseointegration via Early Immunomodulation, *Advanced Science* (2024) 2307269. <https://doi.org/10.1002/ADVS.202307269>.
- [252] S. Cai, C. Wu, W. Yang, W. Liang, H. Yu, L. Liu, Recent advance in surface modification for regulating cell adhesion and behaviors, *Nanotechnol Rev* 9 (2020) 971–989. https://doi.org/10.1515/NTREV-2020-0076/ASSET/GRAPHIC/J_NTREV-2020-0076_FIG_011.JPG.
- [253] T.H. Pham, E.N. Kim, N.M. Trang, G.S. Jeong, Gallic acid induces osteoblast differentiation and alleviates inflammatory response through GPR35/GSK3 β / β -

- catenin signaling pathway in human periodontal ligament cells, *J Periodontal Res* 59 (2024) 204–219. <https://doi.org/10.1111/JRE.13208>.
- [254] W. Lao, Y. Zhao, Y. Tan, M. Johnson, Y. Li, L. Xiao, J. Cheng, Y. Lin, X. Qu, Regulatory Effects and Mechanism of Action of Green Tea Polyphenols on Osteogenesis and Adipogenesis in Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells, *Current Issues in Molecular Biology* 2022, Vol. 44, Pages 6046-6058 44 (2022) 6046–6058. <https://doi.org/10.3390/CIMB44120412>.
- [255] V.N. Lima, C.D.M. Oliveira-Tintino, E.S. Santos, L.P. Morais, S.R. Tintino, T.S. Freitas, Y.S. Geraldo, R.L.S. Pereira, R.P. Cruz, I.R.A. Menezes, H.D.M. Coutinho, Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol, *Microb Pathog* 99 (2016) 56–61. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2016.08.004>.
- [256] L.L. Guo, Y.F. Cheng, X. Ren, K. Gopinath, Z.S. Lu, C.M. Li, L.Q. Xu, Simultaneous deposition of tannic acid and poly(ethylene glycol) to construct the antifouling polymeric coating on Titanium surface, *Colloids Surf B Biointerfaces* 200 (2021) 111592. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2021.111592>.
- [257] J. Park, L. Chi, H.Y. Kwon, J. Lee, S. Kim, S. Hong, Decaffeinated green tea extract as a nature-derived antibiotic alternative: An application in antibacterial nano-thin coating on medical implants, *Food Chem* 383 (2022) 132399. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.132399>.
- [258] M.P. Ko, C.J. Huang, A versatile approach to antimicrobial coatings via metal-phenolic networks, *Colloids Surf B Biointerfaces* 187 (2020) 110771. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2020.110771>.
- [259] R. Hengge, Targeting Bacterial Biofilms by the Green Tea Polyphenol EGCG, *Molecules* 2019, Vol. 24, Page 2403 24 (2019) 2403. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24132403>.
- [260] A.R. Blanco, A. Sudano-Roccaro, G.C. Spoto, A. Nostro, D. Rusciano, Epigallocatechin gallate inhibits biofilm formation by ocular staphylococcal isolates, *Antimicrob Agents Chemother* 49 (2005) 4339–4343. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4339-4343.2005/ASSET/EA89D6DF-7AEB-4F31-83C6-6724F9A331AF/ASSETS/GRAPHIC/ZAC0100552800002.JPEG>.

- [261] M. Liu, X. Wu, J. Li, L. Liu, R. Zhang, D. Shao, X. Du, The specific anti-biofilm effect of gallic acid on *Staphylococcus aureus* by regulating the expression of the *ica* operon, *Food Control* 73 (2017) 613–618. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2016.09.015>.
- [262] N. Srivastava, S. Tiwari, K. Bhandari, A.K. Biswal, A.K.S. Rawat, Novel derivatives of plant monomeric phenolics: act as inhibitors of bacterial cell-to-cell communication, *Microb Pathog* 141 (2020) 103856. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2019.103856>.
- [263] B. Huber, L. Eberl, W. Feucht, J. Polster, Influence of Polyphenols on Bacterial Biofilm Formation and Quorum-sensing, *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* 58 (2003) 879–884. <https://doi.org/10.1515/ZNC-2003-11-1224/MACHINEREADABLECITATION/RIS>.
- [264] J. Zhu, X. Huang, F. Zhang, L. Feng, J. Li, Inhibition of quorum sensing, biofilm, and spoilage potential in *Shewanella baltica* by green tea polyphenols, *Journal of Microbiology* 53 (2015) 829–836. <https://doi.org/10.1007/S12275-015-5123-3/METRICS>.
- [265] K.S. Inchagova, G.K. Duskaev, D.G. Deryabin, Quorum Sensing Inhibition in *Chromobacterium violaceum* by Amikacin Combination with Activated Charcoal or Small Plant-Derived Molecules (Pyrogallol and Coumarin), *Microbiology (Russian Federation)* 88 (2019) 63–71. <https://doi.org/10.1134/S0026261719010132/METRICS>.
- [266] K.H.C. Roese, C. Torlone, L.A. Cooper, L. Esposito, A.M. Deveau, U.S.R. Röse, K.M. Burkholder, Pyrogallol impairs staphylococcal biofilm formation via induction of bacterial oxidative stress, *J Appl Microbiol* 134 (2023). <https://doi.org/10.1093/JAMBIO/LXAD270>.
- [267] K. Li, G. Guan, J. Zhu, H. Wu, Q. Sun, Antibacterial activity and mechanism of a laccase-catalyzed chitosan–gallic acid derivative against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Food Control* 96 (2019) 234–243. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2018.09.021>.
- [268] Y.-L. Chew, C. Arasi, J.-K. Goh, Pyrogallol Induces Antimicrobial Effect and Cell Membrane Disruption on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA),

- [269] N. Durán, M. Durán, M.B. de Jesus, A.B. Seabra, W.J. Fávaro, G. Nakazato, Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity, *Nanomedicine* 12 (2016) 789–799. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.016>.
- [270] H.D. Beyene, A.A. Werkneh, H.K. Bezabh, T.G. Ambaye, Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles (AgNPs), a review, *Sustainable Materials and Technologies* 13 (2017) 18–23. <https://doi.org/10.1016/J.SUSMAT.2017.08.001>.
- [271] Z. Zulfiqar, R.R.M. Khan, M. Summer, Z. Saeed, M. Pervaiz, S. Rasheed, B. Shehzad, F. Kabir, S. Ishaq, Plant-mediated green synthesis of silver nanoparticles: Synthesis, characterization, biological applications, and toxicological considerations: A review, *Biocatal Agric Biotechnol* 57 (2024) 103121. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2024.103121>.
- [272] S.A. Al-Sahli, F. Al-Otibi, R.I. Alharbi, M. Amina, N.M. Al Musayeib, Silver nanoparticles improve the fungicidal properties of *Rhazia stricta* decne aqueous extract against plant pathogens, *Scientific Reports* 2024 14:1 14 (2024) 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51855-5>.
- [273] A.H. Nawaz, A. Mehmood, A. ur R. Khalid, M.A.R. Khan, Gul-e-lala, K.S. Ahmad, A.G. Nabi, Green synthesis of silver nanoparticles for their antifungal activity against anthracnose disease causing *Colletotrichum capsici*, *Biocatal Agric Biotechnol* 58 (2024) 103178. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2024.103178>.
- [274] M.A. Abdel-Rahman, K.S. Alshallash, A.M. Eid, S.E.D. Hassan, M. Salih, M.F. Hamza, A. Fouda, Exploring the Antimicrobial, Antioxidant, and Antiviral Potential of Eco-Friendly Synthesized Silver Nanoparticles Using Leaf Aqueous Extract of *Portulaca oleracea* L., *Pharmaceuticals* 2024, Vol. 17, Page 317 17 (2024) 317. <https://doi.org/10.3390/PH17030317>.
- [275] M. Yoosefian, H. Sabaghian, Silver nanoparticle-based drug delivery systems in the fight against COVID-19: enhancing efficacy, reducing toxicity and improving drug bioavailability, *J Drug Target* (2024) 1–13. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2024.2356147>.

- [276] A. Panáček, L. Kvítek, R. Prucek, M. Kolář, R. Večeřová, N. Pizúrová, V.K. Sharma, T. Nevěčná, R. Zbořil, Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity, *Journal of Physical Chemistry B* 110 (2006) 16248–16253. https://doi.org/10.1021/JP063826H/SUPPL_FILE/JP063826HSI20060619_085949.PDF.
- [277] A. Kuzma, M. Weis, S. Flickyngerova, J. Jakabovic, A. Satka, E. Dobrocka, J. Chlpik, J. Cirak, M. Donoval, P. Telek, F. Uherek, D. Donoval, Influence of surface oxidation on plasmon resonance in monolayer of gold and silver nanoparticles, *J Appl Phys* 112 (2012). <https://doi.org/10.1063/1.4767688/369148>.
- [278] C. Levard, E.M. Hotze, G. V. Lowry, G.E. Brown, Environmental transformations of silver nanoparticles: Impact on stability and toxicity, *Environ Sci Technol* 46 (2012) 6900–6914. https://doi.org/10.1021/ES2037405/ASSET/IMAGES/MEDIUM/ES-2011-037405_0006.GIF.
- [279] D. Li, Z. Liu, Y. Yuan, Y. Liu, F. Niu, Green synthesis of gallic acid-coated silver nanoparticles with high antimicrobial activity and low cytotoxicity to normal cells, *Process Biochemistry* 50 (2015) 357–366. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.01.002>.
- [280] D.Y. Kim, J. Suk Sung, M. Kim, G. Ghodake, Rapid production of silver nanoparticles at large-scale using gallic acid and their antibacterial assessment, *Mater Lett* 155 (2015) 62–64. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2015.04.138>.
- [281] G.A. Martínez-Castañón, N. Niño-Martínez, F. Martínez-Gutierrez, J.R. Martínez-Mendoza, F. Ruiz, Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes, *Journal of Nanoparticle Research* 10 (2008) 1343–1348. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9428-6>.
- [282] Té Verde – Jesper, (n.d.). <https://jesper.com.ar/te-verde/#teverdebancha> (accessed June 2, 2024).
- [283] M. Reto, M.E. Figueira, H.M. Filipe, C.M.M. Almeida, Chemical composition of green tea (*Camellia sinensis*) infusions commercialized in Portugal, *Plant Foods*

- for Human Nutrition 62 (2007) 139–144. <https://doi.org/10.1007/s11130-007-0054-8>.
- [284] K.K.H.Y. Ho, T.C. Haufe, M.G. Ferruzzi, A.P. Neilson, Production and polyphenolic composition of tea, *Nutr Today* 53 (2018) 268–278. <https://doi.org/10.1097/NT.0000000000000304>.
- [285] A. Chandra, A. Bhattarai, A.K. Yadav, J. Adhikari, M. Singh, B. Giri, Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Tea Leaves from Three Different Elevations, *ChemistrySelect* 5 (2020) 4239–4246. <https://doi.org/10.1002/SLCT.201904826>.
- [286] A. Wirwis, Z. Sadowski, Green Synthesis of Silver Nanoparticles: Optimizing Green Tea Leaf Extraction for Enhanced Physicochemical Properties, *ACS Omega* 8 (2023) 30532–30549. https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.3C03775/ASSET/IMAGES/LARGE/AO3C03775_0011.JPEG.
- [287] S. Wu, X. Zhou, X. Yang, Z. Hou, Y. Shi, L. Zhong, Q. Jiang, Q. Zhang, A rapid green strategy for the synthesis of Au “meatball”-like nanoparticles using green tea for SERS applications, *Journal of Nanoparticle Research* 16 (2014) 1–13. <https://doi.org/10.1007/S11051-014-2325-2/METRICS>.
- [288] M.A. Asghar, E. Zahir, S.M. Shahid, M.N. Khan, M.A. Asghar, J. Iqbal, G. Walker, Iron, copper and silver nanoparticles: Green synthesis using green and black tea leaves extracts and evaluation of antibacterial, antifungal and aflatoxin B1 adsorption activity, *LWT* 90 (2018) 98–107. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2017.12.009>.
- [289] A.K. Masooleh, A. Ahmadikhah, A. Saidi, Green synthesis of stable silver nanoparticles by the main reduction component of green tea (*Camellia sinensis* L.), *IET Nanobiotechnol* 13 (2019) 183–188. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2018.5141>.
- [290] M.M. Aboulwafa, F.S. Youssef, H.A. Gad, S.D. Sarker, L. Nahar, M.M. Al-Azizi, M.L. Ashour, Authentication and discrimination of green tea samples using UV–vis, FTIR and HPLC techniques coupled with chemometrics analysis, *J Pharm Biomed Anal* 164 (2019) 653–658. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.11.036>.

- [291] D. Paramelle, A. Sadovoy, S. Gorelik, P. Free, J. Hobley, D.G. Fernig, A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra, *Analyst* 139 (2014) 4855–4861. <https://doi.org/10.1039/c4an00978a>.
- [292] J. Shang, X. Gao, Nanoparticle counting: Towards accurate determination of the molar concentration, *Chem Soc Rev* 43 (2014) 7267–7278. <https://doi.org/10.1039/c4cs00128a>.
- [293] J. Park, S.H. Cha, S. Cho, Y. Park, Green synthesis of gold and silver nanoparticles using gallic acid: catalytic activity and conversion yield toward the 4-nitrophenol reduction reaction, *Journal of Nanoparticle Research* 18 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3466-2>.
- [294] R. Amooaghaie, M.R. Saeri, M. Azizi, Synthesis, characterization and biocompatibility of silver nanoparticles synthesized from *Nigella sativa* leaf extract in comparison with chemical silver nanoparticles, *Ecotoxicol Environ Saf* 120 (2015) 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.06.025>.
- [295] S. Chen, X. Li, Z. Yang, S. Zhou, R. Luo, M.F. Maitz, Y. Zhao, J. Wang, K. Xiong, N. Huang, A simple one-step modification of various materials for introducing effective multi-functional groups, *Colloids Surf B Biointerfaces* 113 (2014) 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.08.041>.
- [296] C.Y. Flores, C. Diaz, A. Rubert, G.A. Benítez, M.S. Moreno, M.A. Fernández Lorenzo de Mele, R.C. Salvarezza, P.L. Schilardi, C. Vericat, Spontaneous adsorption of silver nanoparticles on Ti/TiO₂ surfaces. Antibacterial effect on *Pseudomonas aeruginosa*, *J Colloid Interface Sci* 350 (2010) 402–408. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.06.052>.
- [297] F. Ghilini, M.C. Rodríguez González, A.G. Miñán, D. Pissinis, A.H. Creus, R.C. Salvarezza, P.L. Schilardi, Highly Stabilized Nanoparticles on Poly- l -Lysine-Coated Oxidized Metals: A Versatile Platform with Enhanced Antimicrobial Activity, *ACS Appl Mater Interfaces* 10 (2018) 23657–23666. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b07529>.
- [298] H. Wang, D. Chen, Y. Wei, Y. Chang, J. Zhao, A simple and sensitive assay of gallic acid based on localized surface plasmon resonance light scattering of silver

- nanoparticles through modified Tollens process., *Anal Sci* 27 (2011) 937–941. <https://doi.org/10.2116/analsci.27.937>.
- [299] H.A. Widatalla, L.F. Yassin, A.A. Alrasheid, S.A. Rahman Ahmed, M.O. Widdatallah, S.H. Eltilib, A.A. Mohamed, Green synthesis of silver nanoparticles using green tea leaf extract, characterization and evaluation of antimicrobial activity, *Nanoscale Adv* 4 (2022) 911–915. <https://doi.org/10.1039/d1na00509j>.
- [300] Q. Sun, X. Cai, J. Li, M. Zheng, Z. Chen, C.P. Yu, Green synthesis of silver nanoparticles using tea leaf extract and evaluation of their stability and antibacterial activity, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 444 (2014) 226–231. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.12.065>.
- [301] A. Ricci, K.J. Olejar, G.P. Parpinello, P.A. Kilmartin, A. Versari, Application of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy in the characterization of tannins, *Appl Spectrosc Rev* 50 (2015) 407–442. <https://doi.org/10.1080/05704928.2014.1000461>.
- [302] C.S. Robb, S.E. Geldart, J.A. Seelenbinder, P.R. Brown, Analysis of green tea constituents by HPLC-FTIR, *J Liq Chromatogr Relat Technol* 25 (2002) 787–801. <https://doi.org/10.1081/JLC-120003036>.
- [303] F. Yousefbeyk, H. Ebrahimi-Najafabadi, S. Dabirian, S. Salimi, F. Baniardalani, F.A. Moghadam, S. Ghasemi, Phytochemical Analysis and Antioxidant Activity of Eight Cultivars of Tea (*Camellia sinensis*) and Rapid Discrimination with FTIR Spectroscopy and Pattern Recognition Techniques, *Pharmaceutical Sciences* 29 (2023) 100–110. <https://doi.org/10.34172/PS.2022.27>.
- [304] J. Blumberg, B. Bolling, C. Chen, H. Xiao, Review and Perspective on the Composition and Safety of Green Tea Extracts, *Eur J Nutr Food Saf* 5 (2015) 1–31. <https://doi.org/10.9734/ejnfs/2015/12712>.
- [305] H.N. Graham, *Green Tea Composition, Consumption, and Polyphenol Chemistry*, 1992.
- [306] W.R. Rolim, M.T. Pelegriño, B. de Araújo Lima, L.S. Ferraz, F.N. Costa, J.S. Bernardes, T. Rodrigues, M. Brocchi, A.B. Seabra, Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles: Characterization, cytotoxicity

- evaluation and antibacterial activity, *Appl Surf Sci* 463 (2019) 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.08.203>.
- [307] M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani, M.R. Mozafari, Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems, *Pharmaceutics* 2018, Vol. 10, Page 57 10 (2018) 57. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS10020057>.
- [308] P. Korshed, L. Li, Z. Liu, A. Mironov, T. Wang, Size-dependent antibacterial activity for laser-generated silver nanoparticles, *J Interdiscip Nanomed* 4 (2019) 24–33. <https://doi.org/10.1002/jin2.54>.
- [309] P. Korshed, L. Li, Z. Liu, T. Wang, The molecular mechanisms of the antibacterial effect of picosecond laser generated silver nanoparticles and their toxicity to human cells, *PLoS One* 11 (2016). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160078>.
- [310] Werner. Stumm, J.J. Morgan, *Aquatic Chemistry: 2nd edition*, (1981) 1827. https://books.google.com/books/about/Aquatic_Chemistry.html?hl=ru&id=NLV_yfulgkQC (accessed June 2, 2024).
- [311] T.S. Peretyazhko, Q. Zhang, V.L. Colvin, Size-controlled dissolution of silver nanoparticles at neutral and acidic pH conditions: Kinetics and size changes, *Environ Sci Technol* 48 (2014) 11954–11961. https://doi.org/10.1021/ES5023202/SUPPL_FILE/ES5023202_SI_001.PDF.
- [312] H.J. Park, J.Y. Kim, J. Kim, J.H. Lee, J.S. Hahn, M.B. Gu, J. Yoon, Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity, *Water Res* 43 (2009) 1027–1032. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2008.12.002>.
- [313] H. Wolfmeier, D. Pletzer, S.C. Mansour, R.E.W. Hancock, New Perspectives in Biofilm Eradication, *ACS Infect Dis* 4 (2018) 93–106. https://doi.org/10.1021/ACSINFECDIS.7B00170/ASSET/IMAGES/MEDIUM/ID-2017-00170W_0004.GIF.
- [314] O. McNeilly, R. Mann, M. Hamidian, C. Gunawan, Emerging Concern for Silver Nanoparticle Resistance in *Acinetobacter baumannii* and Other Bacteria, *Front*

<https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.652863/BIBTEX>.

- [315] A. Panáček, L. Kvítek, M. Smékalová, R. Večeřová, M. Kolář, M. Röderová, F. Dyčka, M. Šebela, R. Pucek, O. Tomanec, R. Zbořil, Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it, *Nature Nanotechnology* 2017 13:1 13 (2017) 65–71. <https://doi.org/10.1038/s41565-017-0013-y>.
- [316] R. Bryaskova, D. Pencheva, S. Nikolov, T. Kantardjiev, Synthesis and comparative study on the antimicrobial activity of hybrid materials based on silver nanoparticles (AgNps) stabilized by polyvinylpyrrolidone (PVP), *J Chem Biol* 4 (2011) 185–191. <https://doi.org/10.1007/s12154-011-0063-9>.
- [317] J.P. Ruparelia, A.K. Chatterjee, S.P. Duttagupta, S. Mukherji, Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles, *Acta Biomater* 4 (2008) 707–716. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.11.006>.
- [318] G.A. Martínez-Castañón, N. Niño-Martínez, F. Martínez-Gutierrez, J.R. Martínez-Mendoza, F. Ruiz, Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes, *Journal of Nanoparticle Research* 10 (2008) 1343–1348. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9428-6>.
- [319] P. Parvekar, J. Palaskar, S. Metgud, R. Maria, S. Dutta, The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*, *Biomater Investig Dent* 7 (2020) 105–109. <https://doi.org/10.1080/26415275.2020.1796674>.
- [320] D. Franco, G. Calabrese, S.P.P. Guglielmino, S. Conoci, Metal-Based Nanoparticles: Antibacterial Mechanisms and Biomedical Application, *Microorganisms* 10 (2022). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091778>.
- [321] E.A. Skomorokhova, T.P. Sankova, I.A. Orlov, A.N. Savelev, D.N. Magazenkova, M.G. Pliss, A.N. Skvortsov, I.M. Sosnin, D.A. Kirilenko, I. V. Grishchuk, E.I. Sakhenberg, E. V. Polishchuk, P.N. Brunkov, A.E. Romanov, L. V. Puchkova, E.Y. Ilyechova, Size-Dependent Bioactivity of Silver Nanoparticles: Antibacterial Properties, Influence on Copper Status in Mice, and Whole-Body Turnover, *Nanotechnol Sci Appl* 13 (2020) 137–157. <https://doi.org/10.2147/nsa.s287658>.

- [322] L. Pauksch, S. Hartmann, M. Rohnke, G. Szalay, V. Alt, R. Schnettler, K.S. Lips, Biocompatibility of silver nanoparticles and silver ions in primary human mesenchymal stem cells and osteoblasts, *Acta Biomater* 10 (2014) 439–449. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2013.09.037>.
- [323] C.E. Albers, W. Hofstetter, K.A. Siebenrock, R. Landmann, F.M. Klenke, In vitro cytotoxicity of silver nanoparticles on osteoblasts and osteoclasts at antibacterial concentrations, *Nanotoxicology* 7 (2013) 30–36. <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.626538>.
- [324] K. Skłodowski, S.J. Chmielewska-Deptuła, E. Piktel, P. Wolak, T. Wollny, R. Bucki, Metallic Nanosystems in the Development of Antimicrobial Strategies with High Antimicrobial Activity and High Biocompatibility, *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 2104 24 (2023) 2104. <https://doi.org/10.3390/IJMS24032104>.
- [325] D.E. Pissinis, G.A. Benítez, P.L. Schilardi, Two-step biocompatible surface functionalization for two-pathway antimicrobial action against Gram-positive bacteria, *Colloids Surf B Biointerfaces* 164 (2018) 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.01.057>.
- [326] J. Wang, J. Li, S. Qian, G. Guo, Q. Wang, J. Tang, H. Shen, X. Liu, X. Zhang, P.K. Chu, Antibacterial Surface Design of Titanium-Based Biomaterials for Enhanced Bacteria-Killing and Cell-Assisting Functions Against Periprosthetic Joint Infection, *ACS Appl Mater Interfaces* 8 (2016) 11162–11178. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b02803>.
- [327] I.E. Sille, D.E. Pissinis, N.S. Fagali, F. Ghilini, M.N. Urrutia, P.L. Schilardi, Antimicrobial-Loaded Polyacrylamide Hydrogels Supported on Titanium as Reservoir for Local Drug Delivery, *Pathogens* 12 (2023). <https://doi.org/10.3390/pathogens12020202>.
- [328] Y.F. Cheng, J.Y. Zhang, Y.B. Wang, C.M. Li, Z.S. Lu, X.F. Hu, L.Q. Xu, Deposition of catechol-functionalized chitosan and silver nanoparticles on biomedical titanium surfaces for antibacterial application, *Materials Science and Engineering C* 98 (2019) 649–656. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.019>.

- [329] Q. Tang, W. Wang, X. Zhang, X. Fang, C. Zhang, Z. Zhu, Y. Hou, M. Lai, Bi-functionalization of titanium with a mixture of peptides for improving its osteogenic and antibacterial activity, *Colloid Interface Sci Commun* 51 (2022) 100673. <https://doi.org/10.1016/J.COLCOM.2022.100673>.
- [330] Z. Wei, K. Li, S. Wang, L. Wen, L. Xu, Y. Wang, Z. Chen, W. Li, H. Qiu, X. Li, J. Chen, Controllable AgNPs encapsulation to construct biocompatible and antibacterial titanium implant, *Front Bioeng Biotechnol* 10 (2022). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1056419>.
- [331] P. Jiang, Y. Zhu, Y. Wu, Q. Lin, Y. Yu, W. Yu, Y. Huang, Synthesis of flame-retardant, bactericidal, and color-adjusting wood fibers with metal phenolic networks, *Ind Crops Prod* 170 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113796>.
- [332] F. Ghilini, M.C. Rodríguez González, A.G. Miñán, D. Pissinis, A.H. Creus, R.C. Salvarezza, P.L. Schilardi, Highly Stabilized Nanoparticles on Poly- l -Lysine-Coated Oxidized Metals: A Versatile Platform with Enhanced Antimicrobial Activity, *ACS Appl Mater Interfaces* 10 (2018) 23657–23666. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b07529>.
- [333] X. Chen, Z. Yi, G. Chen, X. Ma, W. Su, X. Cui, X. Li, DOX-assisted functionalization of green tea polyphenol nanoparticles for effective chemophotothermal cancer therapy, *J Mater Chem B* 7 (2019) 4066–4078. <https://doi.org/10.1039/c9tb00751b>.
- [334] T. Bian, A. Gardin, J. Gemen, L. Houben, C. Perego, B. Lee, N. Elad, Z. Chu, G.M. Pavan, R. Klajn, Electrostatic co-assembly of nanoparticles with oppositely charged small molecules into static and dynamic superstructures, *Nature Chemistry* 2021 13:10 13 (2021) 940–949. <https://doi.org/10.1038/s41557-021-00752-9>.
- [335] P. Hajdu, I. Lampé, R. Rácz, S. Biri, A. Csík, F. Tóth, M. Szalóki, V. Hegedűs, Z. Dombrádi, I. Varga, I. Csarnovics, S. Kökényesi, D.L. Beke, C. Hegedűs, Optimized size and distribution of silver nanoparticles on the surface of titanium implant regarding cell viability, *Applied Sciences (Switzerland)* 10 (2020) 1–13. <https://doi.org/10.3390/app10207063>.

- [336] M. Stoian, A. Kuncser, F. Neatu, M. Florea, M. Popa, S.N. Voicu, M.C. Chifiriuc, A.M. Hanganu, M.E. Anghel, M. Tudose, Green synthesis of aminated hyaluronic acid-based silver nanoparticles on modified titanium dioxide surface: Influence of size and chemical composition on their biological properties, *Int J Biol Macromol* 253 (2023) 127445. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.127445>.