



TESIS DOCTORAL

COLONIZACIÓN BACTERIANA EN PELÍCULAS DE ÁCIDO  
POLILÁCTICO ENRIQUECIDAS CON MAGNESIO Y  
BROMURO DE HEXADECILTRIETILAMONIO.  
*CONSIDERACIONES EN ENTORNO DIABÉTICO*

MARÍA FERNÁNDEZ GRAJERA

PROGRAMA EN MODELIZACIÓN Y EXPERIMENTACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Conformidad de la directora y coodirectores en su caso

*Dra. Amparo María Gallardo Moreno*

*Dr. Miguel Ángel Pacha Olivenza*

*Dra. María Luisa González Martín*

Esta tesis cuenta con la autorización del director/a y coodirector/a de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.

2023





TESIS DOCTORAL

COLONIZACIÓN BACTERIANA EN PELÍCULAS DE ÁCIDO  
POLILÁCTICO ENRIQUECIDAS CON MAGNESIO Y  
BROMURO DE HEXADECILTRIEILAMONIO.  
*CONSIDERACIONES EN ENTORNO DIABÉTICO*

MARÍA FERNÁNDEZ GRAJERA

PROGRAMA EN MODERNIZACIÓN Y EXPERIMENTACIÓN EN CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA

Conformidad de la directora y coodirectores en su caso

*Dra. Amparo María Gallardo Moreno*

*Dr. Miguel Ángel Pacha Olivenza*

*Dra. María Luisa González Martín*

2023





A los primeros que me llamaron *Doctora*....

A mis *Abuelos*

# Financiación

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a las siguientes ayudas de financiación:

- Junta de Extremadura. Consejería de Economía e Infraestructuras. Ayudas para la financiación de contratos predoctorales para la formación de doctores en los centros públicos de I+D pertenecientes al Sistema Extremeño de Ciencia, Tecnología e Innovación en el ejercicio 2017. Decreto 45/2016, de 12 de abril. DOE 95 de 19 de mayo de 2017. Cofinanciado por el Fondo Social Europeo, *"Una manera de hacer Europa"* : PD16055.
- Junta de Extremadura. Ayuda a Grupos de Investigación. Consejería de Economía, Competitividad e Innovación. Decreto 56/2021, de 4 de junio. DOE 55, de 21 de marzo de 2022. Cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional. GR21119 - Grupo de Investigación FQM006 (ANAYCO).
- Esta tesis doctoral es parte del proyecto de I+D+i RTI2018-096862-B-I00, financiado por Ministerio de Ciencia e Innovación/ Agencia Estatal de Investigación /10.13039/501100011033/ FEDER *"Una manera de hacer Europa"*
- Junta de Extremadura. Proyecto de investigación. Consejería de Economía e Infraestructuras. Decreto 68/2016, de 31 de mayo de 2016. DOE 114, de 16 de junio de 2021. Cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional. IB20092.

Además, agradecer la ayuda a NANBIOSIS, y al Servicio de Análisis Elemental y Molecular (SAEM) y al Servicio de Caracterización de Sólidos y Superficies (SACSS) de los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Extremadura (SAIUEx), por toda su asistencia y apoyo a durante todo el proceso de esta tesis.



Fondo Social Europeo  
Fondo Europeo de Desarrollo Regional  
*"Una manera de hacer Europa"*

Unión Europea



«La gratitud se da cuando se almacena en el corazón y no en la mente»  
(Lionel Hampton)



# Resumen

---

El aumento de la esperanza de vida ha generado el incremento de problemas de salud que precisan del uso de implantes en prácticas clínicas. Sin embargo, estos implantes pueden convertirse en focos de infección debido a la colonización de microorganismos y otras patologías como la diabetes. La creciente incidencia de infecciones requiere medidas urgentes para prevenir no solo su aparición, sino también su propagación.

Esta Tesis investiga las causas por las que las bacterias alteran su proceso de colonización de biomateriales poliméricos, cuando éstos se enriquecen con compuestos activos o cuando se suplementa el entorno bacteriano con componentes diabéticos. Así, se podrán diseñar estrategias más eficaces para combatir las infecciones asociadas a implantes. El material escogido ha sido el ácido poliláctico (PLA), un polimérico degradable con gran potencial en biomedicina, enriquecido con Mg y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB). El entorno diabético se ha simulado con glucosa y cuerpos cetónicos, y se han utilizado bacterias típicas en las infecciones protésicas, como las del género *Staphylococci*. El estudio combina la caracterización física superficial de bacterias y materiales con los ensayos *in vitro* de colonización que incluyen adhesión inicial, viabilidad y formación de biocapas.

Los resultados muestran que el enriquecimiento con Mg y CTAB genera respuestas bactericidas del PLA y mejora su humectabilidad. Además, la patología diabética con hiperglucemia y cetoacidosis representa el peor escenario de colonización ya que las bacterias encuentran en este entorno un impulso en su actividad metabólica que potencia su afinidad bacteria-superficie y maximiza la formación de biocapas.

# Abstract

---

Increased life expectancy has led to an increase in the number of health problems requiring implants in clinical practices. However, these implants can become hotspots of infection due to microorganism's colonisation and other pathologies such as diabetes. The increasing incidence of infections requires urgent measures to prevent not only their occurrence, but also their spread.

This thesis studies the causes by which bacteria alter their colonisation process on polymeric biomaterials, when these are enriched with active compounds, or when their environment is supplemented with diabetic components. In this way, more effective strategies can be designed to combat implant-associated infections. The material chosen was polylactic acid (PLA), a degradable polymer with great potential in biomedicine, enriched with Mg and hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB). The diabetic environment was simulated with glucose and ketone bodies, and bacteria typical of prosthetic infections, such as *Staphylococci*, were used. The study combines surface physical characterisation of bacteria and materials with in vitro colonisation assays including initial adhesion, viability and biofilm formation.

The results show that enrichment with Mg and CTAB generate bactericidal responses of PLA and improve its wettability. Moreover, diabetic pathology with hyperglycaemia and ketoacidosis represents the worst case scenario for colonisation as bacteria find in this environment a boost in their metabolic activity that enhances their bacteria-surface affinity and maximises biofilm formation.



# Índice de Figuras

## Capítulo I. Introducción

Figura 1.1. Isómeros $\alpha$ de ácido láctico .....	6
Figura 1.2. Rutas de fermentación bacteriana para la producción de ácido láctico.....	8
Figura 1.3. Estructura cristalina de la forma $\alpha$ del PLLA.....	13
Figura 1.4. Estructura del tensioactivo bromuro de hexadeciltrimetilamonio....	18
Figura 1.5. Representación esquemática de las fases de formación de biocapas .....	31
Figura 1.6. Representación esquemática de las superficies bacterianas Gram-positivas y Gram-negativas.....	33

## Capítulo III. Materiales y Métodos

Figura 3.1. Películas de PLA cristalino.....	79
Figura 3.2. Ejemplo de PLA semicristalino depositado en un disco.....	80
Figura 3.3. Cámara de adhesión de silicona.....	81
Figura 3.4. Ilustración del impacto del haz de iones primarios sobre una superficie en la técnica ToF-SIMS.....	83
Figura 3.5. Diagrama de interacción entre un haz de electrones y un materia.	86
Figura 3.6. Esquema del sistema de medida de ICP-MS.....	88
Figura 3.7. Esquema de la difracción de rayos X en una red cristalina.....	89
Figura 3.8. Ángulo de contacto de un líquido $\theta$ sobre una superficie sólida. Ejemplificación de las tensiones sobre la línea triple.....	90
Figura 3.9. Equipo de goniometría Krüss.....	94
Figura 3.10. Gotas de agua desionizada sobre una ácido poliláctico fijada en vidrio.....	95



<b>Figura 3.11.</b> Esquema de la interacción de dos superficies con una disolución electrolítica sometida a un flujo por la creación de un campo eléctrico.....	96
<b>Figura 3.12.</b> Esquema de un microscopio de fuerza atómica.....	99
<b>Figura 3.13.</b> Curva de crecimiento bacteriano típica.....	105
<b>Figura 3.14.</b> Imagen de suspensiones bacterianas analizadas con la técnica MATH para evaluar la hidrofobicidad superficial bacteriana.....	108
<b>Figura 3.15.</b> Esquema de la interacción de una partícula con carga negativa con las cargas de una disolución electrolítica.....	109
<b>Figura 3.16.</b> Celda de medida de potencial $\zeta$ modelo DTS1070.....	111
<b>Figura 3.17.</b> Diagrama del montaje para estudios de adhesión bacteriana con un modelo estático.....	112
<b>Figura 3.18.</b> Modelo 3D de la cámara de flujo de placas plano paralelas.....	114
<b>Figura 3.19.</b> Montaje experimental del ensayo de adhesión dinámico.....	115
<b>Figura 3.20.</b> Montaje del ensayo de biocapa sobre materiales.....	116
<b>Figura 3.21.</b> Esquema del sistema interno de microscopía confocal del perfilómetro.....	121

## Capítulo IV. Resultados y Discusión

<b>Figura 4.1.</b> BSED de las superficies de PLA.....	132
<b>Figura 4.2.</b> Imágenes topográficas de AFM y un perfil representativo (línea blanca en las imágenes topográficas) de las películas de PLA sin degradar.....	133
<b>Figura 4.3.</b> Difractograma de rayos X de películas PLA10Mg (línea negra) y PLA (línea roja).....	136
<b>Figura 4.4.</b> Seguimiento de la liberación de $Mg^{2+}$ , desde las películas de PLA10Mg hasta el medio PBS.....	138
<b>Figura 4.5.</b> Imágenes de SEM de secciones transversales de películas de PLA10Mg tras diferentes tiempos de degradación.....	139
<b>Figura 4.6.</b> Imágenes de AFM de películas de PLA enriquecidas con o sin magnesio y CTAB sin degradación.....	145

<b>Figura 4.7.</b> Imágenes de AFM de películas de PLA enriquecidas con o sin magnesio y CTAB tras un mes de degradación.....	145
<b>Figura 4.8.</b> Imágenes de AFM de películas de PLA enriquecidas con o sin magnesio y CTAB tras tres mes de degradación.....	146
<b>Figura 4.9.</b> Ángulos de contacto del agua ( $\theta_A$ ) y del diiodometano ( $\theta_D$ ) sobre películas de PLA enriquecidas con Mg y CTAB sin y con degradación de uno o tres meses.....	147
<b>Figura 4.10.</b> Intensidades relativas de los iones $\text{Br}^-$ y $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2^-$ medidas medianteToF-SIMS en las películas enriquecidas con Mg y/o CTAB sin y/o con uno y tres meses de degradación.....	151
<b>Figura 4.11.</b> Densidad de bacterias adheridas a la superficie de las películas de PLA enriquecidas con Mg y CTAB.....	154
<b>Figura 4.12.</b> Viabilidad de la biocapa creada en la película de PLA en unidades relativas de luz (RLU).....	161
<b>Figura 4.13.</b> Ejemplo de curvas de crecimiento de <i>S. aureus</i> en medio enriquecidos con ambientes diabéticos.....	165
<b>Figura 4.14.</b> Tiempo de generación de <i>S. aureus</i> cultivada en medios enriquecidos con ambientes diabéticos.....	164
<b>Figura 4.15.</b> Porcentaje de IS de <i>S. aureus</i> obtenido para medios enriquecidos con ambientes diabéticos.....	173
<b>Figura 4.16.</b> Imágenes SEM tomadas con aumentos de 150x a 50000x para las biocapas formadas por <i>S. aureus</i> en TSB enriquecido con los diferentes ambientes diabéticos.....	175
<b>Figure 4.17.</b> imágenes de perfilometría de las biocapas formadas por <i>S. aureus</i> en diferentes ambientes diabéticos.....	177
<b>Figura 4.18.</b> Ejemplo del ajuste exponencial del sistema enriquecido con $0,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucosa en el crecimiento y en la adhesión (G1).....	183
<b>Figura 4.19.</b> Estudio por tramos de la evolución de la adhesión bacteriana sobre PLA control (sin enriquecimiento diabético en el crecimiento ni en la adhesión).....	186
<b>Figura 4.20.</b> Estudio por tramos de la evolución de la adhesión bacteriana sobre PLA cuando se enriquece el crecimiento y la adhesión con $0,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucosa (G1).....	186
<b>Figura 4.21.</b> Estudio por tramos de la evolución de la adhesión bacteriana sobre PLA cuando se enriquece el crecimiento y la adhesión con $1,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucosa (G2).....	187

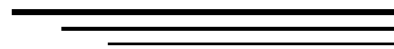
<b>Figura 4.22.</b> Estudio por tramos de la evolución de la adhesión bacteriana sobre PLA cuando se enriquece el crecimiento y la adhesión con 1 mmol·L <sup>-1</sup> de cuerpos cetónicos (K1).....	187
<b>Figura 4.23.</b> Estudio por tramos de la evolución de la adhesión bacteriana sobre PLA cuando se enriquece el crecimiento y la adhesión con 9 mmol·L <sup>-1</sup> de cuerpos cetónicos (K2).....	188
<b>Figura 4.24.</b> Estudio por tramos de la evolución de la adhesión bacteriana sobre PLA cuando se enriquece el crecimiento y la adhesión con 0,9 g·L <sup>-1</sup> de glucosa y 1 mmol·L <sup>-1</sup> de cuerpos cetónicos (GK1). ....	188
<b>Figura 4.25.</b> Estudio por tramos de la evolución de la adhesión bacteriana sobre PLA cuando se enriquece el crecimiento y la adhesión con 1,9 g·L <sup>-1</sup> de glucosa y 9 mmol·L <sup>-1</sup> de cuerpos cetónicos (GK2).....	189
<b>Figura 4.26.</b> Medida de las unidades relativas de luz (RLU %) de las bacterias antes y después de 300 min de contacto con PBS enriquecido con enriquecimiento diabéticos.....	196
<b>Figura 4.27.</b> Porcentaje de RLU obtenido de las biocapas relativizado al entorno sin enriquecimiento (control) para cada condición.....	199

# Índice de Tablas

## Capítulo IV. Resultados y Discusión

<b>Tabla 4.1.</b> Valores de la hidrofobicidad y la tensión superficial a través de las medidas de ángulo de contacto de las películas PLA10Mg y PLA sin y con cuatro horas de degradación.....	135
<b>Tabla 4.2.</b> Densidad de bacterias adheridas a las superficies, viabilidad de las bacterias adheridas, concentración de $Mg^{2+}$ y pH de las películas de PLA y PLA10Mg con y sin degradación.....	140
<b>Tabla 4.3.</b> Componentes dispersiva ( $\gamma^d$ ) y no dispersiva ( $\gamma^{nd}$ ) de la tensión superficial total ( $\gamma^{TOT}$ ) y energía libre de interacción entre dos películas inmersas en agua ( $\Delta G_{SAS}$ ) para PLA enriquecido con magnesio y/o CTAB tras uno y tres meses de degradación.....	150
<b>Tabla 4.4.</b> Valores de los diámetros medios, la hidrofobicidad, el potencial zeta y pH del medio de cultivo de <i>S. aureus</i> , crecida en los diferentes ambientes con enriquecimientos diabéticos.....	166
<b>Tabla 4.5.</b> Datos de cobertura bacteriana (%) y biovolumen ( $\mu m^3/\mu m^2$ ) medidos en las imágenes de perfilometría de las biocapas bacterianas creadas con diferentes ambientes diabéticos.....	167
<b>Tabla 4.6.</b> Ángulos de contacto, energía libre superficial, componentes Lifshitz-van der Waals, ácido-base, parámetros electrón-donador y electrón aceptor y el potencial zeta del PLA .....	179
<b>Tabla 4.7.</b> Parámetros obtenidos a partir de las dos estrategias de análisis de las curvas de adhesión.....	184

# Índice



Resumen.....	i
Abstract.....	ii
Índice de Figuras .....	iii
Índice de Tablas .....	vii
Índice	
<b>Capítulo_I. Introducción.....</b>	<b>1</b>
I.1. Contexto de esta investigación .....	1
I.2. Ácido Poliláctico.....	4
I.2.1. Polimerización del ácido poliláctico.....	6
I.2.2. Propiedades del ácido poliláctico.....	10
I.2.3. Modificaciones superficiales.....	14
I.2.4. Aplicaciones del ácido poliláctico en biomedicina.....	19
I.3. Colonización bacteriana de superficies en biomedicina.....	24
I.3.1. Etapas del proceso de colonización bacteriano.....	27
I.3.2. Superficies bacterianas.....	32
I.3.3. Microorganismos implicados en la colonización de implantes protésicos.....	36
I.3.4. Aproximaciones experimentales para el estudio de la colonización en biomateriales.....	38
I.4. Entorno diabético.....	39
I.4.1. Las infecciones y la diabetes.....	40
I.5. Bibliografía.....	43
<b>Capítulo_II. Objetivos.....</b>	<b>72</b>

---

<b>Capítulo III. Materiales y Métodos</b> .....	76
III.1. Superficies de ácido poliláctico.....	76
III.1.1. Preparación de las muestras de ácido poliláctico.....	77
III.1.2. Degradación de las muestras de ácido poliláctico.....	80
III.1.3. Caracterización superficial de las muestras de ácido poliláctico.....	82
III.2. Microorganismos.....	100
III.2.1. Suspensiones bacterianas: Entorno diabético.....	100
III.2.2. Caracterización superficial bacteriana.....	107
III.2.3. Adhesión bacteriana.....	111
III.2.4. Formación de biocapas.....	116
III.3. Bibliografía.....	123
<b>Capítulo IV. Resultados y Discusión</b> .....	131
IV.1. Películas de ácido poliláctico enriquecidas.....	131
IV.1.1. Películas de ácidos poliláctico enriquecidas con magnesio.....	131
IV.1.2. Películas de ácido poliláctico enriquecidas con magnesio y CTAB.....	143
IV.2. Colonización bacteriana en un entorno enriquecido con condiciones diabéticas.....	163
IV.2.1. Bacterias en un entorno enriquecido con condiciones diabéticas.....	163
IV.2.2. Colonización bacteriana sobre películas de ácido poliláctico en un entorno enriquecido con condiciones diabéticas.....	178
IV.3. Bibliografía.....	202
<b>Capítulo V. Conclusiones Generales</b> .....	217
<b>Anexos</b> .....	221

---





# Capítulo I. Introducción

## I. Introducción

### I.1. Contexto de esta investigación

Según la Organización Mundial de la Salud, la esperanza de vida a nivel mundial ha aumentado en más de seis años desde 2000 hasta 2019 [1], lo que ha llevado a un incremento de la incidencia de problemas inflamatorios, de degeneración articular, de desgaste óseo y de pérdida de visión, entre otros [2]–[4]. Una consecuencia directa de este nuevo paradigma social es el incremento de prácticas clínicas que requieren el uso de implantes para reparar diferentes zonas del cuerpo humano [4], [5]. Si bien los implantes han mejorado la calidad de vida, su uso generalizado también supone un enorme gasto económico para cualquier sistema sanitario y social [3], [6].

Uno de los problemas que tiene la inserción de materiales en el cuerpo humano es que pueden actuar como plataformas colonizables para los microorganismos, y, por tanto, ser un foco de infecciones. Por ello, el aumento del número de implantaciones por procesos quirúrgicos es un factor que ocasiona el incremento de infecciones [7]. Según el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades, alrededor de 4 millones de pacientes sufren estas infecciones en la Unión Europea. Como consecuencia en Europa ha habido más de 30.000 muertes al año asociadas de manera directa a las infecciones, y más de 100.000 debidas a complicaciones relacionadas con estas [8].

El tratamiento de las infecciones se suele realizar con la administración de antibióticos. El uso sistemático e incorrecto de estos, es una causa de la resistencia bacteriana a los antibióticos. La tendencia al alza observada de este problema exige actuaciones urgentes para evitar la aparición y propagación de infecciones resistentes. En la actualidad, una de las estrategias es investigar soluciones alternativas al uso de antibióticos que inhiban la infección, siendo su finalidad

tanto la disminución de la resistencia antibiótica como de la hipersensibilidad y/o la alergia, entre otros efectos [9].

Evitar las infecciones asociadas a los dispositivos biomédicos es un objetivo complejo, influenciado por muchos factores. Entre ellos los propios del paciente (enfermedades sistémicas crónicas como la diabetes, tabaquismo, abuso de alcohol, etc.), los de las técnicas quirúrgicas utilizadas en la implantación, los de la tipología de la lesión a la que se dirige el dispositivo (si afectan a grandes daños en los tejidos blandos o duros, si son fracturas muy grandes o pequeñas, si hay un suministro vascular inadecuado, etc.) y los de las características del implante (funcionamiento inadecuado, características superficiales, forma, etc.) [10]. Especial atención merecen las complicaciones asociadas a la diabetes. Según un estudio realizado por Mihu *et al.* (2012) [11], los pacientes diabéticos tienen un mayor riesgo de infecciones asociadas a prótesis, en comparación con pacientes no diabéticos, debido a que su sistema inmunológico está comprometido y a sus problemas de vascularización que dificultan los procesos de cicatrización. Además, la hiperglucemia en los pacientes diabéticos puede promover la formación de biocapas en la superficie de la prótesis, lo que aumenta aún más el riesgo de infección [12], [13]. Por ello, la diabetes es un factor de riesgo que debe ser tenido en cuenta en la investigación de nuevos biomateriales para prótesis, y en el desarrollo de estrategias para la prevención y tratamiento de infecciones para pacientes de este tipo [14]–[21].

La evidencia muestra que cuando el tratamiento antibiótico no funciona, es necesaria la sustitución del dispositivo infectado mediante un tratamiento que necesita de dos cirugías, añadiendo un factor de riesgo adicional. En la primera, se retira la prótesis contaminada y se trata la infección del paciente, mientras que, en la segunda, se coloca un nuevo dispositivo estéril [22]. Esto conlleva más sufrimiento al paciente, un nuevo proceso de adecuación del implante y más riesgo de reinfección. Por lo tanto, para aumentar el bienestar de los pacientes,

son necesarios nuevos materiales que permitan fabricar implantes mejores y más resistentes a ser colonizados por microorganismos.

Un biomaterial se puede definir como un material de origen natural o sintético destinado a reparar, sustituir o tratar un sistema dentro del cuerpo humano [23]–[26]. Estos materiales deben cumplir con los requisitos necesarios para llevar a cabo su función no causando daños al huésped, es decir, siendo biocompatibles. La relación entre un biomaterial y su entorno fisiológico puede modificarse alterando no solo las propiedades volumétricas del material, sino, especialmente, también las características superficiales del mismo. Las propiedades superficiales de un implante son de crucial importancia, ya que una vez insertado, es su superficie la primera que comienza a interactuar con el entorno biológico. Por ello, si sus características no son adecuadas la funcionalidad del implante se puede ver comprometida, ya sea por no lograr una buena integración tisular, por promover la aparición de infecciones, por no posibilitar la liberación de fármacos situados incluido en el material, o, en general, por no permitir alcanzar el objetivo para el que fue colocado en el paciente.

Una propiedad atractiva de los biomateriales puede ser la degradabilidad. Los dispositivos temporales, que pueden ser cerámica, metálica o polimérica, pueden desaparecer o absorberse con el tiempo una vez implantados [9]. El interés de utilizar materiales degradables reside en el propósito de disminuir la presencia de materiales extraños en el cuerpo por los riesgos que ello supone. Además, en el caso de elementos implantables temporales, el uso de este tipo de materiales evita la necesidad de segundas intervenciones para extraerlos una vez cumplida su finalidad [27], [28]. Sin embargo, uno de los mayores retos para este tipo de materiales es lograr un equilibrio entre la degradación del material y el crecimiento de tejido sano del huésped. Si la desaparición del material sucede

más rápido que el crecimiento del tejido del huésped, se perderá la estabilidad biomecánica y la reparación tisular se verá afectada [28]–[30].

Materiales como los polímeros degradables que no generen productos tóxicos son en una buena alternativa, en ciertas aplicaciones, a los materiales metálicos permanentes empleados tradicionalmente [27], [28], [31], [32]. Se entiende como polímero a un material compuesto por monómeros repetidos de igual o diferente composición [28]. La red de monómeros se puede conformar por cadenas lineales, ramificadas o reticuladas. Existen multitud de estudios que describen el uso de polímeros en el ámbito biomédico, como para la fabricación de jeringas o chips de microfluidos [33], catéteres [34], [35], y también para la elaboración de dispositivos implantables como stents [36], [37], tornillos dentales [2]o andamios óseos [38].

En las últimas décadas, los polímeros degradables han suscitado un interés creciente. La degradabilidad, que se refiere al proceso de hidrólisis que sufre el material a temperaturas de hasta 50 °C, puede prolongarse durante un período que oscila entre varios meses y un año. Los factores que afectan a este proceso son diversos, como la cristalinidad y el peso molecular del polímero, la porosidad o la ubicación del implante. En la actualidad, las polilactonas sintéticas biodegradables, como el ácido poliláctico (PLA), y sus copolímeros, son muy utilizadas en dispositivos biomédicos, debido a su excelente capacidad para interactuar con el tejido biológico sin causar reacciones adversas, y por sus buenas características de degradación [39], [40].

### I.2.Ácido Poliláctico

El ácido poliláctico o PLA es un poliéster termoplástico alifático, que en los últimos años ha suscitado un gran interés industrial y académico como posible sustituto de los polímeros derivados del petróleo [41]. La molécula precursora de este polímero es el ácido láctico. La primera síntesis registrada de PLA fue en

1932 por Wallace Carother en los laboratorios DuPont, quien descubrió que el calentamiento de la lactida en vacío producía PLA. Desde entonces, el uso de PLA se ha extendido enormemente.

El PLA no sólo es biocompatible y biodegradable, sino que es producido a partir de recursos naturales renovables no fósiles. El monómero del PLA, el ácido láctico, se puede obtener a través de la fermentación de azúcares por bacterias [39], [40], [42], [43]. Estos azúcares se pueden conseguir a partir de plantas como el maíz, la patata, la melaza de caña, la remolacha azucarera, etc. Por ello, se puede considerar al PLA como un producto ecológico que permite la reutilización de materia prima renovable [39].

A pesar de que el ácido poliláctico se utiliza en la actualidad en diversas aplicaciones industriales, tales como la fabricación de tejidos y embalajes, ha ganado gran relevancia en el campo de la biomedicina debido a sus propiedades únicas [39], [40], [42], [44]. De hecho, este material tiene una gran versatilidad y puede ser empleado en diversas aplicaciones médicas, desde la ingeniería de tejidos hasta la ortopedia, cardiología y odontología [39], [40], [42], [45]–[48]. Además, las características inherentes del PLA facilitan la rápida creación de prototipos y la fabricación eficiente mediante impresión 3D [40], [44].

En reparación ósea, los implantes absorbibles, tienen la ventaja adicional de no erosionar tanto al hueso durante su implantación o retirada en comparación con los permanentes [49]–[55]. Además, el PLA tiene la capacidad de estimular células aisladas para regenerar tejidos [31], [56] y, además liberar fármacos, como analgésicos, antiinflamatorios y antibióticos [57], [58]. Esto ha motivado recientemente su estudio como andamios enriquecidos para el trasplante celular, tanto *in vitro* como *in vivo* [59].

A pesar de las propiedades descritas, el PLA presenta ciertas limitaciones dependientes de su aplicación, como la deficiente resistencia a la compresión o la

generación de productos ácidos durante la degradación [43], [59]–[61]. Por lo tanto, se considera que la incorporación de otros compuestos o aditivos de la matriz de PLA, es un método efectivo para obtener características específicas adecuadas a su uso final [42].

### I.2.1. Polimerización del ácido poliláctico

El ácido láctico (AL) (ácido 2-hidroxiopropiónico) fue descubierto en 1780 por Carl Wilhelm Scheele [43], [62], [63], y es sintetizable tanto por métodos biológicos como químicos. [28]. Es una molécula quiral simple, muy soluble en agua, que existe como dos isómeros, ácido L- y D-láctico (figura 1.1), que difieren en su respuesta frente a la luz polarizada. Se considera un monómero con gran potencial para conversiones químicas porque contiene un grupo carboxílico y uno hidroxilo [39]. En estado natural el AL se encuentra en su forma L-, pero es posible generar una mezcla racémica D- y L- cuando se sintetiza químicamente [43]. La lactida es el dímero cíclico que se forma como molécula intermedia en la polimerización de PLA. Esta molécula posee tres estructuras diferentes, a saber, L-lactida, D-lactida y DL-lactida [62], [63]. Aunque el polímero obtenido por ácido láctico o lactida puede denominarse de formas diferentes, se conocen ambos de manera genérica como PLA [40].

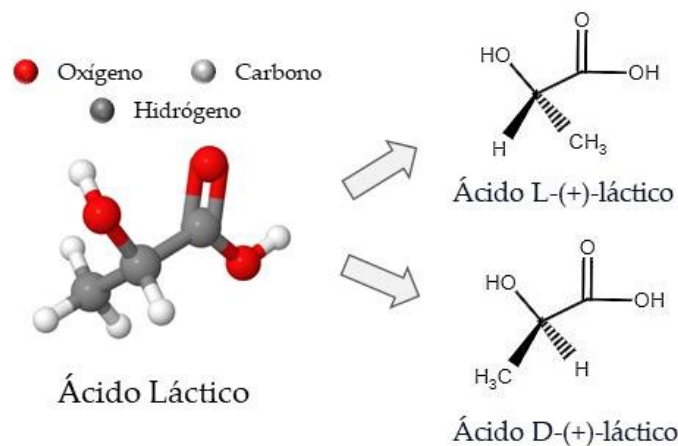
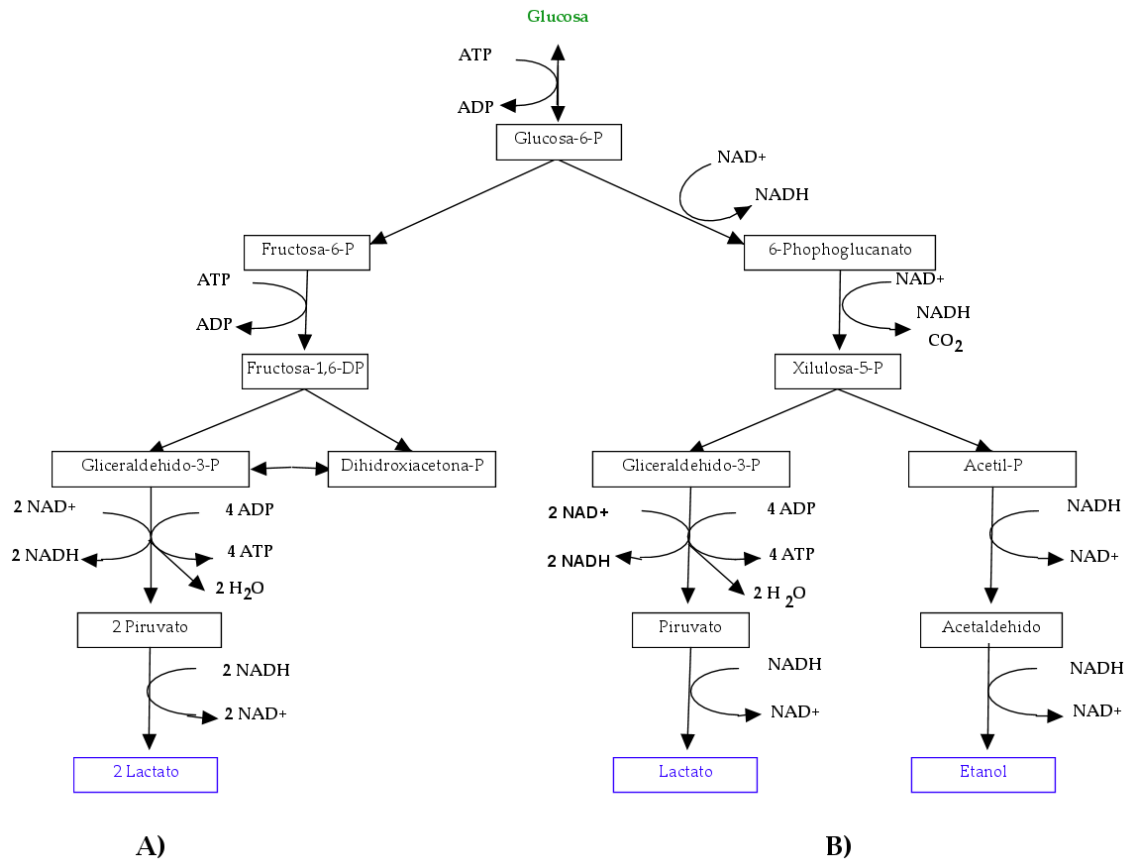


Figura 1.1. Isómeros a de ácido láctico.

Aunque es posible sintetizar el AL a través del lactonitrilo, se puede obtener gracias a la fermentación bacteriana [39]. La elección de la cepa bacteriana determina el proceso de fermentación que se llevara a cabo, así como el isómero de AL obtenido [39]. Según la revisión de Reddy *et al.*[64] existen unos 20 géneros de bacterias productoras de AL, entre ellas encontramos *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. El género *Lactobacillus* es el más destacable, ya que comprende alrededor de 80 especies que producen AL [43].

En el proceso de fermentación, los microorganismos transforman los carbohidratos, como los azúcares de las plantas, en AL en condiciones anaeróbicas con un bajo rendimiento energético, requiriendo de otros nutrientes, tales como vitaminas, aminoácidos, péptidos, minerales, ácidos grasos e hidratos de carbono [43]. Estas bacterias productoras de AL son heterótrofas, lo que significa que carecen de capacidad biosintética [64]. Además, presentan un crecimiento más lento que las de tipo aerobio, pueden sobrevivir bien a temperaturas entre 5 °C y 45 °C, y en condiciones ligeramente ácidas (pH entre 5,5-6,5). Podemos encontrar dos tipos de procesos fermentativos, el heterofermentativo y el homofermentativo. Como indica la figura 1.2, en los procesos heterofermentativos se obtiene como resultado cantidades equimolares de ácido láctico, ácido acético, etanol y dióxido de carbono a partir de la hexosa utilizada. En cambio, en el proceso homofermentativo solo se produce ácido láctico a partir del metabolismo de la hexosa [39], [43]. Durante el proceso de fermentación, las condiciones como el pH, la temperatura, la composición de la atmósfera y, en algunos casos, la agitación, se controlan para optimizar el rendimiento y la pureza del material.





**Figura 1.2.** Rutas de fermentación bacteriana para la producción de ácido láctico. A) Proceso homofermentativo y B) proceso heterofermentativo.

El PLA es un polímero muy versátil. Debido a la existencia de los isómeros de AL, se pueden crear polímeros con diferentes estructuras: ácido poli-L-láctico puro (PLLA), ácido poli-D-láctico puro (PDLA) y ácido poli-D,L-láctico (PDLLA) [39]. El PLLA y el PDLA son isotácticos, ópticamente activos y cristalinos, mientras que el PDLLA es relativamente atáctico, ópticamente inactivo y amorfo [39]. Asimismo, el PLA puede cristalizar en tres formas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) [39].

La polimerización de PLA requiere que el monómero presente una alta pureza, ya que las impurezas interfieren con el curso de la reacción y reducen la calidad del polímero obtenido. Actualmente los procesos más usados de polimerización a partir del ácido láctico son la policondensación por métodos directos, como la deshidratación azeotópica o la polimerización enzimática, y la polimerización por apertura de anillo (ROP) [39], [42].

En la policondensación directa, la reacción se lleva a cabo en un solo paso, proporcionando poco control sobre el peso molecular del PLA producido. En esta ruta se elimina el agua por condensación, y es necesario el uso de un disolvente en condiciones de alto vacío y temperatura controlada [42]. Con este método, solo se puede producir PLA de peso molecular entre bajo e intermedio, principalmente debido a las dificultades para eliminar el agua y las impurezas. Además, no se puede controlar la estereoregularidad del polímero durante el proceso, dando al PLA propiedades mecánicas limitadas.[40]. Una mejora de las técnicas de policondensación directa es la destilación azeotrópica, donde utilizando un disolvente de alto punto de ebullición se elimina el agua en el proceso de esterificación directa, obteniendo PLA de alto peso molecular [42].

En el proceso de polimerización por apertura de anillo se genera un PLA de mayor peso molecular utilizando prepolímero de AL mediante lactida. Como hemos mencionado, la composición de los estero complejos de lactida depende de la alimentación de los microorganismos productores de AL, del catalizador utilizado y de los parámetros de procesamiento, es decir, temperatura y presión. En general, la ruta ROP se ha aplicado comúnmente en la producción industrial de PLA debido a su facilidad de control del proceso de polimerización, aunque requiere pasos de reacción adicionales. El proceso de polimerización comienza con la reacción de condensación de AL acuoso para producir un prepolímero de PLA de bajo peso molecular. A continuación, el prepolímero se convierte en una mezcla de estereoisómeros de lactida usando la catálisis para mejorar la velocidad y la selectividad de las reacciones de ciclación intramolecular. La mezcla de lactida se purifica por destilación al vacío, y se utiliza tras el proceso de prepolimerización para producir diferentes grados de PLA con propiedades físicas y químicas muy controladas [42].

## I.2.2. Propiedades del ácido poliláctico

Cuando se utiliza el PLA para diseñar dispositivos biomédicos se deben considerar las diferentes propiedades del polímero.

Según hemos citado con anterioridad, a partir de los dos monómeros del ácido láctico, se pueden formar tres posibles estereoformas de lactida; L-lactida, D-lactida y D-L-lactida [39], [43]. Con estos precursores se producen diferentes isómeros de PLA con igual composición química pero diferente estructura estérica [39]. Las propiedades térmicas, mecánicas y de biodegradación del PLA están influenciadas por la elección y distribución de los estereoisómeros en las cadenas poliméricas. La poli-L-lactida (PLLA), que resulta de la polimerización de la L-lactida, se prefiere cuando se requiere mayor resistencia mecánica y un tiempo de degradación más prolongado. Además, la pureza óptica del PLA tiene un gran impacto en sus propiedades estructurales, térmicas, de barrera y mecánicas. Por otro lado, el PLA con un contenido de L- superior al 90 % tiende a ser cristalino, mientras que los grados con menor pureza óptica presentan una cristalinidad baja [39], [44], [65]. Igualmente, la temperatura de fusión ( $T_m$ ) y la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) del PLA disminuyen al aumentar el contenido de isómero D [42].

En el apartado anterior (*sección I.2.1*) hemos indicado que, según el método de polimerización elegido, se obtiene PLA con diferentes pesos moleculares, el cual determina en parte su potencial de uso en aplicaciones biomédicas [40]. Cuando el PLA está destinado a un tratamiento donde se necesitan dispositivos con alta resistencia mecánica, se debe utilizar PLA con alto peso molecular. En cambio, si se emplea para fabricar nanopartículas para liberación de fármacos, las propiedades mecánicas no son prioritarias, pero, sin embargo, sí se busca un menor tiempo de degradación, el cual está asociado con polímeros de bajo peso molecular [40]. No obstante, las propiedades finales del PLA no dependen

enteramente del peso molecular, sino también del contenido de impurezas y de la relación entre ambos isómeros de AL dentro de las cadenas PLA [39].

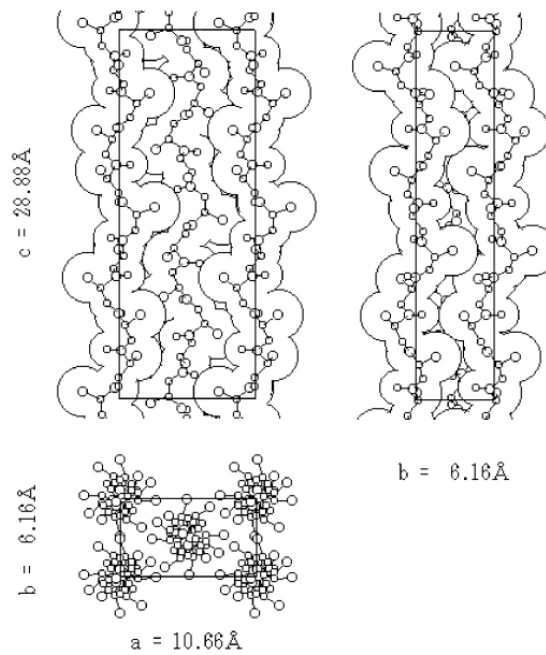
La cristalinidad de un polímero puede considerarse como el empaquetamiento de las cadenas del polímero para producir una disposición molecular ordenada. Esta característica puede variar según los procesos de fabricación y la composición de isómeros de AL [44]. El grado de cristalinidad modifica las interacciones entre las cadenas, su organización y su empaquetamiento, de modo que afecta a propiedades físicas como la dureza, el módulo de elasticidad, la resistencia a la tracción, la rigidez y el punto de fusión [44]. Además, existe una relación inversa entre el grado de cristalinidad y la velocidad de degradación [28], [66]–[68]. Particularmente, el PLLA, al poseer un alto grado de cristalinidad tiene una estructura más ordenada y compacta y, por lo tanto, tiene mejores propiedades mecánicas y un tiempo de degradación más largo que otros PLA [40].

Las características físicas como la densidad, la capacidad calorífica y las propiedades mecánicas y reológicas del PLA varían en función de sus temperaturas de transición [39]. El PLA tiene una T<sub>g</sub> relativamente alta, y una T<sub>m</sub> baja en comparación con otros termoplásticos. Estas temperaturas dependen tanto del peso molecular como de la cristalinidad del polímero [65]. Siendo más altas en el PLA con el esteroisómero PLLA del polímero [39], [65], [69]. Si consideramos un PLA puro, desde el punto de vista estereoquímico, es un polímero semicristalino con una T<sub>g</sub> de 55 °C y una T<sub>m</sub> de 180 °C. [43] También, la arquitectura de la cadena de PLA influye en la temperatura de transición vítrea [43], siendo más alta en cadenas lineales que con una estructura de cadena ramificada. Esto se debe a que la cadena de PLA lineal tiene una estructura más compacta que las cadenas de PLA ramificadas, debido al mayor número de grupos terminales en el PLA ramificado.

Podemos encontrar el PLA cristalizado en tres formas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ . La fase  $\alpha$  es el polimorfo de PLA más común y estable. Está caracterizada por presentar una formación tipo hélice  $10_3$  (10 unidades repetitivas en 3 vueltas de la hélice) de las dos cadenas antiparalelas empaquetadas dentro de una celda unitaria ortorrómbica, teniendo una  $T_m$  de 185 °C (figura 1.3) [43], [65], [70]. Varios estudios han demostrado que un PLA con mayor proporción de fase  $\alpha$  posee mejores propiedades de barrera frente a la hidratación, y, por tanto, a la degradación, mayor módulo de Young y mayor estabilidad térmica [71], [72].

Las propiedades mecánicas del PLA pueden variar según el peso molecular del polímero, su grado de cristalinidad [43], y por la configuración estereoquímica de las estructuras moleculares de la cadena principal. De modo que el PLA final se puede manipular mediante el uso de diferentes monómeros de AL y lactida. El PLA presenta baja resistencia al impacto ( $2,5 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ) y solo alcanza el 10 % de elongación antes de romperse, un módulo de Young de alrededor de 3 GPa y, una resistencia a la tracción entre 50 y 70 MPa [44], [73]. Sin embargo, su escasa tenacidad limita su uso en aplicaciones que requieran deformación plástica a niveles de tensión más elevados [44].

Una de las propiedades más importantes para el procesamiento del PLA para la creación de dispositivos biomédicos es su capacidad para disolverse. El PLA puede hacerlo en cloroformo, cloruro de metileno, dioxano, acetonitrilo, 1,1,2-tricloroetano y ácido dicloroacético. También, posee cierta solubilidad en tolueno, acetona, etilbenceno y tetrahidrofurano (THF) cuando se calienta [39], [40]. Cabe mencionar que la solubilidad está influenciada por el grado de cristalinidad del polímero, debido a la dificultad que presenta la migración del disolvente entre las cadenas del polímero si tienen una estructura muy orientada [43].



**Figura 1.3.** Estructura cristalina de la forma  $\alpha$  del PLLA. Arriba izquierda: proyección ac; superior derecha: proyección bc, inferior: proyección ab proyección. En las proyecciones ac y bc, las cadenas están envueltas con los radios de Van der Waals de los átomos que las componen [74].

En medios acuosos el PLA se degrada por hidrólisis. El grado de cristalinidad, el peso molecular, la porosidad, y el contenido de humedad determinan la tasa de degradación del polímero [27], [43], [44]. Igualmente, la geometría del dispositivo creado con PLA afecta a su degradación, ya que cuanto mayor sea el área de la superficie expuesta al medio acuoso, mayor será la velocidad de degradación del dispositivo creado. La degradación del polímero en un medio fisiológico tiene lugar cuando las cadenas poliméricas se rompen debido a la hidrólisis y, en menor medida, a la actividad enzimática. Cuando estos medios entran en contacto con el material, primero actúan sobre fases con un grado de cristalinidad bajo [75], y a continuación, sobre fases con un grado de cristalinidad alto [76]. Esto ocurre debido a que las fases con cristalinidad baja poseen cadenas poliméricas menos empaquetadas, con ramificaciones o asimetrías, lo que facilita la interacción de las moléculas de agua con la cadena polimérica. Una vez iniciada la rotura de las cadenas poliméricas principales, el proceso se acelera

debido a los grupos hidroxilo generados. El aumento de estos productos ácidos ocasiona una reducción del pH local provocando la autocatálisis del material [76].

### I.2.3. Modificaciones superficiales

Como ya hemos comentado, las propiedades superficiales de un biomaterial son tan importantes como sus propiedades volumétricas. Los procesos para modificar la superficie del PLA son muy diversos y se puede diferenciar entre métodos físicos y químicos [77]. Dentro de los métodos físicos el uso de plasma para la activar la superficie del PLA permite sustituir los grupos funcionales del polímero por átomos o grupos químicos propios del plasma usado. También, la exposición a la radiación UV genera radicales libres que pueden activar la superficie al unirse otras moléculas con ellos o, comenzar la rotura de las cadenas poliméricas provocando el deterioro de sus propiedades mecánicas.

Entre los métodos químicos destaca el uso de la química húmeda que permite la creación de grupos funcionales o radicales libres por las roturas de los enlaces de la cadena polimérica. Una vez generados estos puntos de unión, es posible insertar componentes biológicos y orgánicos previamente introducidos en la fase líquida creando una amplia gama de funcionalidades biomédicas.

Ahora bien, también cuando se introducen aditivos en la matriz de PLA es de esperar que estos compuestos alteren la estructura del polímero y lleguen a afectar sus propiedades superficiales.

La adición de sustancias activas al interior del PLA Esta es una de las técnicas más utilizadas para con el objetivo de mejorar su comportamiento y modular su proceso de degradación. Estos aditivos pueden ser entre otros, partículas metálicas, biocerámicos, proteínas, aceites esenciales o tensioactivos. El enriquecimiento de la matriz con dichas sustancias se puede realizar con diferentes técnicas, y en distintas fases del proceso de fabricación. En polímeros

no degradables las sustancias añadidas pretenden, en su mayoría, mejorar sus propiedades intrínsecas, como la resistencia mecánica, la fluencia, la conductividad eléctrica, etc. En cambio, en polímeros degradables estas sustancias, no sólo se incorporan para mejorar las propiedades ya mencionadas, sino que al liberarse por la degradación del polímero pueden generar un efecto o una respuesta positiva en el medio circundante, como lograr una actividad antimicrobiana o mejorar la integración tisular. Por citar un ejemplo, en el trabajo de Škrlová *et al.* [36], se enriqueció PLA con una serie de compuestos, como partículas metálicas de nitrato de plata de al 1 % (p/p) y tensioactivos cuaternarios como el bromuro de hexadecilpiridinio y el bromuro de hexadeciltrimetilamonio, anclados en vermiculita u óxido de grafeno. Esta modificación ocasionó que la superficie evitara la adhesión bacteriana, haciendo efectiva su respuesta antimicrobiana durante 6 meses.

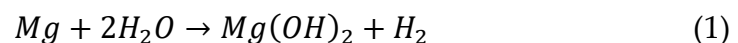
Para esta tesis se sintetizó un material polimérico degradable enriquecido. Concretamente, se incorporaron partículas metálicas y un tensioactivo catiónico en la matriz de PLA. Entre de las partículas metálicas que pueden ser añadidas a las matrices poliméricas, el magnesio aparece como una buena opción.

El  $Mg^{2+}$ , es el cuarto ion con más presencia en el cuerpo humano [78]. Los huesos, músculos y tejidos blandos no musculares retienen el 99 % de magnesio del cuerpo. Este elemento posee un papel fundamental en la fisiología cerebral, cardíaca y muscular. Está presente en moléculas tan importantes como el adenosín trifosfato (ATP), el adenosín difosfato (ADP), los ácidos nucleicos, etc. y también media en las actividades enzimáticas relacionadas con la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN), de ácido ribonucleico (ARN) y de proteínas. Interviene en diversas funciones como los procesos intracelulares, las actividades enzimáticas y el intercambio de sodio y potasio a través de membranas [79], [80]. Incluso su presencia puede acelerar el crecimiento celular y la formación ósea [80]. Asimismo, el magnesio presenta propiedades características contra los

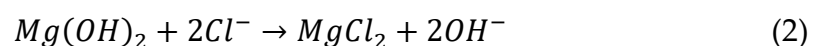


microorganismos [81]–[84]. El efecto antibacteriano asociado al Mg se relaciona con la alcalinización del medio circundante durante su degradación, y al gran estrés osmótico originado en las células bacterianas por la asimilación de iones de magnesio [83]–[86]. La degradación del Mg ocasiona un aumento del pH por encima de 9 en los alrededores de la bacteria. Como respuesta, el microorganismo liberará a través de su membrana un gran número de protones para equilibrar el pH. Así, el gradiente electroquímico de  $H^+$  en el espacio intermembrana se ve alterado, inhibiendo la creación de ATP por la bacteria y disminuyendo la viabilidad de los microorganismos [85]. Esto ocurre debido a que los protones son los que activan el mecanismo de creación de ATP. En segundo lugar, una alta concentración de magnesio en el exterior de la membrana bacteriana genera efectos nocivos en su viabilidad. Al poseer posiciones y efectos importantes en la bacteria, un aumento excesivo de magnesio provoca un estrés osmótico debido a su función como regulador de la presión osmótica [87].

Por otra parte, cuando el Mg reacciona con el agua genera hidrógeno e hidróxido de magnesio según la reacción (1):

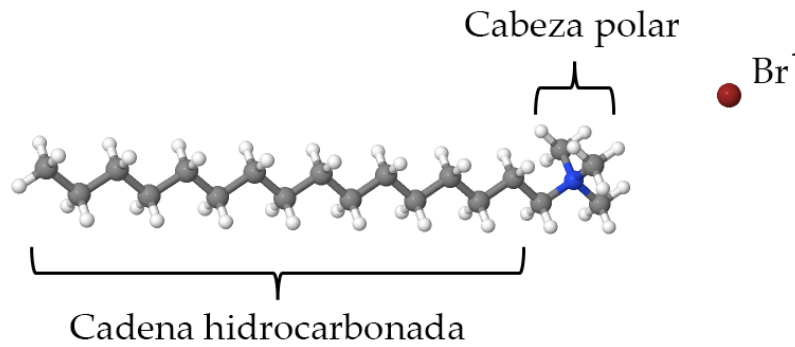


Este proceso es muy sensible al pH. El hidróxido de magnesio es soluble a un pH menor de 10,5, pero precipita por encima de él. Puesto que el magnesio localizado en los implantes se expone a medios fisiológicos acuosos, con componentes diversos, es relevante conocer sus consecuencias sobre la degradación [88]. En la revisión de Luque-Agudo *et al.*, se ha descrito que el Mg puede formar fosfatos, carbonatos y sales mixtas dependiendo de los componentes del medio acuoso en el que se degrade [88]. En el caso de la presencia de cloruros en el medio, tanto el Mg como el  $Mg(OH)_2$  reaccionan, teniendo lugar la formación de  $MgCl_2$  por el siguiente proceso (2):



Esta reacción tiene lugar a un pH entre 7,4 y 7,6, el esperado en el cuerpo humano, ocasionando un aumento de la solubilidad del Mg y favoreciendo por tanto su corrosión, y un aumento de la concentración de  $Mg^{2+}$  y de pH.

Una de las opciones para mejorar las propiedades del metal degradable, y las propiedades mecánicas del polímero, como la fluencia, la dureza y la rigidez, es introducir el magnesio en las soluciones poliméricas [89], [90]. Así, el material degradable compuesto PLA/Mg se ha utilizado para generar pastas de impresión 3D, agujas, alambres, etc [91]–[95]. Al enriquecer matrices poliméricas con partículas sólidas es importante conseguir una buena dispersión de dichas partículas. Diversos estudios han documentado el papel de los tensioactivos como estabilizadores de partículas, evitando así su sedimentación y mejorando su dispersión [96]–[99]. Estas sustancias influyen por medio de la tensión superficial en la superficie de contacto entre fases hidrófobas-hidrófilas. Estas moléculas anfifílicas en la interfase aire-agua orienta su parte hidrofóbica fuera del agua, y su parte hidrofílica queda sumergida. Se pueden clasificar los tensioactivos según la carga que presenta el grupo hidrófilo, como catiónicos, aniónicos, no iónico o zwitteriónicos. En esta tesis se utilizó un tensioactivo catiónico, concretamente el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), formado por una cadena hidrocarbonada hidrofóbica terminada en un grupo amonio cuaternario que presenta carga positiva (figura 1.4). La interacción del CTAB con el Mg se lleva a cabo a través de la adsorción de la parte hidrofóbica por la partícula de Mg, dejando la parte hidrofílica hacia el exterior. La carga positiva del grupo amino ocasiona repulsiones electrostáticas entre partículas de magnesio, promoviendo la buena dispersión de las partículas de Mg [99]–[102].



**Figura 1.4.** Estructura del tensioactivo bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB).

Además de su función como dispersante, el CTAB presenta otras propiedades dentro de la matriz polimérica como la mejora en la mojabilidad del polímero [99], [103], y su eficacia como desinfectante y/o agente bactericida [101], [104], [105], ya que cantidades muy pequeñas de este compuesto son capaces de eliminar biocapas maduras [101], [103]. La facilidad de adsorción del CTAB por las superficies bacterianas, debido a su carga positiva, hace que sea uno de los tensioactivos antisépticos y desinfectantes más potentes [103]. Esta molécula tiene la capacidad de desorganizar la membrana bacteriana [106]–[110], uniéndose a los lípidos de esta, y provocando la desnaturalización de estos [106]–[110]. Al desnaturalizarse, los lípidos de la membrana se dispersan e interfieren con el transporte de iones necesario para la función biológica de la bacteria, causándole la muerte. Además, la unión del CTAB a la membrana bacteriana la hace más hidrofílica y menos adhesiva [105].

En esta tesis se emplearon láminas fabricadas con PLA enriquecidas con partículas de Mg y CTAB. Como ya hemos explicado, estas adiciones pueden otorgar mejores propiedades mecánicas, de degradación, físico-químicas y antimicrobianas al material compuesto que al PLA.

## I.2.4. Aplicaciones del ácido poliláctico en biomedicina

Las propiedades del PLA desempeñan un papel fundamental para determinar las aplicaciones que se den a los dispositivos creados con él. El PLA ha sido empleado para fabricar multitud de elementos en el ambiente biomédico con diferentes características y formas [39], [52]. Existen diferentes procesos para moldear al PLA. Entre ellos podemos destacar la extrusión, la inyección, la impresión 3D, la irradiación por haz de electrones o el *solvent-casting*. El uso de estas técnicas unido a las modificaciones volumétricas y superficiales genera una gran variedad de dispositivos de PLA con diferentes finalidades. Dos de los objetivos en los que más se ha avanzado en el uso del PLA en el ámbito biomédico son la ingeniería de tejidos y la liberación de compuestos.

La ingeniería de tejidos tiene como finalidad restaurar, mejorar o reparar la función de dichos tejidos en el cuerpo humano. En este ámbito, la fabricación de andamios de PLA es una de las opciones más investigadas. Los andamios están destinados a inducir procesos celulares, como la migración, la proliferación y la diferenciación celular. Los primeros estudios con PLA se centraron en utilizar el polímero como material base para la creación de andamios guiando el crecimiento celular [111]. Los andamios de PLA se pueden fabricar de diferentes modos como fibras o espumas [31], [51], [112]. La aparición de la impresión 3D, el bajo coste del material y la gran diversidad de composites utilizables son parte de los motivos por lo que han aumentado el uso de estas estructuras. Un ejemplo de la fabricación de andamios con PLA se encuentra en el estudio de Navarro *et al.* [31], [51], [112], donde usaron PLA combinado con vidrio de fosfato de calcio para desarrollar andamios que poseían poros interconectados, una resistencia mecánica adecuada, y una buena interacción entre las células y el material. Otro ejemplo son los andamios biodegradables creados por Yan *et al.* [112] quienes utilizaron una impresora 3D, e incorporaron al PLA deferozamina, una sustancia

esencial para la angiogénesis y la osteogénesis. Estos andamios mostraron un gran potencial debido a su flexibilidad y plasticidad.

Sin embargo, en la actualidad, el carácter biodegradable del PLA y la versatilidad de sus modificaciones han permitido otros usos en este ámbito. Como ejemplo, cabe citar el estudio de Dürselen *et al.* [113], [114], en el que desarrollaron y evaluaron fibras poliméricas reabsorbibles para la mejora de ligamentos. Las fibras se fabricaron con PLA y poli (ácido glicólico) (PGA) utilizando la técnica de electrospinning, obteniendo un aumento significativo de la carga máxima y la rigidez del ligamento.

Con relación al área cardiovascular, el PLA se ha utilizado para tratar aneurismas arteriales. En varios estudios se utilizaron microesferas o placas de PLLA como dispositivos embolizantes para corregir malformaciones arteriovenosas, fístulas o tumores [115]–[118]. En concreto, Li *et al.* [117] utilizaron microesferas de PLA dirigidas por resonancia magnética, para la embolización de un vaso sanguíneo o una parte específica del sistema vascular, reduciendo el flujo sanguíneo y deteniendo el suministro de oxígeno y nutrientes a una región en particular.

Una propiedad clave para mejorar la regeneración ósea, a través de dispositivos, es la osteoconducción. Hwang *et al.* [56] estudiaron membranas de PLA recubiertas de tantalio por pulverización catódica. Estas membranas tenían una estructura fibrosa, pero con el recubrimiento de Ta ganaron estabilidad mecánica y mejoraron la osteoconducción de PLA. Los ensayos celulares *in vitro* demostraron que los preosteoblastos se adhirieron, proliferaron y diferenciaron muy satisfactoriamente sobre ellas. Este comportamiento *in vitro* se reprodujo en los ensayos *in vivo* con un grado de curación ósea similar al observado en membranas de colágeno. También Shikinami *et al.* [119], quienes fabricaron un material de base PLLA enriquecido con partículas de hidroxiapatita (HP),

compararon la bioresorción, la bioactividad osteoconductora y el reemplazo óseo de varillas hechas con PLLA/HP implantadas en tres sitios diferentes en fémures de conejo. Este material compuesto permitió la liberación sostenida de iones de calcio y fosfato que favorecen la formación ósea. La hidroxiapatita puede estimular de forma independiente la osteogénesis a través de la activación de los osteoblastos y las células preosteoblásticas. La mezcla de PLA con hidroxiapatita consigue unir este efecto con una mejora de las propiedades físicas y mecánicas del compuesto. Zhang *et al.* [120] utilizaron las técnicas de impresión 3D para crear andamios compuestos de PLA/HP, y analizaron la capacidad del andamio fabricado para reparar tejido óseo y reducir la inflamación. Los resultados indicaron que estos andamios eran altamente compatibles, promoviendo la formación de tejido óseo y generando muy poca respuesta inflamatoria, proponiéndolos como una opción muy prometedora para tratar defectos en los huesos.

El uso de PLA en combinación con otros materiales optimizados puede mejorar significativamente las propiedades de los dispositivos utilizados en aplicaciones biomédicas, incluyendo la producción de placas de fijación mandibular [121]. Humaira *et al.*, investigaron placas de PLA con poliéster-éter-cetona (PPC) y nanotubos de halloysita (HNT) [122]. Los resultados mostraron que una relación de masa de 70/25/5 % (p/p) de PLA/PPC/HNT generaba placas con muy buenas propiedades mecánicas, térmicas y de biodegradabilidad, que permitieron su uso en cirugías de mandíbula para estabilizar fracturas y otras lesiones [122].

Los estudios que abordan el uso del PLA como sistema liberador de compuestos se basan fundamentalmente en la capacidad degradable del material. Esta finalidad se consigue o bien, incluyendo sustancias activas en una matriz de PLA, o bien utilizando el polímero para formar nanopartículas cargadas del compuesto [123]–[126]. A partir de estas estructuras sería posible

liberar el compuesto para tratar infecciones protésicas, defectos óseos, tumores, etc [123]–[131]. Lao *et al.* [132] evaluaron la biocompatibilidad y la capacidad de microesferas de PLLA modificadas con quitosano, para ser utilizadas como microportadores de células en la ingeniería de tejidos cartilagosos. Las pruebas de liberación de células demostraron que estas microesferas eran capaces de mantener la viabilidad celular y de liberar las células encapsuladas de manera controlada.

El PLA y sus mezclas se utilizan para generar stents liberadores de fármacos, que ya se encuentran en el mercado. Garg *et al.* [133] en su revisión de hace ya una década, informaba de la multitud de stents usados para esta finalidad. Como ejemplo, señalar el trabajo de Li *et al.* [58] quienes desarrollaron un stent para reducir la incidencia de infecciones y la recurrencia de la estenosis traqueal, recubierto de una membrana de fibras de PLA con nanopartículas de plata. De este modo obtuvieron una alta actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, y una capacidad antihiperplasia significativa en comparación con los stents convencionales.

Los sistemas de administración de fármacos basados en PLA tienen resultados prometedores para las estrategias terapéuticas en los tratamientos contra el cáncer [44] [134]. Yuan *et al.* [135] fabricaron andamios de fibras de PLLA electrohiladas, incluyendo bicarbonato, doxorrubicina e ibuprofeno para la terapia del cáncer hepático. La inclusión de bicarbonato permitió controlar los cambios de pH extracelulares limitantes en el uso de andamios de PLA para el carcinoma hepatocelular. Además, la carga estratégica de ibuprofeno en la superficie del andamio ayudó a controlar la inflamación en sus primeras etapas.

La biodegradabilidad del PLA permite también el uso tópico de los dispositivos creados con él. Los enfermos de diabetes sufren úlceras y heridas que tienden a infectarse debido a que su sistema de cicatrización está

comprometido. Ali *et al.* [136] elaboraron parches multicapa de PLA, incluyendo diferentes sustancias activas en cada capa para abordar los diversos problemas asociados con las heridas diabéticas. Las sustancias liberadas de los parches ayudaron a la deposición de colágeno, a la generación de nuevos vasos sanguíneos y a la reducción de la inflamación en las heridas tratadas. Los estudios histológicos confirmaron la alta eficiencia de los parches en la cicatrización de heridas y la restauración del tejido sin cicatrices [136].

Siafaka *et al.* [137] desarrollaron nanofibras de PLA/ poli(butilenadipato) para un sistema de liberación basado en la temperatura para la administración prolongada de teriflunomida, un agente antirreumatoide. Su liberación se logró gracias a la hipertermia producida por la incorporación de nanopartículas magnéticas en las matrices, permitiendo la liberación del fármaco en respuesta a cambios de temperatura específicos durante un período de 21 días, con una liberación más rápida a temperaturas superiores a 37 °C. Estos resultados demostraron la viabilidad de utilizar la temperatura como una estrategia efectiva para el control de la liberación de fármacos en matrices de PLA. También, se han utilizado sistemas de liberación activados por ultrasonidos. Por ejemplo, este procedimiento se empleó para tratar la candidiasis vaginal, administrando nanopartículas de poli(ácido láctico-co-glicólico)-polietilenglicol (PLGA-PEG) cargadas con anfotericina B (AmB-NP), la cual se liberaba mediante ultrasonidos de baja intensidad [138].

Además, en el ámbito dental, se ha estudiado la liberación de fármacos con efecto antibacteriano desde materiales de PLA. Karacan *et al.* [57] fabricaron un recubrimiento de PLA con gentamicina, creado mediante la técnica de pulverización por plasma. Los resultados de este estudio demostraron que los implantes dentales podían recubrirse con un polímero biodegradable, como el ácido poliláctico, conteniendo microesferas de hidroxiapatita cargadas de



antibióticos utilizadas para reducir o, en algunos casos, incluso eliminar la infección bacteriana.

El PLA también ha sido empleado junto con sustancias naturales con potencial antibacteriano. La investigación de este tipo de sustancias abre un nuevo campo de tratamiento antibacteriano muy necesario debido al aumento de la resistencia antibiótica. El carvacrol es un compuesto natural de bajo costo derivado del orégano que presenta propiedades antibacterianas contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Concretamente, se han desarrollado andamios de PLA cargados con carvacrol mediante impresión 3D como plataformas para apoyar la regeneración del tejido óseo y prevenir la biocapa [139].

### I.3. Colonización bacteriana de superficies en biomedicina

Los procesos infecciosos son uno de los mayores peligros para el éxito de un implante. Como ya hemos indicado, los avances científicos en el desarrollo de nuevos biomateriales deben ir unidos a la investigación de sistemas o mecanismos antimicrobianos, para minimizar o impedir la colonización bacteriana en las nuevas superficies [140], [141].

Las infecciones asociadas a la implantación de una prótesis pueden tener graves consecuencias para la salud del paciente si no son detectadas a tiempo o son mal tratadas. Es importante que los pacientes y los cirujanos tomen medidas preventivas, como la administración de antibióticos profilácticos o la esterilización adecuada de los equipos quirúrgicos, para minimizar el riesgo de infección [3], [140], [142]. Las bacterias poseen varias vías de acceso al implante como son la hematógena y la directa. La primera necesita de la transmisión sanguínea del patógeno, y la segunda, ocurre cuando las bacterias se infiltran en el tejido al producirse una herida abierta o a través de la propia cirugía [143]–[145]. Una vez las bacterias entran, la infección puede verse potenciada por la

presencia de tejido muerto en la zona de implantación, la liberación de partículas del implante al tejido circundante o la falta de vascularización del área de implantación [146], [147].

Las infecciones pueden clasificarse según el momento en el que se detectan como tempranas o tardías. Las infecciones tempranas son aquellas que se detectan en los primeros meses después de la cirugía de la prótesis. En cambio, las infecciones tardías son las que se manifiestan varios meses o incluso años después de la cirugía de implantación, las cuales suelen ser causadas por bacterias que provienen de un foco lejano.

Las infecciones producidas después de la colocación de un implante suponen un gran problema para todo tipo de pacientes. Sin embargo, en pacientes con alto riesgo de comorbilidad, como los diabéticos, la acción inmunológica y los tratamientos tradicionales no resultan en muchos casos suficientes para contrarrestar las infecciones [148].

Como ya hemos mencionado, la diabetes es una enfermedad que puede aumentar la incidencia de infección en pacientes con implantes, debido a su efecto sobre el sistema inmune como es la desregularización de la secreción de citoquinas inflamatorias o el deterioro de la función de los neutrófilos y las células T que reducen la quimiotaxis y/o la actividad fagocítica [149]–[151]. También pueden presentar una alteración de la función de las células endoteliales y de la microcirculación [151]–[154]. Forstermann y Sessa [152] estudiaron como la hiperglucemia se asocia a una disminución de la producción de óxido nítrico, importante en tejidos endoteliales, lo cual puede contribuir a un mayor estrés oxidativo, una adhesión leucocitaria y una permeabilidad vascular anormal. Asimismo, los pacientes diabéticos sufren una disminución de la capacidad de cicatrización de las heridas debido a que los cambios vasculares ocasionan la reducción del suministro de sangre en la zona lesionada. De esta

forma, estas alteraciones influyen en la llegada de nutrientes hacia la zona para reparar, causando un impacto negativo en la recuperación del tejido.

La comprensión de las interacciones biológicas subyacentes entre la diabetes y la infección en pacientes con implantes es fundamental para el desarrollo de estrategias de prevención y tratamiento más efectivas. No obstante, las investigaciones del efecto de la diabetes sobre los microorganismos implicados en las infecciones están poco exploradas, y abren otro punto de vista y otro frente de tratamiento para evitar o eliminar las infecciones en pacientes diabéticos con implantes.

Un modelo que ilustra el proceso de infección es el descrito por Gristina en 1990 [155]. Este autor plantea una disputa entre bacterias y células por el éxito del implante, la llamada “carrera por la superficie” en la que las bacterias y las células del huésped compiten por ocupar la superficie del implante. Si las ganadoras de la carrera son las células del huésped, es más probable que haya una integración tisular y la superficie sea menos susceptible a la colonización bacteriana. Pero, si las vencedoras son las bacterias, las defensas del huésped no serán capaces de impedir la adhesión bacteriana y la posterior creación de una biocapa [155].

En 2008, Geoghegan *et al.* eran conscientes de que el éxito de los microorganismos para empezar a colonizar un implante dependía de su capacidad para adaptar la expresión de sus factores de virulencia al entorno [156]. Los factores de virulencia más comunes que intervienen en las infecciones protésicas son la existencia de proteínas de adhesión o adhesinas, la fabricación de exopolisacáridos, la capacidad de formación de biocapas, la segregación de enzimas para ayudar a resistir el ataque del sistema inmunológico, la resistencia a los antibióticos y los cambios genéticos que les permiten adaptarse mejor a la superficie de las prótesis.

### I.3.1. Etapas del proceso de colonización bacteriano

Desde hace varias décadas se están realizando esfuerzos por dilucidar los mecanismos exactos que intervienen en los procesos de colonización bacteriana. Sin embargo, hasta la fecha no hay un modelo teórico exacto que se pueda aplicar a cualquier sistema de adhesión bacteriana. De lo que no hay duda, es que el proceso de colonización bacteriana se compone de dos fases en las que los microorganismos se adhieren a la superficie del biomaterial. La primera fase se conoce como adhesión inespecífica y/o reversible regida por interacciones físico-químicas. La segunda fase de adhesión es de carácter específico y/o irreversible en la que intervienen las interacciones moleculares y celulares.

Para que la adhesión bacteriana se lleve a cabo, es necesario que la bacteria se aproxime a la superficie del material. En este proceso de aproximación la hidrofobicidad y la carga eléctrica son propiedades que ayudan a predecir el comportamiento de la bacteria, de modo que puede ser asimilado al de una partícula coloidal. La teoría DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek) es un modelo teórico que permite describir las interacciones entre coloides y entre los sustratos [157]–[160]. Según esta teoría, la fijación de partículas cargadas, como los microorganismos, a una superficie se produce debido a la combinación de fuerzas de largo alcance, de tipo Lifshitz-Van der Waals, y las fuerzas de corto alcance, de tipo electrostático. En el caso de un proceso de adhesión bacteriana cuando el microorganismo se sitúa a partir de 50 nm de la superficie del material entran en juego las fuerzas Lifshitz-Van der Waals que son generalmente atractivas. Las fuerzas electrostáticas, que son el resultado de la doble capa eléctrica que se forma alrededor de las superficies de las bacterias y del sustrato al estar inmersas en un medio iónico, influyen en la adhesión cuando ambas superficies se encuentran muy próximas, a menos de 5 nm. Además de estas fuerzas, también actúan en distancias cortas, interacciones polares, incluido el

puente de hidrógeno [161], [162] que, aunque también son de naturaleza electrostática, por su entidad, suelen analizarse separadamente.

Si bien estos modelos, han demostrado ser útiles para predecir la adhesión de microorganismos a superficies, no es posible encontrar una descripción universal aplicable para cada caso [163]–[165]. Esto es debido a que los procesos de adhesión dependen de multitud de factores a nivel experimental consecuencia de la complejidad del sistema, que suponen una limitación para aplicar modelos teóricos, por lo que no siempre los resultados teóricos definen eficientemente el comportamiento empírico.

Al finalizar la fase de adhesión inespecífica, las bacterias están suficientemente próximas a la superficie para que puedan actuar interacciones de tipo bioquímico entre las moléculas y las estructuras de la superficie bacteriana, con la capa superficial del sustrato [3], [78]. Después de esta fase, las bacterias comienzan a proliferar, y se forman lo conocido como biocapas [3], [22], [166].

Se puede definir la biocapa como un conjunto de células procariotas embebidas en una matriz exopolisacárida de origen biológico, situadas sobre la superficie de un determinado material, bien sea biótico o abiótico [167]. Las biocapas representan una forma de crecimiento protegido que permite a los microorganismos sobrevivir en ambientes hostiles, y que les hace presentar una fisiología y comportamiento significativamente diferentes a los microorganismos que crecen individualmente. Las técnicas actuales de observación tridimensional de alta resolución, y el uso de colorantes moleculares específicos han demostrado que las biocapas no son simplemente agregados pasivos de células adheridas a una superficie, sino que son sistemas biológicos complejos y dinámicos desde un punto de vista estructural. La biocapa presenta un alto nivel de diferenciación

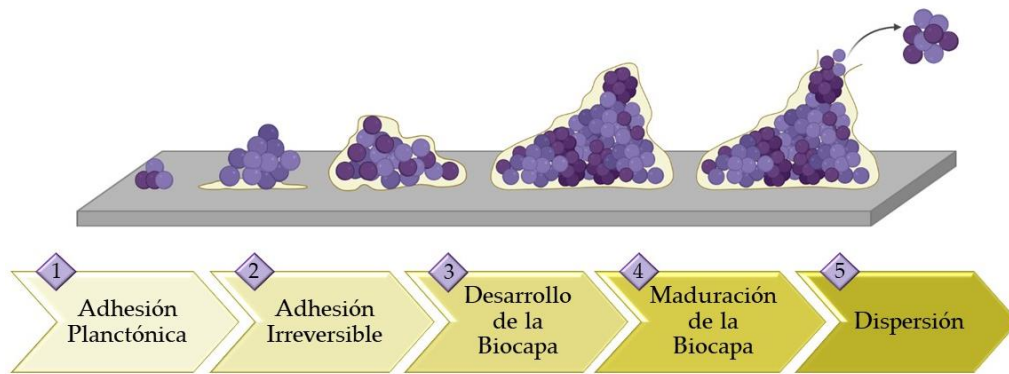
celular, complejos sistemas de comunicación célula-célula y otorga resistencia antibiótica a las bacterias embebidas en ella [168].

El proceso de desarrollo de la biocapa es único en biología, ya que implica la actividad coordinada de varios genomas de procariotas que no actúan en las bacterias en forma planctónica, para formar una comunidad multicelular funcional [169]. La formación de la biocapa ocurre mediante al menos tres mecanismos: división bacteriana, reunificación de células adheridas mediante la movilidad superficial y captación de células planctónicas. La contribución relativa de cada mecanismo depende de los organismos involucrados, la naturaleza de la superficie y las condiciones físico-químicas del medio ambiente, lo que afecta a la estructura de la biocapa resultante.

La biocapa está estructurada en microcolonias de bacterias rodeadas de la denominada matriz exopolisacárida (EPS). Estas estructuras contienen canales abiertos, permitiendo el intercambio de nutrientes y el acceso al medio, lo que posibilita que las células en el interior de la biocapa se mantengan en condiciones nutricionales adecuadas. En el interior de la biocapa, se crea un gradiente de pH y de oxígeno que afecta a su metabolismo, siendo metabólicamente más activas las bacterias situadas en áreas superficiales con respecto a las localizadas en las zonas más profundas. En estas últimas, las bacterias deben adaptarse a una disponibilidad reducida de oxígeno.

La matriz envolvente de la biocapa insoluble, viscosa y única para cada microorganismo está constituida mayoritariamente por polisacáridos, pero también por proteínas, ácidos nucleicos y compuestos del medio fisiológico. La matriz de EPS ofrece diferentes ventajas a los microorganismos. Entre ellas, la protección de las bacterias que hay dentro frente a los factores de estrés externos como la salinidad del ambiente, una temperatura extrema o la presión [22], [166].

En el proceso de formación de la biocapa puede distinguirse tres etapas. (figura 1.5) [22], [170]. En la primera fase, una vez adheridas las bacterias a la superficie de manera específica comienzan a segregar EPS. En esta fase es de suma importancia tanto la movilidad superficial como la organización de los microorganismos sobre la superficie del sustrato, para comenzar a agruparse. El EPS exudado por las bacterias se dispersa parcialmente en el medio líquido ocasionando la unión de las bacterias entre sí, facilitando el inicio de la formación de microcolonias y la maduración de la biocapa. En la fase siguiente tiene lugar la maduración de la biocapa. En proceso se crea una arquitectura compleja, con canales y poros dentro de la matriz, así como la redistribución de las bacterias en la biocapa. También, la densidad y complejidad de la biocapa aumentan con el tiempo a medida que las bacterias adheridas se multiplican, mueren y sus componentes extracelulares interactúan con las moléculas orgánicas e inorgánicas del ambiente circundante. La maduración de la biocapa está limitada por el pH interno, la presencia de oxígeno, la osmolaridad y/o la penetración de nutrientes. En la última fase tiene lugar la dispersión de las bacterias fuera de la biocapa que puede ocurrir por varios mecanismos. La separación es el mecanismo interno por el cual las bacterias se dispersan debido a la disminución de nutrientes u oxígeno. También es posible que la dispersión de las bacterias de la biocapa tenga lugar por factores externos, como la erosión, en la que un estímulo externo continuo hace que se dispersen, o la abrasión producida cuando una partícula externa colisiona con la biocapa. Las bacterias de la biocapa dispersadas pueden revertir su estado planctónico, por lo que, el desarrollo de vida de la biocapa se transforma en un ciclo completo. Asimismo, los residuos y nutrientes exudados fuera de la biocapa preparan nuevos focos en la superficie para que las bacterias dispersas se establezcan.



**Figura 1.5.** Representación esquemática de las fases de formación de biocapas.

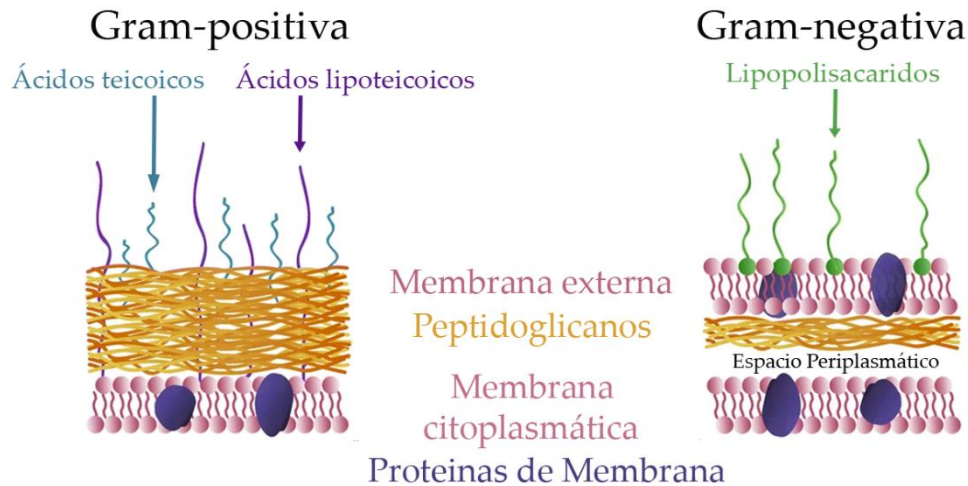
La comunicación entre bacterias es de vital importancia en todo el proceso de creación de una biocapa. Las bacterias interactúan entre sí a través de un proceso llamado *quorum sensing* (QS) tanto fuera como dentro de la matriz de EPS. El *quorum sensing* es un proceso de comunicación celular en que las bacterias segregan y detectan moléculas de señalización que se difunden en el entorno. Cuando la concentración de estas moléculas alcanza un nivel crítico, las bacterias pueden detectar la densidad de población de su misma especie y coordinar su comportamiento. Este comportamiento coordinado puede incluir la producción de enzimas, la liberación de toxinas o la formación o la salida de las biocapas. Las principales moléculas señalizadoras o auto-inductoras que son empleadas para comunicarse con las demás bacterias son las N-acil homoserina lactona, que predominan en bacterias Gram-negativas, mientras que los péptidos autoinductores prevalecen en las Gram-positivas, específicamente los oligopéptidos modificados [171], [172]. En concreto en las Gram-positivas, este mecanismo de comunicación depende de dos sensores de quinasa que detectan las señales de oligopéptidos, lo que activa la fosforilación y la unión al ADN, regulando la transcripción de genes [173], [174].



### I.3.2. Superficies bacterianas

La superficie de las bacterias es la primera parte del microorganismo que interaccionan con el ambiente. En el campo biológico se denomina envoltura bacteriana, y está formada, de dentro a fuera, por una membrana citoplasmática, una pared celular y, en algunos casos, una membrana externa. También existen otro tipo de elementos, conocidos como estructuras variables o facultativas que pueden estar presentes o ausentes, y que difieren entre los diferentes tipos de microorganismos. Entre estas se incluyen los flagelos, las fimbrias o pilis, que son apéndices bacterianos, así como la cápsula o las endosporas.

Se pueden clasificar las bacterias en función del color que obtiene después de realizar la tinción de Gram, donde se diferencian entre bacterias Gram-positivas o Gram-negativas (figura 1.6). La superficie bacteriana de las Gram-positivas posee una pared celular compuesta predominantemente por capas de peptidoglicanos situadas alrededor de la membrana citoplasmática [175], [176]. En la zona de la pared celular se encuentran otros componentes como los ácidos teicoicos y los lipoteicoicos. Los ácidos teicoicos son glicopolímeros unidos covalentemente a los peptidoglicanos. En cambio, los lipoteicoicos se conectan a la membrana citoplasmática a través de un anclaje lipídico. La membrana citoplasmática de las bacterias Gram-positivas tiene una estructura de bicapa lipídica, formada principalmente por fosfolípidos y lípidos anfipáticos. Asimismo, contiene proteínas de transporte y receptores de señalización. Además, por fuera del peptidoglicano suele existir una cubierta de proteínas. La diversidad de estas proteínas junto con la variedad de los ácidos teicoicos son elementos distintivos entre los diferentes grupos de bacterias Gram-positivas que permiten clasificarlas.



**Figura 1.6.** Representación esquemática de las superficies bacterianas Gram-positivas y Gram-negativas.

La estructura y composición química de la superficie de las bacterias Gram-negativas es mucho más compleja. Lo más notable es la presencia de tres capas en la superficie. En la parte más exterior encontramos la membrana externa, compuesta por una bicapa lipídica, muy similar en composición a la membrana citoplasmática, también con cabezas polares, colas de ácidos grasos y proteínas integrales [175]. Está dividida en dos, la parte externa donde se sitúan los lipopolisacáridos (LPS) proyectados hacia el ambiente, y la interna constituida por una capa de fosfolípidos que contactan con el espacio periplasmático [176]. Este espacio está situado entre la membrana externa y la membrana citoplasmática. En él se localizan diversas enzimas hidrolíticas importantes para la degradación y metabolización por la bacteria de macromoléculas de gran tamaño. Además, también presentan una fina capa de peptidoglicanos [175], [176]. La membrana citoplasmática de las bacterias Gram-negativas es similar a la de las Gram-positivas, pero contiene más proteínas de transporte y enzimas debido a su papel en la regulación del transporte de moléculas a través de la membrana.

Como hemos descrito, la pared celular se compone por una red de peptidoglicanos. Esta molécula está compuesta por dos derivados de glucosa, N-acetilglucosamina (NAGA) y ácido N-acetilmurámico (NAM), alternados en

cadenas lineales largas. A su vez, las cadenas se entrecruzan con las aminas de cada cadena, componiendo un tetrapéptido con estructura en forma de celosía. Los aminoácidos de la estructura son L-alanina, D-glutamina, L-lisina o ácido meso-diaminopimérico (DPA) y D-alanina, los cuales se pueden encontrar en diferentes proporciones dependiendo de la bacteria. El peptidoglicano es un elemento clave para la estructura, la división y la supervivencia de las bacterias. Igualmente, en el proceso de infección el peptidoglicano puede interactuar con la fagocitosis y estimular respuestas inmunitarias, como procesos pirogénicos debido a que son reconocidos por los receptores específicos del sistema inmune, llevando desencadenar una cascada de señalización intracelular que ocasiona la producción y liberación de mediadores inflamatorios [175]–[179].

Los ácidos teicoicos y los lipoteicoicos (WTA) son moléculas presentes en la red de peptidoglicanos. Estas moléculas son antígenos superficiales que diferencian los serotipos bacterianos. Son capaces de favorecer la fijación a otros sustratos y a receptores específicos del hospedador [175]. Químicamente estas moléculas son polímeros de ribitol o glicerol modificados y unidos a grupos fosfato. Los grupos hidroxilo libres del glicerol o ribitol pueden estar sustituidos por diferentes azúcares como D-alanina, galactosa, glucosa, NAGA, N-acetilgalactosamina o succinato [180].

Los fosfolípidos que forman la membrana citoplasmática poseen componentes hidrofóbicos (ácidos grasos) e hidrofílicos (glicerol-fosfato) que presentan multitud de formas químicas distintas debido a la variación de los grupos unidos al esqueleto del glicerol. La estructura bicapa de la membrana citoplasmática se mantiene gracias a los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas. Adicionalmente, la interacción de cationes como  $Mg^{2+}$  o  $Ca^{2+}$ , ayudan también a estabilizarla al forman enlaces iónicos con las cargas negativas de los fosfolípidos [177]. Los fosfolípidos y otros compuestos de la membrana

intervienen en los mecanismos de producción de energía, la permeabilidad selectiva y el transporte de moléculas.

Todos estos componentes participan en las interacciones superficiales entre bacteria y sustrato en el proceso de colonización bacteriana, gracias a sus características proveen a la superficie de la bacteria de carga eléctrica y un cierto grado de hidrofobicidad. La N-acetilglucosamina o el ácido N-acetilmurámico que forman los peptidoglicanos influyen en la carga eléctrica de la superficie bacteriana, gracias a los grupos amino y carboxilo, en diferente número dependiendo de cada especie bacteriana. Por otro lado, cuando se encuentran en un medio acuoso, los ácidos teicoicos y lipoteicoicos pueden ionizarse resultando en una carga neta en la superficie de la bacteria. Al ser moléculas anfipáticas expresan una región hidrofóbica y otra hidrofílica en su estructura. La región hidrofóbica les confiere una fuerte afinidad por las superficies hidrofóbicas, como las membranas celulares y las proteínas. Además, se ha sugerido que los ácidos teicoicos y los lipoteicoicos pueden interactuar directamente con las células del huésped y modular su respuesta inmunitaria [181]–[183]. Asimismo, la carga de todos los compuestos de la superficie bacteriana está influenciada por el pH del ambiente, la presencia de iones en el ambiente y la producción de polímeros extracelulares.

Las propiedades de la superficie bacteriana son importantes en el proceso de colonización de una superficie. Estas características pueden modificarse o bien debido a cambios en la composición de la superficie bacteriana motivados por la variación de la temperatura, el pH, la presencia de ciertos nutrientes, o bien [184]–[186] por la adsorción sobre la superficie de los microorganismos de algún componente presente en el medio de suspensión. Weidenmaier y Lee investigaron cómo la introducción de altas concentraciones de glucosa originaba una sobreproducción de polisacáridos en la especie de *S. aureus* [187]. Igualmente, la pared puede reorganizarse debido a bajas temperaturas o escasos

nutrientes. Oliver analizó la capacidad de las bacterias de entrar en una fase vital de letargo debido a la exposición a condiciones subletales. Después de su recuperación observó una nueva distribución de la pared bacteriana que afectaba a las propiedades superficiales de esta, modificando su hidrofobicidad y carga superficial [188]. Cullmann y Schlungger [189] estudiaron la variación de las proteínas de membrana en varias cepas de *S. aureus* después de exponerlas en su fase de crecimiento a una situación hiperglucémica, cambios en la temperatura y sustancias bactericidas. Los resultados mostraron que la hiperglucemia ocasionó la pérdida de proteínas de la superficie bacteriana, y que la exposición a sustancias antibióticas modificó la composición de proteínas de membrana entre las diferentes cepas [189].

Es conveniente resaltar que, en cualquier caso, los cambios de composición de la superficie bacteriana dependen de la cepa y la forma en la que se alteren los componentes químicos en la pared bacteriana.

### I.3.3. Microorganismos implicados en la colonización de implantes protésicos

Los microorganismos asociados a las infecciones relacionadas con implantes protésicos son diversos. Los más frecuentemente aislados son *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus salivarius* y *Candida albicans* [36]. Los *Staphylococcus* son responsables del 50-60 % de las infecciones en implantes protésicos, mientras que otras especies solo representan un 10 % de los casos [143], [190]–[197].

El género *Staphylococcus* lo constituyen cocos no esporulados de 0,15 a 1,5  $\mu\text{m}$  que suelen estar solos, en parejas o en racimos. Esta es una de sus características más significativas, debida a su proceso de división celular asimétrica, y a su habilidad de dividirse en más de un plano [198]. Las especies de este género se clasifican entre aquellas con la capacidad de coagular el plasma (coagulasa

positiva) y las que no (coagulasa negativa). Cabe mencionar que también es uno de los aislados más comunes en infecciones protésicas en pacientes con diabetes [199]–[203]. En ambos ámbitos los *Staphylococcus* más frecuentes en infecciones asociadas a dispositivos biomédicos protésicos son *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* [193], [194] debido a la multitud de factores de virulencia que expresan [3], [204]. En particular, la especie *S. aureus*, posee mucha relevancia en el contexto diabético [199], [201], [203].

La especie *Staphylococcus epidermidis* es una bacteria Gram-positiva y anaerobia facultativa, situada dentro del grupo coagulasa negativo del género *Staphylococcus*. La coagulasa es una proteína que permite la conversión del fibrinógeno en fibrina, quien potencia la unión de las plaquetas en la sangre. Generalmente estas bacterias se presentan no encapsuladas, es decir, estos microorganismos no generan una capsula de polisacáridos o proteínas como defensa frente ataques ambientales o del huésped. Esta especie se localiza principalmente en la piel del huésped, por donde se puede introducir a través de las heridas y cicatrices, o en el proceso de implantación quirúrgica. En consecuencia, se la relaciona con numerosos episodios de infecciones nosocomiales. Además, se utiliza frecuentemente como modelo para evaluar la contaminación en prótesis [205]. Asimismo, tiene un comportamiento de patógena oportunista. Esto indica que puede ser parte de la microbiota inocua del cuerpo humano, pero si el sistema inmunológico se debilita por alguna razón, como enfermedad, tratamiento médico o afección crónica; pueden aprovechar la oportunidad para causar una infección en el paciente [198]. Su gran capacidad de formar biocapas es uno de sus factores de virulencia [3], [206]. Otro de sus factores de virulencia es su producción de la proteína de adhesión a polisacáridos intercelulares, lo cuales están muy implicados en la formación de biocapa.

La especie *Staphylococcus aureus*, también posee la capacidad de formar biocapa. Su principal peligro reside en sus factores de virulencia [207] que afectan

a su capacidad para invadir y causar daño al huésped. Algunos de los factores de virulencia son la expresión de proteínas específicas como la proteína A que facilita la adhesión a las células y la fagocitosis, la producción de diversas toxinas como la  $\beta$ -hemolisina o la toxina de Panton-Valentine leukocidina, que pueden causar daño tisular y suprimir la respuesta inmunitaria del huésped, y, uno de los más peligrosos, es su capacidad para crear resistencia antibiótica a través de mutaciones genéticas o transferencia horizontal de genes de resistencia. *S. aureus* es una de las bacterias más asociadas a las infecciones protésicas e infecciones en pacientes diabéticos, de ahí su elección en este trabajo [140], [150], [199], [202], [208], [209]. De forma similar a *S. epidermidis* es una bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa con carácter oportunista y sin encapsulación. Sin embargo, *S. aureus* posee la capacidad de producir coagulasa. Se puede encontrar en el organismo en las fosas nasales, las axilas o en el tracto gastrointestinal. Además, *S. aureus* es muy habitual como bacteria estándar en ensayos *in vitro* y como modelo de infección en entornos diabéticos [140], [150], [199], [202], [208], [209].

### I.3.4. Aproximaciones experimentales para el estudio de la colonización en biomateriales

Elegir la metodología *in vitro* adecuada al objetivo para estudiar la adhesión y retención bacteriana es una de las decisiones más complejas. Aunque los estudios *in vitro* son simplificaciones del ambiente *in vivo* [210], [211] los ensayos ofrecen muchas ventajas, ya que permiten controlar parámetros como la adición secuencial de sustancias durante el experimental. Además, dejan evaluar el progreso de la adhesión, y/o comparar la eficacia de sustancias antibacterianas [212]–[214].

Existen modelos estáticos de adhesión, caracterizados por ser sistemas cerrados donde una misma suspensión de bacterias se encuentra en contacto con el material, sin movimiento relativo o con una ligera agitación para minimizar el



efecto de sedimentación. Este método es el más sencillo y directo. Pueden implementarse en placas Petri, placas de microtitulación ó tubos de ensayo, entre otros, y, sobre cualquier superficie.

En contraposición, los modelos dinámicos garantizan un flujo constante de bacterias sobre la superficie que se evalúa, controlando parámetros del flujo, como el coeficiente de difusión, el número de Reynolds y el coeficiente de cizalladura. Para esta técnica existen dispositivos específicos donde realizar el análisis como cámaras de flujo de placas paralelas o dispositivos de Robbin.

En lo relativo al estudio de la biocapa, existen diferentes métodos de análisis. El índice de *slime*, por ejemplo, es una técnica que permite evaluar la creación de biocapa estudiando la cantidad de matriz extracelular producida y el aumento del crecimiento bacteriano. Por otro lado, la estimación de ATP en las bacterias de la biocapa informa de la cantidad relativa de bacterias vivas en la matriz de EPS formada sobre el material.

#### I.4. Entorno diabético

La diabetes es una enfermedad ampliamente extendida, lo que la convierte en un problema global que afecta a la calidad de vida. Según la OMS, la diabetes causó en 2016 1,6 millones de muertes. Particularmente, en Estados Unidos en 2017, la diabetes se convirtió en la séptima causa de muerte [215]. Si pensamos en el número de personas afectadas por la diabetes, la estadística es alarmante: la prevalencia ha aumentado un 4 % desde 1980 hasta 2014. La Federación Internacional de Diabetes contabilizó 125 millones de personas en todo el mundo en 2017 [216], afirmando que el 8,8 % de la población adulta mundial tiene diabetes [217]. Se estima que afecte a 220 millones de personas en el año 2020 en todo el mundo [218], llegando a 440 millones en 2030 [219]. Asimismo, se teme que aumente su prevalencia hasta 629 millones de personas en 2045 [215].



La diabetes *mellitus* es un trastorno metabólico crónico caracterizado por el descontrol de los niveles de glucosa e insulina en sangre. La glucosa es un monosacárido que proporciona energía al organismo. En cambio, la insulina es una hormona producida en el páncreas que facilita la entrega de la glucosa a las células, los tejidos y los órganos [220]. Cuando la diabetes está mal controlada también está asociada a la cetoacidosis. Se entiende como cetoacidosis a una elevación en la concentración de los cuerpos cetónicos. El desequilibrio en la producción de cuerpos cetónicos y de glucosa puede deberse o bien por una producción insuficiente de insulina, o bien porque la insulina producida no puede ser asimilada adecuadamente por el organismo [218]. En el caso de un nivel insuficiente de insulina, las células sustituyen con ácidos grasos la falta de glucosa como fuente de energía. El resultado de esta ruta metabólica son los cuerpos cetónicos, que a su vez pueden ser metabolizados por el cuerpo humano. Por lo tanto, cuando la glucosa está presente en la sangre, pero no puede ser metabolizada por falta de insulina, los cuerpos cetónicos aparecerán al metabolizar los ácidos grasos para reemplazar la glucosa. Según Ghimire y Dhamoon, la cadena bioquímica que desencadena el uso de cuerpos cetónicos se activa por la combinación de niveles bajos de insulina y niveles altos de glucagón, es decir, una relación baja de insulina/glucagón [221]. Al contrario que la insulina, la hormona glucagón contribuye a aumentar los niveles de glucosa en la sangre. Por este motivo, estos autores concluyeron que en la diabetes la alta producción de cuerpos cetónicos o cetoacidosis está relacionada con una hiperglucemia típica con deficiencia relativa o absoluta de insulina [221]. En esta situación coexistirán la hiperglucemia y la cetoacidosis en la sangre de los pacientes diabéticos.

### I.4.1. Las infecciones y la diabetes

Varios [14]–[20] han mostrado evidencias que relacionan la diabetes con un mayor riesgo de desarrollar infecciones en diferentes partes del cuerpo. Calvet *et al.*, revisaron las infecciones más comunes en pacientes con diabetes [15]. Sus

resultados señalaron que las más habituales se desarrollaban en la cabeza, la nariz, el tracto urinario, la piel y el hueso [222]. Asimismo, Richard *et al.* tras un exhaustivo estudio de la relación entre infección y diabetes, concluyeron que según los criterios de Bradford-Hill, que sirven para estudiar una relación epidemiológica entre una presunta causa y un efecto observado, la hiperglucemia desempeñaba el papel principal en esta relación causal [18]. Las úlceras diabéticas crónicas son un problema importante que ocasiona la amputación de extremidades en alrededor del 15 % de los pacientes diabéticos en los Estados Unidos [223]. En el caso de las infecciones moderadas y graves del pie diabético (DFI) aproximadamente el 20 % resultan en amputación [224]

También en el caso de reemplazos óseos, la hiperglucemia y la cetoacidosis influyen negativamente en el éxito de las prótesis implantadas debido por una parte a que incentivan las infecciones, y, por otro lado, porque la glucosa y los cuerpos cetónicos también podrían dañar el estado de los biomateriales, como han estudiado diferentes autores [225]–[227]. En un estudio *in vivo*, colocaron pernos intramedulares de fémur en ratones. En esta experiencia se observó que la osteomielitis fue más grave en ratones diabéticos que en ratones con niveles normales de glucosa [228]. Resultados similares fueron encontrados por Lovati *et al.* [229], quienes observaron que la infección periprotésica aparecía en todos los ratones diabéticos, pero no en los controles [229]

Además, los niveles elevados de glucosa en sangre afectan negativamente a la quimiotaxis y fagocitosis de los neutrófilos, disminuyendo las defensas del sistema inmunitario y dificultando la cicatrización de las heridas [230]. También, se ha observado que en condiciones diabéticas hay una mala vascularización y un mantenimiento del estado inflamatorio que limita la capacidad de cicatrización [231].

Como ya hemos mencionado, además de los efectos en el organismo y en los materiales protésicos, la hiperglucemia y la cetoacidosis causan alteraciones en

los microorganismos. El conocimiento de esos posibles cambios en la superficie bacteriana ayudaría a trazar una estrategia más eficaz para combatir las infecciones tras la implantación de prótesis. Jacquet *et al.* [222], llevaron a cabo un interesante trabajo *in vivo* sobre la influencia del entorno diabético en las infecciones cutáneas producidas por *S. aureus* [222]. Los autores señalaron que la respuesta del huésped sólo revelaba cambios menores, pero la especie *S. aureus* aislada en los ratones diabéticos presentaba alteraciones significativas en los números de genes asociados a la traducción y la modificación postraduccional, y al transporte y el metabolismo de aminoácidos.

## I.5. Bibliografía

- [1] WHO, “Global Report on Diabetes”. En *Library Cataloguing-in-Publication Data Global report on diabetes*, (2016).
- [2] M. B. Cruz, N. Silva, J. F. Marques, A. Mata, F. S. Silva, y J. Caramès, “Biomimetic Implant Surfaces and Their Role in Biological Integration-A Concise Review,” *Biomimetics*, (2022), 7(2), pp. 74.
- [3] U. Filipović, R. G. Dahmane, S. Ghannouchi, A. Zore, y K. Bohinc, “Bacterial adhesion on orthopedic implants,” *Adv Colloid Interface Sci*, (2020), 283, pp. 102228.
- [4] A. Manero, K. E. Crawford, H. Prock-Gibbs, N. Shah, D. Gandhi, y M. J. Coathup, “Improving disease prevention, diagnosis, and treatment using novel bionic technologies,” *Bioeng Transl Med*, (2023), 8(1), pp. e10359.
- [5] A. Klug, Y. Gramlich, M. Rudert, P. Drees, R. Hoffmann, M. Weißenberger, y K. P. Kutzner, “The projected volume of primary and revision total knee arthroplasty will place an immense burden on future health care systems over the next 30 years,” *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, (2021), 29(10), pp. 3287.
- [6] H. J. Busscher, H. C. van der Mei, G. Subbiahdoss, P. C. Jutte, J. J. A. M. van den Dungen, S. A. J. Zaat, M. J. Schultz, y D. W. Grainger, “Biomaterial-Associated Infection: Locating the Finish Line in the Race for the Surface,” *Sci Transl Med*, (2012), 4(153).
- [7] I. J. Macha, I. Karacan, B. Ben-Nissan, S. Cazalbou, y W. H. Müller, “Development of antimicrobial composite coatings for drug release in dental, orthopaedic and neural prostheses applications,” *SN Appl Sci*, (2019), 1(1), pp. 1–10.
- [8] T. F. Moriarty, U. Schlegel, S. Perren, y R. G. Richards, “Infection in fracture fixation: Can we influence infection rates through implant design?” *J Mater Sci Mater Med*, (2010), 21(3), pp. 1031–1035.

- [9] V. Allizond, S. Comini, A. M. Cuffini, y G. Banche, "Current Knowledge on Biomaterials for Orthopedic Applications Modified to Reduce Bacterial Adhesive Ability," *Antibiotics*, (2022), 11(4), pp. 529.
- [10] J. Raphel, M. Holodniy, S. B. Goodman, y S. C. Heilshorn, "Multifunctional Coatings to Simultaneously Promote Osseointegration and Prevent Infection of Orthopaedic Implants," *Biomaterials*, (2016), 84, pp. 301.
- [11] D. K. Wukich, "Diabetes and its negative impact on outcomes in orthopaedic surgery," *World J Orthop*, (2015), 6(3), pp. 331.
- [12] P. C. A. Domingues, V. C. Oliveira, F. L. Bim, C. P. Aires, A. P. dos Santos, D. T. de Castro, C. H. Silva-Lovato, D. de Andrade, y E. Watanabe, "Influence of glucose supplementation on biofilm formation of *Candida albicans* and *Candida glabrata* isolated from diabetic and non-diabetic individuals" *Arch Oral Biol*, (2022), 134, pp. 105339.
- [13] R. Waldrop, A. McLaren, F. Calara, y R. McLemore, "Biofilm Growth Has a Threshold Response to Glucose in Vitro," *Clin Orthop Relat Res*, (2014), 472(11), pp. 3305–3310.
- [14] H. Brem y M. Tomic-Canic, "Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes," *J Clin Invest*, (2007), 117(5), pp. 1219–1222.
- [15] H. M. Calvet y T. T. Yoshikawa, "Infections in Diabetes," *Infect Dis Clin North Am*, (2001), 15(2), pp. 407–421.
- [16] M. Board, C. Lopez, C. van den Bos, R. Callaghan, K. Clarke, y C. Carr, "Acetoacetate is a more efficient energy-yielding substrate for human mesenchymal stem cells than glucose and generates fewer reactive oxygen species," *Int J Biochem Cell Biol*, (2017), 88, pp. 75–83.
- [17] F. López-Simarro, E. Redondo Margüello, J. J. Mediavilla Bravo, T. Soriano Llorca, J. Iturralde Iriso, y A. Hormigo Pozo, "Prevention and treatment of infectious diseases in diabetic patients" *Semergen*, (2019), 45(2), pp. 117–127.

- [18] T. Richard, F. Buttafuoco, M. Vanhaeverbeek, y S. Cherifi, "Association between diabetes mellitus and infection: Which evidence for a causal role of hyperglycemia?" *Rev Med Brux*, (2018), 39(6), pp. 495–504.
- [19] A. Sultan y B. Bauduceau, "Risque infectieux au cours du diabète: parlons-en!," *Médecine des Maladies Métaboliques*, (2020), 14(1), pp. 13–20.
- [20] E. J. Hamilton, N. Martin, A. Makepeace, B. A. Sillars, W. A. Davis, y T. M. E. Davis, "Incidence and Predictors of Hospitalization for Bacterial Infection in Community-Based Patients with Type 2 Diabetes: The Fremantle Diabetes Study," *PLoS One*, (2013), 8(3), pp. e60502.
- [21] I. M. Carey, J. A. Critchley, S. Dewilde, T. Harris, F. J. Hosking, y D. G. Cook, "Risk of Infection in Type 1 and Type 2 Diabetes Compared with the General Population: A Matched Cohort Study," *Diabetes Care*, (2018), 41(3), pp. 513–521.
- [22] S. Veerachamy, T. Yarlagadda, G. Manivasagam, y P. K. Yarlagadda, "Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review" *Proc Inst Mech Eng H*, (2014), 228(10), pp. 1083–1099.
- [23] D. F. Williams, "On the nature of biomaterials," *Biomaterials*, (2009), 30(30), pp. 5897–5909.
- [24] S. Lascano y D. Estay, "Biomedical Devices: Materials, Fabrication and Control," *Intelligent Systems, Control and Automation: Science and Engineering*, (2022), 82, pp. 195–219.
- [25] L. Ghasemi-Mobarakeh, D. Kolahreez, S. Ramakrishna, y D. Williams, "Key terminology in biomaterials and biocompatibility," *Curr Opin Biomed Eng*, (2019), 10, pp. 45–50.
- [26] A. A. John, A. P. Subramanian, M. V. Vellayappan, A. Balaji, S. K. Jaganathan, H. Mohandas, T. Paramalinggam, E. Supriyanto, y M. Yusofa, "Review: physico-chemical modification as a versatile strategy for the biocompatibility enhancement of biomaterials," *RSC Adv*, (2015), 5(49), pp. 39232–39244.

- [27] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castaño, y J. A. Planell, "Biomaterials in orthopaedics," *J R Soc Interface*, (2008), 5(27), pp. 1137.
- [28] Z. Sheikh, S. Najeeb, Z. Khurshid, V. Verma, H. Rashid, y M. Glogauer, "Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications," *Materials*, (2015), 8(9), pp. 5744.
- [29] A. Mostafavi, T. Abudula, C. S. Russell, E. Mostafavi, T. J. Williams, N. Salah, A. Alshahrie, S. Harris, S. M. M. Basri, y Y. K. Mishra, "In situ printing of scaffolds for reconstruction of bone defects," *Acta Biomater*, (2021), 127, pp. 313–326.
- [30] F. Hejazi, S. Bagheri-Khoulenjani, N. Olov, D. Zeini, A. Solouk, y H. Mirzadeh, "Fabrication of nanocomposite/nanofibrous functionally graded biomimetic scaffolds for osteochondral tissue regeneration," *J Biomed Mater Res A*, (2021), 109(9), pp. 1657–1669.
- [31] M. Navarro, M. P. Ginebra, J. A. Planell, S. Zeppetelli, y L. Ambrosio, "Development and cell response of a new biodegradable composite scaffold for guided bone regeneration" *J Mater Sci Mater Med*, (2004), 15(4), pp. 419–422.
- [32] C. Peng, J. Wang, X. Liu, y L. Wang, "Differences in the Plastispheres of Biodegradable and Non-biodegradable Plastics: A Mini Review" *Front Microbiol*, (2022), 13.
- [33] Y. Zhao, B. Zhu, Y. Wang, C. Liu, y C. Shen, "Effect of different sterilization methods on the properties of commercial biodegradable polyesters for single-use, disposable medical devices," *Materials Science and Engineering: C*, (2019), 105, pp. 110041.
- [34] R. Gharibi y S. Agarwal, "Favorable Antibacterial, Antibiofilm, Antiadhesion to Cells, and Biocompatible Polyurethane by Facile Surface Functionalization," *ACS Appl Bio Mater*, (2021), 4(5), pp. 4629–4640.

- [35] M. Fernández-Grajera, M. Hierro-Oliva, L. F. de Alarcón, y A. M. Gallardo-Moreno, "Chemical composition of explanted deteriorated nephrostomy polyurethane-catheters through X-ray photoelectron spectroscopy," *Mater Chem Phys*, (2020), 239, pp. 121979.
- [36] K. Škrlová, Z. Rybková, T. Stachurová, J. Zagora, K. Malachová, D. Měřinská, R. Gabor, M. Havlíček, A. Muñoz-Bonilla, M. Fernández-García, y D. Plachá, "Long-term antimicrobial effect of polylactide-based composites suitable for biomedical use," *Polym Test*, (2022), 116, pp. 107760.
- [37] K. Škrlová, K. Malachová, A. Muñoz-Bonilla, D. Měřinská, Z. Rybková, M. Fernández-García, y D. Plachá, "Biocompatible Polymer Materials with Antimicrobial Properties for Preparation of Stents," *Nanomaterials*, (2019), 9(11).
- [38] H. Zhou, J. G. Lawrence, y S. B. Bhaduri, "Fabrication aspects of PLA-CaP/PLGA-CaP composites for orthopedic applications: A review," *Acta Biomater*, (2012), 8(6), pp. 1999–2016.
- [39] A. J. R. Lasprilla, G. A. R. Martinez, B. H. Lunelli, A. L. Jardini, y R. M. Filho, "Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices – A review," *Biotechnol Adv*, (2012), 30(1), pp. 321–328.
- [40] A. P. Gupta y V. Kumar, "New emerging trends in synthetic biodegradable polymers – Polylactide: A critique," *Eur Polym J*, (2007), 43(10), pp. 4053–4074.
- [41] M. Nofar y C. B. Park, "Poly (lactic acid) foaming," *Prog Polym Sci*, (2014), 39(10), pp. 1721–1741.
- [42] M. Murariu y P. Dubois, "PLA composites: From production to properties," *Adv Drug Deliv Rev*, (2016), 107, pp. 17–46.
- [43] L. T. Sin y B. S. Tveen, "Polylactic Acid," *Polylactic Acid: A Practical Guide for the Processing, Manufacturing, and Applications of PLA*, (2019), pp. 1–405.
- [44] V. DeStefano, S. Khan, y A. Tabada, "Applications of PLA in modern medicine," *Engineered Regeneration*, (2020), 1, pp. 76–87.



- [45] W. Lorenz, "Walter Lorenz Surgical Inc." 2010.
- [46] E. Waris, Y. T. Konttinen, N. Ashammakhi, R. Suuronen, y S. Santavirta, "Bioabsorbable fixation devices in trauma and bone surgery: current clinical standing" *Expert review of medical devices*, (2004), 1(2), pp. 229–240.
- [47] S. Divakara Shetty y N. Shetty, "Investigation of mechanical properties and applications of polylactic acids—a review," *Mater Res Express*, (2019), 6(11), pp. 112002.
- [48] C. Kalirajan, A. Dukle, A. J. Nathanael, T. H. Oh, y G. Manivasagam, "A Critical Review on Polymeric Biomaterials for Biomedical Applications," *Polymers*, (2021), 13(17), pp. 3015.
- [49] G. Dearnaley, J. Asher, A. T. Peacock, S. J. Allen, y R. E. J. Watkins, "The use of thin layer activation to evaluate ion beam surface treatments of orthopaedic implant materials," *Surf Coat Technol*, (2007), 201(19–20), pp. 8070–8075.
- [50] T. Phaechamud y S. Chitrattha, "Pore formation mechanism of porous poly (dl-lactic acid) matrix membrane," *Materials Science and Engineering: C*, (2016), 61, pp. 744–752.
- [51] Q. Zhang, V. N. Mochalin, I. Neitzel, I. Y. Knoke, J. Han, C. A. Klug, J. G. Zhou, P. I. Lelkes, y Y. Gogotsi, "Fluorescent PLLA-nanodiamond composites for bone tissue engineering," *Biomaterials*, (2011), 32(1), pp. 87–94.
- [52] M. S. Singhvi, S. S. Zinjarde, y D. V. Gokhale, "Polylactic acid: synthesis and biomedical applications," *J Appl Microbiol*, (2019), 127(6), pp. 1612–1626.
- [53] X. Li, L. Han, X. Liu, C. Chu, J. Ju, J. Bai, y X. Zhang, "A study on the impact behaviors of Mg wires/PLA composite for orthopedic implants," *J Mater Sci*, (2019), 54(23), pp. 14545–14553.
- [54] I. A. Kurzina, O. A. Laput, D. A. Zuza, I. V. Vasenina, M. C. Salvadori, K. P. Savkin, D. N. Lytkina, V. V. Botvin, y M. P. Kalashnikov, "Surface property modification of biocompatible material based on polylactic acid by ion implantation," *Surf Coat Technol*, (2020), 388, pp. 125529.

- [55] T. Zimmermann, A. Ferrandez-Montero, M. Lieblich, B. Ferrari, J. L. González-Carrasco, W. D. Müller, y A. D. Schwitalla, "In vitro degradation of a biodegradable polylactic acid/magnesium composite as potential bone augmentation material in the presence of titanium and PEEK dental implants" *Dental Materials*, (2018), 34(10), pp. 1492–1500.
- [56] C. Hwang, S. Park, I. G. Kang, H. E. Kim, y C. M. Han, "Tantalum-coated polylactic acid fibrous membranes for guided bone regeneration," *Materials Science and Engineering: C*, (2020), 115, pp. 111112.
- [57] I. Karacan, I. Macha, G. Choi, S. Cazalbou, y B. Ben-Nissan, "Antibiotic Containing Poly Lactic Acid/Hydroxyapatite Biocomposite Coatings for Dental Implant Applications," *Key Eng Mater*, (2017), 758, pp. 120–125.
- [58] Z. Li, D. Jiao, W. Zhang, K. Ren, L. Qiu, C. Tian, Y. Li, J. Li, X. Zhou, Y. Zhao, y X. Han, "Antibacterial and antihyperplasia polylactic acid/silver nanoparticles nanofiber membrane-coated airway stent for tracheal stenosis," *Colloids Surf B Biointerfaces*, (2021), 206, pp. 111949.
- [59] Y. Chen, A. F. T. Mak, M. Wang, J. Li, y M. S. Wong, "PLLA scaffolds with biomimetic apatite coating and biomimetic apatite/collagen composite coating to enhance osteoblast-like cells attachment and activity," *Surf Coat Technol*, (2006), 201(3–4), pp. 575–580.
- [60] P. Wan, C. Yuan, L. L. Tan, Q. Li, y K. Yang, "Fabrication and evaluation of bioresorbable PLLA/magnesium and PLLA/magnesium fluoride hybrid composites for orthopedic implants" *Compos Sci Technol*, (2014), 98, pp. 36–43.
- [61] C. Swaroop y M. Shukla, "Nano-magnesium oxide reinforced polylactic acid biofilms for food packaging applications," *Int J Biol Macromol*, (2018), 113, pp. 729–736.
- [62] M. Poletto y M. Poletto, "Composites from Renewable and Sustainable Materials," *Composites from Renewable and Sustainable Materials*, (2016).

- [63] E. Zuza, E. Meaurio, J. Sarasua, E. Zuza, E. Meaurio, y J. Sarasua, "Biodegradable Polylactide-Based Composites," *Composites from Renewable and Sustainable Materials*, (2016).
- [64] G. Reddy, M. Altaf, B. J. Naveena, M. Venkateshwar, y E. V. Kumar, "Amylolytic bacterial lactic acid fermentation — A review" *Biotechnol Adv*, (2008), 26(1), pp. 22–34.
- [65] L. T. Lim, R. Auras, y M. Rubino, "Processing technologies for poly (lactic acid)," *Prog Polym Sci*, (2008), 8(33), pp. 820–852.
- [66] A.-C. Albertsson y I. K. Varma, "Aliphatic Polyesters: Synthesis, Properties and Applications," (2002), pp. 1–40.
- [67] G. Winzenburg, C. Schmidt, S. Fuchs, y T. Kissel, "Biodegradable polymers and their potential use in parenteral veterinary drug delivery systems," *Adv Drug Deliv Rev*, (2004), 56(10), pp. 1453–1466.
- [68] Y. Tokiwa y B. P. Calabia, "Biodegradability and biodegradation of polyesters," *J Polym Environ*, (2007), 15(4), pp. 259–267.
- [69] M. Sain, S. B. Ghosh, y S. Bandyopadhyay-Ghosh, "Composites" En R. Auras, L. T. Lim, S. E. M. Selke, y H. Tsuji (Eds). *Poly (Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications* (2010), Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons, Inc.
- [70] J. Cesar y V. Infante, "Relación estructura-propiedades de films de nanocompuestos de pla," (2012)., TDX [Tesis Doctorals en Xarxa].
- [71] J. P. Kalish, K. Aou, X. Yang, y S. L. Hsu, "Spectroscopic and thermal analyses of  $\alpha'$  and  $\alpha$  crystalline forms of poly (l-lactic acid)," *Polymer (Guildf)*, (2011), 52(3), pp. 814–821.
- [72] M. Cocca, M. L. Di Lorenzo, M. Malinconico, y V. Frezza, "Influence of crystal polymorphism on mechanical and barrier properties of poly (l-lactic acid)," *Eur Polym J*, (2011), 5(47), pp. 1073–1080.

- [73] J. M. Raquez, Y. Habibi, M. Murariu, y P. Dubois, "Polylactide (PLA)-based nanocomposites," *Prog Polym Sci*, (2013), 10–11(38), pp. 1504–1542.
- [74] S. Sasaki y T. Asakura, "Helix distortion and crystal structure of the  $\alpha$ -form of poly(L-lactide)," *Macromolecules*, (2003), 36(22), pp. 8385–8390.
- [75] A. Göpferich, "Mechanisms of polymer degradation and erosion," *Biomaterials*, (1996), 17(2), pp. 103–114.
- [76] L. Suming y M. Vert, "Morphological Changes Resulting from the Hydrolytic Degradation of Stereocopolymers Derived from L-and DL-Lactides," *Macromolecules*, (1994), 27(11), pp. 3107–3110.
- [77] M. Drobot, S. Ursache, y M. Aflori, "Surface Functionalities of Polymers for Biomaterial Applications," *Polymers*, (2022), 14(12), pp. 2307.
- [78] A. Abram, A. Zore, U. Lipovž, A. Košak, M. Gavras, Ž. Boltežar, y K. Bohinc, "Bacterial Adhesion on Prosthetic and Orthotic Material Surfaces," *Coatings*, (2021), 11(12), pp. 1469.
- [79] C. Zhang, J. Lin, y H. Liu, "Magnesium-based Biodegradable Materials for Biomedical Applications," *MRS Adv*, (2018), 3(40), pp. 2359–2364.
- [80] E. Davoodi, H. Montazerian, A. S. Mirhakimi, M. Zhianmanesh, O. Ibhadode, S. I. Shahabad, R. Esmailizadeh, E. Sarikhani, S. Toorandaz, S. A. Sarabi, R. Nasiri, Y. Zhu, J. Kadkhodapour, B. Li, A. Khademhosseini, y E. Toyserkani, "Additively manufactured metallic biomaterials," *Bioact Mater*, (2022), 15, pp. 214–249.
- [81] Y. Li, G. Liu, Z. Zhai, L. Liu, H. Li, K. Yang, L. Tan, P. Wan, X. Liu, Z. Ouyang, Z. Yu, T. Tang, Z. Zhu, X. Qu, y K. Dai, "Antibacterial Properties of Magnesium In Vitro and in an In Vivo Model of Implant-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infection," *Antimicrob Agents Chemother*, (2014), 58(12), pp. 7586.

[82] D. A. Robinson, R. W. Griffith, D. Shechtman, R. B. Evans, y M. G. Conzemius, "In vitro antibacterial properties of magnesium metal against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*," *Acta Biomater*, (2010), 6(5), pp. 1869–1877.

[83] M. I. Rahim, R. Eifler, B. Rais, y P. P. Mueller, "Alkalization is responsible for antibacterial effects of corroding magnesium," *J Biomed Mater Res A*, (2015), 103(11), pp. 3526–3532.

[84] J. Rodríguez-Sánchez, M. Á. Pacha-Olivenza, y M. L. González-Martín, "Bactericidal effect of magnesium ions over planktonic and sessile *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli*," *Mater Chem Phys*, (2019), 221, pp. 342–348.

[85] H. Qin, Y. Zhao, M. Cheng, Q. Wang, Q. Wang, J. Wang, Y. Jiang, Z. An, y X. Zhang, "Anti-biofilm properties of magnesium metal via alkaline pH," *RSC Adv*, (2015), 5(28), pp. 21434–21444.

[86] M. C. Fernández-Calderón, S. C. Cifuentes, M. A. Pacha-Olivenza, A. M. Gallardo-Moreno, L. Saldaña, J. L. González-Carrasco, M. T. Blanco, N. Vilaboa, M. L. González-Martín, y C. Pérez-Giraldo, "Antibacterial effect of novel biodegradable and bioresorbable PLDA/Mg composites," *Biomedical Materials*, (2017), 12(1), pp. 015025.

[87] K. Nandakumar, K. R. Sreekumari, y Y. Kikuchi, "Antibacterial Properties of Magnesium Alloy AZ31B: In - vitro Studies using the Biofilm-forming Bacterium *Pseudomonas sp.*," *Biofouling*, (2002), 18(2), pp. 129–135.

[88] V. Luque-Agudo, M. C. Fernández-Calderón, M. A. Pacha-Olivenza, C. Pérez-Giraldo, A. M. Gallardo-Moreno, y M. L. González-Martín, "The role of magnesium in biomaterials related infections," *Colloids Surf B Biointerfaces*, (2020), 191, pp. 110996.

[89] L. Tan, X. Yu, P. Wan, y K. Yang, "Biodegradable Materials for Bone Repairs: A Review," *J Mater Sci Technol*, (2013), 29(6), pp. 503–513.

- [90] X. Li, C. Chu, L. Zhou, J. Bai, C. Guo, F. Xue, P. Lin, y P. K. Chu, "Fully degradable PLA-based composite reinforced with 2D-braided Mg wires for orthopedic implants," *Compos Sci Technol*, (2017), 142, pp. 180–188.
- [91] Y. H. Wu, N. Li, Y. Cheng, Y. F. Zheng, y Y. Han, "Invitro Study on Biodegradable AZ31 Magnesium Alloy Fibers Reinforced PLGA Composite," *J Mater Sci Technol*, (2013), 29(6), pp. 545–550.
- [92] J. Sawai, H. Kojima, H. Igarashi, A. Hashimoto, S. Shoji, T. Sawaki, A. Hakoda, E. Kawada, T. Kokugan, y M. Shimizu, "Antibacterial characteristics of magnesium oxide powder," *World J Microbiol Biotechnol*, (2000), 16(2), pp. 187–194.
- [93] C. C. Coelho, R. Araújo, P. A. Quadros, S. R. Sousa, y F. J. Monteiro, "Antibacterial bone substitute of hydroxyapatite and magnesium oxide to prevent dental and orthopaedic infections," *Materials Science and Engineering: C*, (2019), 97, pp. 529–538.
- [94] S. C. Cifuentes, R. Gavilán, M. Lieblich, R. Benavente, y J. L. González-Carrasco, "In vitro degradation of biodegradable polylactic acid/magnesium composites: Relevance of Mg particle shape," *Acta Biomater*, (2016), 32, pp. 348–357.
- [95] S. C. Cifuentes, E. Frutos, J. L. González-Carrasco, M. Muñoz, M. Multigner, J. Chao, R. Benavente, y M. Lieblich, "Novel PLLA/magnesium composite for orthopedic applications: A proof of concept," *Mater Lett*, (2012), 74, pp. 239–242.
- [96] M. Chandrasekar, S. Suresh, y A. Chandra Bose, "Experimental investigations and theoretical determination of thermal conductivity and viscosity of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/water nanofluid," *Exp Therm Fluid Sci*, (2010), 34(2), pp. 210–216.
- [97] X. H. Li, Y. P. Sun, W. J. Lu, R. Ang, S. B. Zhang, X. B. Zhu, W. H. Song, y J. M. Dai, "Size dependence of electronic and magnetic properties of double-perovskite Sr<sub>2</sub>FeMoO<sub>6</sub>," *Solid State Commun*, (2008), 145(3), pp. 98–102.
- [98] W. Yu, H. Xie, L. Chen, y Y. Li, "Enhancement of thermal conductivity of kerosene-based Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanofluids prepared via phase-transfer method," *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, (2010), 355(1–3), pp. 109–113.

- [99] A. M. Gallardo-Moreno, V. Luque-Agudo, M. L. González-Martín, y M. Hierro-Oliva, "Micro-structured and self-assembled patterns in PLA-cast films as a function of CTAB content, magnesium and substratum hydrophobicity," *Appl Surf Sci*, (2022), 597, pp. 153676.
- [100] A. Ferrández-Montero, M. Lieblich, R. Benavente, J. L. González-Carrasco, y B. Ferrari, "Study of the matrix-filler interface in PLA/Mg composites manufactured by Material Extrusion using a colloidal feedstock," *Addit Manuf*, (2020), 33, pp. 101142.
- [101] G. C. Carvalho, G. D. Marena, J. C. F. Karnopp, J. Jorge, R. M. Sábio, M. A. U. Martines, T. M. Bauab, y M. Chorilli, "Cetyltrimethylammonium bromide in the synthesis of mesoporous silica nanoparticles: General aspects and in vitro toxicity," *Adv Colloid Interface Sci*, (2022), 307, pp. 102746.
- [102] A. Ferrández-Montero, M. Lieblich, R. Benavente, J. L. González-Carrasco, y B. Ferrari, "New approach to improve polymer-Mg interface in biodegradable PLA/Mg composites through particle surface modification," *Surf Coat Technol*, (2020) 383, pp. 125285.
- [103] M. Hierro-Oliva, V. Luque-Agudo, A. M. Gallardo-Moreno, y M. L. González-Martín, "Characterization of Magnesium-Polylactic Acid Films Casted on Different Substrates and Doped with Diverse Amounts of CTAB," *Molecules*, (2021), 26(16), pp. 4811.
- [104] U. Tezel, J. A. Pierson, y S. G. Pavlostathis, "Effect of polyelectrolytes and quaternary ammonium compounds on the anaerobic biological treatment of poultry processing wastewater," *Water Res*, (2007), 41(6), pp. 1334–1342.
- [105] J. Azeredo, A. P. Pacheco, I. Lopes, R. Oliveira, y M. J. Vieira, "Monitoring cell detachment by surfactants in a parallel plate flow chamber," *Water Science and Technology*, (2003), 47(5), pp. 77–82.
- [106] G. McDonnell y A. D. Russell, "Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance," *Clin Microbiol Rev*, (1999), 12(1), pp. 147.



- [107] L. Cheng, M. D. Weir, K. Zhang, S. M. Xu, Q. Chen, X. Zhou, y H. H. K. Xu, "Antibacterial nanocomposite with calcium phosphate and quaternary ammonium," *J Dent Res*, (2012), 91(5), pp. 460–466.
- [108] M. Simões, M. O. Pereira, y M. J. Vieira, "Action of a cationic surfactant on the activity and removal of bacterial biofilms formed under different flow regimes," *Water Res*, (2005) 39(2–3), pp. 478–486.
- [109] G. Nicoletti, V. Boghossian, F. Gurevitch, R. Borland, y P. Morgenroth, "The antimicrobial activity in vitro of chlorhexidine, a mixture of isothiazolinones ('Kathon' CG) and cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB)," *Journal of Hospital Infection*, (1993), 23(2), pp. 87–111.
- [110] A. R. Bucci, L. Marcelino, R. K. Mendes, y A. Etchegaray, "The antimicrobial and antiadhesion activities of micellar solutions of surfactin, CTAB and CPCl with terpinen-4-ol: applications to control oral pathogens," *World J Microbiol Biotechnol*, (2018), 34(6), pp. 1–9, Jun. 2018.
- [111] M. Savioli Lopes, A. L. Jardini, y R. Maciel Filho, "Poly (Lactic Acid) Production for Tissue Engineering Applications," *Procedia Eng*, (2012), 42, pp. 1402–1413.
- [112] Y. Yan, H. Chen, H. Zhang, C. Guo, K. Yang, K. Chen, R. Cheng, N. Qian, N. Sandler, Y. S. Zhang, H. Shen, J. Qi, W. Cui, y L. Deng, "Vascularized 3D printed scaffolds for promoting bone regeneration," *Biomaterials*, (2019), 190–191, pp. 97–110.
- [113] L. Drselén, M. Dauner, H. Hierlemann, H. Planck, L. E. Claes, y A. Ignatius, "Resorbable polymer fibers for ligament augmentation," *J Biomed Mater Res*, (2001) 58(6), pp. 666–672.
- [114] M. C. Araque-Monrós, D. M. García-Cruz, J. L. Escobar-Ivirico, L. Gil-Santos, M. Monleón-Pradas, y J. Más-Estellés, "Regenerative and Resorbable PLA/HA Hybrid Construct for Tendon/Ligament Tissue Engineering," *Ann Biomed Eng*, (2020), 48(2), pp. 757–767.



[115] M. J. Imola y V. L. Schramm, "Resorbable Internal Fixation in Pediatric Cranial Base Surgery," *Laryngoscope*, (2002), 112(10), pp. 1897–1901.

[116] B. L. Eppley, L. Morales, R. Wood, J. Pensler, J. Goldstein, R. J. Havlik, M. Habal, A. Losken, J. K. Williams, F. Burstein, A. A. Rozzelle, y A. M. Sadove, "Resorbable PLLA-PGA plate and screw fixation in pediatric craniofacial surgery: Clinical experience in 1883 patients," *Plast Reconstr Surg*, (2004), 114(4), pp. 850–856.

[117] N. Li, Y. Jiang, R. Plantefève, F. Michaud, Z. Nosrati, C. Tremblay, K. Saatchi, U. O Häfeli, S. Kadoury, G. Moran, F. Joly, S. Martel, y G. Soulez, "Magnetic Resonance Navigation for Targeted Embolization in a Two-Level Bifurcation Phantom," *Ann Biomed Eng*, (2019), 47(12), pp. 2402–2415.

[118] Y. J. Liang, H. Yu, G. Feng, L. Zhuang, W. Xi, M. Ma, J. Chen, N. Gu, y Y. Zhang, "High-Performance Poly (lactic-co-glycolic acid)-Magnetic Microspheres Prepared by Rotating Membrane Emulsification for Transcatheter Arterial Embolization and Magnetic Ablation in VX2 Liver Tumors," *ACS Appl Mater Interfaces*, (2017), 9(50), pp. 43478–43489.

[119] Y. Shikinami, Y. Matsusue, y T. Nakamura, "The complete process of bioresorption and bone replacement using devices made of forged composites of raw hydroxyapatite particles/poly l-lactide (F-u-HA/PLLA)," *Biomaterials*, (2005), 26(27), pp. 5542–5551.

[120] H. Zhang, X. Mao, Z. Du, W. Jiang, X. Han, D. Zhao, D. Han, y Q. Li, "Three dimensional printed macroporous polylactic acid/hydroxyapatite composite scaffolds for promoting bone formation in a critical-size rat calvarial defect model," *Sci Technol Adv Mater.*, (2016), 17(1), pp. 136–148.

[121] T. Kanno, S. Sukegawa, Y. Furuki, Y. Nariai, y J. Sekine, "Overview of innovative advances in bioresorbable plate systems for oral and maxillofacial surgery," *Jpn Dent Sci Rev*, (2018), 54(3), pp. 127.

[122] I. N. H. M. Haneef, Y. F. Buys, N. M. Shaffiar, A. M. Abdul Hamid, S. I. S. Shaharuddin, y Fitriani, "Composition optimization of PLA/PPC/HNT

nanocomposites for mandibular fixation plate using single-factor experimental design," *J Mech Behav Biomed Mater*, (2022), 135, pp. 105423.

[123] Q. Cong, L. Lin, B. Qi, C. Xu, y X. Zhang, "Human Chorionic Gonadotropin Polypeptide Nanoparticle Drug Delivery System Improves Methotrexate Efficacy in Gestational Trophoblastic Neoplasia in vitro," *Cancer Manag Res*, (2021), 13, pp. 1699.

[124] S. R. R. do Reis, E. Helal-Neto, A. O. da Silva de Barros, S. R. Pinto, F. L. Portilho, L. B. de Oliveira Siqueira, L. M. R. Alencar, S. A. Dahoumane, F. Alexis, E. Ricci-Junior, y R. Santos-Oliveira, "Dual Encapsulated Dacarbazine and Zinc Phthalocyanine Polymeric Nanoparticle for Photodynamic Therapy of Melanoma," *Pharm Res*, (2021), 38(2), pp. 335–346.

[125] C. Ayad, P. Libeau, C. Lacroix-Gimon, C. Ladavière, y B. Verrier, "LipoParticles: Lipid-Coated PLA Nanoparticles Enhanced In Vitro mRNA Transfection Compared to Liposomes," *Pharmaceutics*, (2021), 13(3).

[126] L. Khanizadeh, R. Sarvari, B. Massoumi, S. Agbolaghi, y Y. Beygi-Khosrowshahi, "Dual Nano-Carriers using Polylactide-block-Poly (N-isopropylacrylamide-random-acrylic acid) Polymerized from Reduced Graphene Oxide Surface for Doxorubicin Delivery Applications," *Journal of Ultrafine Grained and Nanostructured Materials*, (2020), 53(1), pp. 60–70.

[127] M. M. Yallapu, B. K. Gupta, M. Jaggi, y S. C. Chauhan, "Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells," *J Colloid Interface Sci*, (2010), 351(1), pp. 19–29.

[128] D. J. Hanlon *et al.*, "Enhanced stimulation of anti-ovarian cancer CD8(+) T cells by dendritic cells loaded with nanoparticle encapsulated tumor antigen," *Am J Reprod Immunol*, (2011), 65(6), pp. 597–609.

[129] F. Qi, J. Wu, H. Li, y G. Ma, "Recent research and development of PLGA/PLA microspheres/nanoparticles: A review in scientific and industrial aspects," *Front Chem Sci Eng*, (2019), 13(1), pp. 14–27.

[130] G. Ruan y S. S. Feng, "Preparation and characterization of poly (lactic acid)-poly (ethylene glycol)-poly (lactic acid) (PLA-PEG-PLA) microspheres for controlled release of paclitaxel," *Biomaterials*, (2003), 24(27), pp. 5037-5044.

[131] H. Shakeri, M. Haghbin Nazarpak, R. Imani, y L. Tayebi, "Poly (l-lactic acid)-based modified nanofibrous membrane with dual drug release capability for GBR application," *Int J Biol Macromol*, (2023), 231, pp. 123201.

[132] L. Lao, H. Tan, Y. Wang, y C. Gao, "Chitosan modified poly(l-lactide) microspheres as cell microcarriers for cartilage tissue engineering," *Colloids Surf B Biointerfaces*, (2008), 66(2), pp. 218-225.

[133] S. Garg, C. Bourantas, y P. W. Serruys, "New concepts in the design of drug-eluting coronary stents," *Nature Reviews Cardiology*, (2013), 10(5), pp. 248-260.

[134] K. K. Gupta, N. Pal, P. K. Mishra, P. Srivastava, S. Mohanty, y P. Maiti, "5-Fluorouracil-loaded poly(lactic acid)-poly(caprolactone) hybrid scaffold: Potential chemotherapeutic implant," *J Biomed Mater Res A*, (2014), 102(8), pp. 2600-2612.

[135] Z. Yuan, X. Zhao, J. Zhao, G. Pan, W. Qiu, X. Wang, Y. Zhu, Q. Zheng, y W. Cui, "Synergistic mediation of tumor signaling pathways in hepatocellular carcinoma therapy via dual-drug-loaded pH-responsive electrospun fibrous scaffolds," *J Mater Chem B*, (2015), 3(17), pp. 3436-3446.

[136] I. H. Ali, I. A. Khalil, y I. M. El-Sherbiny, "Design, development, in-vitro and in-vivo evaluation of polylactic acid-based multifunctional nanofibrous patches for efficient healing of diabetic wounds," *Scientific Reports*, (2023), 13(1), pp. 1-17.

[137] P. I. Sifaka, P. Barmbalexis, y D. N. Bikiaris, "Novel electrospun nanofibrous matrices prepared from poly(lactic acid)/poly(butylene adipate) blends for controlled release formulations of an anti-rheumatoid agent," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, (2016), 88, pp. 12-25.

- [138] M. Yang, Y. Cao, Z. Zhang, J. Guo, C. Hu, Z. Wang, y Y. Du, "Low intensity ultrasound-mediated drug-loaded nanoparticles intravaginal drug delivery: an effective synergistic therapy scheme for treatment of vulvovaginal candidiasis," *J Nanobiotechnology*, (2023), 21(1), pp. 1–20.
- [139] X. Farto-Vaamonde, L. Diaz-Gomez, A. Parga, A. Otero, A. Concheiro, y C. Alvarez-Lorenzo, "Perimeter and carvacrol-loading regulate angiogenesis and biofilm growth in 3D printed PLA scaffolds," *J Control Release*, (2022), 352, pp. 776–792.
- [140] G. Pietrocola, D. Campoccia, C. Motta, L. Montanaro, C. R. Arciola, and P. Speziale, "Colonization and Infection of Indwelling Medical Devices by *Staphylococcus aureus* with an Emphasis on Orthopedic Implants," *Int J Mol Sci*, (2022), 23(11).
- [141] C. R. Arciola, D. Campoccia, y L. Montanaro, "Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion," *Nat Rev Microbiol*, (2018), 16(7), pp. 397–409.
- [142] C. Deirmengian, "CORR Insights®: Do Serologic and Synovial Tests Help Diagnose Infection in Revision Hip Arthroplasty with Metal-on-metal Bearings or Corrosion?" *Clin Orthop Relat Res*, (2015), 473(2), pp. 506–508.
- [143] M. Ribeiro, F. J. Monteiro, y M. P. Ferraz, "Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions," *Biomatter*, (2012), 2(4), pp. 176–194.
- [144] H. Segawa, D. T. Tsukayama, R. F. Kyle, D. A. Becker, y R. B. Gustilo, "Infection after total knee arthroplasty. A retrospective study of the treatment of eighty-one infections," *J Bone Joint Surg Am*, (1999), 81(10), pp. 1434–1445.
- [145] W. Zimmerli, A. Trampuz, y P. E. Ochsner, "Prosthetic-joint infections," *N Engl J Med*, (2004), 351(16).

- [146] W. Zimmerli y C. Moser, "Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic biofilm infections," *FEMS Immunol Med Microbiol*, (2012), 65(2), pp. 158–168.
- [147] J. M. Anderson, A. Rodriguez, y D. T. Chang, "Foreign body reaction to biomaterials," *Semin Immunol*, (2008), 20(2), pp. 86–100.
- [148] C. L. Romanò, S. Scarponi, E. Gallazzi, D. Romanò, y L. Drago, "Antibacterial coating of implants in orthopaedics and trauma: a classification proposal in an evolving panorama," *J Orthop Surg Res*, (2015), 10(1).
- [149] J. Chávez-Reyes, C. E. Escárcega-González, E. Chavira-Suárez, A. León-Buitimea, P. Vázquez-León, J. R. Morones-Ramírez, C. M. Villalón, A. Quintanar-Stephano, B. A. Marichal-Cancino, "Susceptibility for Some Infectious Diseases in Patients With Diabetes: The Key Role of Glycemia," *Front Public Health*, (2021), 9, pp. 44.
- [150] J. Casqueiro, J. Casqueiro, y C. Alves, "Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis," *Indian J Endocrinol Metab*, (2012), 16(1), pp. 27.
- [151] L. Machado-Villarroel, M. Montano-Candia, y D. Abraham Dimakis-Ramírez, "Diabetes mellitus y su impacto en la etiopatogenia de la sepsis," *Acta Med.*, (2017), 15(3), pp. 207-215.
- [152] U. Förstermann y W. C. Sessa, "Nitric oxide synthases: regulation and function," *Eur Heart J*, (2012), 33(7).
- [153] P. Schuetz, K. Yano, M. Sorasaki, L. Ngo, M. St Hilaire, J. M. Lucas, W. Aird, y N. I. Shapiro., "Influence of diabetes on endothelial cell response during sepsis," *Diabetologia*, (2011), 54(5), pp. 996–1003.
- [154] J. J. Mediavilla Bravo, "Complicaciones de la diabetes mellitus. Diagnóstico y tratamiento," *Medicina de Familia - SEMERGEN*, (2001), 1. 27, no. 3, pp. 132–145.

- [155] A. G. Gristina, P. T. Naylor, y Q. N. Myrvik, "Biomaterial-Centered Infections: Microbial Adhesion versus Tissue Integration," *Pathogenesis of Wound and Biomaterial-Associated Infections*, (1990), pp. 193–216.
- [156] M. Geoghegan, J. S. Andrews, C. A. Biggs, K. E. Eboigbodin, S. Rolfe, J. Scholes, J. J. Ojeda, M. E. Romero-Gonzalez, R. G. J. Edyvean, L. Swanson, R. Rutkaite, R. Fernando, Y. Pen, Z. Zhang, y S. A. Banwart, "The polymer physics and chemistry of microbial cell attachment and adhesion," *Faraday Discuss*, (2008), 139(0), pp. 85–103.
- [157] T. ThF, "Particle-surface adhesion," En M. J. Berkeley RCW, Lynch JM, y V. B. Rutter PR (Eds.), *Microbial Adhesion to Surfaces* (1980), pp 93, Ellis Horwood Chichester.
- [158] B. Derjaguin y L. Landau, "Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes," *Prog Surf Sci*, (1993), 43(1–4), pp. 30–59.
- [159] E. J. W. Verwey, "Theory of the stability of lyophobic colloids," *J Phys Colloid Chem*, (1947), 51(3), pp. 631–636.
- [160] P.R. Rutter, y B. Vincent, "The adhesion of microorganisms to surfaces: physico-chemical aspects". En R.C.W. Berkeley, J.M. Lynch, J. Melling, P.R. Rutter, and B. Vincent (Eds.), *Microbial Adhesion to Surfaces*, (1980), pp. 79–92, Chichester: Ellis Horwood.
- [161] C. Abalos-Labruzzo, "Adhesión bacteriana a biomateriales," *Avances en odontoestomatología*, ISSN 0213-1285, (2005), 21(1), pp. 347–353.
- [162] M. Katsikogianni, Y. F. Missirlis, L. Harris, y J. Douglas, "Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions," *Eur Cell Mater*, (2004), 8, pp. 37–57.
- [163] A. T. Poortinga, R. Bos, y H. J. Busscher, "Electrostatic interactions in the adhesion of an ion-penetrable and ion-impenetrable bacterial strain to glass," *Colloids Surf B Biointerfaces*, (2001), 20(2), pp. 105–117.

- [164] A. M. Gallardo-Moreno, H. C. Mei, H. J. Busscher, M. L. González-Martín, J. M. Bruque, y C. Pérez-Giraldo, "Adhesion of *Enterococcus faecalis* 1131 grown under subinhibitory concentrations of ampicillin and vancomycin to a hydrophilic and a hydrophobic substratum," *FEMS Microbiol Lett*, (2001), 203(1), pp. 75–79.
- [165] X. Zhang, X. Zhou, H. Xi, J. Sun, X. Liang, J. Wei, X. Xiao, Z. Liu, S. Li, Z. Liang, Y. Chen, y Z. Wu, "Interpretation of adhesion behaviors between bacteria and modified basalt fiber by surface thermodynamics and extended DLVO theory," *Colloids Surf B Biointerfaces*, (2019), 177, pp. 454–461.
- [166] Y. Li, X. Li, Y. Hao, Y. Liu, Z. L. Dong, y K. Li, "Biological and Physiochemical Methods of Biofilm Adhesion Resistance Control of Medical-Context Surface," *Int J Biol Sci*, (2021), 17(7), pp. 1769.
- [167] P. Olivenza y M. Angel, "Caracterización y respuesta antibacteriana de la superficie del biomaterial Ti6AL4V sometido a diferentes modificaciones físicas", (2013).
- [168] I. Lasa, J. L. Del Pozo, J. R. Penadés, y J. Leiva, "Biofilms bacterianos e infección," *An Sist Sanit Navar*, (2005), 28(2), pp. 163–175.
- [169] R. D. Monds y G. A. O'Toole, "The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review," *Trends Microbiol*, (2009), 17(2), pp. 73–87.
- [170] M. G. Mazza, "The Physics of Biofilms -- An Introduction," *J Phys D Appl Phys*, (2016), 49(20).
- [171] M. Thoendel, J. S. Kavanaugh, C. E. Flack, y A. R. Horswill, "Peptide signaling in the staphylococci," *Chem Rev*, (2011), 111(1), pp. 117–151.
- [172] D. M. Díaz y A. S. de la Sen, "Sistemas de quorum sensing en bacterias," *REDUCA (Biología)*, (2011), 3(5), pp. 39–55.
- [173] J. G. Thomas y L. A. Nakaishi, "Managing the complexity of a dynamic biofilm," *J Am Dent Assoc*, (2006), 137(11), pp. S10–S15.



- [174] W. Paulander, A. N. Varming, M. S. Bojer, C. Friberg, K. Bæk, y H. Ingmer, "The agr quorum sensing system in *Staphylococcus aureus* cells mediates death of sub-population," *BMC Res Notes*, (2018), 11(1), pp. 1–5.
- [175] P. Murray, K. S. Rosenthal, y M. A. Pfaller, *Microbiología médica*, (2018). Elsevier Health Sciences.
- [176] N. Lucana, R. Maroley, E. Huanca, y M. Reyna, "Estructura Bacteriana" *Revist. Act. Clin.* (2014), 49, pp. 1-5.
- [177] M. Madigan, K. Bender, D. Buckley, W. M. Sattley, y D. Stahl, *Brock Biology of Microorganisms 15th Edition*, (2019). Pearson education Lmted.
- [178] M. H. Nyirenda, E. Morandi, U. Vinkemeier, D. Constantin-Teodosiu, S. Drinkwater, M. Mee, L. King, G. Podda, G. Zhang, A. Ghaemmaghami, C. S. Constantinescu, A. Bar-Or, y B. Gran, "TLR2 stimulation regulates the balance between regulatory T cell and Th17 function: a novel mechanism of reduced regulatory T cell function in multiple sclerosis," *J Immunol*, (2015), 194(12), pp. 5761–5774.
- [179] E. A. Montazeri, A. D. Khosravi, A. Jolodar, M. Ghaderpanah, y S. Azarpira, "Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from burn patients by multiplex PCR," *Burns*, (2015), 41(3), pp. 590–594.
- [180] G. Brooks, K. C. Carroll, J. Butel, S. Morse, y T. Mietzner, "*Jawetz, Melnick, y Adelberg Microbiología*", (2010). LANGE Basic Science McGraw-Hill Companies, Incorporated.
- [181] V. Thammavongsa, H. K. Kim, D. Missiakas, y O. Schneewind, "Staphylococcal manipulation of host immune responses," *Nat Rev Microbiol*, (2015), 13(9), pp. 529–543.
- [182] S. Kuroda, Y. Sugawara, T. Deguchi, H. M. Kyung, y T. Takano-Yamamoto, "Clinical use of miniscrew implants as orthodontic anchorage: success rates and postoperative discomfort," *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, (2007), 131(1), pp. 9–15.



[183] C. Weidenmaier, J. F. Kokai-Kun, S. A. Kristian, T. Chanturiya, H. Kalbacher, M. Gross, G. Nicholson, B. Neumeister, J. J. Mond, y A. Peschel., "Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections," *Nat Med*, (2004), 10(3), pp. 243–245.

[184] Y. Oogai, M. Matsuo, M. Hashimoto, F. Kato, M. Sugai, y H. Komatsuzawa, "Expression of Virulence Factors by *Staphylococcus aureus* Grown in Serum," *Appl Environ Microbiol*, (2011), 77(22), pp. 8097.

[185] F. C. Neuhaus y J. Baddiley, "A Continuum of Anionic Charge: Structures and Functions of d-Alanyl-Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria" *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, (2003), 67(4), pp. 686–723.

[186] T. Koprivnjak, V. Mlakar, L. Swanson, B. Fournier, A. Peschel, y J. P. Weiss, "Cation-induced transcriptional regulation of the *dlt* operon of *Staphylococcus aureus*," *J Bacteriol*, (2006), 188(10), pp. 3622–3630.

[187] C. Weidenmaier y J. C. Lee, "Structure and Function of Surface Polysaccharides of *Staphylococcus aureus*," *Curr Top Microbiol Immunol*, (2017), 409, pp. 57–93.

[188] J. D. Oliver, "The viable but nonculturable state in bacteria," *Journal Microbiol*, (2005), 43, pp. 93–100.

[189] W. Cullmann y H. Schlunegger, "Influence of exogenous factors and antibiotics on the cytoplasmic membrane proteins of *Staphylococcus aureus*," *Chemotherapy*, (1992), 38(4), pp. 211–217.

[190] A. J. Tande y R. Patel, "Prosthetic joint infection," *Clin Microbiol Rev*, (2014), 27(2), pp. 302–345.

[191] E. M. Schwarz, J. Parvizi, T. Gehrke, A. Aiyer, A. Battenberg, S. A. Brown, J. J. Callaghan, M. Citak, K. Egol, G. E. Garrigues, M. Ghert, K. Goswami, A. Green, S. Hammound, S. L. Kates, A. C. McLaren, M. A. Mont, S. Namdari, W. T. Obrebsky, R. O'Toole, S. Raikin, C. Restrepo, B. Ricciardi, K. Saeed, J. Sanchez-Sotelo, N. Shohat, T. Tan, C. P. Thirukumaran, y B. Winters, "2018 International Consensus Meeting on

Musculoskeletal Infection: Research Priorities from the General Assembly Questions," *J Orthop Res*, (2019), 37(5), pp. 997–1006.

[192] E. A. Masters, R. P. Trombetta, K. L. de Mesy Bentley, B. F. Boyce, A. L. Gill, S. R. Gill, K. Nishitani, M. Ishikawa, Y. Morita, H. Ito, S. N. Bello-Irizarry, M. Ninomiya, J. D. Brodell Jr, C. C. Lee, S. P. Hao, I. Oh, C. Xie, H. A. Awad, J. L. Daiss, J. R. Owen, S. L. Kates, E. M. Schwarz, y G. Muthukrishnan, "Evolving concepts in bone infection: redefining 'biofilm', 'acute vs. chronic osteomyelitis', 'the immune proteome' and 'local antibiotic therapy,'" *Bone Res*, (2019), 7(1).

[193] R. Coates, J. Moran, y M. J. Horsburgh, "Staphylococci: colonizers and pathogens of human skin," *Future Microbiol*, (2014), 9(1), pp. 75–91.

[194] R. O. Darouiche, "Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence," *Clin Infect Dis*, (2001), 33(9), pp. 1567–1572.

[195] C. R. Arciola, D. Campoccia, P. Speziale, L. Montanaro, y J. W. Costerton, "Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials," *Biomaterials*, (2021), 33(26), pp. 5967–5982.

[196] R. A. Gittens, L. Scheideler, F. Rupp, S. L. Hyzy, J. Geis-Gerstorfer, Z. Schwartz, y B. D. Boyan., "A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects," *Acta Biomater*, (2014), 10(7), pp. 2907–2918.

[197] S. Kalasin y M. M. Santore, "Non-specific adhesion on biomaterial surfaces driven by small amounts of protein adsorption," *Colloids Surf B Biointerfaces*, (2009), 73(2), pp. 229–236.

[198] V. Aguadero Acera, "Tipificación molecular y estudio de clonalidad de 'Staphylococcus aureus' resistente a meticilina, productores de infecciones intrahospitalarias y extrahospitalarias en Extremadura," (2014). [Tesis de doctorado, Universidad de Extremadura]. *Dehesa*. Repositorio Institucional de la Universidad de Extremadura.

- [199] L. Hakeem, R. B. S. Laing, I. Tonna, J. G. Douglas, y A. R. Mackenzie, "Invasive Staphylococcus aureus infections in diabetes mellitus," *British Journal of Diabetes and Vascular Disease*, (2013), 13(4), pp. 164–177.
- [200] E. N. Menne, R. Y. Sonabend, E. O. Mason, L. B. Lamberth, W. A. Hammerman, C. G. Minard, S. L. Kaplan, y K. G. Hulten, "Staphylococcus aureus infections in pediatric patients with diabetes mellitus," *Journal of Infection*, (2012), 65(2), pp. 135–141.
- [201] M. L. U. Hansen, N. Gotland, N. Mejer, A. Petersen, A. R. Larsen, y T. Benfield, "Diabetes increases the risk of disease and death due to Staphylococcus aureus bacteremia. A matched case-control and cohort study," *Infect Dis (Lond)*, (2017), 49(9), pp. 689–697.
- [202] E. J. Boyko, B. A. Lipsky, R. Sandoval, E. M. Keane, J. S. Monahan, R. E. Pecoraro, y R. F. Hamman, "NIDDM and Prevalence of Nasal Staphylococcus aureus Colonization: San Luis Valley Diabetes Study," *Diabetes Care*, (1989), 12(3), pp. 189–192.
- [203] J. Smit, M. Søgaard, H. C. Schönheyder, H. Nielsen, T. Frøslev, and R. W. Thomsen, "Diabetes and risk of community-acquired Staphylococcus aureus bacteremia: a population-based case-control study," *Eur J Endocrinol*, (2016). 174(5), pp. 631–639.
- [204] T. J. Foster, "The MSCRAMM Family of Cell-Wall-Anchored Surface Proteins of Gram-Positive Cocci," *Trends Microbiol*, (2019), 27(11), pp. 927–941.
- [205] D. J. Cunningham, J. J. Kavolus, M. P. Bolognesi, S. S. Wellman, y T. M. Seyler, "Specific Infectious Organisms Associated With Poor Outcomes in Treatment for Hip Periprosthetic Infection," *J Arthroplasty*, (2017), 32(6), pp. 1984-1990.e5.
- [206] American Type Culture Collection, "Staphylococcus Epidermidis (ATCC 35983) Pathogen Safety Data Sheet / Infectious Substances Infectious Agent"
- [207] Y. Zheng, L. He, T. K. Asiamah, y M. Otto, "Colonization of medical devices by staphylococci," *Environ Microbiol*, (2018), 20(9), pp. 3141–3153.

- [208] S. Gupta, J. Koirala, R. Khardori, y N. Khardori, "Infections in diabetes mellitus and hyperglycemia," *Infect Dis Clin North Am*, (2007), 21(3), pp. 617–638.
- [209] B. A. Lipsky, A. R. Berendt, P. B. Cornia, J. C. Pile, E. J. G. Peters, D. G. Armstrong, H. G. Deery, J. M. Embil, W. S. Joseph, A. W. Karchmer, M. S. Pinzur, y E. Senneville, "2012 Infectious Diseases Society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections," *Clin Infect Dis*, (2012), 54(12).
- [210] M. Fletcher, "Methods for Studying Adhesion and Attachment to Surfaces," *Methods in Microbiology*, (1990), 22(C), pp. 251–283.
- [211] G. D. Christensen, L. Baldassarri, y W. Andrew Simpson, "Methods for studying microbial colonization of plastics," *Methods Enzymol*, (1995), 253(C), pp. 477–500.
- [212] A. M. Gallardo-Moreno, M. A. Pacha-Olivenza, L. Saldaña, C. Pérez-Giraldo, J. M. Bruque, N. Vilaboa, y M. L. González-Martín., "In vitro biocompatibility and bacterial adhesion of physico-chemically modified Ti6Al4V surface by means of UV irradiation," *Acta Biomater*, (2008), 5(1), pp. 181–192.
- [213] M. Á. Pacha-Olivenza, A. Rodríguez-Cano, M. L. González-Martín, y A. M. Gallardo-Moreno, "Kinetic of Adhesion of *S. epidermidis* with Different EPS Production on Ti6Al4V Surfaces," *Biomed Res Int*, (2019), 2019, pp. 1437806.
- [214] D. Lindsay, A. Killington, K. Fouhy, M. Loh, y P. Malakar, "The CDC biofilm bioreactor is a suitable method to grow biofilms, and test their sanitiser susceptibilities, in the dairy context," *Int Dairy J*, (2022), 126, pp. 105264.
- [215] International Diabetes Federation, (2017). *IDF Diabetes Atlas Eighth edition 2017*, 8th ed.
- [216] V. Kumar, B. Y. Patel, y A. H. Robinson, "Diabetes and orthopaedic surgery: a review," *Orthop Trauma*, (2019), 33(4), pp. 212–216.
- [217] A. D. Association, "Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus," *Diabetes Care*, (2014), 37(1), pp. S81–S90.

- [218] A. K. Prajapati, "Urinary tract infection in diabetics.," En P. Behzadi (Ed). *Microbiology of Urinary Tract Infections - Microbial Agents and Predisposing Factors*, Payam Behzadi, (2018), pp. 2-5, IntechOpen.
- [219] S. Wild, G. Roglic, A. Green, R. Sicree, y H. King, "Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030," *Diabetes Care*, (2004), 27(5), pp. 1047–1053.
- [220] G. Wilcox, "Insulin and Insulin Resistance," *Clinical Biochemist Reviews*, (2005), 26(2), pp. 19.
- [221] P. Ghimire y A. S. Dhamoon, "Ketoacidosis," En *StatPearls*, (2022), Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- [222] R. Jacquet, A. E. LaBauve, L. Akoolo, S. Patel, A. A. Alqarzaee , T. W. F. Lung, K. Poorey, T. P. Stinear, V. C. Thomas, R. J. Meagher, y D. Parker, "Dual gene expression analysis identifies factors associated with *Staphylococcus aureus* virulence in diabetic mice," *Infect Immun*, (2019), 87(5).
- [223] A. D. Deshpande, M. Harris-Hayes, y M. Schootman, "Epidemiology of Diabetes and Diabetes-Related Complications," *Phys Ther*, (2008), 88(11), pp. 1254–1264.
- [224] P. A. Lazzarini, R. E. Pacella, D. G. Armstrong, y J. J. van Netten, "Diabetes-related lower-extremity complications are a leading cause of the global burden of disability," *Diabetic Medicine*, (2018) 35(9), pp. 1297–1299.
- [225] E. Tamam y I. Turkyilmaz, "Effects of pH and Elevated Glucose Levels on the Electrochemical Behavior of Dental Implants," *Journal of Oral Implantology*, (2014), 40(2), pp. 153–159.
- [226] R. L. W. Messer, G. Tackas, J. Mickalonis, Y. Brown, J. B. Lewis, y J. C. Wataha, "Corrosion of machined titanium dental implants under inflammatory conditions," *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, (2009), 88(2), pp. 474–481.

[227] L. Y. Cui, X. T. Li, R. C. Zeng, S. Q. Li, E. H. Han, y L. Song, "In vitro corrosion of Mg-Ca alloy – The influence of glucose content," *Front Mater Sci*, (2017), 11(3), pp. 284–295, Sep. 2017.

[228] S. A. Montelongo, T. Guda, y J. Ong, "Bone graft for craniofacial applications", *Translating Biomaterials for Bone Graft: Bench-top to Clinical Applica*, CRC Press - Taylor&Francis Group, (2017), pp. 14.

[229] A. B. Lovati, C. L. Romanò, L. Monti, C. Vassena, S. Previdi, y L. Drago, "Does PGE1 Vasodilator Prevent Orthopaedic Implant-Related Infection in Diabetes? Preliminary Results in a Mouse Model," *PLoS One*, (2014), 9(4), pp. e94758.

[230] T. W. K. Kok, N. Agrawal, S. S. Sathappan, y W. K. Chen, "Risk factors for early implant-related surgical site infection," *Journal of Orthopaedic Surgery*, (2016), 24(1), pp. 72–76.

[231] M. Fernandes-Gomes, J. B. Amorim, L. C. Giannas, y M. A. Castillo-Salgado, "Biomaterials for Tissue Engineering Applications in Diabetes Mellitus," En L. A. Dobrzański (Ed). *Biomaterials in Regenerative Medicine*, (2018), pp. 409-435, InTech.



## Capítulo II. Objetivos

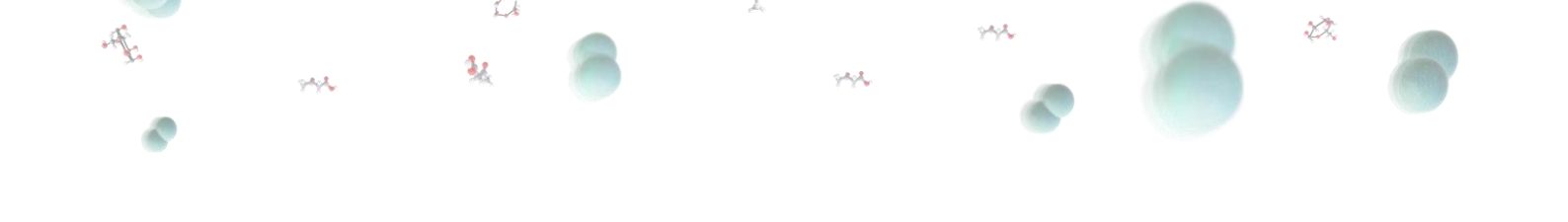


## II. Objetivos

Esta tesis evalúa cómo la colonización bacteriana a biomateriales se ve afectada al alterar la composición del material y la del entorno. En este sentido, se han establecido dos objetivos principales, divididos en objetivos parciales. El primero de ellos se centra en el enriquecimiento del material y el segundo en la modificación del entorno.

1. Estudiar la influencia en la colonización bacteriana de los cambios superficiales que experimenta un polímero biodegradable enriquecido con sustancias activas.
  - 1.1. Caracterización física de los cambios experimentados por la superficie de las películas de ácido poliláctico (PLA), al enriquecerlas con magnesio y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB).
  - 1.2. Cuantificación del proceso de adhesión bacteriana y formación de biocapas de una bacteria del género *Staphylococcus* sobre las superficies de PLA enriquecidas.
  - 1.3. Análisis del efecto del envejecimiento polimérico en los procesos de adhesión y formación de biocapas.
  - 1.4. Estudio del efecto bactericida y/o bacterioestático de los componentes introducidos en las matrices de PLA.

2. Evaluar cómo en un entorno alterado con condiciones diabéticas pueden modificarse las características y el comportamiento de microorganismos frente a la colonización de un material polimérico.
  - 2.1. Determinar el efecto en el crecimiento de una bacteria del género *Staphylococcus* al modificar la composición del medio de cultivo y de las suspensiones preparadas, simulando condiciones diabéticas.
  - 2.2. Obtener parámetros físicos determinantes en los procesos de adhesión de las superficies de las bacterias crecidas y suspendidas en medios con composiciones que simulan diferentes estados de glucemia y cetoacidosis.
  - 2.3. Trabajar con un modelo de flujo laminar para estudiar *in situ* la adhesión bacteriana a películas de PLA y cuantificar la capacidad de las bacterias para formar biocapas en condiciones que simulan diferentes estados diabéticos.



«Es hora de elegir entre lo que es fácil y lo que es correcto»  
(A. Dumbledore, *Harry Potter y El Cáliz de Fuego*)

# Capítulo III.

## Materiales y Métodos

### III. Materiales y Métodos

En este capítulo se abordaron los materiales y los métodos utilizados en esta tesis para alcanzar los objetivos planteados.

#### III.1. Superficies de ácido poliláctico

Se utilizaron dos tipos de PLA atendiendo a su estructura cristalina. Como hemos mencionado en la introducción, el grado de cristalinidad afecta a diferentes propiedades del PLA, entre ellas a la tasa de degradación o a las propiedades mecánicas. En esta tesis se ha trabajado con PLA con dos grados de cristalinidad: un PLA de alto grado de cristalinidad que denominaremos cristalino y, un PLA con menor grado de cristalinidad que llamaremos semicristalino.

Como PLA de alto grado de cristalinidad, se utilizó Ingeo™ Biopolymer 2003D de NatureWorks LLC (Blair, Estados Unidos), que fue guardado a temperatura ambiente y protegido de la humedad. El PLA cristalino, tiene un alto peso molecular, con un 4,25 % del isómero D. Este porcentaje es el que genera un alto grado de cristalinidad en el PLA. Tiene una viscosidad inherente de  $0,4 \text{ dL}\cdot\text{g}^{-1}$  a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , resistencia a la tracción de  $60 \text{ MPa}$ , un módulo de tracción de  $3,61 \text{ GPa}$  y un módulo de flexión de  $3,83 \text{ GPa}$ . Además, presenta una temperatura de fusión entre  $145\text{-}160 \text{ }^\circ\text{C}$  y una temperatura de transición vítrea a  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ .

El PLA que denominamos semicristalino, es de la empresa PURASORB© (Corbion, Amsterdam, Países Bajos) cuya referencia es PDL04. Este PLA es un copolímero de grado GMP del isómero DL-lactida. El grado GMP implica calidad y seguridad para la elaboración de productos para la industria de alimentos, fármacos, cosméticos y productos médicos. El stock de este PLA granulado se conservó a  $-15 \text{ }^\circ\text{C}$ . Su resistencia a la tracción es de alrededor  $70 \text{ MPa}$ , la temperatura de transición vítrea de  $47 \text{ }^\circ\text{C}$  y su dureza Shore D de

60-65. Asimismo, se caracteriza por una tenacidad relativamente baja, con una energía de fractura de aproximadamente  $7-8 \text{ J}\cdot\text{m}^{-1}$  y una viscosidad inherente igual a la del PLA cristalino.

Con estos polímeros se prepararon muestras circulares de 25 mm de diámetro que fueron empleadas en todos los ensayos.

### III.1.1. Preparación de las muestras de ácido poliláctico

El proceso de fabricación de las películas de PLA se llevó a cabo con la técnica *solvent-casting*. En esta técnica primero se disuelve el material polimérico y, a continuación, se vierte sobre un molde o superficie donde una vez evaporado el disolvente se genera una película fina de polímero. Siguiendo esta técnica, se fabricaron películas de PLA cristalino con y sin enriquecimiento de magnesio y CTAB, y de PLA semicristalino sin enriquecer.

Para realizar las películas sin enriquecimiento de PLA cristalino se comenzó pesando, 0,25 gramos de PLA para disolverlos en un matraz de vidrio con 5 mL de cloroformo (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Alemania, pureza > 99,5 %) obteniendo una disolución de concentración 5 % (p/v). El matraz cerrado se colocó en un agitador a 100 rpm durante el tiempo necesario para asegurar la disolución de los gránulos de PLA, como mínimo 3 horas. Para la creación de las películas se utilizaron moldes de forma cilíndrica de 5 cm de altura y de 30 mm de diámetro. La composición de estos moldes es silicona basada en polidimetilsiloxano. En los moldes se depositó 1 mL la disolución de PLA obtenida, dejándose secar a temperatura ambiente durante 8 horas, y a continuación, en una estufa a 70 °C durante otras 48 h. Estos tiempos fueron seleccionados tras comprobar mediante fluorescencia de rayos X que la presencia de cloroformo estaba en el límite del nivel de detección del equipo. Pasado ese tiempo las muestras, se sacaron de la estufa y se dejaron atemperar durante una hora. Finalmente, se extrajeron las películas del molde, y se troquelaron con un

sacabocados (EFCO Creative GMBH, Rohrbach, Alemania) de 25 mm de diámetro.

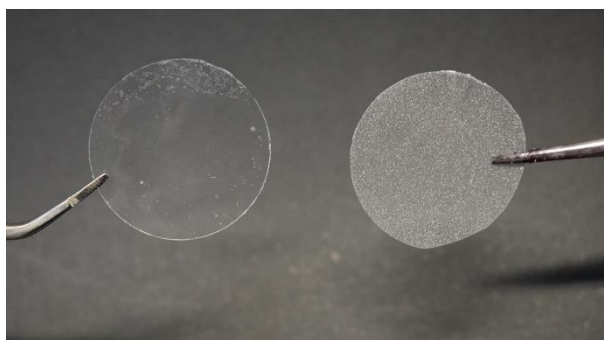
Las películas de PLA cristalino se enriquecieron con partículas esféricas de magnesio de  $\leq 50 \mu\text{m}$  (NitroParis, Castellón, España). Las características de estas partículas se seleccionaron en base al trabajo de Cienfuentes *et al.* [1]. Estos autores demostraron que la forma esférica genera una tasa de degradación de los compuestos PLA/Mg más lenta que las partículas con formas irregulares ocasionando a su vez una menor liberación de hidrógeno y una formación tardía de grietas en el PLA [1]. Las películas de PLA se prepararon con dos concentraciones de Mg 10 % y 3 % (p/p). Estas concentraciones se eligieron en base a resultados preliminares. En ensayos anteriores realizados, las películas poliméricas cargadas con magnesio ofrecieron una importante y rápida respuesta antibacteriana cuando la concentración de Mg era de 10 % (p/p), mientras que la concentración del 3 % (p/p) fue la más alta que no redujo significativamente la viabilidad de las bacterias adheridas.

Para elaborar las películas de PLA con Mg, se añadieron las partículas a un tubo con 5 mL de la disolución de PLA cristalino en cloroformo. La cantidad añadida de Mg se calculó en función de la concentración final buscada. Los tubos se colocaron en un agitador rotativo de carrusel hasta que las partículas de magnesio se hallaron distribuidas uniformemente en la disolución. Finalmente, se depositó la mezcla en los moldes y se procedió como se ha descrito anteriormente.

Para la producción de las películas de PLA cristalino enriquecidas con CTAB (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Alemania) se emplearon dos concentraciones del tensioactivo 1 % y 5 % (p/p). La concentración del 1 % se eligió asumiendo que si todo el CTAB incluido en la película se liberará al medio de degradación (30 mL) tendríamos la concentración mínima inhibitoria (CMI) de CTAB de

$16,6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , según Nicoletti *et al.* [2]. La concentración de 5 % (p/p) se seleccionó para reforzar y corroborar el posible efecto del tensioactivo sobre las bacterias. El procedimiento seguido para la elaboración de las películas enriquecidas con CTAB fue similar al empleado para preparar películas con Mg.

Por último, en el caso de las películas enriquecidas con ambos compuestos (CTAB y Mg) se añadió en primer lugar el CTAB a la disolución del polímero y, una vez homogeneizado, se añadieron las partículas de magnesio. El resto del proceso fue similar al ya detallado. En la figura 3.1 se muestran películas de PLA cristalino sin enriquecimiento y con enriquecimiento de magnesio al 10 % (p/p).



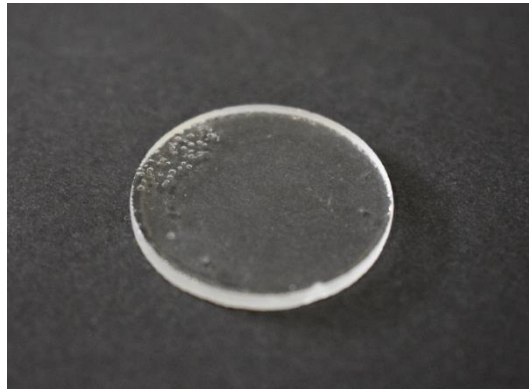
**Figura 3.1.** Películas de PLA cristalino. A la izquierda una película enriquecida y a la derecha una de PLA enriquecido con magnesio 10% (p/p).

En esta tesis vamos a denominar a estas películas como PLA  $X/Y$ , siendo  $X$  la concentración de magnesio, es decir 0 ó 3 %, e  $Y$  la concentración de CTAB, es decir, 1 % ó 5 %. La película PLA10Mg se refiere a la película preparada con 10 % (p/p) de magnesio exclusivamente.

El proceso de preparación de las muestras con el PLA semicristalino fue similar al seguido en las películas de PLA cristalino sin enriquecimiento. El primer paso fue disolver el PLA en cloroformo, pero para conseguir la misma viscosidad en la disolución que la del PLA cristalino, se utilizó una proporción de 20 % (p/v). Las películas se obtuvieron depositando  $0,8 \mu\text{L}$  de la disolución de PLA sobre discos de vidrio de 25 mm de diámetro (Garvaglass S.L.L., Barcelona, España). Antes de su uso los discos de vidrio se sumergieron en una disolución



saturada de ácido sulfúrico con dicromato potásico (mezcla crómica) durante 15 min, enjuagándose a continuación con abundante agua destilada. Una vez pasados los tiempos de secado, las muestras depositadas se almacenaron en el desecador hasta su utilización. La figura 3.2 es un ejemplo de PLA semicristalino depositado en un disco.



**Figura 3.2.** Ejemplo de PLA semicristalino depositado en un disco.

### III.1.2. Degradación de las muestras de ácido poliláctico

El estudiar la degradación de los materiales es importante para conocer si estos sufren alteraciones a lo largo del tiempo dentro de sistemas acuosos, como son los medios fisiológicos. En particular, se estudió la degradación de las películas de PLA cristalino enriquecidas con Mg y/o CTAB.

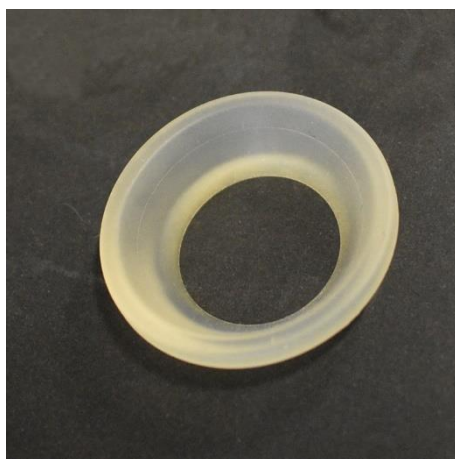
La degradación se llevó a cabo en una solución salina de fosfato (PBS) 0,15 M. Para prepararla se elaboró primero un tampón KPi disolviendo en 100 mL de agua destilada 4,35 g de  $K_2HPO_4$  (PanReac-AppliChem, Barcelona, España) y 3,4 g de  $KH_2PO_4$  (PanReac-AppliChem, Barcelona, España) Después, a un matraz de 1 litro se añadieron 20 mL de Kpi, 8,76 g de NaCl (PanReac-AppliChem, Barcelona, España) y agua destilada hasta completar 1 L.

Las películas de PLA sin y con 10 % magnesio se sometieron a degradación durante 8 h, 1, 7, 14, 21 días y 28 días. Los ensayos de degradación se realizaron

sumergiendo las películas de PLA en recipientes herméticos de plástico de 100 mL conteniendo 50 mL de PBS, a 37 °C. Antes y después del proceso de degradación se midió el pH del PBS utilizado en dichos ensayos. Pasado los tiempos de degradación, las películas se secaron con nitrógeno seco y, se almacenaron al menos 24 horas en un desecador.

Para estudiar el efecto de la degradación durante los procesos de adhesión bacteriana, se degradaron las películas durante cuatro horas a 37 °C utilizando un volumen de PBS similar al empleado en los experimentos de adhesión (0,9 mL). Con este fin, se colocaron las películas en placas Petri, y se ajustaron sobre ellas cámaras de adhesión de silicona reutilizables (flexiPERM) (Greiner bio-one, Kremsmünster, Austria) con forma de cono truncado de 20 mm de diámetro interno (figura 3.3) para controlar la superficie expuesta al PBS.

Tras el proceso de degradación, se tomó una muestra del PBS utilizado para cuantificar los iones  $Mg^{2+}$  liberados mediante un análisis de espectroscopia de masas de las películas. Además, los cambios en la morfología de las superficies se analizaron mediante AFM y SEM.



**Figura 3.3.** Cámara de adhesión de silicona.

Para estudiar la degradación en las muestras con magnesio y CTAB se procedió a sumergir verticalmente en 30 mL de PBS las películas en recipientes herméticos de plástico, con ayuda de ganchos para mantener la verticalidad. El proceso de adhesión se llevó a cabo durante 1 mes y 3 meses en una estufa a 37 °C. Pasado este tiempo las muestras se secaron con un flujo de nitrógeno, y se almacenaron en un desecador para análisis posteriores. Estas películas se denominarán PLA<sup>X</sup>/<sub>Y</sub><sup>Z</sup>, donde X e Y hacen referencia al Mg y al CTAB respectivamente, y z al tiempo de degradación 0, 1 o 3 meses.

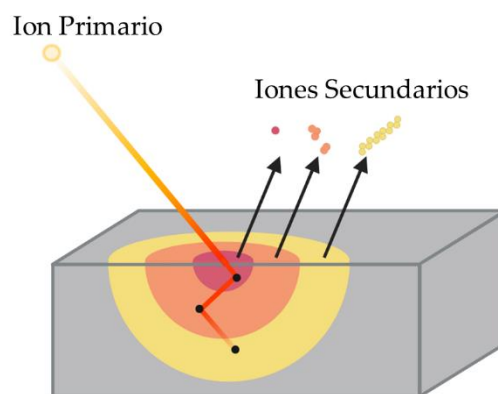
### III.1.3. Caracterización superficial de las muestras de ácido poliláctico

Como ya hemos mencionado, las propiedades de las superficies de los biomateriales son cruciales para su respuesta en el medio fisiológico. Por esta razón, es preciso conocer las características de la superficie de los sustratos de PLA relevantes en su interacción tanto con el medio en el que se encuentren inmersos como con los posibles microorganismos que puedan intentar su colonización. Concretamente, se consideró fundamental hacer un análisis de la composición química de las superficies, su grado de cristalinidad, su morfología, su energía libre superficial y sus propiedades eléctricas superficiales. Además, teniendo en cuenta que los sustratos de PLA utilizados son degradables, se hizo el seguimiento de esta degradación a través de los cambios de composición de los medios en los que se degradaron las películas. Para algunos análisis se emplearon técnicas experimentales que requieren del uso de equipos muy sofisticados que están disponibles en los Servicios de Apoyo a la Investigación de la UEx (SAIUEx), algunos de ellos también formando parte de la Instalación Científico Técnica Singular (ICTS) NANBIOSIS, y que son operados exclusivamente por técnicos de estos servicios. Concretamente, estas técnicas fueron la espectrometría de masas de iones secundarios por tiempo de vuelo (ToF-SIMS), la microscopía electrónica de barrido (SEM), la difracción de

rayos X (RDX) y la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). A continuación, se presenta una descripción básica de los fundamentos en los que se apoyaron estas técnicas, y se describen las características y procedimientos seguidos en su empleo.

### III.1.3.1. Composición química superficial: Espectrometría de masas de iones secundarios de tiempo de vuelo (ToF-SIMS)

La espectrometría de masas de iones secundarios por tiempo de vuelo (ToF-SIMS) se utiliza para determinar la composición química de la parte más externa de un material. Pocas técnicas son capaces de proporcionar esta información referida a profundidades de no más de unas decenas de nanómetros. Gracias a un bombardeo con partículas muy energéticas, se consigue fragmentar las moléculas de la superficie en pedazos de diversos tamaños, ionizados o no, que, arrancados de la superficie, son acelerados y transportados a un espectrómetro de masas para su análisis (figura 3.4).



**Figura 3.4.** Ilustración del impacto del haz de iones primarios sobre una superficie en la técnica ToF-SIMS.

Para el bombardeo de la superficie se emplean haces de iones, denominados iones primarios, muy focalizados y energéticos, de Cs, Xe, Ga, C<sub>60</sub>, Bi o incluso, para muestras biológicas, de clústeres de argón. Estos haces se producen en el equipo con pistolas de metal líquido en las que, gracias a la aplicación de un campo eléctrico muy intenso sobre agujas mojadas en estos metales, se consigue

desorber iones de los metales con una energía muy elevada, del orden de 5 a 25 keV. Como es esperable, el haz primario pierde energía según penetra en el material, provocando que la fragmentación de las moléculas se vaya produciendo al romperse enlaces cada vez menos energéticos. De este modo, tras el bombardeo se van a obtener un gran número de pedazos diferentes de las moléculas superficiales, debido a los distintos modos en los que se hayan podido romper. En general, estos fragmentos son iones positivos o negativos, extraídos de la zona más cercana al punto de bombardeo o especies moleculares desde las zonas más alejadas, aunque no es descartable la recombinación de algunos de ellos tras la ruptura. La extracción de iones de la superficie provoca que se cargue eléctricamente. En el caso de muestras conductoras este exceso de carga se distribuye y compensa en el material, pero si se trata de no conductoras, entre cada pulso en el bombardeo de los iones primarios se hace incidir un chorro de electrones de baja energía sobre la muestra para mantener su electroneutralidad.

Para analizar las consecuencias de este bombardeo con el haz primario, los iones producidos son acelerados y focalizados hacia el detector del equipo, en condiciones de ultra-alto vacío. Teniendo en cuenta que el tiempo que cada uno de estos fragmentos iónicos tarda en llegar al detector va a depender de su masa,  $m$ , y de su carga,  $z$ , en esta técnica se van a poder clasificar estos fragmentos, precisamente, según el tiempo que transcurre desde el instante del impacto del haz primario hasta el momento en que alcanzan el detector, también llamado, tiempo de vuelo del ion. De este modo, se obtiene un espectro en el que se informa del número de cuentas, o iones recibidos, en el detector para cada relación  $m/z$ .

El equipo utilizado en esta tesis fue un ToF-SIMS<sup>5</sup> (ION TOF, Münster, Alemania), equipado con un cañón de  $\text{Bi}_3^{2+}$  a 25 keV con un ángulo de incidencia de  $40^\circ$ , y una intensidad de 0,21 pA. Se analizaron áreas de  $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ , registrándose los espectros de iones negativos con una dosis superior a

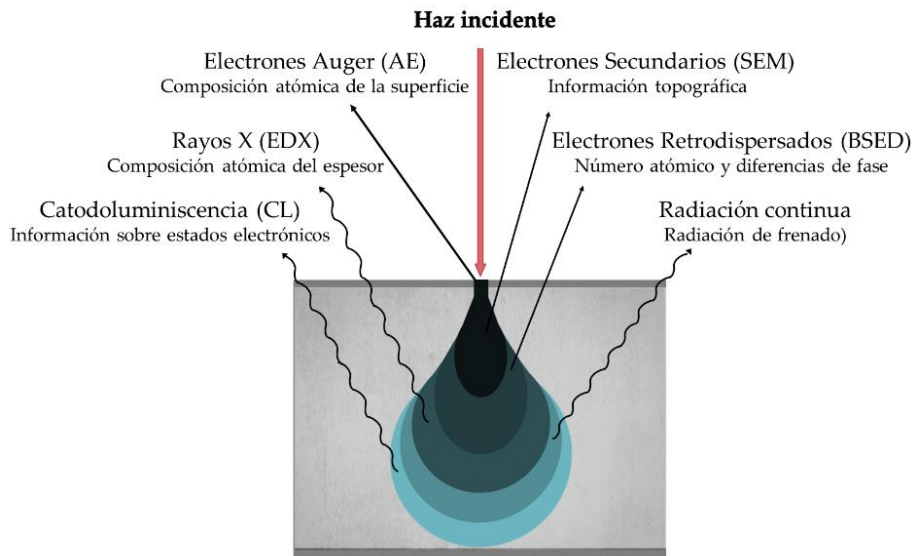
$10^{12}$  iones / $\text{cm}^2$ . Todo el proceso tuvo lugar dentro de una cámara de vacío a una presión de  $2,4 \cdot 10^{-9}$  mbar. Este equipo forma parte de la Instalación Científica Técnica Singular, ICTS, NANBIOSIS y del Servicio de Caracterización de Sólidos y Superficies de los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Extremadura, SCAS-SAIEX.

### III.1.3.2. Imagen y composición superficial: Microscopía Electrónica de Barrida (SEM)

La microscopía SEM es una poderosa herramienta para examinar e interpretar diferentes características superficiales como la topografía o la composición.

SEM es un tipo de microscopía electrónica que genera imágenes de alta resolución de la superficie de un material, gracias a las interacciones electrón-materia. Al hacer incidir sobre un material un haz de electrones procedentes del equipo, se producen diferentes procesos como la emisión de electrones desde los átomos del material, o como la emisión de radiación, a diferentes niveles de energías, todas ellas consecuencia de la interacción entre el haz incidente y los átomos del material (figura 3.5) [3]. El haz de electrones incidentes que se hace rastrear por toda la superficie ioniza los átomos del material, provocando la liberación de electrones, llamados secundarios, desde estos. Puesto que los que se producen en zonas más profundas del material no tienen energía suficiente para escapar solo se recogen los producidos por los átomos que están en los primeros nanómetros de la superficie, y prácticamente provenientes exclusivamente del lugar de impacto del haz de electrones primarios. Ello permite que las imágenes obtenidas al recoger los iones secundarios tengan una resolución muy alta, por debajo del nanómetro. También, al incidir el haz primario de electrones sobre la muestra y arrancar un electrón de las capas más interiores de un átomo del material, se produce una emisión característica de rayos X. Esta emisión es consecuencia del decaimiento de un electrón procedente

de una capa atómica superior, al hueco generado. Puesto que los niveles energéticos de cada átomo son únicos, la señal de rayos X (EDX) proporciona información de la composición química del material con una profundidad de cientos decenas de nanómetros (figura 3.5).



**Figura 3.5.** Diagrama de interacción entre un haz de electrones y un material.

Por otra parte, los electrones incidentes también pueden ser retrodispersados (BSED) por los átomos del material. En este caso, las imágenes que se obtienen al recoger a estos electrones hacen referencia a zonas más profundas del material, gracias a que la energía de los estos electrones, provenientes directamente del haz incidente, es muy alta. Como esta dispersión es muy dependiente del número atómico del átomo que la provoca, este tipo de señal, BSED, permite obtener información sobre cómo se distribuyen los diferentes átomos sobre la superficie del material. De este modo, se puede observar cómo los elementos se muestran más o menos brillantes en función de lo alto que sea su número atómico [5], [6].

En esta tesis se utilizó el microscopio Quanta 3D FEG (FEI, Hillsboro, Estados Unidos). La toma de imágenes de las muestras de PLA se utilizó tamaño spots de 6,5, donde el rango de aumentos utilizado fue de 150x a 650x y el tamaño de imagen desde 8,5 mm a 10,8 mm. El desarrollo de este análisis se llevó a cabo en



su totalidad por el Servicio de Caracterización de Sólidos y Superficies de los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Extremadura.

### III.1.3.3. Composición química de los medios de degradación: Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS)

La espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inducido (ICP-MS) permite cuantificar los iones presentes en una muestra en un rango de concentraciones que va desde ppt a ppm [6]–[9].

Esta técnica permite utilizar un espectrómetro de masas para analizar muestras líquidas gracias a la ionización previa del líquido por la acción de un plasma, generalmente de argón. Para ello, una vez que es introducida la muestra líquida en el nebulizador que tiene el equipo, es transformada en aerosol con gas argón [10]. Este aerosol es dirigido a una cámara en la que se ioniza por la acción del plasma de argón, generado por inducción electromagnética que permite alcanzar hasta los 8000 K. Los iones obtenidos pasan a un analizador cuadrupolar donde es posible separarlos en función de su relación masa/carga. Una vez alcanzado el detector, este procede a evaluar su abundancia dentro de la muestra introducida. En la figura 3.6 se esquematiza las partes del equipo y del proceso de medida mencionados.

El equipo utilizado en esta tesis fue un 7900 Agilent ICP-MS (Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos), Las muestras fueron diluidas 1/10 para realizar la medida. La pureza del gas de colisión y del gas de argón para el plasma es del 99,99 %, ambos procedentes de Prazair (Madrid, España). Este equipo forma parte del Servicio de Análisis Elemental y Molecular de los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Extremadura.



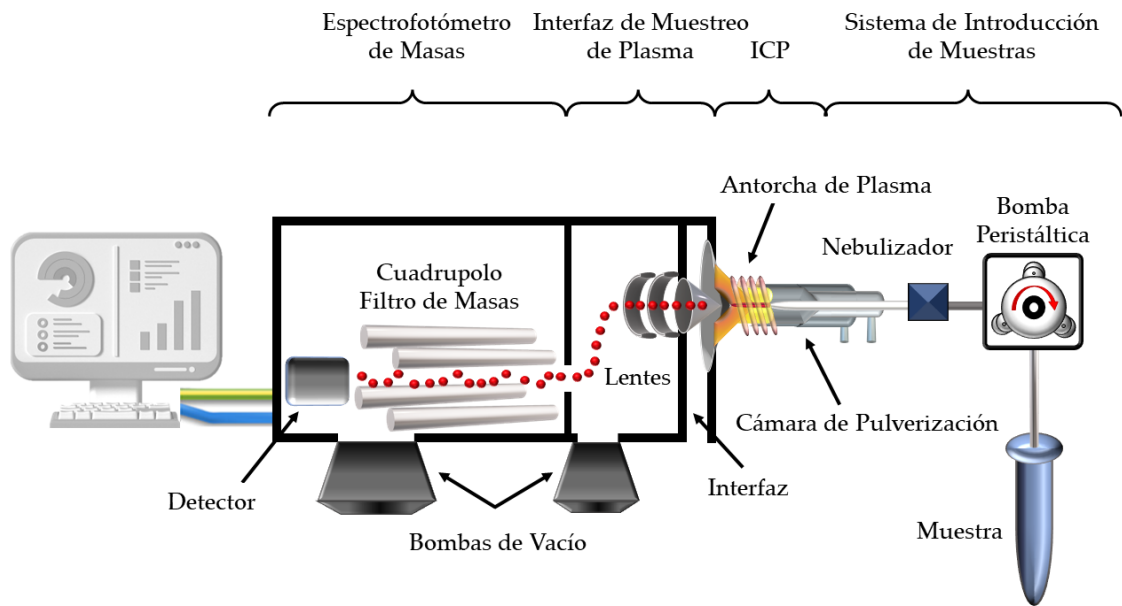


Figura 3.6. Esquema del sistema de medida de ICP-MS.

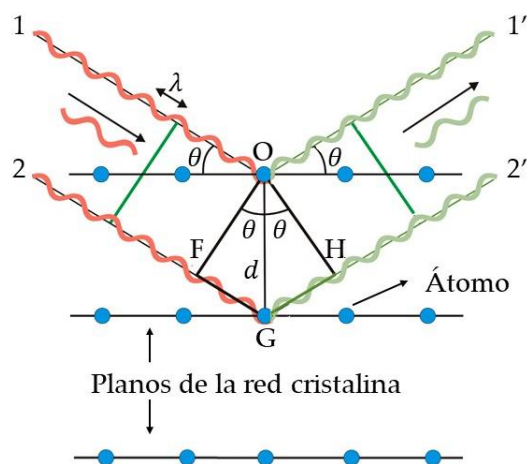
### III.1.3.4. Estructura Cristalina: Difracción de Rayos X (XDR)

La difracción de rayos X es una técnica que permite caracterizar la estructura cristalina de los materiales. Se basa en la dispersión coherente de un haz de rayos X al ser enfocado sobre una superficie con una ordenación cristalina. Estas interferencias constructivas se rigen por la ley de Bragg (3).

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \theta \quad (3)]$$

donde  $n$  es el orden de difracción,  $\lambda$  es la longitud de onda del rayo incidente,  $d$  es la distancia entre los planos que unen los puntos equivalentes de la red cristalina, y  $\theta$  es el ángulo de incidencia de la radiación X que da la interferencia positiva (figura 3.7).

Básicamente, en un difractómetro se hace incidir un haz de rayos X sobre la muestra con la posibilidad de modificar el ángulo de incidencia. Este giro se va realizando a la vez que se recoge el haz difractado en un detector. Según la ley de Bragg, conocido el ángulo al que la señal obtenida es máxima, es posible averiguar la distancia entre los planos de la red cristalina.



**Figura 3.7.** Esquema de la difracción de rayos X en una red cristalina. Las esferas representan los átomos que se sitúan sobre planos, perpendiculares separados a una distancia  $d$ . Los rayos X de color rojo, inciden sobre los planos a un ángulo  $\theta$ . Después de incidir las ondas emergentes de color verde, están en fase, y se observa difracción a un ángulo  $\theta$  respecto de los planos de difracción o  $2\theta$  respecto al haz incidente.

El equipo utilizado en esta tesis fue un difractómetro Bruker D8 ADVANCE (Bruker, Billerica Estados Unidos). El equipo está dotado de un monocromador Ge 111, que genera una radiación  $K\alpha$  de cobre ( $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ). Utilizando un detector lineal con una abertura de  $6^\circ$  y una potencia de 30 kV y 40 mA, se obtuvieron los espectros necesarios para determinar la cristalinidad del material. La medida se realizó con un rango entre  $10\text{-}80^\circ$  usando un incremento de  $0,02^\circ$ . Este equipo forma parte del Servicio de Caracterización de Sólidos y Superficies de los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Extremadura.

### III.1.3.5. Hidrofobicidad y Tensión Superficial: Goniometría de gotas depositadas

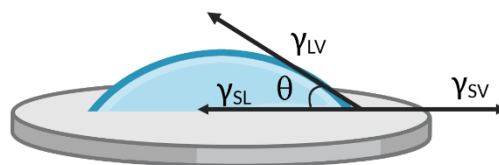
La goniometría de los ángulos de contacto de líquidos permite determinar la energía libre superficial que, en el caso de líquidos y sólidos isotrópicos, coincide con la tensión superficial. Esta propiedad es determinante en la interacción de un sólido con su entorno. En particular, permite evaluar el grado de hidrofobicidad de las superficies, es decir, su capacidad para evitar su interacción con el agua.

Esta propiedad es de especial importancia en cualquier material inmerso en un medio acuoso, y como ya hemos dicho, todos los medios biológicos lo son.

En 1805, Young describió que para lograr que una gota de líquido depositada esté en equilibrio sobre una superficie topográficamente lisa y químicamente homogénea, es necesario que la resultante de las fuerzas aplicadas en la línea de triple contacto entre el sólido, el líquido y la fase gaseosa sea cero. La exigencia de equilibrio implica que la fase gaseosa ha de estar en equilibrio con el líquido y el sólido, lo que obliga a que el gas sea el vapor saturado del líquido utilizado a la temperatura del experimento, y que sobre la superficie haya una capa de vapor adsorbida, caracterizada por una presión superficial ( $\pi_e$ ). De este modo, las componentes horizontales de las fuerzas en la línea triple cumplen (4):

$$\gamma_{LV} \cdot \cos \theta = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} - \pi_e \quad (4)$$

donde  $\gamma_{LV}$ ,  $\gamma_{SV}$  y  $\gamma_{SL}$  hacen referencia a las tensiones interfaciales líquido-vapor, sólido-vapor y sólido-líquido, respectivamente, y  $\theta$  al ángulo que forma la gota depositada del líquido, medido desde la fase líquida, figura 3.8.



**Figura 3.8.** Gota un líquido sobre una superficie sólida. Encontramos que  $\theta$  representa el ángulo de contacto, y  $\gamma_{LV}$ ,  $\gamma_{SV}$  y  $\gamma_{SL}$  como tensiones interfaciales líquido-vapor, sólido-vapor y sólido-líquido

No obstante, si el líquido no se esparce sobre la superficie, es decir, su ángulo de contacto es mayor que cero, se considera que la interacción entre la superficie y las moléculas del líquido es lo suficientemente débil como para que la adsorción del vapor del líquido sea muy baja y, por lo tanto, la contribución de su presión

superficial a las fuerzas sobre la línea triple despreciable. De este modo la ecuación se escribe como (5):

$$\gamma_{LV} \cdot \cos \theta = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \quad (5)$$

La ecuación (5) permite obtener la energía libre del sólido  $\gamma_{SV}$ , conocidos la tensión superficial del líquido, el ángulo de contacto que forma sobre la superficie, y la tensión interfacial sólido-líquido. Las dos primeras magnitudes son accesibles experimentalmente, pero no la tercera. Para solventar este problema, una línea de trabajo se basa en admitir que las energías libres superficiales e interfaciales pueden separarse en contribuciones aditivas, cada una de ellas asociada a diferentes fuerzas intermoleculares. De manera la tensión superficial total,  $\gamma^{TOT}$ , se describiría como la suma de componentes independientes,  $\gamma^j$ , asociadas a distintas interacciones intermoleculares (6):

$$\gamma^{TOT} = \sum_j \gamma^j \quad (6)$$

Existen diferentes aproximaciones que justifican la elección del reparto de las contribuciones de cada fuerza intermolecular. En esta tesis se trabajó bajo el esquema de las aproximaciones de Van Oss y de Owens-Wendt-Kaelble (OWK).

En el modelo de Van Oss, la tensión superficial se puede describir como la suma dos componentes, una debida a interacciones por fuerzas Lifshitz-Van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ) y otra componente, de tipo polar, que engloba las interacciones puente de hidrógeno y las ácido-base, según Lewis ( $\gamma^{AB}$ ) (7) [11]–[14]:

$$\gamma^{TOT} = \gamma^{LW} + \gamma^{AB} \quad (7)$$

Además, se postula que la interacción ácido-base, al depender del carácter donador o aceptor de electrones, según Lewis, puede escribirse en función de unos parámetros aceptor de electrones ( $\gamma^+$ ) y donador de electrones ( $\gamma^-$ ), de modo que la componente ácido-base se entiende como la media geométrica de ambos (8).

$$\gamma^{AB} = 2 \cdot \sqrt{\gamma^+ \cdot \gamma^-} \quad (8)$$

Con ello, y según este modelo que admite el carácter aditivo de las contribuciones a las energías libres, y la regla de combinación de la media geométrica para cada tipo de interacción, se tiene que la tensión interfacial entre un sólido y un líquido viene dada por (9):[11]–[14]

$$\gamma_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - 2 \cdot \sqrt{\gamma_S^{LW} \cdot \gamma_L^{LW}} - 2 \cdot \sqrt{\gamma_S^+ \cdot \gamma_L^-} - 2 \cdot \sqrt{\gamma_S^- \cdot \gamma_L^+} \quad (9)$$

Introduciendo la ecuación (9) en la ecuación de Young (5) se obtiene la expresión (10):

$$(1 + \cos \theta_L) \cdot \gamma_L^{TOT} = 2 \left( \sqrt{\gamma_L^{LW} \cdot \gamma_S^{LW}} + \sqrt{\gamma_L^- \cdot \gamma_S^+} + \sqrt{\gamma_L^+ \cdot \gamma_S^-} \right) \quad (10)$$

Gracias a esta ecuación, si se miden los ángulos de contacto de tres líquidos, de componente Lifshitz-van der Waals y parámetros donador y aceptor de electrones de su tensión superficial conocidos, es posible determinar la componente  $\gamma_S^{LW}$ , y los parámetros,  $\gamma_S^+$  y  $\gamma_S^-$ , para el sólido, y por tanto, su tensión superficial, resolviendo un sistema de tres ecuaciones para esas tres incógnitas.

Asimismo, a partir de estas componentes y parámetros, también es posible obtener a energía libre de cohesión del sólido inmerso en agua,  $\Delta G_{SAS}$ , según la expresión (11).

$$\Delta G_{SAS} = -2 \left( \sqrt{\gamma_S^{LW}} - \sqrt{\gamma_A^{LW}} \right)^2 + 4 \left( \sqrt{\gamma_S^+ \cdot \gamma_A^-} + \sqrt{\gamma_S^- \cdot \gamma_A^+} - \sqrt{\gamma_S^+ \cdot \gamma_S^-} - \sqrt{\gamma_A^+ \cdot \gamma_A^-} \right) \quad (11)$$

Esta energía libre proporciona una medida de la hidrofobicidad del material, ya que, si su valor es negativo, correspondiendo a una interacción favorable entre las superficies del sólido, indica un comportamiento hidrófobo, mientras que un

valor positivo es consecuencia de la repulsión entre las superficies por la presencia del agua, es decir hidrofiliidad.

La segunda aproximación para el cálculo de la tensión superficial que se ha utilizado en esta tesis es la desarrollada por Owens, Went y Kaelble (OWK). Estos autores propusieron para la tensión superficial una relación aditiva de dos términos, uno proveniente de fuerzas dispersivas ( $\gamma^d$ ) y otro de las no dispersivas ( $\gamma^{nd}$ ). El modelo de Van Oss y el de OWK son similares, pero difieren en la asignación de las fuerzas que se asocian con cada componente de la tensión superficial: las fuerzas no dispersivas dipolo-dipolo y dipolo-dipolo inducido se consideran para ser contabilizadas en la componente  $\gamma^{LW}$  en la aproximación de Van Oss junto con las fuerzas de London. Sin embargo, desde un punto de vista práctico, al ser las primeras mucho menores que la London, ambas componentes se utilizan e interpretan indistintamente. Además, solo la propuesta de Van Oss, que precisamente elaboró este autor basándose en la OWK, introduce el concepto de parámetros donador o aceptor de electrones para el cálculo de la tensión superficial.

De este modo, según la aproximación OWK, se tiene para la tensión superficial (12):

$$\gamma^{TOT} = \gamma^d + \gamma^{nd} \quad (12)$$

Y para la tensión interfacial (13) [15]:

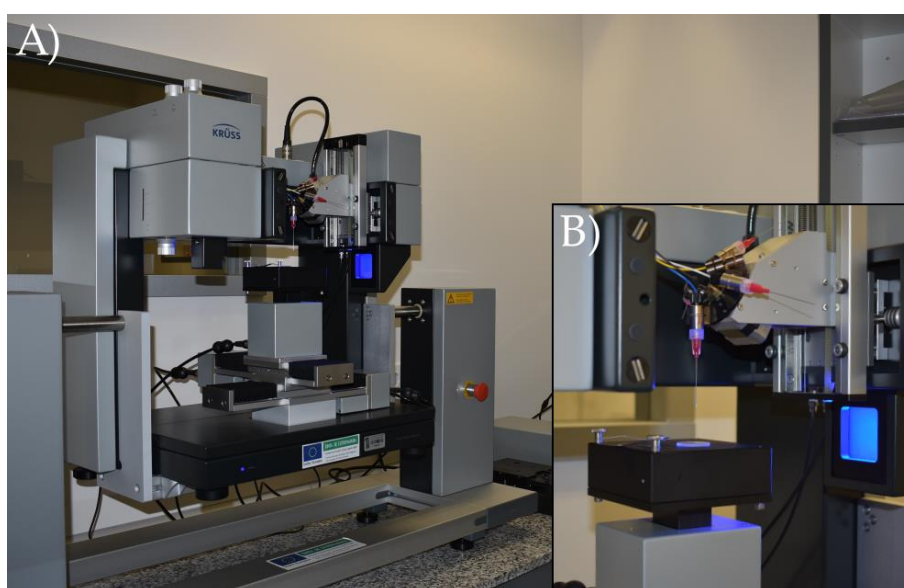
$$\gamma_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - 2 \cdot \sqrt{\gamma_S^d \cdot \gamma_L^d} - 2 \cdot \sqrt{\gamma_S^{nd} \cdot \gamma_L^{nd}} = \left( \sqrt{\gamma_S^d} - \sqrt{\gamma_L^d} \right)^2 + \left( \sqrt{\gamma_S^{nd}} - \sqrt{\gamma_L^{nd}} \right)^2 \quad (13)$$

que sustituidas en la ecuación de Young dan la expresión (14):

$$\gamma_L \cdot (1 + \cos \theta) = 2 \cdot \sqrt{\gamma_S^d \cdot \gamma_L^d} + 2 \cdot \sqrt{\gamma_S^{nd} \cdot \gamma_L^{nd}} \quad (14)$$

Similar al caso de la aproximación de Van Oss, gracias a esta ecuación, si se miden los ángulos de contacto de dos líquidos, de componentes dispersiva y no-dispersiva conocidas, es posible determinar la tensión superficial del sólido.

En esta tesis, se utilizaron los líquidos agua desionizada (Milli-Q), formamida (Fluka Chemicals, Buchs, Suiza) y diiodometano (Fluka Chemicals, Buchs, Suiza), cuyos componentes y parámetros están referenciados.[16] El ángulo de contacto de las gotas de estos líquidos se midió en un goniómetro automático DSA 100E (Krüss, Hamburg, Alemania) (figura 3.9).



**Figura 3.9.** Equipo de goniometría Krüss DSA 100E. A) Visión general. B) Carrusel de agujas para la dosificación de líquidos.

Este equipo permite depositar series de gotas de forma automática en posiciones y a velocidades previamente definidas. Se depositaron sobre la superficie gotas de 5  $\mu\text{L}$ , 6  $\mu\text{L}$  y 2  $\mu\text{L}$  para el agua, la formamida y el diiodometano, respectivamente, a una velocidad de 10  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . La medida del ángulo de contacto se realizó pasados 15 s tras la deposición, para asegurar un estado estacionario en el sistema. Para ello, con una cámara enfocada a las gotas se adquirieron imágenes que se analizaron con el software Drop Shape Analyser (Krüss GmbH, Hamburg, Alemania). A través de las imágenes se cuantificaron los ángulos de contacto a ambos lados de la gota, y se evaluó la tensión superficial

de cada muestra. En la figura 3.10 se puede ver como ejemplo de gotas de agua destilada sobre una muestra de PLA fijado sobre vidrio. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado sobre muestras independientes.



**Figura 3.10.** Gotas de agua desionizada sobre una ácido poliláctico fijada en vidrio.

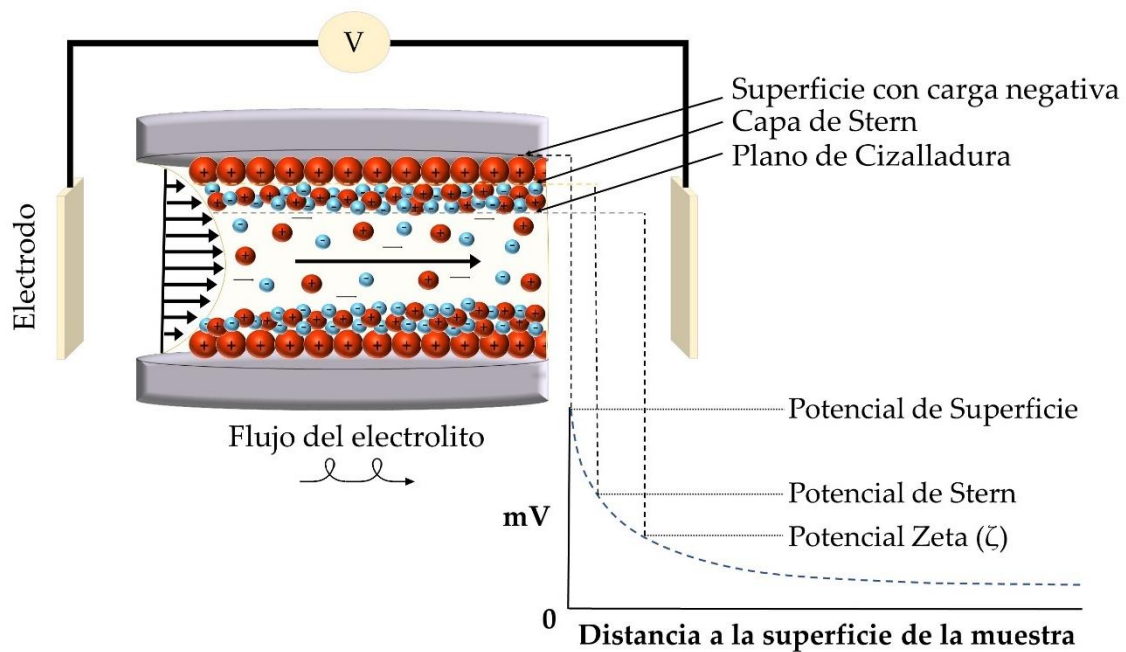
### III.1.3.6. Potencial zeta de superficies: Potencial y corriente de flujo

Las propiedades eléctricas de las superficies contribuyen de manera significativa a su interacción con su entorno, y pueden llegar a ser decisivas en procesos como la adhesión bacteriana. Cuando una superficie, entra en contacto con un medio líquido tiene lugar un proceso de carga eléctrica por ionización o disociación de los grupos superficiales, o por la adsorción sobre las superficies de iones presentes en el líquido, por ejemplo, si el líquido es agua, grupos  $-OH$ . Para mantener la electroneutralidad, la carga superficial de co-iones se equilibra con una cantidad igual, pero de signo opuesto de iones llamado contraiones en los que se denomina doble capa. Una parte de estos contraiones se distribuyen en una capa muy próxima a la superficie, denominada capa de Stern, donde quedan fuertemente unidos a ella. Mientras, el resto de los contraiones se sitúan en una zona en la que están sometidos a la agitación térmica, y que se denomina capa difusa de la doble capa (figura 3.11). Aun así, en esta capa, los iones más cercanos a la capa de Stern se mueven solidarios con la partícula, hasta una distancia de la partícula, denominada plano de cizalladura, aunque no se puede conocer su posición con precisión, incluso en algunos casos coincidiendo con el plano de Stern, y llegando a depender de la forma de partícula. Aunque la carga



eléctrica de la superficie del material no es accesible experimentalmente, sí lo es el potencial eléctrico en la superficie de cizalladura, denominado potencial zeta ( $\zeta$ ), el cual permite caracterizar las propiedades eléctricas del material.

El pH de la disolución influye significativamente en el valor del potencial zeta, ya que el exceso de protones o de grupos hidroxilos altera la carga de los grupos funcionales de la superficie del material. El punto isoeléctrico de un material es el valor de pH en el cual la superficie tiene una carga neta igual a cero. En cambio, si el material se encuentra en una disolución con un pH más bajo o más alto que dicho punto, su superficie tendrá una carga neta positiva o negativa, respectivamente.



**Figura 3.11.** Esquema de la interacción de dos superficies con una disolución electrolítica sometida a un flujo por la creación de un campo eléctrico.

Para estimar el potencial zeta de una superficie extensa se utiliza una técnica basada en las propiedades electrocinéticas que tiene el sistema debido a la presencia de la doble capa. En esta técnica se sitúan dos superficies muy próximas, formando entre ellas canales capilares, con un electrodo a cada extremo, por donde se introduce una disolución iónica (figura 3.11). Aplicando una diferencia de presión entre los extremos del canal, la disolución es obligada

a moverse por él, provocando un desplazamiento de carga eléctrica a lo largo del mismo debido al arrastre de contraiones de la parte difusa de la doble capa, denominada corriente de flujo. Como consecuencia de esta corriente, se establece una diferencia de potencial entre los extremos del capilar, que a su vez genera una corriente conductora en sentido opuesto. En el estado estacionario, ambas corrientes son iguales, y a la diferencia de potencial inducida se denomina potencial de corriente.

Las ecuaciones fundamentales que relacionan el potencial de flujo y la corriente de flujo con el potencial zeta fueron obtenidas por Marjan von Smoluchowski y Hermann von Helmholtz. La ecuación de Helmholtz-Smoluchowsky para el cálculo de potencial zeta se expresa como (15):

$$\zeta = \frac{\eta}{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r} \cdot \frac{L}{Q} \cdot \frac{dI_f}{dp} \quad (15)$$

donde  $I_f$  es la corriente de flujo,  $p$  es la presión aplicada en el canal,  $\eta$  es la viscosidad dinámica del líquido-electrolito,  $\varepsilon_r$  la permitividad dieléctrica relativa del electrolito,  $\varepsilon_0$  la permitividad dieléctrica del vacío, y  $L$  y  $Q$ , la longitud y la sección transversal del canal capilar, respectivamente.

Esta ecuación también se puede escribir en función del potencial de corrientes  $V_f$ , ya que  $I_f = V_f/R$ , siendo  $R$  la resistencia eléctrica dentro del canal, de modo que el potencial zeta se expresaría como (16):

$$\zeta = \frac{\eta}{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r} \cdot k \cdot \frac{dV_f}{dp} \quad (16)$$

siendo,  $k$  la conductividad del líquido (17):

$$K = \frac{1}{R} \cdot \frac{L}{Q} \quad (17)$$

En esta tesis, la determinación del potencial zeta de las superficies de

polímero se realizó a través del análisis del potencial y corriente de flujo medidos con un equipo electrocinético (EKA) (Anton Paar, Graz, Austria). Los ensayos se llevaron a cabo con una celda simétrica donde se situaron enfrentadas dos muestras idénticas de 25 mm de diámetro, y se utilizó como electrolito KCl 1 mM, con pH 5,6. La presión se aplicó en forma de rampa desde 0 a 600 mbar, realizándose 4 ciclos para todas las medidas, cambiando el sentido del flujo entre un ciclo y el siguiente. Las medidas fueron realizadas por triplicado con muestras independientes.

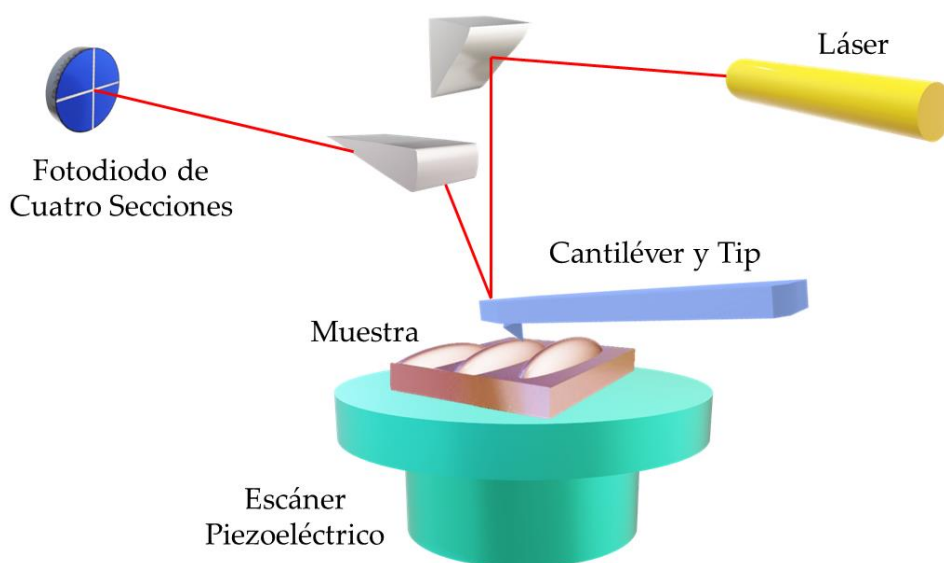
### III.1.3.7. Topografía: Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Las características de la topografía de la superficie de un material son muy relevantes de cara a su interacción con el entorno. Una mayor o menor rugosidad, o la forma y distribución de los accidentes topográficos pueden ser decisivos en un biomaterial para favorecer, o no, la adhesión bacteriana o la proliferación celular. La microscopía de fuerza atómica (AFM) permite obtener una imagen de la superficie con una resolución y detalle en el orden de nanómetros [17]–[21].

Cuando dos cuerpos se sitúan muy próximos entre sí, las fuerzas interfaciales que actúan en sus superficies pueden hacer que se desplacen uno respecto a otro, atrayéndose o repeliéndose. Si uno de estos cuerpos tiene una masa pequeña y presenta una superficie también pequeña respecto al otro cuerpo, como resultado de las fuerzas interfaciales se podría observar su movimiento relativo, frente del cuerpo más masivo. La microscopía de fuerza atómica se basa en la respuesta mecánica de una sonda nanométrica cuando se aproxima a una superficie, de modo que el equipo detecta el movimiento de la sonda al interactuar con los átomos o moléculas de la superficie de la muestra. Estas sondas son pequeños voladizos o palancas que poseen una punta muy fina y afilada alojada en un extremo. Tanto la palanca como la punta pueden presentar diferentes formas y tamaños, para acceder a diferentes tipos de superficies. Cuando la sonda se

acerca a la superficie del material, y la punta siente la interacción con ella, se produce una deflexión en la palanca, dependiente de la intensidad de la fuerza de interacción superficie-punta. Para registrar estos movimientos los equipos de AFM utilizan un mecanismo de detección óptico basado en la reflexión de un haz láser enfocado sobre la palanca de la sonda (figura 3.12). El detector óptico está dividido en cuatro zonas y permite determinar la intensidad recibida en cada una de ellas. Al moverse la sonda, el láser se reflejará con diferentes ángulos, produciendo diferentes cambios de intensidad en las zonas del detector. También son posibles cambios de intensidades debidos a torsiones de sonda por las modificaciones en la viscosidad de la superficie.

Un modo de trabajo de estos equipos consiste en recorrer la superficie registrando los desplazamientos que sufre la sonda como consecuencia exclusivamente de los accidentes topográficos, y que se consigue manteniendo constante la distancia entre la punta de la sonda y la superficie. La distancia sonda-superficie puede ser finita o permitir el contacto entre ambas. Esta señal, punto a punto, junto con el desplazamiento horizontal de la superficie, permiten la construcción de una imagen topográfica de la superficie.



**Figura 3.12.** Esquema de un microscopio de fuerza atómica.

El equipo utilizado en esta tesis fue microscopio AFM 5500 Agilent (Technologies, Santa Clara, Estados Unidos). Las medidas se llevaron a cabo con sondas de diferentes características, una rectangular de silicio con constante de fuerza nominal de 0,03 N/m y con un radio de curvatura en la punta de aproximadamente de 8 nm (serie CSC38/Cr-AlBs, MikroMash, Sofía, Bulgaria), y la segunda, también rectangular (FMV-PT, Bruker, Billerica Estados Unidos), con una constante de fuerza de 2,8 N/m y un radio de curvatura de aproximadamente 25 nm, que permitieron obtener imágenes y evaluar parámetros de rugosidad de las superficies. En los estudios de las películas de PLA enriquecidas con 10% (p/p) de Mg se eligió cuantificar la topografía mediante rugosidad cuadrática media (RMS) tomando imágenes de  $15 \times 15 \mu\text{m}^2$ , debido a las características superficiales encontradas. Y para los análisis de las muestras de PLA enriquecidas con 3% (p/p) de Mg y diferentes concentraciones de CTAB, se escogieron imágenes representativas de  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  y  $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ , donde se estimó la rugosidad media (Sa). Todas las medidas se realizaron en muestras independientes por triplicado.

## III.2. Microorganismos

En esta tesis hemos trabajado con dos cepas bacterianas diferentes, ambas Gram-positivas de la colección americana de cultivos tipo (ATCC, American Type Collection Culture): *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35983 y *Staphylococcus aureus* ATCC29213. la cepa *S. epidermidis* ATCC 35983 fue la usada para los ensayos en materiales enriquecidos, mientras que la cepa *S. aureus* ATCC29213 fue la utilizada para los ensayos de ambiente diabético.

### III.2.1. Suspensiones bacterianas: Entorno diabético

Para realizar la investigación sobre los efectos de la diabetes sobre los microorganismos hemos utilizado un modelo de ambiente diabético basado en la presencia de glucosa y cuerpos cetónicos en distintas concentraciones. Las concentraciones de glucosa y cuerpos cetónicos utilizadas en este trabajo las

hemos seleccionado basándonos en la bibliografía [22]–[27] y en nuestros experimentos previos. En concreto, se eligieron dos concentraciones de glucosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos): una dentro de un rango no patológico que denominaremos normal (G1) de  $0,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , y otra patológica (G2) de  $1,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , asociada a un estado de hiperglucemia [28], [29]. En particular, las concentraciones de niveles normales o prediabéticos se seleccionaron siguiendo las directrices del informe de la Asociación Americana de Diabetes de 2016. En este informe, propusieron que los niveles normales de glucosa debían ser menores a  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , y los considerados prediabéticos debían estar entre  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $1,26 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Además, en el trabajo de Fernandes-Gomes *et al.* [30] se indicaba que los rangos normales de glucosa se encuentran entre  $0,7$  y  $0,99 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . A la vista de estos datos, se desarrollaron experimentos previos de crecimiento bacteriano con *S. aureus* expuesta a cuatro concentraciones no patológicas entre  $0$  a  $1,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . En esos casos, los valores obtenidos para la tasa de crecimiento no mostraron diferencias significativas entre las distintas concentraciones de glucosa. Por lo tanto, atendiendo a toda la información obtenida, se eligió la concentración de  $0,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  para el rango no patológico.

Igualmente, para la selección de la concentración de glucosa patológica o de hiperglucemia, nos hemos basado en el informe de la Asociación Americana de Diabetes de 2016, que estipula la hiperglucemia en concentraciones por encima de  $1,26 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Además, se utilizaron los trabajos de Xu *et al.* [28], [29] donde estudiaban la creación de biocapas por *S. epidermidis* en un modelo hiperglucémico establecido a la concentración de  $1,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Asimismo, en experimentos previos de crecimiento bacteriano realizados con un rango de concentraciones patológicas de glucosa de  $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $3,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , sólo se encontraron pequeñas diferencias en la tasa de crecimiento para la concentración  $1,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Los tres cuerpos cetónicos principales son el acetoacetato de metilo (ACE) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), el ácido hidroxibutírico (HA)

(Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) y la acetona (PanReac-AppliChem, Barcelona, España) [23], [24], [31]. En el cuerpo humano se presentan mezclados en proporciones variables para ACE y HA dependiendo del estado del paciente y, con un 2 % para acetona [24]. Mientras que existe una extensa bibliografía para establecer los niveles de glucosa en la diabetes, no ocurre lo mismo con los cuerpos cetónicos. La bibliografía consultada determinó que los niveles normales de cuerpos cetónicos no deben ser menores a  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , situando los niveles de alerta de cetoacidosis entre  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , y cualquier valor por encima de  $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  fue considerado un caso grave de cetoacidosis. Con esta información se desarrollaron en nuestro laboratorio estudios previos de crecimiento bacteriano con 4 concentraciones de cuerpos cetónicos desde  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  hasta  $9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  con diferentes proporciones de HA:ACE. Tras lo que se seleccionó la proporción de HA:ACE de 1:6, se observaron diferencias significativas en las tasas de crecimiento en la concentración normal de  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (K1) en comparación con los otros niveles, por lo que fue elegida. Para la concentración asociada a la cetoacidosis, se eligió una concentración de  $9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (K2), que es la que presentan pacientes con niveles diabéticos no controlados.

También, se prepararon medios con mezclas con glucosa y cuerpos cetónicos para poder estudiar ambientes similares a los que presentan pacientes diabéticos. Dashora *et al.* [23] estudiaron un nuevo tratamiento para la diabetes y el riesgo de cetoacidosis, utilizando los niveles de cetoacidosis mencionados, junto con los niveles altos de glucosa. [23] En ese estudio la concentración de glucosa que se consideró fue de  $2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pero afirmaron que no son necesarios estos niveles para sufrir una cetoacidosis peligrosa. Por este motivo, se preparó un ambiente mixto normal o no patológico (GK1) utilizando las concentraciones de  $0,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glucosa y  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de cuerpos cetónicos, y otro ambiente mixto patológico con  $1,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glucosa y  $9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de cuerpos cetónicos.



Estos ambientes se prepararon utilizando como disolventes medios de cultivo y PBS. Los medios o disoluciones sin enriquecimientos fueron los considerados como controles.

### III.2.1.1. Cultivos bacterianos

Las bacterias que hemos utilizado en esta tesis se mantuvieron almacenadas en un stock a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en bolas porosas (Microbank, Pro-Lab Diagnostics, Austin, Estados Unidos).

Para iniciar los experimentos, se inocularon placas de crecimiento sólido agar sangre (OXOID Ltd, Hampshire, Reino Unido) con una bola del stock durante 24 horas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Este proceso sirvió para obtener colonias aisladas que se utilizaron en el resto de los experimentos.

Para estudiar la adhesión bacteriana en un modelo estático se siguió el siguiente protocolo de crecimiento. A partir de las colonias aisladas, se inocularon tubos de 5 mL de cultivo de caldo de Soja Trypticasa (TSB) (OXOID Ltd, Hampshire, Reino Unido) que estuvieron en la estufa a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 9 h, creando así un precultivo. Se añadieron  $25\text{ }\mu\text{L}$  de este precultivo a un matraz de 50 mL de TSB, el cual se incubó 14 horas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , al contenido de este matraz le llamaremos cultivo. Pasado ese tiempo de crecimiento, el matraz se sonicó durante 5 min para disgregar posibles cúmulos de bacterias. Para separar las bacterias del TSB se realizó un proceso de lavado. Para ellos se repartieron los 50 mL del matraz de cultivo entre seis tubos de ensayo para centrifugarlos durante 5 min a 1000 g (Sorvall TC6, Newtown, Estados Unidos). Previamente, los tubos de la centrifugación se limpiaron con mezcla crómica y, se enjuagaron dos veces con agua destilada. Al terminar el centrifugado, se desechó el sobrenadante de los tubos conservando el pellet. Posteriormente, se rellenó con 5 mL de PBS cada tubo y, se volvieron a centrifugar. Los dos pasos anteriores con PBS se repitieron dos veces. Finalmente, el pellet bacteriano de todos los tubos se



unió y resuspendió en 1 mL de PBS. De este mililitro se tomó el volumen preciso para obtener la concentración del 62 % de transmitancia ( $3 \cdot 10^8$  cfu/mL según escala McFarland) a 492 nm en una suspensión bacteriana de PBS con un volumen determinado para el modelo de adhesión estática. Esta transmitancia se midió con un espectrofotómetro Helios Epsilon (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Estados Unidos).

Para los estudios de adhesión bacteriana en un modelo dinámico el protocolo fue similar. En este tipo de ensayos las bacterias se sometieron al enriquecimiento con el modelo diabético de los ambientes. A diferencia del protocolo anterior, los 25  $\mu$ L de precultivo se introdujeron en medios de cultivo con diferentes enriquecimientos diabéticos. En estos casos los diferentes medios de cultivo se prepararon partir de TSB sin glucosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) y, se enriquecieron con las concentraciones no patológicas o patológicas del ambiente del modelo diabético. El crecimiento en estos medios siguió el mismo protocolo que el detallado para el modelo de adhesión estático, con la salvedad de que el PBS empleado para la suspensión bacteriana al 62 % de transmitancia, estaba enriquecido del mismo modo que los medios de cultivo en cada caso.

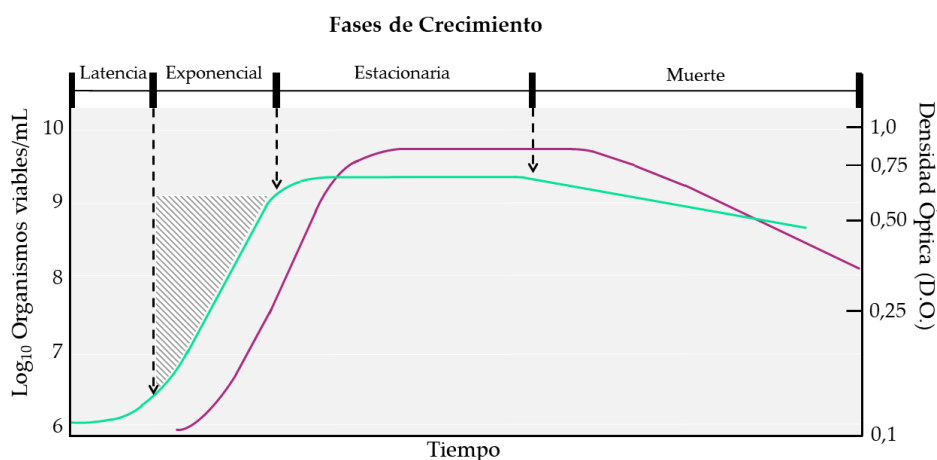
En los ensayos de formación de biocapas, el protocolo de cultivo bacteriano fue similar al descrito para modelos estáticos de adhesión, con la excepción de que las bacterias no se lavaron tras el crecimiento y, el medio utilizado para preparar las suspensiones bacterianas de trabajo fue TSB en lugar de PBS.

Estos ensayos se realizaron con ambiente enriquecidos con el modelo diabético y en condiciones sin enriquecimiento. Para los ensayos sin requerimientos diabéticos se eligió una concentración bacteriana del 82 % de transmitancia. Y para los ensayos con condiciones diabéticas se tomó una transmitancia del 62 %, igual que en los experimentos de adhesión dinámico.

Para realizar la caracterización superficial bacteriana, los microorganismos se cultivaron con los pasos descritos para las bacterias del modelo estático de adhesión. Aunque, el protocolo de lavado y la suspensión bacteriana, se realizó en una disolución de cloruro potásico (KCl) (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Alemania) en agua milli Q a 0,1 mM, en lugar de en PBS.

### III.2.1.2. Curvas de crecimiento bacteriano

La dinámica de crecimiento bacteriano se puede modelar con la representación del logaritmo del número de microorganismos en la suspensión con respecto al tiempo de incubación. La curva de crecimiento con alimento finito presenta 4 fases (figura 3.13). Comienza con una fase de latencia donde la bacteria se aclimata al nuevo ambiente. Continúa con la fase de crecimiento exponencial en el que la cantidad de bacterias vivas es mayor que la cantidad de bacterias muertas y, posteriormente, en la fase de crecimiento estacionario donde la cantidad de bacterias vivas es similar a la cantidad de bacterias muertas. Por último, la fase de muerte en la que la viabilidad bacteriana se reduce de forma acusada por el agotamiento de nutrientes. En esta tesis hemos trabajado con las bacterias en estado activo y, por eso, se decidió utilizar la fase exponencial de crecimiento.



**Figura 3.13.** Curva de crecimiento bacteriano típica. La línea verde representa el número de bacterias viables en el cultivo bacteriano a lo largo del tiempo. En cambio, la línea púrpura representa la turbidez del cultivo bacteriano a lo largo del tiempo.

El enriquecimiento con diferentes sustancias del medio de cultivo de un microorganismo puede alterar su forma de crecimiento, como ya hemos mencionado en la introducción. Por ello, se analizaron las curvas de crecimiento de *S. aureus* cuando su medio de cultivo se enriqueció con las concentraciones no patológicas o patológicas características del ambiente diabético (*sección III.2.1.1*). Para llevar a cabo este experimental se inocularon 25  $\mu$ L del precultivo bacteriano en 50 mL de TSB sin glucosa a 37 °C durante 14 horas. A partir de este cultivo, se incubaron tubos con 3 mL de TSB sin y con enriquecimiento de glucosa y/o cuerpos cetónicos ajustando el inoculó a la transmitancia del 62 %, a 492 nm, con un espectrofotómetro de luz horizontal. Dichos tubos se incubaron con agitación a 37 °C en una estufa Hotcold (J. P. Selecta, Barcelona, España). El crecimiento bacteriano en los tubos se evaluó midiendo la densidad óptica (DO) a distintos tiempos en un espectrofotómetro. Se hicieron medidas en la primera hora y media cada 30 segundos; durante las cuatro horas siguientes las imágenes se cada 10 minutos; y por último hasta llegar a las 10 horas de incubación se tomaron medidas cada 60 minutos. Antes de cada medida se hacía un blanco en el espectrofotómetro. Las curvas se hicieron por triplicado con cultivos independientes.

La fase exponencial se caracterizó mediante la siguiente expresión (18):

$$\log N = \log N_0 - \mu \cdot (t_f - t_0) \quad (18)$$

donde  $N$  representa la absorbancia final del crecimiento,  $N_0$  la absorbancia inicial del crecimiento bacteriano y  $\mu$  es un índice que se denomina constante específica de la tasa de crecimiento y tiene unidades del inverso del tiempo ( $\text{min}^{-1}$ ). En nuestro caso, se determinó el tiempo de generación ( $g$ ) definido como el tiempo que tarda la población bacteriana en duplicarse. Esta variable se calculó con la siguiente expresión (19):

$$g = \frac{0.693}{\mu} \quad (19)$$

También, se midió el pH en los distintos medios de cultivo utilizados (con y sin enriquecimiento) antes y después del crecimiento bacteriano. Los valores se determinaron por triplicado a temperatura ambiente con un pH-metro GLP 21 (Crison Instruments™, Lainate, Italia). Los datos de pH se presentaron como valores medios  $\pm$  error estándar (SD) de la media. El análisis estadístico se realizó con el GraphPad InStat 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, Estados Unidos), utilizando el procedimiento de comparaciones múltiples, la prueba de Dunnett. Todos los análisis se realizaron con un nivel de significación de  $p < 0,05$ .

### III.2.2. Caracterización superficial bacteriana

#### III.2.2.1. Hidrofobicidad: Adhesión Microbiana a Hidrocarburos (MATH)

El método de adhesión microbiana a los hidrocarburos (MATH) fue desarrollado por Rosenberg *et al.* [32]. Esta técnica cuantificó mediante la DO, el reparto de las bacterias suspendidas entre un medio acuoso y uno hidrocarbonado. La afinidad de la bacteria por una u otra fase depende de la polaridad de las moléculas en la superficie bacteriana. Cuando estas moléculas poseen grupos no polares tienden a interactuar con otras moléculas no polares, evitando la interacción con moléculas polares como el agua.

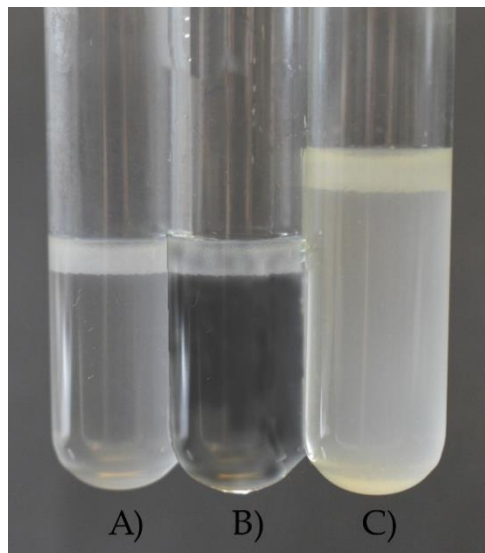
Las medidas se hicieron cultivando bacterias como se describió en la **sección III.2.1.1**, en particular, después del lavado de bacterias, el pellet obtenido fue resuspendido en 1 mL de disolución acuosa de KCl 0,1 mM.

Para estudiar la hidrofobicidad de la superficie bacteriana, en primer lugar, se prepararon 3 mL de suspensiones bacterianas en KCl enriquecido con diferentes ambientes del modelo diabético con una densidad óptica inicial entre 0,6 y 0,9 abs a una longitud de onda de 492 nm. En un segundo paso, después de añadir 150  $\mu$ L de n-hexadecano (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Alemania,

pureza 99 %) se agitó la mezcla en un vortex durante 60 s. Por último, las muestras se dejaron en reposo durante 10 min para permitir la separación de las fases. Pasado este tiempo, se midió la densidad óptica final ( $DO_f$ ) de la suspensión. La hidrofobicidad relativa de superficie bacteriana ( $R$ ) se obtuvo mediante la siguiente expresión (20) [33]:

$$R = \left[ \frac{(DO_i - DO_f)}{DO_i} \right] \cdot 100 \quad (20)$$

Los tres tubos de la figura 3.14 corresponden a tres tipos de microorganismos con diferente rango de hidrofobicidad. Se puede la separación de fases entre el medio acuoso (zona inferior) y el hidrocarburo (zona superior).

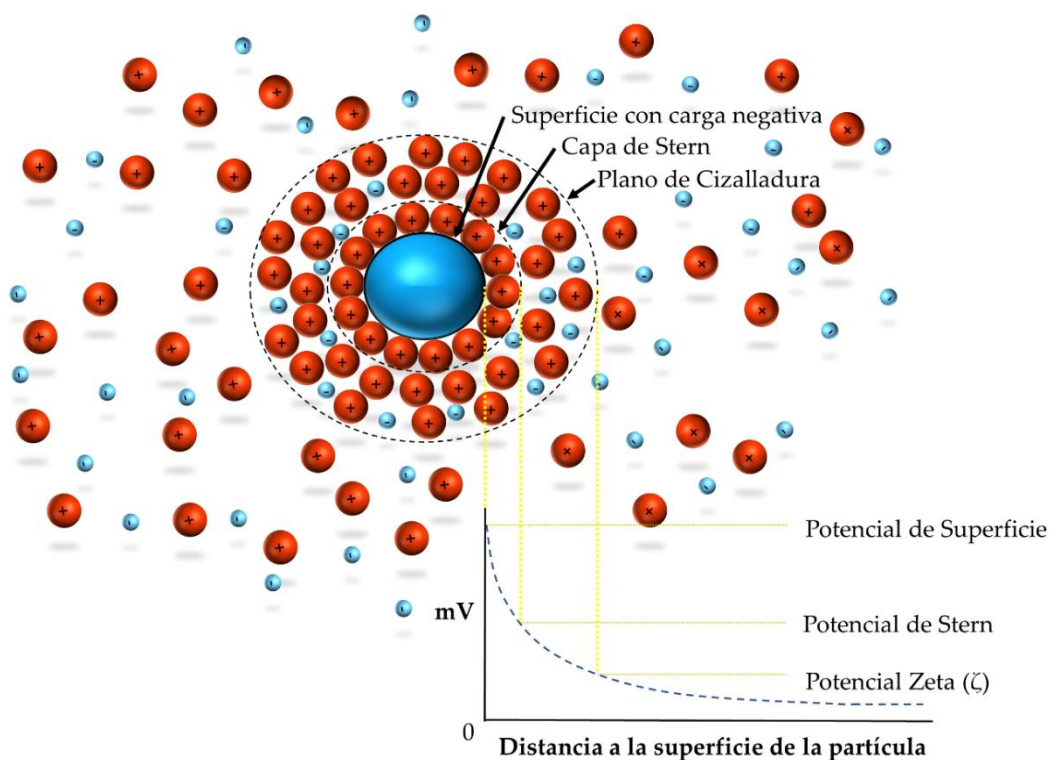


**Figura 3.14.** Imagen de suspensiones bacterianas analizadas con la técnica MATH para evaluar la hidrofobicidad superficial bacteriana. El tubo A) muestra un microorganismo con hidrofobicidad media, B) con hidrofobicidad alta y C) con hidrofobicidad leve.

Los análisis se determinaron por triplicado con cultivos independientes. Los datos se dieron como valores medios  $\pm$  desviación estándar de la media. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad InStat 3.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, Estados Unidos), utilizando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer. Todos los análisis se realizaron con un nivel de significación de  $p < 0,05$ .

### III.2.2.2. Potencial zeta de microorganismos: electroforesis

Como hemos mencionado, la carga eléctrica de una superficie es una de las propiedades cruciales para determinar la interacción de los microorganismos con las superficies. En la figura 3.15 se representa la distribución de cargas al sumergir una partícula en una disolución iónica. Al igual que ocurre cuando la superficie extensa de un material está en contacto con una disolución, alrededor de la superficie bacteriana se crea la doble capa eléctrica, con la capa de Stern de iones fuertemente atraídos y la capa difusa de iones determinándose el potencial zeta en el plano de cizalladura.



**Figura 3.15.** Esquema de la interacción de una partícula con carga negativa con las cargas de una disolución electrolítica.

Para analizar la carga eléctrica de la superficie bacteriana se midió el potencial zeta utilizando la técnica de electroforesis. Se entiende como electroforesis, al movimiento realizado por las partículas en una suspensión iónica al aplicar un campo eléctrico. Este movimiento es medido por el equipo gracias al efecto Doppler, es decir, a partir del cambio de frecuencia en un haz de luz tras incidir

sobre la partícula. Esta evaluación se realiza comparando un haz de referencia con su haz dispersado con un cierto ángulo,  $17^\circ$ , en el equipo de la esta tesis. Esto permite calcular la movilidad electroforética ( $\mu_e$ ) como el cociente entre la velocidad de la partícula en el fluido ( $v$ ) y el campo eléctrico ( $E$ ) aplicado la ecuación (21)

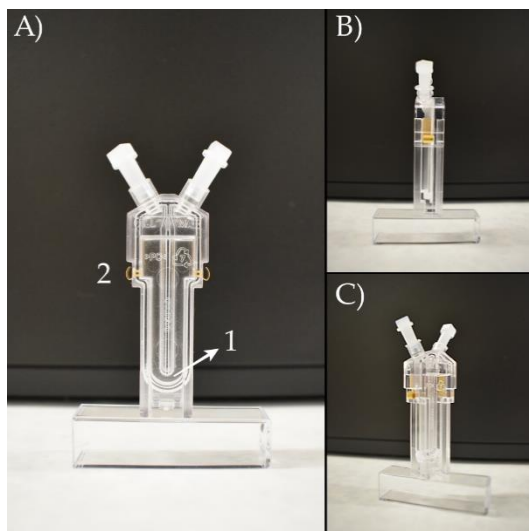
$$\mu_e = \frac{v}{E} \quad (21)$$

A partir del modelo de Smoluchowski se relaciona la movilidad electroforética con el potencial zeta siempre que se cumpla que el tamaño de la partícula es mucho mayor que el espesor de la doble capa eléctrica creada alrededor de ella en la disolución iónica, como se expresa en la siguiente ecuación (22):

$$\zeta = \frac{4 \cdot \pi \cdot \eta}{\varepsilon} \cdot \mu_e \quad (22)$$

donde  $\varepsilon$  y  $\eta$  son la permitividad y la viscosidad del medio de suspensión.

Las determinaciones del potencial zeta se realizaron en un equipo Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments (Malvern, Reino Unido). Las medidas se llevaron a cabo utilizando 1 mL de suspensión bacteriana en KCl, ajustada a una transmitancia del 62 % a 492 nm, como se describió en la *sección III.2.1.1*. Con este volumen se llenó la celda de medida DTS1070 (figura 3.16) del Zetasizer, y se introdujo dentro del aparato. El equipo proporcionó el valor del potencial zeta de las bacterias y la conductividad del medio.



**Figura 3.16.** Celda de medida de potencial  $\zeta$  modelo DTS1070 . A) imagen frontal de la celda donde se marca con el número uno se señala el canal donde se contiene la solución bacteriana y con el número dos se marca la posición de los electrodos de la celda. B) Imagen lateral de la celda. C) Imagen de la celda con un cierto giro.

Los experimentos se realizaron a 25 °C al menos tres veces con cultivos independientes para confirmar la reproducibilidad. Los datos expresaron como valores medios y su desviación estándar de la media. El análisis estadístico se realizó con el GraphPad InStat 3.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, Estados Unidos), utilizando el procedimiento de comparación de pares de columnas seleccionadas, prueba de Bonferroni. Todos los análisis se realizaron con un nivel de significación de  $p < 0,05$ .

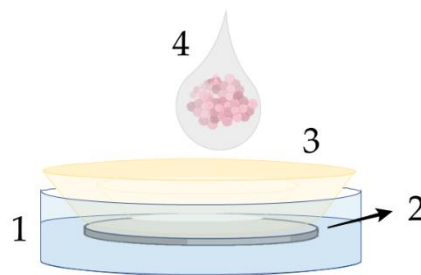
### III.2.3. Adhesión bacteriana

Los experimentos de adhesión microbiana se han realizado tanto en condiciones estáticas, como dinámicas, es decir manteniendo la muestra, y la suspensión en un recipiente estanco, o bien permitiendo que la suspensión bacteriana fluya sobre la superficie.



### III.2.3.1. Adhesión en estático

En esta técnica, las películas de PLA se fijaron a la base de una placa de poliestireno con una cinta de doble cara. Sobre cada muestra se colocaron cámaras de silicona asegurando un mismo área de contacto película-suspensión bacteriana para todas las muestras estudiadas. La figura 3.17 muestra un esquema del montaje realizado.



**Figura 3.17.** Diagrama del montaje para estudios de adhesión bacteriana con un modelo estático. En una placa Petri (1) se fija la película (2) y se coloca la cámara de silicona (3), donde se deposita la suspensión bacteriana.

Para los ensayos se utilizó una suspensión bacteriana en PBS según se describe en la *sección III.2.1.1* a la concentración de  $3 \cdot 10^8$  cfu/mL. Se depositó 1 mL de esta suspensión dentro del pocillo sobre la superficie del material. Las muestras se colocaron en un agitador orbital de 20 rpm (Heidolph Rotamax 120, Heidolph Electro GmbH and Co, Schwabach, Alemania) dentro de una estufa durante cuatro horas a 37 °C. Tras este tiempo se retiró la suspensión bacteriana, la cámara de silicona, y se sumergió la película cuidadosamente en un recipiente con PBS, de modo que la interfase formada eliminara las bacterias débilmente adheridas.

Para visualizar las bacterias adheridas y su viabilidad se usó el kit Live/Dead BacLight L-7012 (Invitrogen SA, Barcelona, España) que permite diferenciar entre bacterias viables y no viables o dañadas, preparado según las indicaciones del fabricante. El kit contiene el fluorocromo SYTO™ 9 que penetra en todas las bacterias, tiñéndolas de color verde y, el yoduro de propidio que sólo es capaz

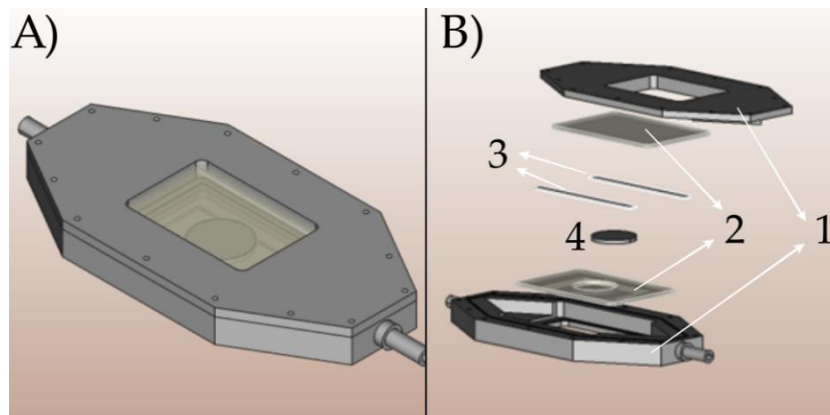
de penetrar en las bacterias con la pared dañada coloreándolas de rojo. Se depositaron 15  $\mu\text{L}$  del kit sobre la muestra, dejándolos en contacto durante 5 minutos en oscuridad. Las bacterias teñidas se observaron utilizando un microscopio de epifluorescencia Eclipse Ci (Nikon, Tokyo, Japón) con un objetivo 100x. Se capturaron imágenes de la superficie utilizando el software Leica Application Suite versión 4.7.1 (Leica Microsystems, Ginebra, Suiza), eligiéndolas posiciones de forma aleatoria. Posteriormente, se utilizó el programa NIS-Elements BR 4.10 (Nikon Instruments Inc., Melville, Estados Unidos) para cuantificar el número de bacterias adheridas, diferenciando entre las viables y las no viables en áreas marcadas de 1  $\text{cm}^2$ .

Los experimentos se realizaron por triplicado con cultivos independientes y los resultados se expresaron como valores medios junto a su error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad InStat 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, Estados Unidos), utilizando el procedimiento de comparaciones múltiples, y la prueba de Dunnett. Todos los análisis se realizaron con un nivel de significación de  $p < 0,05$ .

### III.2.3.2. Adhesión en dinámico

Para los ensayos de adhesión en dinámico se empleó una cámara de flujo laminar de placas plano paralelas, como la descrita en el trabajo de Sjollem *et al.* [34] (figura 3.18). Esta cámara posee unas dimensiones de 16 x 8 x 1,8 cm con orificios de entrada y salida de fluido. La entrada del fluido se realiza a través de una rampa que permite controlar el caudal, para que el régimen del fluido en el interior sea laminar. La cámara está compuesta por dos placas metálicas unidas con tornillos con unas ventanas en su parte central de las placas (figura 3.18 A y B). Para sellar las ventanas se utilizaron láminas de metacrilato transparente ajustadas con juntas tóricas a las placas metálicas. La lámina inferior de metacrilato se diseñó con un rebaje de 25 mm de diámetro y 2 mm de

profundidad para permitir fijar exactamente las muestras de PLA. Para hacer posible el paso del fluido entre las láminas se utilizaron separadores de teflón de 60  $\mu\text{m}$  de espesor. Gracias a este diseño fue posible observar directamente el proceso de adhesión utilizando un microscopio metalográfico invertido GX51 (Olympus, España) con un objetivo de 20x y una cámara acoplada.

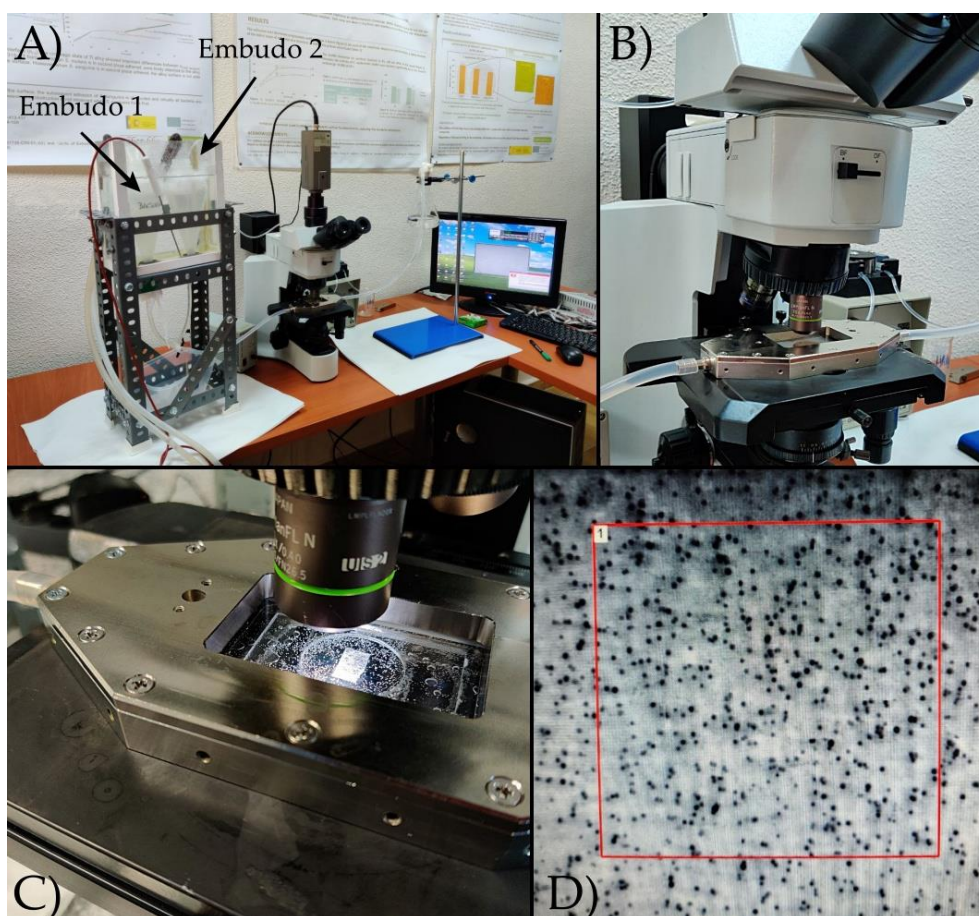


**Figura 3.18.** Modelo 3D de la cámara de flujo de placas plano paralelas. En la imagen A) Cámara cerrada. B) Esquema de la cámara donde podemos ver las partes de metal superior e inferior (1), láminas de metacrilato (2), separadores de teflón (3) y una muestra (4).

Para estos experimentos, se prepararon 250 mL de suspensión bacteriana siguiendo los pasos que se detallaron en la *sección III.2.1.1*. Antes de comenzar el experimento, se hacía circular PBS sobre la superficie durante 15 minutos a una velocidad de 2  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  utilizando una bomba peristáltica a fin de acondicionarla. Tras este tiempo, y utilizando una llave en T, se sustituyó el paso de PBS por el de la suspensión bacteriana. Para conseguir este flujo se usaron dos embudos decantadores, uno con 250 mL de PBS y otro con 250 mL de la suspensión bacteriana situados a una altura superior a la entrada de la cámara de flujo y, dentro de un baño termostatzado de agua a 37 °C (figura 3.19).

La cuantificación de la adhesión se realizó tomando imágenes durante 5 horas con la cámara de vídeo del microscopio conectada a un ordenador. Durante los primeros 10 minutos, se tomaron imágenes cada 30 segundos y, en los siguientes 10 minutos, cada 60 segundos. Además, a partir del minuto 20 se tomaron imágenes cada 5 minutos hasta completar 3 horas de experimento, donde a partir

de este tiempo y hasta la finalización del experimento, se capturaron las imágenes cada 15 minutos. Para cuantificar las bacterias adheridas a la superficie se utilizó el programa NIS-Elements BR 4.10 (Nikon Instruments Inc., Melville, Estados Unidos). Para evaluar la capacidad de retención bacteriana de la superficie, finalizadas las 5 horas de adhesión se hizo pasar una burbuja de aire por los tubos a través de la cámara de flujo. El estado resultante de la superficie se analizó de forma similar a las superficies tras la adhesión.



**Figura 3.19.** Montaje de los ensayos de adhesión en un modelo dinámico. A) Disposición de la cámara de flujo en el microscopio. B) Ventana con muestra circular de PLA. C) Imagen tomada a tiempo real de la adhesión de bacterias a la superficie. D) Montaje experimental completo.

Todas las medidas se realizaron por duplicado con cultivos independientes. Los resultados se expresaron con sus valores medios y desviaciones estándar de la media. El análisis estadístico se realizó con el paquete de software estadístico R (The R Foundation for Statistical Computing, [www.r-project.org](http://www.r-project.org)-R Core Team,

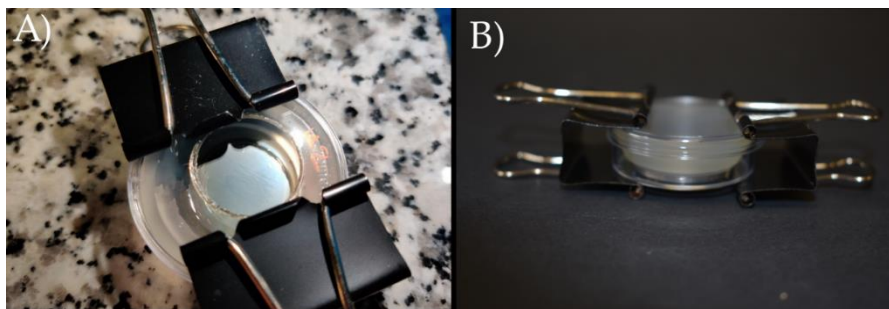
2014). Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con una prueba post-hoc de Tukey. Todos los análisis se realizaron con un nivel de significación de  $p < 0,05$ .

### III.2.4. Formación de biocapas

Los experimentos de formación de biocapas permitieron estudiar el comportamiento del proceso de colonización en condiciones más cercanas a las encontradas *in vivo*. Para ello se han evaluado biocapas cuantificando ATP y el índice de *slime* que generaba.

#### III.2.4.1. Estimación de la biocapa por cuantificación de ATP

En esta técnica hemos evaluado la formación de la biocapa a partir de la cuantificación relativa de ATP producido por la bacteria en el interior de la biocapa. Para ello, se utilizó un montaje con pocillos de silicona similar al descrito en la *sección III.2.3.1*. Al ser mayor la duración de estos ensayos que los de adhesión se utilizaron pinzas para asegurar que no hubiera fugas de la suspensión bacteriana entre el pocillo y la superficie (figura 3.20).



**Figura 3.20.** Montaje del ensayo de biocapa sobre materiales. En la foto A) se observa un ejemplo del montaje desde una perspectiva vertical y en la imagen B) desde una perspectiva lateral.

Las bacterias necesarias para estos análisis se prepararon en TSB siguiendo los pasos detallados en la *sección III.2.1.1*, sin y con ambientes enriquecidos según el modelo diabético. Para la formación de la biocapa sin acondicionamiento diabético sobre las películas de PLA se depositó 1 mL de la



suspensión bacteriana con una dilución 1/100, a partir de la suspensión bacteriana definida a una concentración del 82 % de transmitancia. Para los ensayos con enriquecimiento diabético, sobre los discos de PLA se han añadido 0,5 mL de la disolución bacteriana en TSB sin glucosa con una dilución 1/100 a partir de una solución bacteria con una transmitancia del 62 %, más 0,5 mL de TSB enriquecido con el doble de las concentraciones detallada en la *sección 2.1*.

Las muestras se incubaron durante 24 horas a 37 °C con una ligera agitación, haciendo uso de una cámara de humedad. Pasado este tiempo, las muestras se lavaron cuidadosamente dos veces con TSB estéril para eliminar las bacterias no adheridas. La cuantificación de la biocapa se llevó a cabo con el reactivo BacTiter-Glo (Promega Corporation, Madison, Estados Unidos), que permitió determinar la presencia de ATP. El reactivo se une al ATP dando una señal luminiscente cuya intensidad es proporcional a la cantidad de ATP. Concretamente, se usó 1 mL de reactivo BacTiter-Glo añadido tras los lavados a la superficie donde creció la biocapa. Después se dejó incubar 5 min en oscuridad. Posteriormente, este mililitro se pasó a placas estériles de microtitulación, de fondo plano, de poliestireno blanco estériles de 96 pocillos (Greiner bio-one, Kremsmünster, Austria). Con el lector de fluorescencia de microplacas (FLx800; Bio-Tek Instruments, Inc. Vermont, Estados Unidos) se midió la cantidad de luz emitida durante 10 min. Los experimentos se repitieron con muestras pareadas y, por triplicado con cultivos independientes.

El paquete de software estadístico R (The R Foundation for Statistical Computing, [www.r-project.org](http://www.r-project.org)-R Core Team, 2014) se utilizó para realizar los análisis estadísticos. Los datos se estudiaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con una prueba post-hoc de Tukey. Los datos se dieron como valores medios con su desviación estándar de la media. Todos los análisis se realizaron con un nivel de significación de  $p < 0,05$ .

### III.2.4.2. Estimación de la biocapa por Índice de *Slime*

Para evaluar la acción de los compuestos diabéticos añadidos al medio de cultivo en la capacidad de las bacterias para formar biocapas, hemos hecho crecer biocapas sobre una superficie estándar, como es la del poliestireno de las placas de microtitulación. La información que se obtuvo en estos ensayos permitió comparar la generación de EPS en función del crecimiento bacteriano utilizando el índice de *slime* (IS). El índice de *slime* se obtiene a partir de la relación entre la lectura de la densidad óptica tras la creación de biocapa ( $DO - biocapa$ ) y la del crecimiento bacteriano ( $DO - crecimiento$ ) dentro de los pocillos. El resultado se expresa en porcentaje respecto al control sin enriquecimiento, según la expresión (23):

$$IS = \frac{\left( \frac{DO - biocapa \text{ con suplemento}}{DO - crecimiento \text{ con suplemento}} \right)}{\left( \frac{DO - biocapa \text{ sin suplemento}}{DO - crecimiento \text{ sin suplemento}} \right)} \cdot 100 \quad (23)$$

Las bacterias se prepararon como se indicó en la **sección III.2.1.1** salvo que el volumen final de la suspensión bacteriana fueron 9,5 mL de TSB sin glucosa. Se tomaron 100  $\mu$ L de la suspensión bacteriana para inocular placas estériles de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano de poliestireno transparente (Greiner bio-one, Kremsmünster, Austria). Seguidamente, se añadieron a estas 100  $\mu$ L de TSB enriquecido con concentraciones dobles de las condiciones diabéticas indicadas en la **sección III.2.1**. La placa se incubó durante 24 horas a 37 °C con una ligera agitación. Pasado ese tiempo se midió la densidad óptica, que corresponde a la  $DO - crecimiento$ , al ser una medida del crecimiento del cultivo en función de la turbidez del medio. Las mediciones se realizaron con un espectrofotómetro de microplacas (ELx800; Bio-Tek Instruments, Inc., Vermont, Estados Unidos).

Después, los pocillos se lavaron tres veces con PBS sin y con el enriquecimiento diabético utilizado en cada caso para eliminar las bacterias no adheridas, de modo que sólo permaneció la biocapa en el pocillo. Para secar las biocapas, las placas se introdujeron en la estufa a 37 °C durante 24 horas. A continuación, para colorear las biocapas se añadió cristal violeta (Química Panreac, Barcelona, España), dentro de los pocillos. Después de 5 minutos, el exceso de colorante se eliminó enjuagando la placa con agua destilada, y se dejó secar a temperatura ambiente durante 12 horas. Tras este tiempo, se añadieron 200 µL de ácido acético glacial al 33 % (v/v) (Química Panreac., Barcelona, España) para recoger todo el tinte dentro del pocillo. La *DO – biocapa* es la medida de la densidad óptica asociada a la lectura de la turbidez con el cristal violeta a 492 nm. Los experimentos se repitieron al menos cuatro veces con cultivos independientes para confirmar la reproducibilidad.

La formación de biocapa se ha representado con sus valores medios y su desviación estándar. El análisis estadístico se realizó con el GraphPad InStat 3.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, Estados Unidos), utilizando muestras no apareadas T-student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con valores de  $p \leq 0,05$ .

#### III.2.4.3. Visualización de la biocapa

Hemos llevado a cabo experimentos de perfilometría y microscopía electrónica de barrido para visualizar la estructura y conformación de las biocapas formadas sobre poliestireno. En este caso, para poder utilizar técnicas como la microscopía electrónica de barrido fue necesario un protocolo previo para su fijación.

Las biocapas que se evaluaron se crearon siguiendo los pasos descritos en la *sección III.2.1.1* aplicando las pautas para enriquecimientos diabéticos. Después del crecimiento, se sometieron a un proceso de fijación a la superficie, necesario

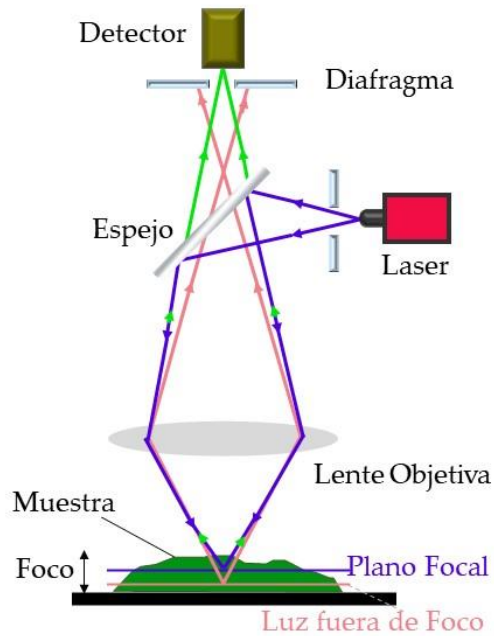


para evitar la contaminación de los equipos de medida. Para ello, las superficies con biocapa se sumergieron en glutaraldehído (PanReac-AppliChem, Barcelona, España) al 3 % durante 12-15 horas y posteriormente se lavaron suavemente con TSB durante 5 minutos. Después, pasaron por diferentes baños de etanol absoluto en agua destilada (PanReac-AppliChem, Barcelona, España) con concentraciones crecientes de 30 %, 50 %, 70 %, 90 % y 100 % durante 1 hora cada uno.

### Visualización de la biocapa por perfilometría

La perfilometría óptica es un método de caracterización topográfico no destructivo, sin contacto, que permite el análisis de superficies con una resolución lateral y vertical de hasta pocas decenas de nanómetros. El equipo de perfilometría de este trabajo permite utilizar 3 métodos de análisis superficial: interferometría, variación de foco y confocal.

Teniendo en cuenta las características de nuestros sistemas, en este trabajo hemos utilizado la metodología confocal debido a que las muestras analizadas no son muestras pulidas a espejo adecuadas para medidas por interferometría. Sin embargo, no es preciso acudir a la técnica de variación de foco al tener una topografía muy suave.



**Figura 3.21.** Esquema del sistema interno de microscopía confocal del perfilómetro. La luz procedente del láser (color morado) incide en la superficie. Las líneas de color verde que indican la luz que se refleja desde la superficie que se encuentra en el plano focal. Las líneas rosas representan la luz reflejada fuera de foco, que no puede pasar a través del orificio del diafragma hasta el detector.

La microscopía confocal es una técnica de imagen avanzada que se utiliza para analizar y caracterizar materiales. En este sistema un láser de alta intensidad se enfoca en un punto específico de la muestra y la luz reflejada se recoge mediante un sistema de espejos y lentes para formar una imagen. La existencia de un orificio del diafragma delante del detector en el microscopio permite bloquear la luz que no proviene del plano focal de interés. Esto posibilita obtener imágenes detalladas en diferentes planos focales, lo que permite la construcción de una imagen 3D. En la figura 3.21 se representa la disposición de los elementos de la microscopía confocal.

El análisis de las imágenes permite obtener distintos parámetros topográficos siguiendo las normativas ISO. Los parámetros pueden definir tanto características topográficas en la línea (2D) como en el plano (3D) de la superficie del material. Se pueden agrupar en función de las diferentes características de los elementos topográficos como su altura, la separación entre ellos en el plano u,

otros factores. En esta tesis hemos utilizado tanto el parámetro de rugosidad cuadrática media (RMS), como el parámetro de rugosidad media ( $S_a$ ) para analizar las muestras. El parámetro RMS da un valor promedio de las desviaciones de rugosidad desde la línea media a lo largo de la longitud de un perfil. En cambio, el  $S_a$  mide la media de la diferencia proveniente de la altura promedio con respecto al plano promedio.

En esta tesis se trabajó con un perfilómetro confocal Leica DCM8 (Leica, Wetzlar, Alemania), y las imágenes tomadas se analizaron con el programa LeicaMap®. Las muestras fijadas con las biocapas se colocaron en la pletina del perfilómetro y se tomaron imágenes con un área de  $60 \times 60 \mu\text{m}^2$  con el mayor aumento del equipo (objetivo 150x). Además, para determinar el apilamiento bacteriano, se utilizó el parámetro biovolumen ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) [35]–[37]. Este parámetro estructural, que se define como el volumen de biomasa dividido por el área del campo de visión del microscopio. Este parámetro da información sobre porcentaje de superficie cubierta, ya sea por las bacterias individuales o por los agregados que aparecían de la biocapa.

#### Visualización de la biocapa por microscopia electronica de barrido

Tal y como se hemos introducido en el *seccion III.1.3.3* el microscopio electrónico de barrido (SEM) es una técnica que ofrece imágenes de alta resolución de las superficies. Para analizar la distribución de la biocapa sobre poliestireno se usó el equipo ya mencionado, Quanta 3D FEG (FEI, Hillsboro, Estados Unidos). Antes de introducir las muestras con las biocapas ya fijadas en la cámara de electrones de alto vacío, se secaron al vacío y, se recubrieron con Au. Las imágenes de las biocapas se tomaron con aumentos que iban de 150x a 50000x en secciones aleatorias de las muestras. Estos ensayos fueron realizados en su totalidad en el Servicio de Caracterización de Sólidos y Superficies de los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Extremadura.

### III.3. Bibliografía

- [1] S. C. Cifuentes, R. Gavilán, M. Lieblich, R. Benavente, y J. L. González-Carrasco, "In vitro degradation of biodegradable polylactic acid/magnesium composites: Relevance of Mg particle shape," *Acta Biomater.*, (2016), 32, pp. 348–357.
- [2] G. Nicoletti, V. Boghossian, F. Gurevitch, R. Borland, y P. Morgenroth, "The antimicrobial activity in vitro of chlorhexidine, a mixture of isothiazolinones ('Kathon' CG) and cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB)," *J. Hosp. Infect.*, (1993), 23(2), pp. 87–111.
- [3] J. W. Cori Mamani, "Estudio de la microscopía electrónica de barrido para el mantenimiento predictivo de superficies metálicas en sistemas de esterilización," (2018) [Trabajo de fin de Master, Universidad Mayor de San Andrés.]. *RI-UMSA*. El Repositorio Institucional de la Universidad Mayor de San Andrés.
- [4] J. I. Goldstein, D. E. Newbury, P. Echlin, D. C. Joy, C. E. Lyman, E. Lifshin, L. Sawyer y J. R. Michael, "Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis," (2003), Tercera edición. *Springer*.
- [5] P. J. Goodhew, J. Humphreys, y J. Humphreys, "Electron Microscopy and Analysis," (2000), Tercera edición, *CRC Press*.
- [6] S. H. Crayton, D. R. Elias, A. Al Zaki, Z. Cheng, y A. Tsourkas, "ICP-MS analysis of lanthanide-doped nanoparticles as a non-radiative, multiplex approach to quantify biodistribution and blood clearance," *Biomaterials*. (2012), 33(5), pp. 1509–1519.

- [7] R. S. Houk, A. V. Fassel, G. D. Flesch, H. J. Svec, A. L. Gray, y C. E. Taylor "Inductively Coupled Argon Plasma as an Ion Source for Mass Spectrometric Determination of Trace Elements," *Anal. Chem.*,(1980), 52(14), pp. 2283–2289.
- [8] A. Rohanifar, N. Alipourasiabi, G. S. Shyam Sunder, J. G. Lawrence, Y. J. R. Kirchhoff, "Reversible chelating polymer for determination of heavy metals by dispersive micro solid-phase extraction with ICP-MS," *Microchim. Acta.* (2020), 187(6), pp. 1–10.
- [9] H. Xiao, R. Qi, S. Liu, X. Hu, T. Duan, Y. Zheng, Y. Huang, y X. Jing. "Biodegradable polymer - cisplatin(IV) conjugate as a pro-drug of cisplatin(II)," *Biomaterials.* (2011), 32(30), pp. 7732–7739.
- [10] M. E. Sánchez Lorda, "Avances en espectrometría de masas con fuente de plasma: Análisis simultáneo de elementos mayores y trazas mediante Q-ICP-MS y análisis isotópicos de Sm-Nd mediante HR-MC-ICP-MS. Aplicación en estudios geoquímicos,"(2013) [Tesis de doctorado, Universidad de País Vasco] *ADDI*. Archivo Digital para la Docencia y la Investigación de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU).
- [11] C. J. van Oss, R. J. Good, y M. K. Chaudhury, "Additive and nonadditive surface tension components and the interpretation of contact angles," *Langmuir.* (1988), 4(4), pp. 884–891.
- [12] C. J. van Oss, M. K. Chaudhury, y R. J. Good, "Monopolar surfaces," *Adv. Colloid Interface Sci.*,(1987), 28, pp. 35–64.
- [13] C. J. Van Oss, L. Ju, M. K. Chaudhury, y R. J. Good, "Estimation of the polar parameters of the surface tension of liquids by contact angle measurements on gels," *J. Colloid Interface Sci.*,(1989), 128(2), pp. 313–319.

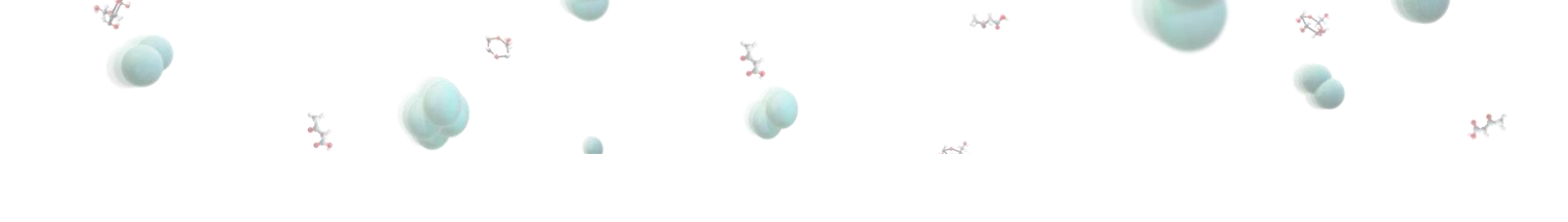
- [14] C. J. van Oss, "Hydrophobicity and hydrophilicity of biosurfaces," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, (1997), 2( 5), pp. 503–512.
- [15] D. K. Owens, y R. C. Wendt, "Estimation of the surface free energy of polymers," *J. Appl. Polym. Sci.*, (1969), 13(8), pp. 1741–1747.
- [16] M. A. Pacha-Olivenza, A. M. Gallardo-Moreno, A. Méndez-Vilas, J. M. Bruque, J. L. González-Carrasco, y M. L. González-Martín, "Effect of UV irradiation on the surface Gibbs energy of Ti6Al4V and thermally oxidized Ti6Al4V," *J. Colloid Interface Sci.*, (2008), 320(1), pp. 117–124.
- [17] B. Gieroba, A. Sroka-Bartnicka, P. Kazimierzak, G. Kalisz, I. S. Pieta, R. Nowakowski, M. Pisarek, y A. Przekora, "Effect of Gelation Temperature on the Molecular Structure and Physicochemical Properties of the Curdlan Matrix: Spectroscopic and Microscopic Analyses," *Int. J. Mol. Sci.* (2020), 21(17), pp. 1–18.
- [18] K. Chen, C. Zhou, H. Liu, y Y. Wang, "Physical aging-induced embrittlement of PLA/PBAT blends probed by tensile test and AFM nanomechanical mapping," *Mater. Lett.*, (2022), 326, pp. 132938.
- [19] E. Rodríguez-Alba, N. Dionisio, M. Pérez-Calixto, L. Huerta, L. García-Uriostequi, M. Hautefeuille, G. Vázquez-Victorio, y G. Burillo, "Surface modification of polyethyleneterephthalate film with primary amines using gamma radiation and aminolysis reaction for cell adhesion studies," *Radiat. Phys. Chem.* (2020), 176, pp. 109070.
- [20] B. Singh y Rohit, "Tailoring and evaluating poly(vinyl sulfonic acid)-sterculia gum network hydrogel for biomedical applications," *Materialia*, (2022), 25, pp. 101524.

- [21] E. Ozkazanc, B. Yegin, N. C. Güven, D. K. Er, y H. Ozkazanc, "Multifunctional P(Py/NMPy) copolymer doped by DBSA for electronic, photoelectric and biomedical applications," *Synth. Met.* (2022), 288, pp. 117118.
- [22] A. D. Association, "2. Classification and Diagnosis of Diabetes," *Diabetes Care.* (2016), 39(1), pp. S13–S22.
- [23] U. Dashora, A. Gallagher, K. Dhatariya, P. Winocour, y R. Gregory, "Association of British Clinical Diabetologists (ABCD) and Diabetes UK joint position statement and recommendations for non-diabetes specialists on the use of sodium glucose co-transporter 2 inhibitors in people with type 2 diabetes," *Br. J. Diabetes Vasc. Dis.* (2016), 16(4), pp. 206–209.
- [24] J. Brooke, M. Stiell, y O. Ojo, "Evaluation of the Accuracy of Capillary Hydroxybutyrate Measurement Compared with Other Measurements in the Diagnosis of Diabetic Ketoacidosis: A Systematic Review," *Int. J. Environ. Res. Public Health.* (2016), 13(9), pp. 837.
- [25] J. M. Ekoé y P. Zimmet. "Diagnosis and Classification". En J. M. Ekoé, M. Rewers, R. Williams y P. Zimmet (Eds.). *The Epidemiology of Diabetes Mellitus.*(2008), pp. 11–30, Wiley.
- [26] P. Ezkurra-Loiola, "Guía de actualización en diabetes mellitus tipo 2," (2016), Fundación.
- [27] F. F. Ferri, "Ferri's clinical advisor 2021,"(2021), *Elsevier*, pp. 2123.
- [28] Y.-s. Xu, L.-h. Ye, Y.-c- Huang, Y.-j. Lei, y L. Zhang, "Effect of high-concentration glucose on biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* on the surface of biomaterials," *Chinese J. Tissue Eng. Res.*(2010), 14(51), pp. 9609.

- [29] Y.-s. Xu, X. Wang, Y.-m. Xu, Y.-j. Lei, M. He, y Y.-c- Huang, "Effect of glucose on eliminating activity and adhesion of *Staphylococcus epidermidis* in *Tupaia belangeri*," *Chinese J. Tissue Eng. Res.*,(2011), 15(51), pp. 9570.
- [30] M. Fernandes-Gomes, J. B. Amorim, L. C. Giannas, y M. A. Castillo-Salgado, "Biomaterials for Tissue Engineering Applications in Diabetes Mellitus". En L. A. Dobrzański, (Ed). *Biomaterials in Regenerative Medicine*, InTech, 2018, pp. 409–435.
- [31] S. Battista, M.A. Maggi, P. Bellio, L. Galantini, A.A. D'Archivio, G. Celenza, R. Colaiezzi y L. Giansant, "Curcuminoids-loaded liposomes: influence of lipid composition on their physicochemical properties and efficacy as delivery systems," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* (2020), 597, pp. 124759.
- [32] M. Rosenberg, D. Gutnick, and E. Rosenberg, "Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity," *FEMS Microbiol. Lett.* (1980), 9(1), pp. 29–33.
- [33] A. M. Gallardo Moreno, "Estudio de los parámetros físico-químicos en el proceso de adhesión de microorganismos a biomateriales. Influencia de factores externos," (2002)., [Tesis de doctorado, Universidad de Extremadura]. *Dehesa*. Repositorio Institucional de la Universidad de Extremadura.
- [34] J. Sjollema, H. J. Busscher, y A. H. Weerkamp, "Real-time enumeration of adhering microorganisms in a parallel plate flow cell using automated image analysis," *J. Microbiol. Methods.* (1989), 9(2), pp. 73–78.



- [35] K K. Henriksen, N. Rørbo, M. L. Rybtke, M. G. Martinet, T. Tolker-Nielsen, N. Høiby, M. Middelboe, y O. Ciofu, "P. aeruginosa flow-cell biofilms are enhanced by repeated phage treatments but can be eradicated by phage–ciprofloxacin combination—monitoring the phage–P. aeruginosa biofilms interactions," *Pathog. Dis.* (2019), 77(2).
- [36] B. H. D. Panariello, M. I. Klein, A. C. Pavarina, y S. Duarte, "Inactivation of genes TEC1 and EFG1 in *Candida albicans* influences extracellular matrix composition and biofilm morphology," *J Oral Microbiol.*, (2017), 9(1), pp. 1385372.
- [37] C. Rodríguez-Melcón, C. Alonso-Calleja, y R. Capita, "Architecture and Viability of the Biofilms Formed by Nine *Listeria* Strains on Various Hydrophobic and Hydrophilic Materials," *Appl. Sci.* (2019), 9(23), pp. 5256.



«La comprensión es una calle de doble sentido »  
(Eleanor Roosevelt)

# Capítulo IV. Resultados y Discusión

## IV. Resultados y Discusión

En este capítulo se presentan conjuntamente los resultados y la discusión de los estudios realizados durante esta tesis. En ella hemos estudiado el efecto del enriquecimiento del PLA en su respuesta antibacteriana y en su degradación. Asimismo, hemos analizado las consecuencias de un enriquecimiento con entornos diabéticos sobre la superficie de los microorganismos y su capacidad de colonización del PLA.

### IV.1. Películas de ácido poliláctico enriquecidas

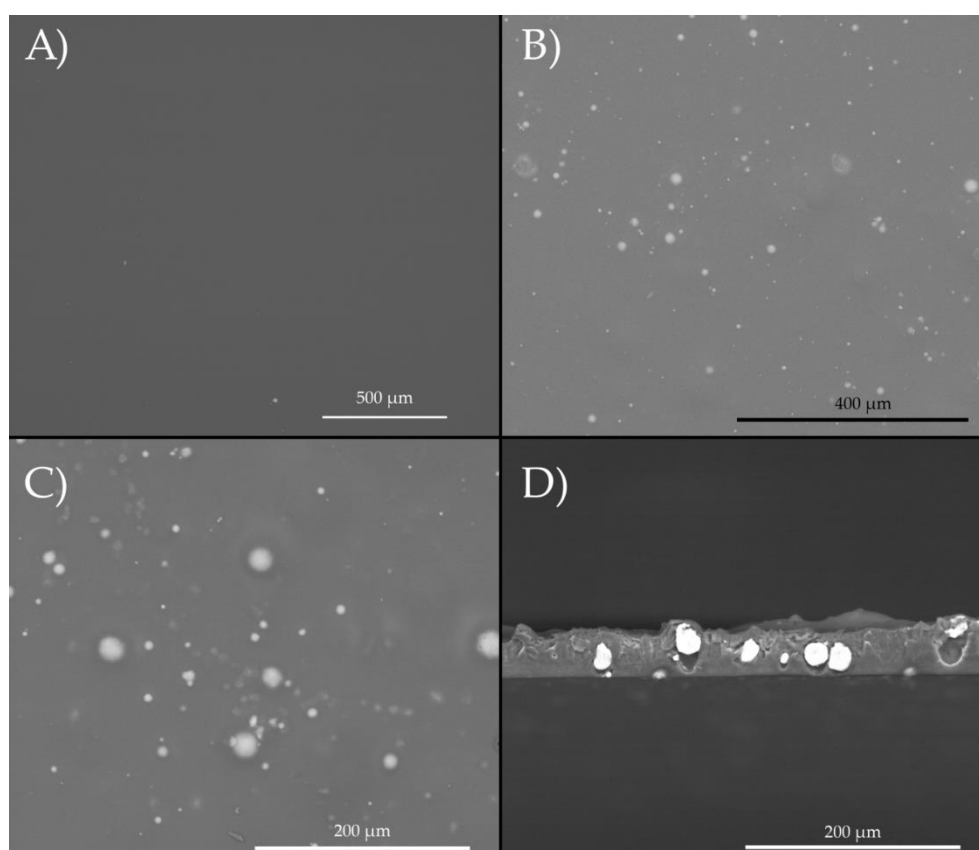
En primer lugar, el estudio se enfocó en el efecto del enriquecimiento con Mg de películas de PLA sobre sus características superficiales y antibacterianas. Posteriormente se consideró también la inclusión del CTAB en la película, y las consecuencias de la degradación del material en un medio fisiológico, relacionándolas con alteraciones superficiales de las películas de PLA y los procesos de colonización bacteriana.

#### IV.1.1. Películas de ácidos poliláctico enriquecidas con magnesio

En primer lugar, se caracterizaron películas de PLA enriquecidas con 10 % (p/p) de Mg y de PLA sin magnesio, que fue considerada como control. Las muestras se degradaron en PBS durante cuatro horas, la misma duración que la de los estudios de adhesión bacteriana, se puede ver de forma detallada en la *sección III.1.2*

#### IV.1.1.1. Caracterización superficial de películas de ácido poliláctico enriquecidas con magnesio

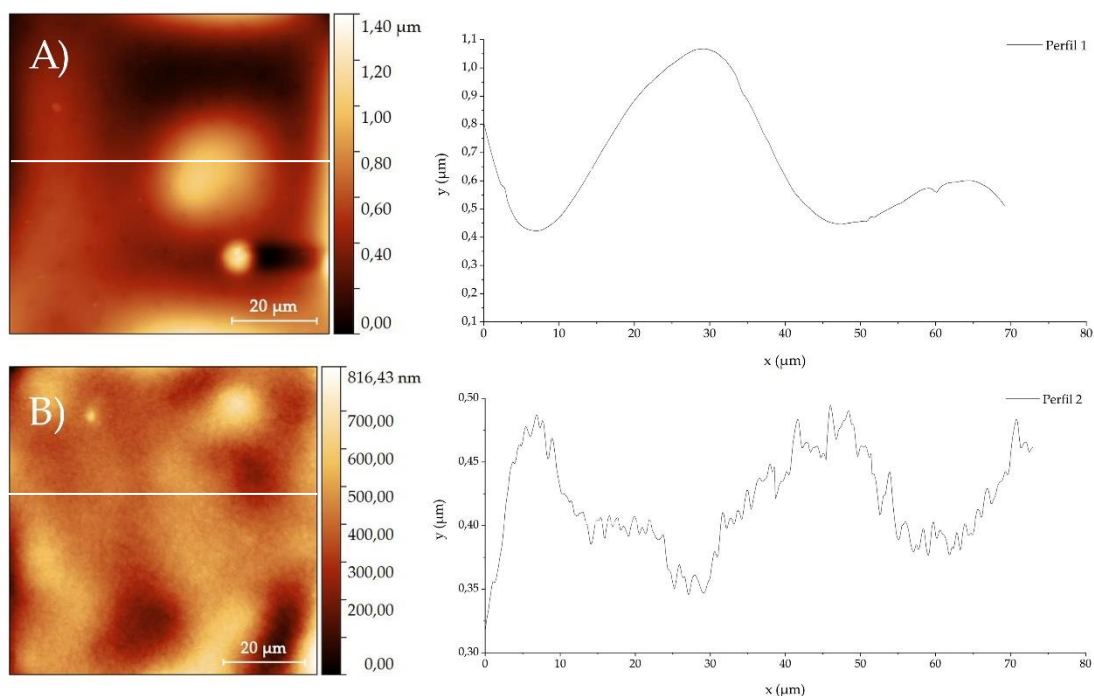
La figura 4.1 muestra la distribución de las partículas de Mg en el interior de las películas sin degradar de PLA y PLA10Mg. Mediante la microscopía de electrones retrodispersados (BSED) se tomaron imágenes de la superficie y de la sección transversal de las películas de PLA. En general, las partículas se encontraron bien dispersas, a pesar de observarse algunos agregados. También se encontraron partículas en la zona más externa de la película deformando la superficie, aun así, la imagen mostró que las partículas de Mg continuaban embebidas en polímero. Además, en las imágenes de las secciones transversales se observó un espesor comprendido entre 40 y 50  $\mu\text{m}$  para el PLA10Mg.



**Figura 4.1.** BSED de las superficies de PLA. A) Imagen de una película de PLA .B y C) Imagen de una película de PLA10Mg. D) Sección transversal de una película de PLA10Mg. Diferentes colores indican diferentes números atómicos. En este caso, los puntos blancos están relacionados con las partículas de Mg y el fondo gris con el polímero.

En el análisis de la topografía realizado con AFM, se encontró un aumento de rugosidad media (RMS) por la adición del Mg. Los valores de rugosidad media fueron  $45 \pm 12$  nm y  $12 \pm 5$  nm para las películas PLA10Mg y PLA, respectivamente. Este fue consecuencia de las protuberancias generadas por la presencia de las partículas de Mg en la matriz (figura 4.2). Este resultado concuerda con lo observado en las imágenes de BSED. Es interesante señalar que la rugosidad de la superficie entre las protuberancias de Mg, dio valores iguales a los encontrados en el PLA control, teniendo un perfil de alturas con valores máximos no superiores a  $0,16 \mu\text{m}$ , mientras que en las zonas con partículas se determinaron alturas de hasta  $0,64 \mu\text{m}$ .

En el caso de las películas de PLA degradadas, el RMS aumentó hasta casi tres veces en relación a las películas sin degradar ( $32 \pm 9$  nm frente a  $12 \pm 5$  nm). Este resultado confirmó que cuatro horas es un tiempo suficiente para iniciar la degradación de la superficie.



**Figura 4.2.** Imágenes topográficas de AFM y un perfil representativo (línea blanca en las imágenes topográficas) de las películas de PLA sin degradar. A) Muestra PLA10Mg. B) Muestra PLA. Como puede verse en la escala, los diferentes colores representan diferentes alturas: los colores oscuros indican huecos y los más claros indican zonas más altas.

Continuando con la caracterización superficial, se evaluó la hidrofobicidad de las películas y su tensión superficial a través de las medidas de ángulo de contacto. En la tabla 4.1, se muestran los ángulos obtenidos. En el caso de los líquidos polares, agua ( $\theta_A$ ) y formamida ( $\theta_F$ ), se obtuvieron en ambos tipos de películas valores de ángulos iguales dentro del error experimental. En relación con el diiodometano, el valor de sus ángulos de contacto fue ligeramente menor en el PLA10Mg respecto al PLA control. El ángulo de contacto del agua ( $\theta_A$ ) obtenido fue superior a los que habitualmente se encuentran en la bibliografía [1], [2] aunque, los valores en esta tesis fueron similares a los medidos por Onder *et al.* [3]. Estos autores referenciaron un ángulo de contacto del agua de  $109,1^\circ$ , que asociaron a la retención de aire dentro de microporos superficiales de sus muestras de PLA. No obstante, en las superficies de esta tesis, las imágenes de SEM no mostraron la existencia de estos microporos y, por tanto, no se puede asociar la alta hidrofobicidad observada a posibles bolsas de aire. Otro factor que puede influenciar la hidrofobicidad del PLA es la cristalinidad. Li *et al.* [4] midieron un aumento de la hidrofobicidad del PLA con cristalinidad, como consecuencia de la orientación de los grupos metilo en su superficie. Estos autores obtuvieron ángulos de contacto de agua de  $78,1^\circ$  y de  $107,5^\circ$  antes y después de orientar estos grupos, respectivamente. Sin embargo, otros factores que influyen en la orientación superficial son el proceso de fabricación y el espesor de la película [5], [6]. Por ello, el método de fabricación podría afectar a la disposición y conformación de las cadenas poliméricas dentro de la misma fase cristalina, lo que determinaría la orientación de los grupos funcionales más expuestos a la superficie, influenciando así la hidrofobicidad.

En la tabla 4.1 se incluye la tensión superficial total ( $\gamma^{TOT}$ ) y sus componentes Lifshitz-van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ) y ácido-base ( $\gamma^{AB}$ ) calculadas según la ecuación (10) para ambas películas sin y con degradación. Las componentes de la tensión superficial,  $\gamma^{LW}$  y  $\gamma^{AB}$ , resultaron ligeramente mayores en las películas sin

degradar con magnesio. Debido a la baja polaridad que mostraron las superficies sin degradar,  $\gamma^{TOT}$  fue solo levemente superior que la  $\gamma^{LW}$ .

**Tabla 4.1.** Valores de la hidrofobicidad y la tensión superficial a través de las medidas de ángulo de contacto de las películas PLA10Mg y PLA sin y con cuatro horas de degradación. Se presentan los ángulos de contacto ( $\theta_A$ : agua,  $\theta_F$ : formamida,  $\theta_D$ : diiodometano). También están presentes la tensión superficial ( $\gamma^{TOT}$ ), las componentes ( $\gamma^{LW}$ : Lifshitz-van der Waals,  $\gamma^{AB}$ : ácido-base) y la energía libre superficial de interacción de las superficies sumergidas en agua ( $\Delta G_{SAS}$ ).

Películas	Sin Degradación		Con Degradación	
	PLA	PLA10Mg	PLA	PLA10Mg
$\theta_A(^{\circ})$	106 ± 2	106 ± 1	98 ± 4	97 ± 4
$\theta_F(^{\circ})$	90 ± 4	88 ± 1	89 ± 4	86 ± 4
$\theta_D(^{\circ})$	66 ± 2	58 ± 3	64 ± 2	63 ± 7
$\gamma^{TOT}(\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2})$	25 ± 2	30 ± 3	27 ± 3	28 ± 4
$\gamma^{LW}(\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2})$	24 ± 1	28 ± 2	24 ± 2	25 ± 3
$\gamma^{AB}(\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2})$	1,2 ± 1,0	1,9 ± 0,6	3,4 ± 2,3	2,9 ± 2,5
$\Delta G_{SAS}(\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2})$	-70 ± 10	-67 ± 5	-46 ± 15	-48 ± 14

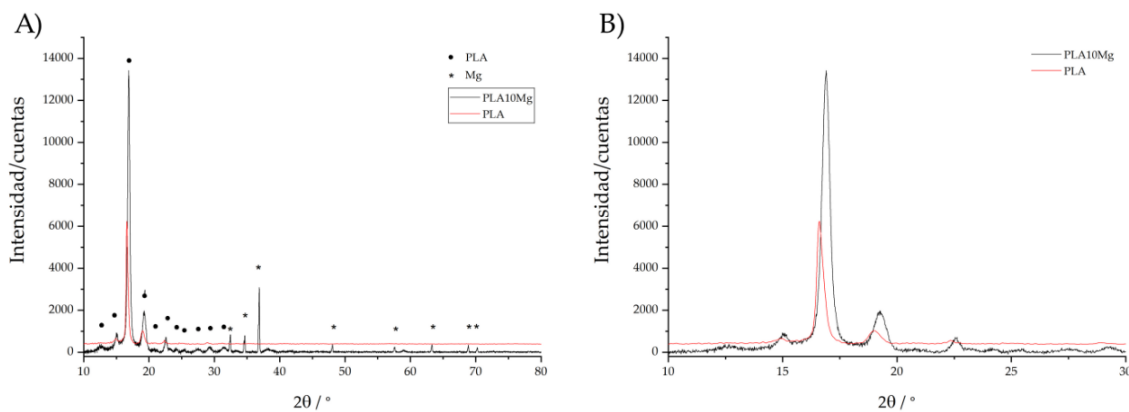
En las películas degradadas no se observaron diferencias entre los ángulos de contacto dentro de la incertidumbre experimental para las dos superficies de PLA (tabla 4.1). El ángulo de contacto con el agua disminuyó ligeramente respecto al de las superficies sin degradar, pero no se obtuvieron cambios significativos en los ángulos de la formamida o del diiodometano.

Una cuantificación de la hidrofobicidad del material se puede obtener a través de la energía libre de interacción de dos superficies del material inmersas en agua ( $\Delta G_{SAS}$ ) [7]. Un valor de  $\Delta G_{SAS}$  negativo representa que la interacción entre superficies se ve favorecida frente a la interacción de las superficies con el agua [8]. El valor de  $\Delta G_{SAS}$  calculado según la ecuación (11) del *capítulo III*, fue el mismo para ambas superficies. Esto está de acuerdo con que el valor  $\theta_A$  fuera similar en ambos casos.



#### IV. Resultados y Discusión

El potencial zeta ( $\zeta$ ) proporciona información de las propiedades eléctricas superficiales de las películas. Utilizando la aproximación de Helmholtz-Smoluchowski, los valores determinados para las películas sin degradar fueron  $-26,0 \pm 0,6$  mV para PLA10Mg y  $-35 \pm 3$  mV para PLA, es decir, un potencial eléctrico de interacción más positivo en el PLA10Mg que en el PLA sin enriquecimiento. Kolska *et al.* [9], obtuvieron un valor del potencial para PLA levemente superior en valor absoluto ( $-47,5 \pm 3$  mV a pH 7) al que se obtuvo en las películas de esta tesis. Sin embargo, Bastekova *et al.* [10] generaron películas cargada negativamente de manera notable con un ángulo de contacto de agua de  $74,5 \pm 5,8^\circ$ , y un valor de potencial zeta de  $-67,2 \pm 5,0$  mV, a pH 6,5. Estas diferencias en el potencial zeta están posiblemente debidas a los distintos métodos de preparación. Por otro lado, el potencial zeta menos negativo de las películas de PLA10Mg puede estar relacionado con la liberación de cationes  $Mg^{2+}$  al medio circundante durante el mismo proceso de medición. Los iones positivos liberados de magnesio pueden quedar retenidos dentro de la doble capa del material, disminuyendo el valor medido de potencial zeta.



**Figura 4.3.** Difractograma de rayos X de películas PLA10Mg (línea negra) y PLA (línea roja). A) Resultado del análisis completo con picos asignados para el polímero y para las partículas de Mg. B) Zoom de la gráfica en zona de los picos indicados en el texto.

Como ya hemos introducido, la cristalinidad influye en gran medida en la capacidad de degradación del PLA. Por este motivo, estudiar si la cristalinidad de las películas sufrió modificaciones al enriquecer con magnesio la matriz es

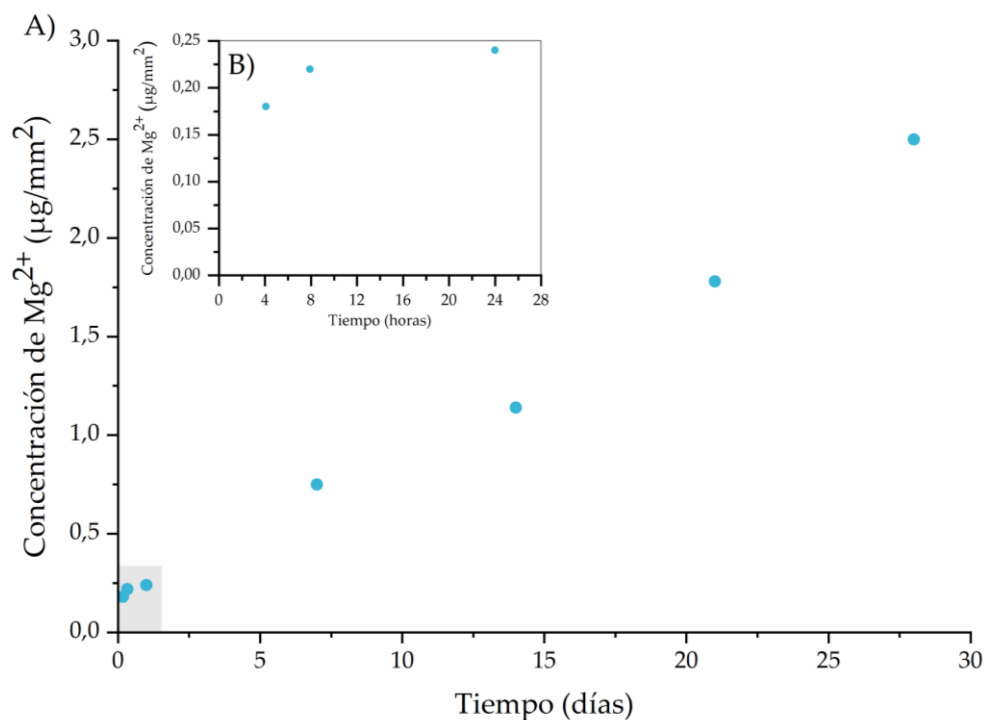
importante. La difracción de rayos X (XDR) sobre ambas películas detectó picos bien definidos (figura 4.3), lo que se indica la presencia de microcristalinidad en las dos superficies (figura 4.3). Además, el que los picos en ambas superficies sean similares pone de manifiesto que la introducción de Mg no modifica el carácter cristalino del PLA, en la misma línea que ocurrió con los resultados de potencial zeta y ángulo de contacto. En ambas superficies se advirtieron picos a  $14,4^\circ$  y  $22,5^\circ$ , los cuales son característicos de la fase cristalina  $\alpha$ , descartando así las otras fases cristalinas. El difractograma del PLA control mostró dos picos a  $16,6^\circ$  y  $19,0^\circ$ , que en el caso de las muestras de PLA10Mg se posicionaron ligeramente desplazados a  $16,9^\circ$  y  $19,2^\circ$ . Este desplazamiento puede ser debido a la distorsión de la cadena polimérica, a causa a la introducción del Mg. Sin embargo, esta no fue suficiente para modificar la cristalinidad, aunque sí afectó al empaquetamiento y al espaciado entre cadenas. La distorsión pudo producir un cierto cambio de ordenación del polímero, aumentando ligeramente el número de grupos metilo apolares expuestos en su superficie, lo que se reflejó en un mayor  $\theta_D$  en el PLA10Mg respecto al PLA. A la vista de estos resultados, se puede afirmar que la influencia del magnesio en las propiedades superficiales del PLA es sutil y varía dependiendo de las características que se analicen.

Un comportamiento significativamente diferente entre ambas películas se observó al exponerlas con un medio acuso, como el medio de degradación. Se observó la aparición de burbujas cerca de la superficie y la pérdida de color grisáceo en las películas con Mg, indicando la liberación de Mg al medio. Para cuantificar el Mg liberado de las películas en el medio de degradación, en este caso PBS, se analizaron mediante la espectrometría de masas los sobrenadantes que estuvieron en contacto con las películas de PLA10Mg a diferentes tiempos durante un mes según el procedimiento detallado en la *sección III.1.2*. Los resultados (figura 4.4) mostraron que durante de las primeras cuatro horas de inmersión de las películas en PBS, la liberación de  $Mg^{2+}$  fue muy rápida. Después

#### IV. Resultados y Discusión

de este tiempo, la liberación progresó de forma lineal con una tasa de liberación de  $0,080 \pm 0,003 \mu\text{g}/(\text{mm}^2 \cdot \text{día})$ .

Consecuencia de la liberación de iones de magnesio al medio PBS, al ser rico en sales de fosfato, fue la formación de una capa de fosfato de magnesio insoluble sobre la superficie de las películas.

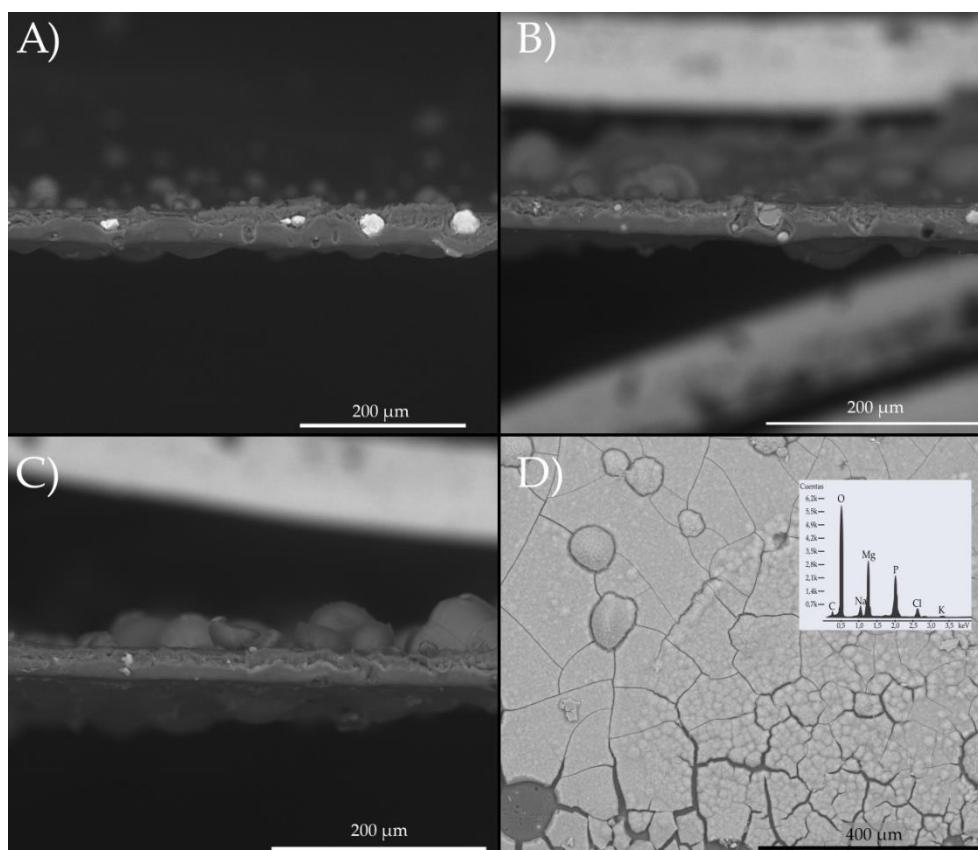


**Figura 4.4.** Seguimiento de la liberación de  $\text{Mg}^{2+}$  desde las películas de PLA10Mg hasta el medio PBS. A) Cinética de liberación a lo largo de un mes. B) Enfoque de los primeros tiempos de liberación.

Para observar la formación progresiva de esta capa de fosfatos depositada sobre PLA10Mg se tomaron imágenes de SEM de las secciones transversales de las películas después de 7, 14, 21 y 28 días de inmersión (figura 4.5.). Para confirmar la composición de la capa depositada se realizó un EDX sobre la muestra inmersa durante 28 días (figura 4.5D).

La deposición de sales sobre el PLA sumergido en distintos medios ha sido observada también por otros autores [11], [12].. Zhang y Ma [13] describieron la formación de apatita sobre PLA incubado en líquido corporal simulado (SBF). La hidrólisis del PLA en ese medio generó grupos ácidos carboxílicos que

proporcionaron una mayor carga negativa a la superficie y, por tanto, favorecieron la unión de los iones de calcio mediante fuerzas electrostáticas y enlaces de hidrógeno. Li *et al.* [14] obtuvieron precipitados similares a los obtenidos en esta tesis, sobre muestras sometidas a ensayos de compresión dinámica en probetas de PLA reforzadas con hilos de magnesio.



**Figura 4.5.** Imágenes de SEM de secciones transversales de películas de PLA10Mg tras diferentes tiempos de degradación. A) 7 días de degradación; B) 14 días de degradación; C) 21 días de degradación; D) 28 días de degradación, se incluye el espectro EDX hecho en esta superficie.

El fosfato de magnesio (MP) tiene propiedades relevantes como la biocompatibilidad, la biodegradabilidad y la bioactividad [15]–[18]. Además, esta capa depositada puede proporcionar una protección eficaz contra la degradación del Mg y del polímero. Adicionalmente, este depósito disminuyó la hidrofobicidad inicial de las películas de PLA10Mg, como se observó al medir al ángulo de contacto de agua. El ángulo obtenido fue de  $71 \pm 20^\circ$ . Hay que señalar que la gran incertidumbre experimental de estas medidas se debió a las

irregularidades en la capa superficial que no cubría uniformemente la superficie de la película.

#### IV.1.1.2. Colonización bacteriana sobre películas de ácido poliláctico enriquecidas con magnesio

Las infecciones, como ya hemos mencionado, son uno de los principales procesos que pueden comprometer los dispositivos implantados. En la mayoría de los casos, la contaminación bacteriana se produce en el momento de la cirugía. Aun así, las bacterias tardan unas horas en adherirse a la superficie y comenzar a formar una biocapa. En consecuencia, cualquier material degradable debería resistir la colonización bacteriana cuando la degradación aún no ha comenzado, o después de un corto período de tiempo tras su inicio.

Para simular estas situaciones se diseñaron experimentos de adhesión con la bacteria *S. epidermidis*. En ellos la bacteria suspendida en PBS estuvo en contacto durante cuatro horas a 37 °C con las superficies de las películas de PLA y PLA10Mg sin y con la degradación previa de 4 horas. Después del tiempo de contacto se cuantificó la densidad de bacterias adheridas, observándose también su viabilidad. Los resultados de ambos experimentos se muestran en la tabla 4.2.

**Tabla 4.2.** Densidad de bacterias adheridas a las superficies, viabilidad de las bacterias adheridas, concentración de Mg<sup>2+</sup> y pH de las películas de PLA y PLA10Mg con y sin degradación.

Películas		Densidad Bacteriana (10 <sup>4</sup> ·bacteria/cm <sup>2</sup> )	Viabilidad (%)	[Mg <sup>2+</sup> ] (ppm)	pH
Sin Degradación	PLA	129 ± 1	100	-	6,61 ± 0,01
	PLA10Mg	110 ± 2	0	14,33 ± 0,92	6,77 ± 0,02
Con Degradación	PLA	120 ± 5	100	-	6,60 ± 0,01
	PLA10Mg	138 ± 2	0	14,79 ± 0,54	6,77 ± 0,01

La adhesión de *S. epidermidis* en las películas sin degradar fue ligeramente inferior en PLA10Mg que en PLA (valor p<0,05, según la prueba de Wilcoxon). En cambio, en las películas degradadas se produjo la tendencia opuesta, donde

se cuantificaron más bacterias adheridas en el PLA sin magnesio que con 10 % (p/p) de Mg (valor  $p < 0,05$ , según la prueba de Wilcoxon). En relación con la viabilidad, se produjeron enormes cambios en ella al comparar las películas sin y con partículas de Mg. En las películas de PLA10Mg con y sin degradación, destacó que todas las bacterias adheridas en la superficie aparecieron dañadas tras el experimento de adhesión (valor  $p < 0,05$  en ambas comparaciones: películas con y sin degradación, según la prueba de Wilcoxon).

Los materiales a base de magnesio tienen características bacteriostáticas y bactericidas [19]–[24]. Los mecanismos que subyacen a estas se relacionan con la acción conjunta sobre las bacterias de los iones de magnesio, y la modificación del pH del medio circundante, especialmente en una zona cercana a la superficie. Para evaluar estos factores, se midió el pH y la concentración de iones  $Mg^{2+}$  liberados en el PBS utilizado en el proceso de degradación de 4 horas (tabla 4.2). El análisis mostró un aumento de 0,13 del pH original (pH 6,64) a pesar de la densidad de iones  $Mg^{2+}$  en el medio. El pequeño cambio en el pH pudo deberse a la formación de fosfatos de Mg, poco solubles en medios acuosos, que se depositaron sobre la superficie. Esto mostró el importante papel que la matriz polimérica juega en el control de la corrosión de las partículas de Mg, dificultando la alcalinización del medio. Además de que los precipitados parecieron disminuir la hidrofobicidad. Algunos autores afirman que la hidrofobicidad de la superficie del material juega un papel más importante en la adhesión bacteriana que la hidrofobicidad de la superficie microbiana [25]. Aunque las películas de PLA y PLA10Mg exhibieron valores similares de hidrofobicidad antes y después de la degradación, siendo de alrededor de  $-68 \pm 4 \text{ mJ}\cdot\text{m}^{-2}$  antes de la degradación y de alrededor de  $-47 \pm 1 \text{ mJ}\cdot\text{m}^{-2}$  después, mostrando la adhesión bacteriana un comportamiento opuesto. Es decir, en el PLA sin degradar, la presencia de Mg ocasionó una disminución de la adhesión, pero en el PLA degradado, la adhesión aumentó en la presencia de Mg.

#### IV. Resultados y Discusión

La adhesión bacteriana es el resultado de la acción conjunta de diferentes factores donde es difícil definir *a priori*, el impacto de las fuerzas hidrofóbicas o eléctricas. Como ya hemos sugerido, los cationes  $Mg^{2+}$  liberados y atrapados en la interfase de PLA10Mg, después de la degradación, favorecerían el acercamiento electrostático y la posterior adhesión de las células bacterianas cargadas negativamente [26], lo que justificó el aumento del  $25,4 \pm 0,1$  % en la densidad bacteriana en el PLA10Mg tras la degradación (tabla 4.2).

### IV.1.2. Películas de ácido poliláctico enriquecidas con magnesio y CTAB

El siguiente paso en esta investigación fue enriquecer con un tensioactivo la matriz de PLA. Este compuesto fue introducido debido a que modifica la mojabilidad de los polímeros [27]. La elección del tensioactivo CTAB, permitió, además, mejorar la matriz de dos modos: mediante la distribución de las partículas de Mg y con la introducción de un compuesto bactericida adicional.

En el apartado anterior donde se utilizó un PLA enriquecido con 10 % (p/p) de Mg se observó una buena capacidad bactericida del material. Para poder distinguir la contribución de CTAB en la respuesta antibacteriana en presencia del magnesio, se modificó la concentración de este. Por ello se usó el 3 % (p/p) de Mg para la fabricación de las películas con presencia de CTAB, ya que después de algunas pruebas fue la concentración máxima a la cual la viabilidad bacteriana no se vio influida de forma significativa.

En estudios previos del grupo de investigación [28] se evaluaron las características de estas películas recién fabricadas, donde se encuentra magnesio y CTAB en la matriz de PLA. La relevancia de estos resultados hizo interesante profundizar en el comportamiento de estas películas, tanto frente a la respuesta bactericida como a su degradación en medios fisiológicos. Por ello, en esta sección se presentan los resultados de la caracterización de las películas tras la degradación en comparación con los resultados previos [28], sin degradación. Además, se analizó la respuesta antibacteriana de las películas antes y después de la degradación. La nomenclatura de estas películas se detalló en la *sección III.1.*

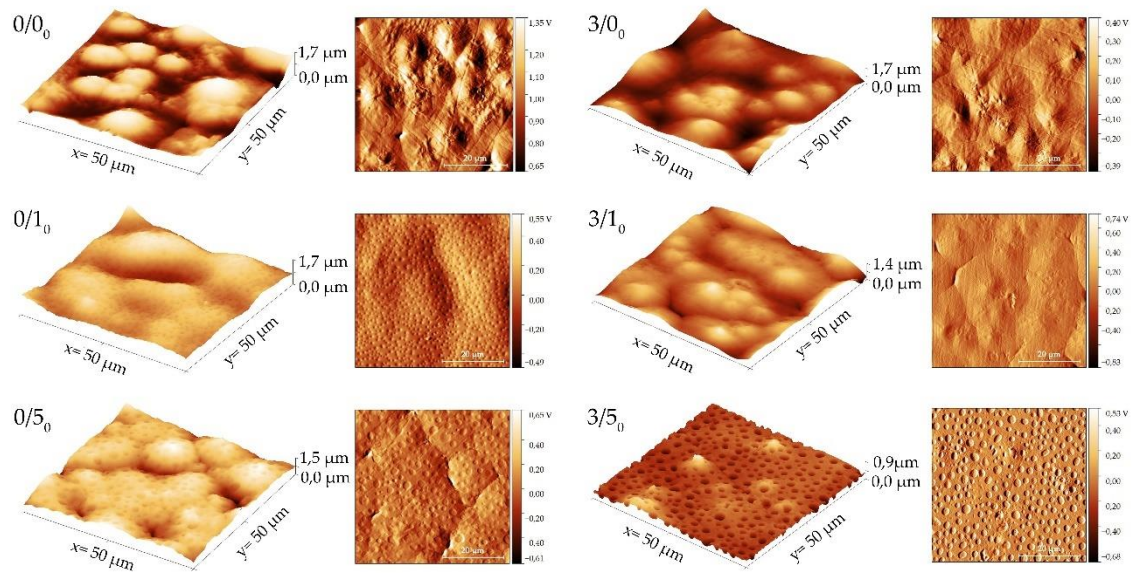


#### IV.1.2.1. Caracterización superficial de películas de ácido poliláctico enriquecidas con magnesio y CTAB

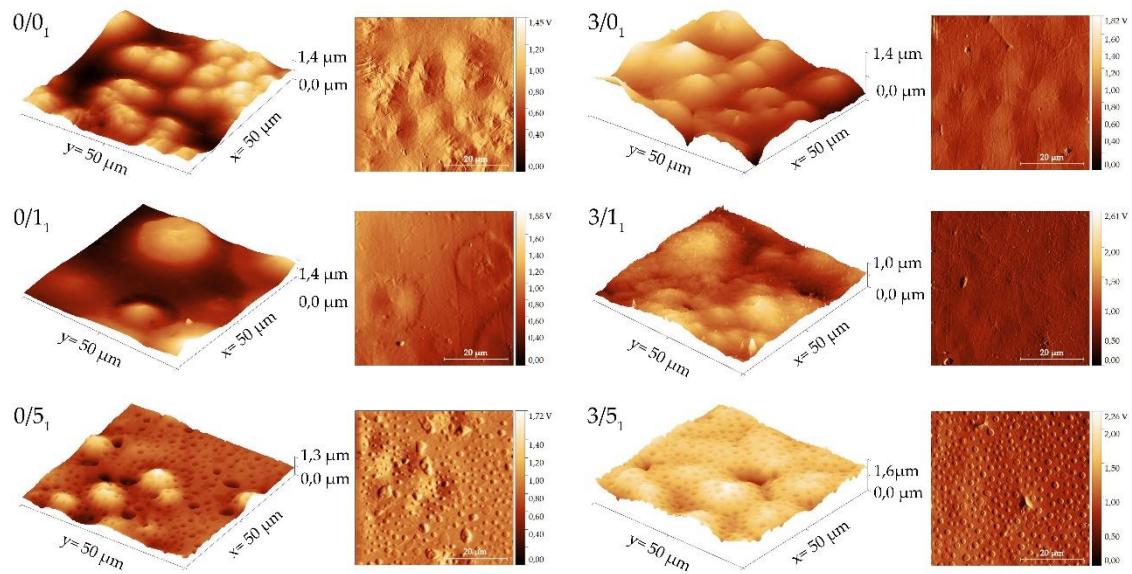
En el análisis de las imágenes de AFM que se hizo de las películas de PLA sin degradar con 3 % (p/p) de Mg se observó una topografía similar a la de las muestras con un enriquecimiento del 10 % (p/p) de Mg, excepto por la presencia de las protuberancias asociadas a las partículas de magnesio próximas a la superficie de las películas con más concentración del metal.

En el estudio que se realizó en las películas de PLA con CTAB se observó que durante el proceso de secado de las muestras se segregaba un exceso del tensioactivo en la superficie [28]. Por ello, la evaluación de la topografía se realizó tras un suave aclarado con agua de las películas para retirar este exceso. El análisis topográfico de las películas sin importar la concentración de tensioactivo mostró que las superficies poseían huecos cilíndricos estructurados por toda ella (figura 4.6). Los tamaños de los huecos aumentaron con la cantidad de CTAB, teniendo un rango de anchura entre 1 y 5  $\mu\text{m}$  [28]. En aquella investigación se asoció la formación de estas estructuras a la cantidad de tensioactivo empleado para la preparación de películas.

Los cambios que se generaron sobre algunas películas por los procesos de degradación son visibles en la figura 4.7. Al comparar las imágenes de AFM de las figuras 4.6 y 4.7, se pudo notar como tras un mes de degradación desaparecieron los huecos de las películas con 1 % (p/p) de CTAB (0/1<sub>0</sub> vs 0/1<sub>1</sub> y 3/1<sub>0</sub> vs 3/1<sub>1</sub>). Además, se observaron algunas deposiciones en forma de cúmulos tras la degradación durante un mes sobre las películas sin y con la concentración de 1 % (p/p) de CTAB.



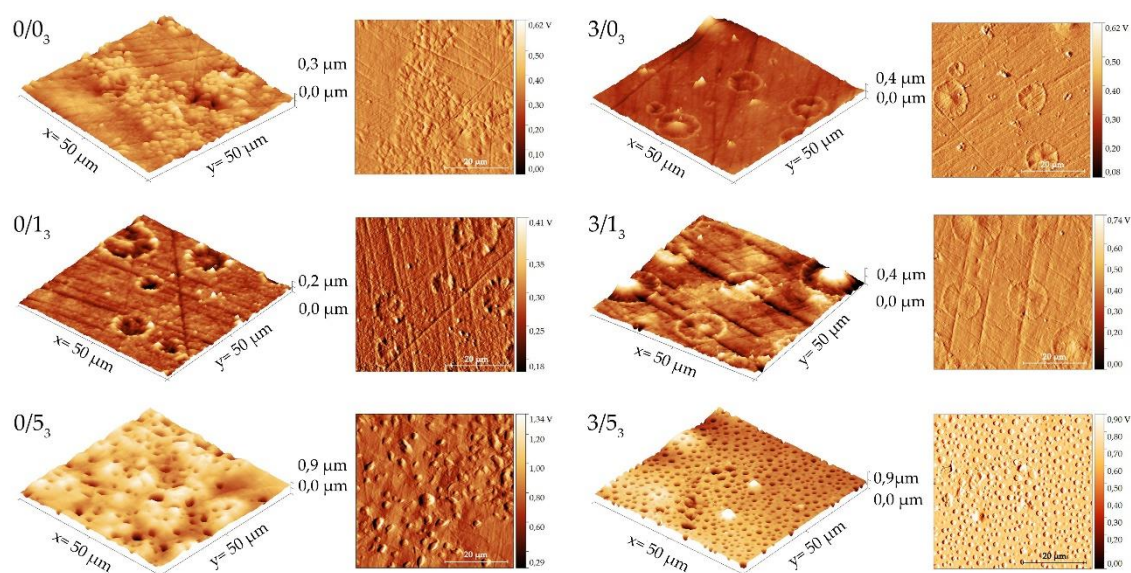
**Figura 4.6.** Imágenes de AFM de películas de PLA enriquecidas con o sin magnesio y CTAB sin degradación. Para cada tipo de película, las imágenes de la izquierda y la derecha son imágenes topográficas y de deflexión, respectivamente.



**Figura 4.7.** Imágenes de AFM de películas de PLA enriquecidas con o sin magnesio y CTAB tras un mes de degradación. Para cada tipo de película, las imágenes de la izquierda y la derecha son imágenes topográficas y de deflexión, respectivamente.

#### IV. Resultados y Discusión

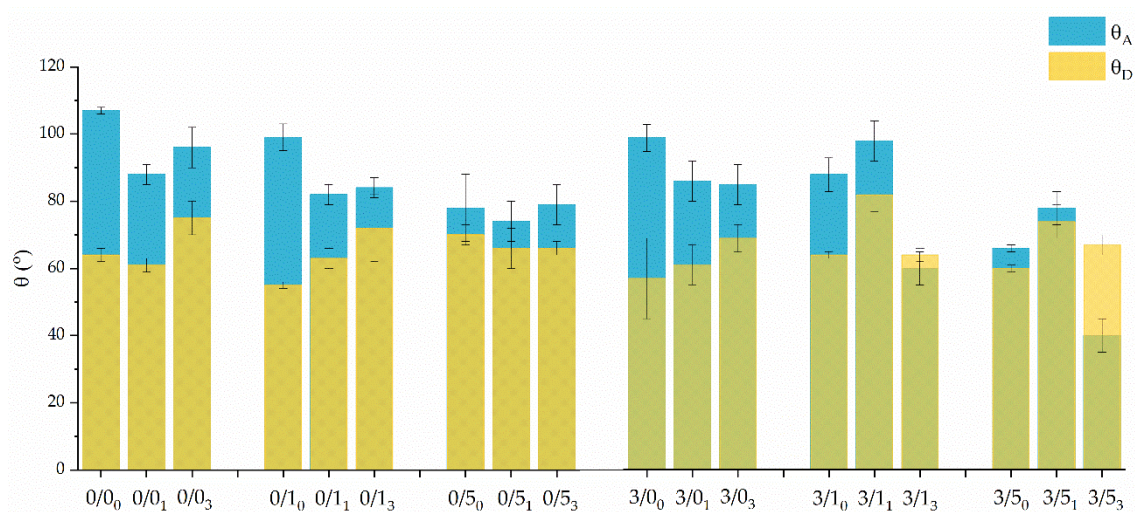
Sin embargo, en las películas con 5 % (p/p) de CTAB los huecos no desaparecieron tras el proceso de degradación (figura 4.7), incluso después de 3 meses de degradación (0/5<sub>0</sub> vs 0/5<sub>1</sub> vs 0/5<sub>3</sub> y 3/5<sub>0</sub> vs 3/5<sub>1</sub> vs 3/5<sub>3</sub>), como se observa en la figura 4.8. En las películas degradadas durante tres meses con la mayor cantidad de CTAB, pero sin magnesio (0/5<sub>3</sub>), se observó un aumento considerable de las dimensiones de estos huecos, llegando a un ancho medio de  $5 \pm 0,6 \mu\text{m}$  y una profundidad media  $500 \pm 30 \text{ nm}$ , siendo en los casos más extremos un 170 % más anchos, y un 250 % más profundos de media. Por otro lado, la anchura y profundidad de los huecos no presentaron diferencias entre las películas enriquecidas con Mg y con la mayor cantidad de CTAB degradadas uno y tres meses (3/5<sub>1</sub> vs 3/5<sub>3</sub>). Tras tres meses de degradación en las muestras 3/5<sub>3</sub> se observó que los huecos poseían un ancho medio de  $1,9 \pm 0,2 \mu\text{m}$  y una profundidad media de  $183 \pm 40 \text{ nm}$ . Estos cambios en las dimensiones de los huecos indicaron que el efecto de la degradación es muy notable tras el primer mes, pero poco significativo tras dos meses adicionales de degradación.



**Figura 4.8.** Imágenes de AFM de películas de PLA enriquecidas con o sin magnesio y CTAB tras tres meses de degradación. Para cada tipo de película, las imágenes de la izquierda y la derecha son imágenes topográficas y de deflexión, respectivamente.



En lo relativo a las medidas del ángulo de contacto del diiodometano y el agua, los resultados se muestran en la figura 4.9. En las películas sin degradar y sin CTAB, se observó una disminución de la hidrofobicidad ( $\theta_A$ ) con la presencia de Mg [28]. Igualmente, cuando el CTAB fue añadido a las películas, se observó una disminución en la hidrofobicidad. Es destacable la relación directa entre la disminución de la hidrofobicidad y la cantidad de CTAB en las muestras, siendo las películas tanto más hidrófilas cuanto mayor es el contenido de CTAB. Se encontró una reducción de  $29 \pm 11^\circ$  y  $33 \pm 5^\circ$  entre 0/0<sub>0</sub> vs 0/5<sub>0</sub> y 3/0<sub>0</sub> vs 3/5<sub>0</sub>, respectivamente. No obstante, con el diiodometano, el líquido apolar, se mostró una tendencia opuesta en estos casos.



**Figura 4.9.** Ángulos de contacto del agua ( $\theta_A$ ) y del diiodometano ( $\theta_D$ ) sobre películas de PLA enriquecidas con Mg y CTAB sin y con degradación de uno o tres meses.

El efecto del tiempo de degradación fue destacable sobre las propiedades físicas de la superficie. La degradación durante uno y tres meses para las películas sin magnesio ocasionó que la hidrofobicidad disminuyera en las películas sin o con 1 % (p/p) de CTAB (figura 4.9). Este cambio en la hidrofobicidad fue más notable tras el periodo corto de degradación (0/0<sub>1</sub>, 3/0<sub>1</sub>, 0/1<sub>1</sub> y 3/1<sub>1</sub>). No obstante, después de 3 meses de degradación, se recuperó parte de la hidrofobicidad perdida en las películas tras el primer mes de degradación

excepto en el PLA con 3 % (p/p) de Mg. Este comportamiento puede relacionarse con la rápida deposición de sales de PBS sobre la superficie de las películas.

La presencia de CTAB afectó a la hidrofobicidad de las películas degradadas con magnesio. La liberación de CTAB en las películas con magnesio tras un mes de degradación respecto a las muestras no degradadas, aumentó significativamente la hidrofobicidad de las superficies independientemente de la concentración del tensioactivo en ellas (3/1<sub>0</sub> vs 3/1<sub>1</sub> y 3/5<sub>0</sub> vs 3/5<sub>1</sub>). No obstante, tras tres meses de degradación, la hidrofobicidad de las películas con CTAB y Mg disminuyó muy significativamente, incluso por debajo del valor de las muestras iniciales, siendo las superficies menos hidrofóbicas de todos los casos estudiados. Este comportamiento observado tras la degradación se pudo relacionar con el efecto conjunto de la liberación de magnesio y CTAB. Por una parte, los iones de magnesio liberados reaccionaron con los fosfatos presentes en el PBS, dando lugar a la deposición de una capa de fosfatos de magnesio, como ocurrió en las películas degradadas con 10 % (p/p) de Mg. Esta capa, aunque pudo actuar como barrera frente a la liberación del tensioactivo, es de esperar que absorbiera agua del medio dando como resultado una superficie más hidrofílica con el paso del tiempo, como refleja la figura 4.9.

La tensión superficial y la energía libre de interacción  $\Delta G_{SAS}$  de las superficies se calcularon utilizando la aproximación de Owens-Wendt-Kaelble (OWK) con los ángulos de contacto del agua y diiodometano (tabla 4.3). Para las muestras no degradadas se encontraron diferencias notables en la componente no dispersiva,  $\gamma^{nd}$  [28]. En el caso de las películas sin degradar enriquecidas con magnesio, sin o con 1 % (p/p) de CTAB el valor de  $\gamma^{nd}$  fue bajo, pero no nulo, lo que indicó una cierta polaridad de la superficie. Sin embargo, en ausencia del magnesio, en las superficies sin degradar con la concentración baja de CTAB, la componente no dispersiva fue nula ( $\gamma^{nd} = 0 \text{ mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ). Por otro lado, las películas de PLA con 5 %

(p/p) de CTAB generaron un aumento de  $\gamma^{nd}$ , sobre todo cuando el magnesio estuvo presente en la matriz.

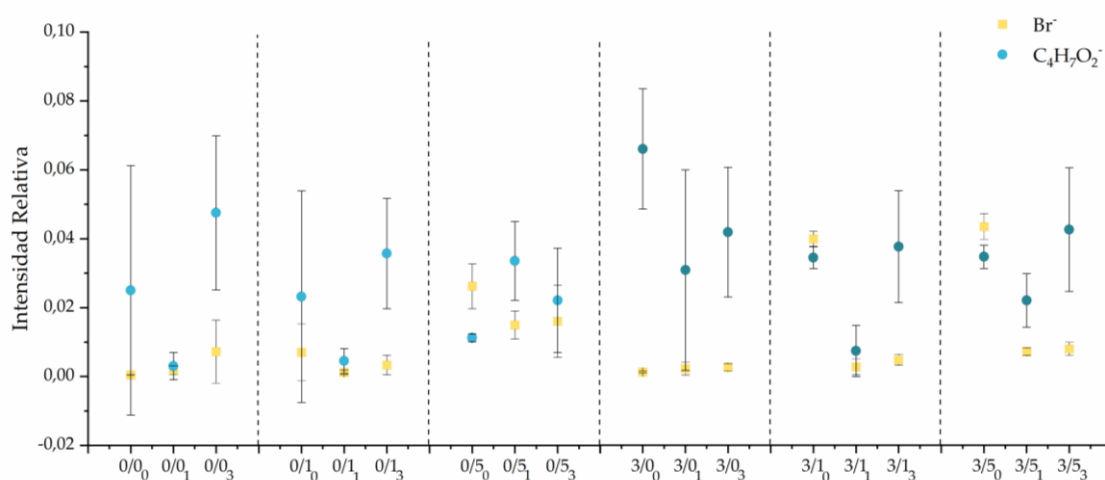
**Tabla 4.3.** Componentes dispersiva ( $\gamma^d$ ) y no dispersiva ( $\gamma^{nd}$ ) de la tensión superficial total ( $\gamma^{TOT}$ ) y energía libre de interacción entre dos películas inmersas en agua ( $\Delta G_{SAS}$ ) para PLA enriquecido con magnesio y/o CTAB tras uno y tres meses de degradación.

Películas	$\gamma^d$ (mJ·m <sup>-2</sup> )	$\gamma^{nd}$ (mJ·m <sup>-2</sup> )	$\gamma^{TOT}$ (mJ·m <sup>-2</sup> )	$\Delta G_{SAS}$ (mJ·m <sup>-2</sup> )	Películas	$\gamma^d$ (mJ·m <sup>-2</sup> )	$\gamma^{nd}$ (mJ·m <sup>-2</sup> )	$\gamma^{TOT}$ (mJ·m <sup>-2</sup> )	$\Delta G_{SAS}$ (mJ·m <sup>-2</sup> )
0/0 <sub>0</sub>	26 ± 1	0 ± 0	26 ± 1	-94 ± 3	3/0 <sub>0</sub>	30 ± 7	1 ± 1	31 ± 8	-84 ± 17
0/0 <sub>1</sub>	28 ± 3	3 ± 2	31 ± 4	-70 ± 9	3/0 <sub>1</sub>	28 ± 3	4 ± 3	32 ± 6	-68 ± 14
0/0 <sub>3</sub>	20 ± 3	3 ± 2	23 ± 5	-80 ± 13	3/0 <sub>3</sub>	23 ± 2	6 ± 3	29 ± 5	-66 ± 12
0/1 <sub>0</sub>	31 ± 1	0 ± 1	32 ± 1	-84 ± 6	3/1 <sub>0</sub>	26 ± 1	4 ± 2	30 ± 2	-70 ± 7
0/1 <sub>1</sub>	27 ± 2	6 ± 2	33 ± 4	-63 ± 7	3/1 <sub>1</sub>	16 ± 3	3 ± 3	19 ± 5	-83 ± 13
0/1 <sub>3</sub>	22 ± 6	7 ± 3	28 ± 9	-65 ± 15	3/1 <sub>3</sub>	26 ± 1	18 ± 4	45 ± 5	-36 ± 8
0/5 <sub>0</sub>	23 ± 2	9 ± 6	32 ± 8	-58 ± 16	3/5 <sub>0</sub>	29 ± 1	13 ± 1	42 ± 1	-43 ± 2
0/5 <sub>1</sub>	25 ± 3	10 ± 5	36 ± 8	-53 ± 14	3/5 <sub>1</sub>	21 ± 3	10 ± 4	31 ± 7	-58 ± 12
0/5 <sub>3</sub>	25 ± 1	8 ± 3	33 ± 4	-59 ± 10	3/5 <sub>3</sub>	25 ± 2	33 ± 5	58 ± 6	-17 ± 7

Los cambios en la polaridad calculada fueron especialmente significativos en las películas degradadas con magnesio después de 3 meses con respecto a las películas no degradadas, donde presentaron un aumento de la polaridad de 350 % en la película 3/1<sub>3</sub> y de 154 % en la 3/5<sub>3</sub>.

Desde el punto de vista de la energía de interacción, las películas sin magnesio fueron más hidrofóbicas que las que lo incluían, independientemente de la concentración de CTAB o del tiempo de degradación. Además, con el incremento de la concentración de CTAB se relacionó una disminución de  $\Delta G_{SAS}$ , es decir un aumento de la hidrofiliidad en estas películas.

Los resultados de la sección anterior mostraron que el Mg se liberó de la matriz del PLA durante de la degradación. Para hacer un seguimiento de la presencia de CTAB en el PLA antes y después de los procesos de degradación, se analizó mediante ToF-SIMS la superficie de las películas.



**Figura 4.10.** Intensidades relativas de los iones  $\text{Br}^-$  y  $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2^-$  medidas mediante ToF-SIMS en las películas enriquecidas con Mg y/o CTAB sin y/o con uno y tres meses de degradación.

Teniendo en cuenta la estructura química del CTAB, se ha seguido la presencia del ion bromuro ( $\text{Br}^-$ ) en la superficie para detectarlo. En la figura 4.10 se muestran las intensidades relativas de los iones característicos del tensioactivo y del polímero (el fragmento  $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2^-$ ) para cada película. Aunque tanto el CTAB



como el PLA poseen cadenas hidrocarbonadas en su estructura, el fragmento seleccionado del polímero se asigna inequívocamente al PLA y no al CTAB, debido a la ausencia de nitrógeno y a la presencia de oxígeno en el fragmento.

En el caso de las muestras no degradadas [27], [28], la presencia de Mg en las películas de PLA hace que el CTAB se detecte de forma más significativa en la superficie de las muestras, siendo el cambio más notable para concentraciones más bajas de CTAB. La presencia de magnesio en las películas de PLA parece reducir la cantidad de tensioactivo en la superficie de las muestras degradadas. Esto es más evidente en las muestras con mayor cantidad de CTAB (0/5 frente a 3/5).

En general en las muestras no degradadas, el ion bromuro es poco detectable en la superficie de las películas preparadas con bajas concentraciones de CTAB y, cuando aumenta la concentración de tensioactivo, la presencia de éste se hace destacable en la superficie. Asimismo, después de la degradación, la cantidad de CTAB en la superficie disminuye significativamente, independientemente de si la muestra ha estado uno o tres meses en degradación.

En definitiva, la presencia de tensioactivos y partículas metálicas, como el CTAB y el Mg respectivamente, modificó las propiedades superficiales de las películas de PLA [27], [28]. A continuación, se analizaron cómo dichos cambios superficiales, juntos con estos componentes activos incluidos en la matriz, fueron capaces de alterar la respuesta de estos materiales frente a la colonización bacteriana sobre su superficie.

#### IV.1.2.2. Colonización bacteriana sobre películas de ácido poliláctico enriquecidas con magnesio y CTAB

Para estudiar la respuesta de las superficies frente a la colonización bacteriana se realizaron dos tipos de ensayos. En el primero, se llevó a cabo un proceso de

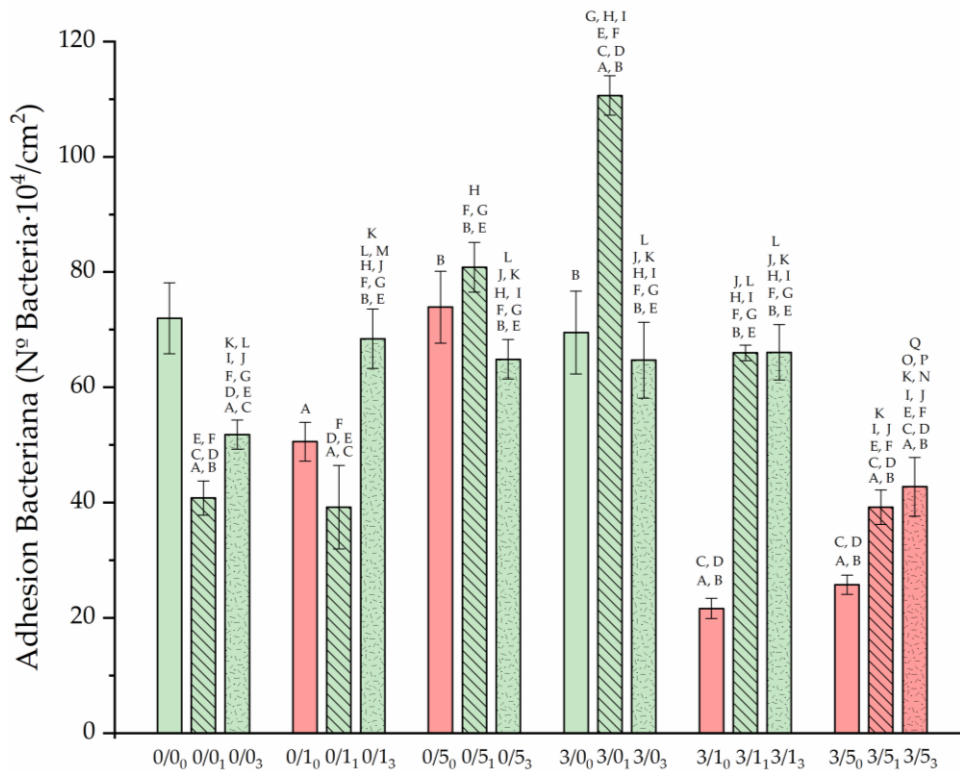
adhesión en el que las bacterias se suspendieron en PBS, que simula un medio fisiológico sin nutrientes paralizando su actividad metabólica. En la *sección III.2.3.1* se ha descrito este procedimiento detalladamente denominado “modelo estático” de adhesión. En el segundo tipo de experimento se analizó la formación de biocapas, para ello se mantuvieron a las bacterias en un estado metabólico activo y se permitió su proliferación sobre las superficies durante 24 horas. La descripción de este procedimiento se detalló en la *sección III.2.4.1*.

#### IV.1.2.2.1. Colonización bacteriana sobre películas de ácido poliláctico enriquecidas con magnesio y CTAB

El gráfico de la figura 4.11 representa la densidad bacteriana superficial sobre las diferentes películas y la viabilidad de dichos microorganismos adheridos.

La adhesión bacteriana inicial a una superficie está mediada por las propiedades superficiales de los microorganismos y del material. Igualmente, los procesos de colonización como la adhesión bacteriana y la formación de biocapas, se ven afectados no sólo por las propiedades físicas de la superficie, sino también por la actividad química de la matriz polimérica.

Los resultados de adhesión sobre las películas no degradadas con sólo 3 % (p/p) de Mg no mostraron diferencias con respecto a la muestra sin enriquecer, a diferencia de lo observado cuando el enriquecimiento de Mg fue del 10 % (p/p). Sin embargo, cuando la presencia de Mg se combina con el CTAB en las películas sin degradar, la adhesión disminuyó significativamente ( $p < 0,05$  según la prueba de Tukey). Para la película 3/10 se observó una reducción de la adhesión bacteriana del 57 % con respecto a la película sin magnesio, 0/10 ( $51 \pm 2 \cdot 10^4$  bacterias/cm<sup>2</sup>). Y a su vez, cuando se realizó la experiencia sobre películas sin degradar con 5 % (p/p) de CTAB, la presencia de Mg disminuyó la adhesión en un 65 % con respecto a la película 0/50 ( $70 \pm 6 \cdot 10^4$  bacterias/cm<sup>2</sup>).



**Figura 4.11.** Densidad de bacterias adheridas a la superficie de las películas de PLA enriquecidas con Mg y CTAB. Las barras lisas, rayadas y punteadas corresponden a las muestras sin degradación, con degradación de 1 mes y 3 meses, respectivamente. El color verde y rojo representan a las bacterias viables y dañadas, respectivamente. Las diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) están señaladas con letras diferentes dependiendo de la muestra utilizada como referencia para la comparación: A con 0/0; B con 0/1; C con 0/5; D con 3/0; E con 3/1; F con 3/5; G con 0/0; H con 0/1; I con 0/5; J con 3/0; K con 3/1; L con 3/5; M con 0/0; N con 0/1; O con 0/5; P con 3/0; Q con 3/1.

En las películas sin degradar preparadas con la concentración menor de CTAB se generó significativamente menos adhesión bacteriana ( $p < 0,05$  según la prueba de Tukey) que sobre las películas sin CTAB, pasando de  $72 \pm 7 \cdot 10^4$  bacterias/cm<sup>2</sup> a  $51 \pm 2 \cdot 10^4$  bacterias/cm<sup>2</sup> en las muestras sin Mg, y de  $68 \pm 6 \cdot 10^4$  bacterias/cm<sup>2</sup> en las muestras con Mg. Sin embargo, en las películas de PLA sin degradación y sin magnesio, la concentración utilizada de CTAB influyó en la adhesión bacteriana. Sobre estas películas se encontró más adhesión para las muestras preparadas con un 5 % (p/p) de CTAB que las preparadas con 1 % (p/p) de CTAB, mientras que en presencia de magnesio la

adhesión permaneció prácticamente constante independientemente de la concentración de tensioactivo utilizada (figura 4.11).

La hidrofobicidad es un factor importante en los procesos de colonización bacterianas [29]–[31]. El enriquecimiento de Mg y/o CTAB hace que las superficies cambien de composición y/o topografía, lo que dificulta encontrar una relación directa entre adhesión e hidrofobicidad. En los casos de esta tesis, la liberación de iones positivos por parte del Mg y/o el CTAB pueden alterar no sólo la interacción eléctrica entre las bacterias sino también con el sustrato.

Trabajando con polidimetilsiloxano (PDMS) enriquecido con CuO-CTAB y ZnO, Sankar *et al.* [32] encontraron una disminución de la colonización por *Staphylococcus* a medida que disminuía la hidrofobicidad del polímero. En ese estudio, la presencia de CTAB cambió el ángulo de contacto de 90° a 73° y la adhesión disminuyó en un 87 %. En los resultados obtenidos en esta tesis, también se observó una disminución del ángulo de contacto de las películas de PLA con CTAB, y una disminución significativa de la adhesión bacteriana ( $p < 0,05$  según la prueba de Tukey) en el PLA sin degradar con CTAB y Mg, probablemente porque los cationes  $Mg^{2+}$  favorecen la menor adhesión encontrada. Esto parece posible debido al menor tamaño de los iones  $Mg^{2+}$  en comparación con los de la molécula de CTAB. Los iones  $Mg^{2+}$  tienen una mayor capacidad para penetrar en la doble capa eléctrica de las bacterias y/o superficies, comprimiéndolas y desestabilizándolas, de forma similar a lo que pueden provocar los cationes divalentes  $Cu^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  en las superficies de Sankar *et al.* [32]. Por este motivo, cuando el PLA sólo está enriquecido con CTAB, la reducción de la adhesión no es tan evidente.

En línea con estos resultados, en el trabajo de Azeredo *et al.* [33] utilizaron una cámara de flujo de placas paralelas para evaluar no sólo la adhesión de *P. fluorescens*, sino también la resistencia bacteriana al paso de un tensioactivo por

la superficie. Los resultados que obtuvieron mostraron que el CTAB no promovía una eliminación significativa de bacterias de la superficie, en contraste con el tensioactivo aniónico dodecilsulfato sódico (SDS), que fue muy eficaz para despegar las bacterias de la superficie. Los autores justificaron sus resultados en base a los cambios físico-químicos de la superficie provocados por los tensioactivos: El SDS inducía un aumento del valor absoluto del potencial zeta negativo y una disminución de la hidrofiliadad de la bacteria, lo que explicaba su gran eficacia para eliminarlas de la superficie. Sin embargo, el CTAB promovió una rápida desorganización eléctrica de la membrana celular debido a las fuerzas de atracción entre los extremos positivos del CTAB y la carga negativa de la superficie bacteriana [34].

En conclusión, se puede hablar de un efecto reductor de la adhesión en la mayoría de las películas con CTAB. En cualquier caso, la presencia de CTAB en la superficie de las películas causa un daño significativo a la viabilidad de las bacterias adheridas. Por ello, en todas las películas donde el CTAB estaba presente se contabilizaron bacterias adheridas no viables.

Como hemos mencionado, durante el proceso de fabricación, en el secado de las películas, parte del tensioactivo es exudado a la superficie [27]. Esto produjo una acción bactericida inicial significativa ( $p < 0,05$  según la prueba de Tukey), como se evidencia en las películas 0/1<sub>0</sub>, 0/5<sub>0</sub>, 3/1<sub>0</sub> y 3/5<sub>0</sub>, lo que implica que al menos se liberó una concentración similar o superior a la CMI,  $0,02 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , determinada específicamente para la cepa usada. A título orientativo, en un estudio similar de degradación con PLA enriquecido con CTAB y magnesio, se estimó una cantidad acumulada de CTAB en PBS tras un mes de degradación de  $0,37 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,74 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $6,6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $35 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para 0/1<sub>1</sub>, 3/1<sub>1</sub>, 0/5<sub>1</sub> y 3/5<sub>1</sub>, respectivamente [28].

La interacción del CTAB con la membrana bacteriana afecta a su viabilidad, al igual que el pH, la osmolaridad del medio, la inanición, las temperaturas extremas, la concentración de oxígeno, la cantidad de glucosa, los agentes bactericidas o el propio estado metabólico bacteriano [35]–[38]. En particular, en el estudio de Sathya *et al.* [39], se investigaron los efectos de nanocompuestos de CTAB en la estructura de la superficie bacteriana utilizando cepas con diferentes propiedades superficiales. Una de sus conclusiones fue que la eficacia bactericida depende de la composición de la superficie bacteriana. Así, las superficies a base de CTAB fueron más eficaces contra las bacterias Gram-positivas, en particular las del género *Staphylococcus*, debido a su gruesa capa de peptidoglicano, que proporciona sitios eficaces para la adhesión a los nanocompuestos de CTAB. En cambio, las bacterias Gram-negativas fueron menos vulnerables a él. Asimismo, en Du *et al.* [40] se realizó un estudio detallado de la actividad bactericida de un material polimérico poli(éter-tioureas) (PETU) enriquecido con los compuestos antimicrobianos poli(etileno-imina) (PEI) y CTAB. Con el CTAB se consiguieron efectos bactericidas a concentraciones inferiores a las utilizadas en esta tesis, y se propusieron mecanismos de acción en función del tipo de bacterias utilizadas. En particular, en el caso de las bacterias Gram-positivas, el CTAB provocó la destrucción de las estructuras superficiales de las bacterias, lo que condujo a un colapso significativo de las mismas y a una fuga del citoplasma. Aunque esta destrucción bacteriana no pareció ser citotóxica en ensayos con células fibroblásticas, y la concentración de CTAB al 1% (p/p) parece ser la concentración ideal en este polímero [40].

Otro factor que tener en cuenta fue cómo influye la degradación de la superficie en la adhesión. En general, la degradación altera el recubrimiento bacteriano. Sin embargo, no fue posible describir una tendencia generalizada para todos los sistemas estudiados. Esto significa que la presencia de magnesio y/o la presencia de diferentes cantidades de CTAB fueron capaces de modular la

adhesión y la viabilidad bacteriana de diferentes maneras con el tiempo (figura 4.11).

Si se comparan las películas no degradadas con las películas tras un mes de degradación, la adhesión bacteriana en el PLA sin magnesio no presentó un efecto uniforme. Sin embargo, en las películas con magnesio la degradación de un mes generó un aumento significativo ( $p < 0,05$  según la prueba de Tukey) de la adhesión con respecto a sus homologas sin degradación. Se encontró un valor de  $111 \pm 4 \cdot 10^4$  bacterias/cm<sup>2</sup> para las películas 3/0<sub>1</sub>, lo que se tradujo en un incremento del 59 % en la adhesión en comparación con la misma película, pero sin degradar. En cambio, sobre la película enriquecida con 1 % (p/p) de CTAB y magnesio ( $66 \pm 1 \cdot 10^4$  bacterias/cm<sup>2</sup>) se generó un aumento del 205 % en la adhesión bacteriana, y sobre la película con 5 % (p/p) de CTAB y magnesio ( $39 \pm 3 \cdot 10^4$  bacterias/cm<sup>2</sup>) uno del 52 %, ambas con respecto a las películas de igual composición química, pero sin degradación.

Adicionalmente, después de tres meses de degradación se produjo una disminución significativa en la adhesión ( $p < 0,05$  según la prueba de Tukey) en las películas sin Mg, con y sin 5 % (p/p) CTAB en comparación con las películas no degradadas (0/0<sub>0</sub> vs 0/0<sub>3</sub> y 0/5<sub>0</sub> vs 0/5<sub>3</sub>). En los casos con magnesio se encontró un comportamiento diferente en 3/1<sub>3</sub> y 3/5<sub>3</sub>, donde la densidad bacteriana aumentó con respecto a las películas sin degradación.

Las películas degradadas que contienen CTAB con la concentración alta expresaron adhesión, en comparación con los controles (0/0 y 3/0), una mayor cuando no había magnesio en el PLA (0/0<sub>1</sub> vs. 0/5<sub>1</sub> y 0/0<sub>3</sub> vs. 0/5<sub>3</sub>), y una disminución si la partícula metálica estaba presente (3/0<sub>1</sub> vs. 3/5<sub>1</sub> y 3/0<sub>3</sub> vs. 3/5<sub>3</sub>), en ambos casos significativas ( $p < 0,05$  según la prueba de Tukey).

Como hemos mencionado, los resultados mostraron que la degradación altera la topografía de las películas de PLA [28][41]. Los cambios más importantes se



dieron en las películas con las concentraciones más altas de CTAB, 5 % (p/p). La deposición de sales, la aparición de huecos en algunas superficies, y la liberación de sustancias activas de las películas constituyeron un escenario en el que prácticamente cada superficie tiene una identidad diferente. No obstante, se deben destacar los comportamientos interesantes observados de la degradación frente a las infecciones. La disminución del número de bacterias adheridas ( $p < 0,05$  según la prueba de Tukey) a las superficies de control 0/0 y la no viabilidad, independientemente del tiempo de degradación, de las bacterias adheridas a las películas 3/5, son algunos ejemplos. Las demás películas con CTAB perdieron su acción bactericida inicial tras la degradación. El magnesio ayudó tanto a la dispersión del CTAB en la matriz polimérica como a la posterior liberación del tensioactivo [41]. Además, la alta densidad de huecos regulares y estructurados de  $1,9 \pm 0,2 \mu\text{m}$  de anchura en 3/5 pudo favorecer la difusión de los iones  $\text{Mg}^{2+}$  y del CTAB, mientras que dicha topografía pudo dificultar la retención bacteriana, ya que fue la superficie con menor número de bacterias adheridas a los tres meses [42]–[45].

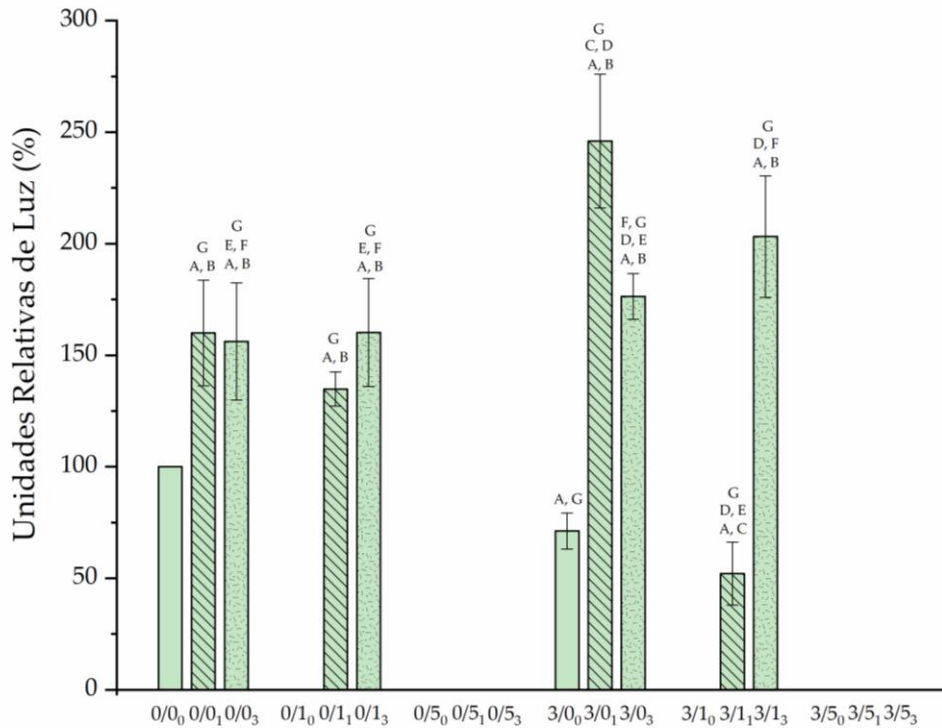
La complejidad de estos sistemas para describir un único comportamiento antimicrobiano se reflejó en el trabajo de Wojcieckowski *et al.* [46], que trabajando con un copolímero de metilmetacrilato-etilacrilato y estireno-etilacrilato con CTAB, observaron valores dispersos en la actividad antimicrobiana tras la degradación de la superficie. Por lo tanto, es necesaria más investigación sobre el uso de CTAB en películas poliméricas con fines bactericidas, ya que hasta ahora la mayor parte de la investigación se ha centrado en las nanopartículas [47] y las emulsiones [48].



#### IV.1.2.2.2. Formación de biocapas sobre películas de ácido poliláctico enriquecidas con magnesio y CTAB

Al igual que en los experimentos de adhesión bacteriana, la formación de biocapa en la superficie de las películas de PLA depende de las tres variables en estudio: Mg, CTAB y tiempo de degradación. En este método, una vez formada la biocapa durante 24 horas se estimó la cantidad de ATP liberado por las células bacterianas utilizando un reactivo específico, y midiendo las unidades de luz relativas (RLU) permitieron extraer información de la viabilidad de los microorganismos en la biocapa. Estos resultados se presentan en la figura 4.12, en ellos los valores de luminiscencia se muestran relativos a las unidades de luz de la película 0/0, a la que se le asocia un valor del 100 %.

El primer aspecto relevante en los ensayos de creación de biocapa (figura 4.12) fue la completa supresión de la biocapa en las mismas películas en las que las bacterias perdieron su viabilidad tras 4 horas de adhesión (figura 4.11). Además de estos casos, en las películas degradadas con 5 % (p/p) de CTAB sin magnesio no se detectó actividad metabólica en la biocapa, lo que demostró que la concentración de moléculas de CTAB liberadas desde en la matriz, tras tres meses de degradación, fueron capaces de inhibir el metabolismo bacteriano sobre el material, pero no afectaron significativamente al comportamiento de adhesión de las bacterias en estado latente en el PBS.



**Figura 4.12.** Viabilidad de la biocapa creada en la película de PLA en unidades relativas de luz (RLU). Las barras lisas, rayadas y punteadas corresponden a las muestras sin degradación, con degradación de 1 mes y 3 meses, respectivamente. El color verde y rojo representan a las bacterias viables o dañadas, respectivamente. Las diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) están señaladas con letras diferentes dependiendo de la muestra utilizada como referencia para la comparación: <sup>A</sup> con 0/0<sub>0</sub>; <sup>B</sup> con 3/0<sub>0</sub>; <sup>C</sup> con 0/0<sub>1</sub>; <sup>D</sup> con 0/1<sub>1</sub>; <sup>E</sup> con 3/0<sub>1</sub>; <sup>F</sup> con 3/1<sub>1</sub>. Además, para la significancia de todos los casos sin viabilidad se asignó la letra <sup>G</sup>.

Tras la degradación, las superficies de PLA con Mg mostraron una mayor capacidad de formación de biocapa en comparación al PLA sin él. Los trabajos anteriores con Mg ofrecieron resultados no muy concluyentes a este respecto. Probablemente, la combinación de la concentración y la dinámica en la que se liberó el Mg fue la responsable de los diferentes comportamientos encontrados en la bibliografía [49]–[51]. En particular, nuestro grupo demostró que concentraciones del 10 % de Mg en películas de PLA son capaces de reducir inicialmente la formación de biocapa después de 8 h, debido al cambio local de pH asociado a una liberación rápida de  $Mg^{2+}$ . En cambio, tras 24 h, las concentraciones de Mg bajaron y pasaron a ser subinhibitorias provocando un aumento significativo de la biocapa [52].

#### IV. Resultados y Discusión

En las películas degradadas, el tiempo de degradación no afectó de igual manera a la formación de biocapa en todas las muestras. Una observación general puede ser que la degradación conduce a un aumento significativo de la formación de biocapa ( $p < 0,05$  según la prueba de Tukey), aunque este aumento no dependió del tiempo de degradación. En concreto los resultados mostraron que sobre las películas con 1 % (p/p) de CTAB se formó más biocapa cuanto más tiempo de degradación sufrieron las muestras, especialmente para aquellas con enriquecimiento de Mg. Además, sobre la película con un 3% (p/p) de Mg y un mes de degradación, la presencia de 1 % (p/p) de tensioactivo generó la mayor diferencia en la formación de biocapa, siendo una disminución de  $79 \pm 1$  % con respecto a las muestras sin CTAB. La mayor biocapa se encontró sobre la superficie de PLA enriquecido con 3 % (p/p) de Mg, tras un mes de degradación. En particular, la evolución fue de  $71 \pm 8$  % de RLU a  $246 \pm 30$  % de RLU al cabo de un mes. En cambio, en las películas sin magnesio se encontró que un aumento del tiempo de degradación afectó a la formación de biocapa. Sin embargo, entre las películas con Mg degradadas uno y tres meses se observó una reducción significativa de la biocapa ( $p < 0,05$  según la prueba de Tukey) en ausencia de CTAB, pero un aumento ( $p < 0,05$  según la prueba de Tukey) si la muestra contenía un 1 % (p/p) de tensioactivo.

A la vista de los resultados obtenidos, se pone de manifiesto que el tipo de polímero, su proceso de fabricación y su geometría final son determinantes en la cantidad de sustancias activas liberadas al medio, con las que se haya enriquecido el material, y, además, como hemos comprobado, la degradación previa de la superficie es un nuevo factor que se debe tener en cuenta a la hora de diseñar materiales biodegradables.

## IV.2. Colonización bacteriana en un entorno enriquecido con condiciones diabéticas

Los microorganismos, como seres vivos, son susceptibles al entorno en el que se encuentren, ya que este puede alterar sus características. Concretamente para las bacterias, los nutrientes, el pH o la osmolaridad influye no solo en sus propiedades internas, sino también a las de su superficie. En la segunda parte de este capítulo se exploró el efecto del ambiente diabético sobre las propiedades superficiales de los microorganismos y sobre su crecimiento. Además, también se analizaron las consecuencias de estas modificaciones superficiales en la capacidad de colonización bacteriana sobre el PLA sin enriquecimiento, a través del estudio de la adhesión con un modelo dinámico y de la capacidad de formación de biocapa, ambos sobre dicho material.

### IV.2.1. Bacterias en un entorno enriquecido con condiciones diabéticas

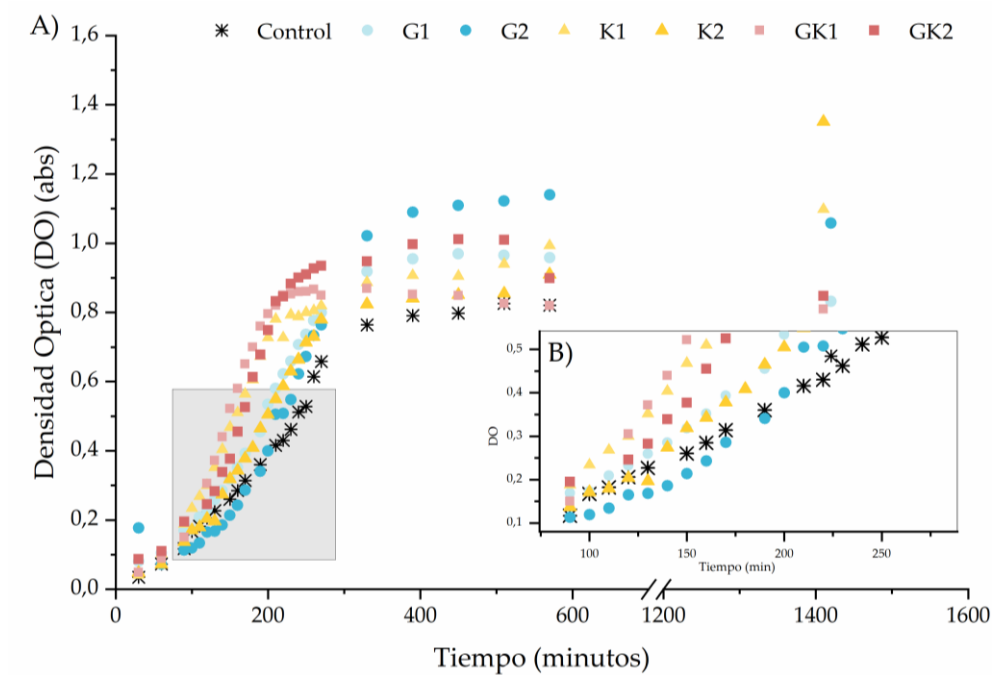
Como ya hemos mencionado, la manera en la que las bacterias colonizan una superficie está influenciada por las propiedades superficiales de la bacteria y del material, que a su vez son función del entorno donde estén inmersos. Asimismo, la diferente composición de la superficie bacteriana permite diferenciar entre unas cepas bacterianas y otras. La retención de solutos en la superficie de las bacterias metabólicamente activas puede modificar no sólo sus propiedades superficiales, sino también su comportamiento interfacial. En esta sección se estudió como un entorno diabético influyó a las propiedades superficiales de los microorganismos, a su dinámica de crecimiento y a su capacidad de formar biocapa.

Específicamente se utilizó la bacteria *Staphylococcus aureus*, la cual fue cultivada en siete ambientes diabéticos, caracterizados por diferentes concentraciones de glucosa y/o cuerpos cetónicos relacionadas o no con rangos patológicos, como se encuentra descrito detalladamente en la **sección III.2.1**.

#### IV.2.1.1. Caracterización superficial de bacterias en un entorno enriquecido con condiciones diabéticas

Para analizar el efecto de los siete ambientes diabéticos seleccionados sobre la bacteria se estudió su influencia en el crecimiento bacteriano, en la hidrofobicidad y en la carga superficial. En la figura 4.13 se presentan las curvas de crecimiento de *S. aureus* en los ambientes utilizados. Como hemos descrito, las curvas de crecimiento tienen cuatro fases: de latencia, de crecimiento exponencial, de crecimiento estacionario y de muerte. En general, para todos los ambientes, las bacterias mostraron una fase de latencia prácticamente de 90 minutos desde el inicio. A continuación, tuvo lugar la fase de crecimiento exponencial hasta aproximadamente los 300 min, seguida de la fase estacionaria de crecimiento indicada por la cuasi meseta de la curva.

Los valores de DO indicaron que el crecimiento bacteriano de la fase estacionaria en todos los medios enriquecidos fue más elevado que en el medio control (figura 4.13), siendo el valor máximo el obtenido para las bacterias expuestas al ambiente hiperglucémico, G2. Una observación interesante en estos experimentos es que en los ambientes con cuerpos cetónicos fue notable la formación de cúmulos bacterianos. Estos no pudieron ser dispersos ni siquiera con la agitación intensa de un vórtex, provocando una elevada incertidumbre en los resultados. Los datos obtenidos mostraron que el medio que ocasionó el mayor retardo a las bacterias para alcanzar la fase de crecimiento estacionario fue el G2. El orden de los ambientes enriquecidos en función del tiempo que tardaron en llegar las bacterias a la fase estacionaria fue  $G2 > GK2 > G1 > GK1 > K1 > K2 > C$ .



**Figura 4.13.** Ejemplo de curvas de crecimiento de *S. aureus* en medio enriquecidos con ambientes diabéticos A) Medidas de DO del crecimiento bacteriano durante 24 horas o 1420 minutos; B) Zoom de la fase exponencial del crecimiento bacteriano.

La DO se utilizó en las curvas de crecimiento como parámetro asociado al número de bacterias en la suspensión. Sin embargo, si la composición del medio altera el tamaño de las bacterias, el número de bacterias medido a través de la DO puede quedar enmascarado. Para descartar o por el contrario considerar, que cualquier cambio en la DO fue debido al tamaño de la bacteria, se midieron los diámetros de las bacterias crecidas en los diferentes ambientes mediante perfilometría. La tabla 4.4 muestra los diámetros medios con las desviaciones estándar obtenidas. Los tamaños de todas las bacterias fueron del mismo dentro de la incertidumbre experimental, por lo que fue posible descartar este factor en la medida de la DO del crecimiento en los ambientes enriquecidos.

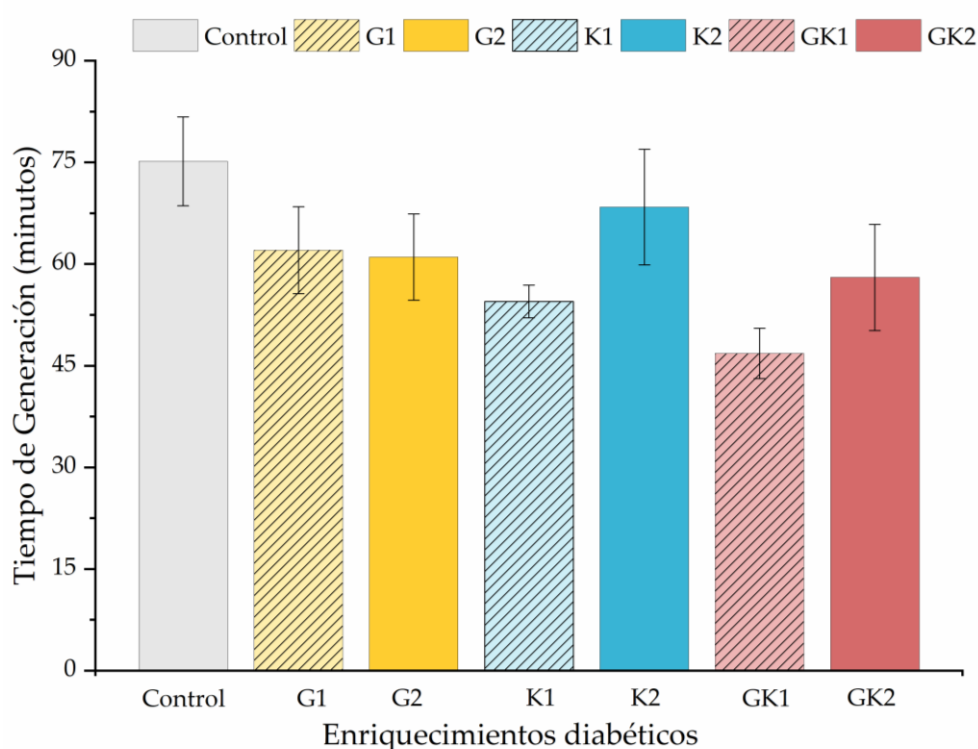
**Tabla 4.4.** Valores de los diámetros medios, la hidrofobicidad, el potencial zeta y pH del medio de cultivo de *S. aureus*, crecida en los diferentes ambientes con enriquecimientos diabéticos. Las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los valores de pH se indican con: + para los valores iniciales con respecto al control; ^ para los valores después del crecimiento bacteriano; \* dentro de cada medio suplementado para comparar el efecto antes y después del crecimiento bacteriano. Las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control en el potencial zeta y la hidrofobicidad, se marca con \*\*.

		Media diámetros bacterianos ( $\mu\text{m}$ )	Hidrofobicidad relativa (%)	pH antes crecimiento	pH después crecimiento	Potencial zeta (mV)
Condiciones diabéticas	C	$0,98 \pm 0,06$	$7 \pm 6$	$-39 \pm 2$	$7,3 \pm 0,09$	$7,3 \pm 0,02$
	G1	$1,02 \pm 0,07$	$49 \pm 5^{**}$	$-47 \pm 2^{**}$	$7,2 \pm 0,05^{+*}$	$5,4 \pm 0,02^{*}$
	G2	$0,98 \pm 0,09$	$47 \pm 5^{**}$	$-49 \pm 5^{**}$	$7,1 \pm 0,05^{+*}$	$4,9 \pm 0,03^{*}$
	K1	$1,07 \pm 0,14$	$75 \pm 4^{**}$	$-38 \pm 2$	$7,2 \pm 0,02^{+}$	$7,2 \pm 0,01$
	K2	$1,02 \pm 0,08$	$77 \pm 10^{**}$	$-19 \pm 5^{**}$	$6,0 \pm 0,04^{+*}$	$6,6 \pm 0,03^{*}$
	GK1	$0,95 \pm 0,12$	$72 \pm 3^{**}$	$-39 \pm 4$	$7,0 \pm 0,08^{+*}$	$5,5 \pm 0,28^{*}$
	GK2	$0,92 \pm 0,14$	$82 \pm 3^{**}$	$-22 \pm 8^{**}$	$5,9 \pm 0,03^{+*}$	$4,9 \pm 0,007^{*}$

La fase exponencial del crecimiento bacteriano presentó pendientes diferentes en función de los nutrientes de los medios (figura 4.13.B), lo que indicó que las tasas de proliferación de las bacterias en cada ambiente fueron diferentes. En esta tesis, para cuantificar los cambios observados en la fase exponencial se calculó el tiempo de generación ( $\mathcal{g}$ ).

Como hemos definido en otros capítulos, el parámetro  $\mathcal{g}$  informa del tiempo que tarda una población de bacterias en duplicarse. Los tiempos de generación calculados en los diferentes ambientes oscilaron entre los 75 minutos para el control y los 47 minutos para el medio GK1 (figura 4.14). La adición de glucosa al medio disminuyó el tiempo de crecimiento de *S. aureus* con respecto al control. Aunque los valores obtenidos para las bacterias cultivadas en G1 y G2 no fueron estadísticamente diferentes entre sí. De modo que el tiempo de generación en la fase exponencial de crecimiento en ambiente enriquecidos con glucosa no parece depender de la cantidad de esta en el entorno. Incluso la baja cantidad de glucosa que se corresponde con una concentración no patológica, como único nutriente

del medio, fue suficiente para desencadenar una rápida tasa de crecimiento de *S. aureus*. Este comportamiento concuerda con las observaciones de Xie *et al.* [53], quienes encontraron que la tasa de crecimiento en la fase exponencial, y también el momento en que comienza la fase estacionaria de *S. aureus*, era independiente de las concentraciones de glucosa en medios de entre 2 y 8 g·L<sup>-1</sup> [53]. Aunque la concentración de glucosa no pareció afectar a la fase exponencial, se encontró que, al cuantificar el crecimiento bacteriano al final de la fase estacionaria, este se vio favorecido en los medios con una concentración hiperglucémica, G2.



**Figura 4.14.** Tiempo de generación de *S. aureus* cultivada en medios enriquecidos con ambientes diabéticos.

Los cuerpos cetónicos son reservas energéticas alternativas para varios microorganismos [54]–[56]. Según los resultados en la figura 4.14, en el ambiente K1 se calculó una  $\mu$  más rápida que en los ambientes con glucosa. De forma similar, los medios enriquecidos conjuntamente con cuerpos cetónicos y con glucosa (GK1 y GK2), proporcionaron una disminución del tiempo de generación en comparación con los medios enriquecidos solamente con cuerpos cetónicos,



K1 y K2. Ahora bien, este decrecimiento del tiempo de generación fue en una proporción similar al obtenido al comparar la  $\mu$  en el medio enriquecido con glucosa respecto al control. *S. aureus* cultivado en medios GK1 presentó el menor tiempo de generación, o lo que es lo mismo, la mayor tasa de crecimiento. En este ambiente se obtuvo una disminución de  $\mu$  del 28 %, con respecto a lo calculado en el ambiente control. Según la bibliografía, el efecto de los cuerpos cetónicos sobre los microorganismos parece depender del tipo de bacterias y de la concentración de estos en el medio. Potezny *et al.* encontraron que los cuerpos cetónicos actúan como bactericidas para la Gram-negativa *E. coli* [57]. Sin embargo, Dubos *et al.* [55] obtuvieron que *S. aureus* puede crecer mejor en un medio con cuerpos cetónicos, incluso a un pH tan bajo como 5,5, que en un medio estándar. Pero a pesar del bajo tiempo de generación mostrado por *S. aureus* debido al consumo de estas moléculas, la cantidad total de bacterias producidas en la fase estacionaria en los ambientes K1 y K2 fue la más baja, a excepción de las obtenidas en el cultivo control. Esto indicó que los cuerpos cetónicos no fueron tan eficaces como la glucosa para aumentar la población final de bacterias a pesar de la mayor tasa de crecimiento inicial que las proporcionan.

Se midieron la hidrofobicidad y el potencial zeta de los microorganismos después de 14 horas de crecimiento, es decir al final de la fase exponencial (tabla 4.4), donde aún existe una gran cantidad de nutrientes para mantener la proliferación bacteriana, pero también donde se encuentran compuestos de desecho producidos por la actividad metabólica de las bacterias, a causa de su crecimiento, que afectan al pH del medio.

El pH del medio control no mostró diferencias antes y después del crecimiento bacteriano. Además, las bacterias cultivadas en estas condiciones mostraron un comportamiento muy hidrófilo, y con una carga superficial negativa de  $-39 \pm 2$  mV. Sin embargo, en las bacterias cultivadas en medios enriquecidos, estas propiedades se modificaron. La adición de glucosa al medio

de cultivo, tanto en concentraciones no patológicas como hiperglucémicas, dio lugar a bacterias con una hidrofobicidad superficial moderada-intermedia (aproximadamente 50 %), y con carga superficial mayor, en valor absoluto, que las bacterias de control (G1:  $-47 \pm 2$  mV y G2:  $-49 \pm 5$  mV). La estructura de la glucosa proporciona a la molécula un carácter electronegativo y anfifílico, lo que hace que la glucosa tenga una hidrofobicidad media [58]. La retención de la glucosa, cuando está en el medio de cultivo, en la superficie de las bacterias parece transferir a estas sus propiedades. El pH medido en el TSB no cambió por la incorporación de glucosa antes del crecimiento, pero al final de la fase exponencial el pH descendió en comparación con el del medio control, siendo de 1,8 y 2,2 puntos inferior para los medios G1 y G2, respectivamente. Un producto de desecho del metabolismo de la glucosa por las bacterias es el ácido láctico [59], por lo que, el cambio de pH observado puede estar relacionado con la presencia de este ácido en el medio de cultivo. En consecuencia, no se puede descartar que algunas de estas moléculas de desecho estén también presentes en las superficies de las bacterias. La influencia de la acidez del entorno fue estudiada por Djerebi *et al.* [60]. En su trabajo analizaron cómo el pH influyó en las propiedades físico-químicas de *Acinetobacter baumannii*. Sus resultados mostraron cómo el pH afectaba en la hidrofobicidad del microorganismo y, por ende, en la adhesión bacteriana.

Por otra parte, la presencia en el medio de crecimiento de los cuerpos cetónicos, moléculas hidrofóbicas, ocasionó que la superficie de las bacterias aumentara su hidrofobicidad hasta valores cercanos al 75 %. Al ser retenidas sobre las bacterias, la menor polaridad de estas moléculas hizo que el potencial zeta de las bacterias también disminuyera, probablemente porque bloquearon parte de la carga de la pared celular de las bacterias [61], [62]. Sin embargo, solo el medio con ambiente de cetoacidosis modificó el potencial zeta de las bacterias con respecto al control, pasando de  $-39 \pm 2$  mV a  $-19 \pm 5$  mV. La concentración de

#### IV. Resultados y Discusión

cuerpos cetónicos no patológica, K1, no fue capaz de afectar de manera significativa la carga superficial bacteriana. El acetoacetato y el ácido (R)- 3-hidroxi-butírico, cuyos pKa son 3,58 y 4,7, respectivamente, son ácidos relativamente fuertes [63]. Cuando los cuerpos cetónicos se añadieron en una concentración K2 al medio de cultivo, provocaron una caída del pH a de hasta 1,3 puntos, a pesar de la capacidad amortiguadora del TSB. A diferencia de lo causado con la glucosa, donde su incorporación antes del crecimiento no alteró el pH del medio. Como hemos mencionado, el metabolismo de la glucosa provocó la acidificación del entorno, en cambio los cuerpos cetónicos provocaron un aumento del pH de 0,6 puntos con respecto a la situación inicial. En el caso del enriquecimiento con la concentración no patológica de cuerpos cetónicos, no hubo cambios en el pH ni antes ni después del crecimiento en comparación con el medio control o con la situación inicial del medio de cultivo. Por lo tanto, la modificación del pH debida al metabolismo de los cuerpos cetónicos confirmó de nuevo el mayor consumo de estos metabolitos en K2 que en K1, generando productos de desecho que parecieron tener un pH básico. Ahora bien, no se puede descartar la influencia en este aumento de la eliminación de los cuerpos cetónicos del ambiente al consumirse por las bacterias.

Para las bacterias en medios mixtos con glucosa y cuerpos cetónicos, los valores de hidrofobicidad y potencial zeta fueron similares a los de las bacterias crecidas ambientes enriquecidos solo con presencia de cuerpos. Esto sugiere que existió una adsorción preferente de los cuerpos cetónicos sobre la glucosa en la superficie bacteriana debido a la mayor solubilidad de la glucosa en el medio acuoso. Al igual que ocurrió con el pH tras el crecimiento bacteriano cuando la glucosa era el único nutriente, en los medios con enriquecimiento mixto el pH descendió tras el crecimiento, posiblemente como consecuencia del ácido láctico producido por el metabolismo de la glucosa. En el medio con baja concentración de glucosa y cuerpos cetónicos, GK1, se produjo un descenso del pH de

1,5 puntos tras el crecimiento bacteriano, el cual fue cercano al producido en el medio G1, que fue de 1,7. Para el medio con la mayor concentración de glucosa y cuerpos cetónicos, GK2, el pH tras el crecimiento bacteriano descendió a 4,9, el mismo valor que en el medio G2, aunque el pH inicial en G2 y GK2 fue diferente. La mayor hidrofobicidad, así como el menor potencial zeta en valor absoluto, se encontraron asociados a la mayor concentración de cuerpos cetónicos en los medios mixtos.

#### IV.2.1.2. Formación de biocapas en un entorno enriquecido con condiciones diabéticas

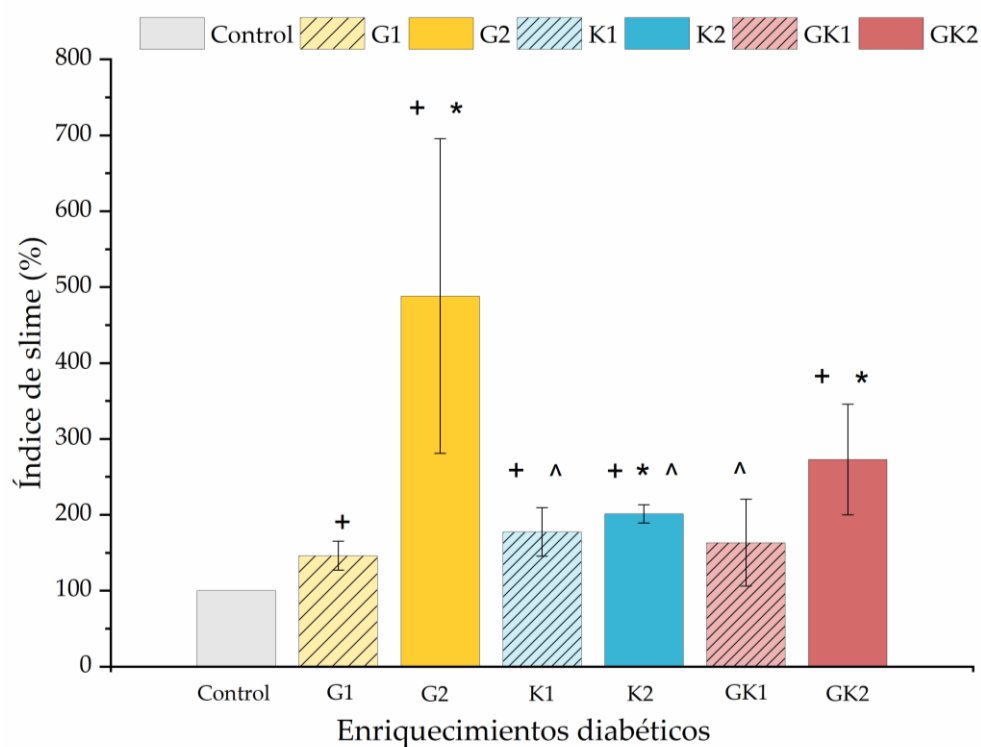
Con el objetivo de evaluar si los cambios superficiales afectaron a la capacidad de *S. aureus* para formar de biocapas, se estudió este proceso sobre una superficie estándar, utilizando los ambientes enriquecidos para replicar el modelo de diabetes de los medios de las curvas de crecimiento. El método elegido para evaluar la formación de biocapa fue la estimación del índice de *slime* en placas de poliestireno. Esta técnica proporciona información sobre la cantidad relativa de biocapa generada al exponer a la bacteria a los diferentes ambientes. Además, con este método se consigue evaluar la biocapa independientemente de la cantidad de bacterias crecidas en el ambiente. También se obtuvo información de la distribución de la biocapa sobre la superficie con las imágenes de SEM y perfilometría.

La figura 4.15 muestra los resultados de IS para la formación de biocapas, y las figuras 4.16 y 4.17 proporcionan una idea de la configuración de la biocapa a través de las imágenes de SEM y perfilometría, respectivamente. Además, la tabla 4.5 recoge los valores de cobertura bacteriana y biovolumen obtenidos a partir de las imágenes de perfilometría.

**Tabla 4.5.** Datos de cobertura bacteriana (%) y biovolumen ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) medidos en las imágenes de perfilometría de las biocapas bacterianas creadas con diferentes ambientes diabéticos. Las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) se indican con: a respecto al control; b respecto a G1, c respecto a G2; d respecto a K1; e respecto a K2; f respecto a GK1.

		Cobertura	Biovolumen
		Bacteriana (%)	( $\text{m}^3/\text{m}^2$ )
Condiciones diabéticas	C	16,1 ± 0,4	1,1 ± 0,1
	G1	32,4 ± 0,3 <sup>a,b</sup>	1,08 ± 0,01
	G2	65,3 ± 0,8 <sup>a,b</sup>	1,3 ± 0,4
	K1	5,5 ± 0,8 <sup>a,b,c</sup>	0,94 ± 0,07
	K2	33 ± 8 <sup>a,c,d</sup>	0,96 ± 0,02
	GK1	23,5 ± 0,8 <sup>a,b,c,d</sup>	1,4 ± 0,1
	GK2	81,1 ± 0,3 <sup>a,b,c,d,e,f</sup>	3,8 ± 1,9

Los resultados mostrados en la figura 4.15 indicaron que la adición de glucosa o cuerpos cetónicos aumentó el índice de *slime* respecto al control. Este efecto fue especialmente notable en el caso de la concentración patológica de glucosa, G2. A pesar de las diferencias en el metabolismo entre las bacterias planctónicas y las sésiles, el consumo de glucosa favoreció una mayor producción de poli-N-acetil- $\beta$ -(1-6)-glucosamina (PNAG) [54]. Este componente de la superficie bacteriana es esencial en la virulencia de la biocapa de *S. aureus*, tal y como denota un elevado IS. La obtención de un IS mayor bajo la condición G2 que bajo la condición G1, indicó que la concentración de glucosa también fue decisiva en la producción de *slime*. Asimismo, el análisis de perfilometría (tabla 4.5) mostró una mayor cobertura bacteriana en G2, 65,3 ± 0,8 %, que en G1, 32,3 ± 0,3 %, lo que revela una mejora extensión de la biocapa cuando esta se forma bajo glucosa.



**Figura 4.15.** Porcentaje de IS de *S. aureus* obtenido para medios enriquecidos con ambientes diabéticos. Diferencias significativas  $p < 0,05$  respecto al control (+), respecto a G1 (\*), respecto a G2(^).

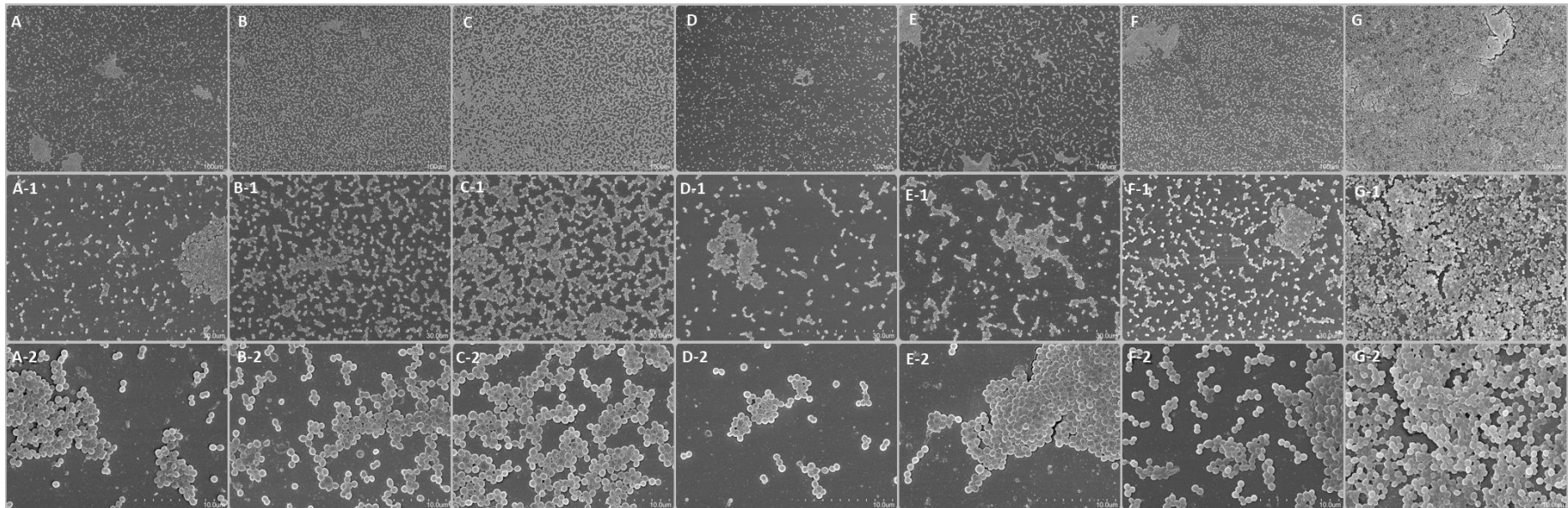
El acetoacetato fue descrito como un inhibidor de la formación de biocapas en un estudio donde se analizó el impacto de los cuerpos cetónicos en la formación de biocapas para algunas bacterias Gram-negativas [57]. Horne *et al.* [64] estudiaron la acción del acetoacetato y el acetoacetato de etilo sobre las biocapas de tres cepas bacterianas diferentes. Los investigadores encontraron que una concentración elevada de acetoacetato, de unos 20 y 35  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , dependiendo de la cepa provocaba un efecto inhibitor del crecimiento de la biocapa. Sin embargo, una pequeña variación de más o menos concentración ocasionaba un aumento de la biocapa. En esta tesis, las biocapas formadas en un ambiente con solo cuerpos cetónicos como nutriente generaron más IS que las bacterias sometidas a la condición de glucosa no patológica (G1) (figura 4.15). Igualmente, con cuerpos cetónicos en el medio de cultivo se obtuvo una cobertura bacteriana inferior a la biocapa creada con el medio de control, como muestran las imágenes de SEM (figura 4.16). Cuantitativamente, en K1 el porcentaje de cobertura

#### IV. Resultados y Discusión

bacteriana fue menor que en el control (tabla 3.5), pero en el caso de K2 el porcentaje de cobertura bacteriana fue similar a G1, siendo el tercero más alto ( $33 \pm 8 \%$ ), concordando con los valores de IS obtenidos. Este comportamiento sugiere que la concentración de cuerpos cetónicos jugó un papel importante en la fijación de la biocapa a los sustratos, a pesar de que en el caso del crecimiento bacteriano planctónico (figura 4.13), los cuerpos cetónicos tuvieron los valores más bajos de densidades ópticas al final del proceso de crecimiento, excluyendo los cultivos en medios de control.

Se encontró que la mayor biovolumen se obtuvo en los ambientes con hiperglucemia, con o sin cetoacidosis, G2 y GK2, frente a los ambientes con concentraciones no patológicas. El crecimiento de la biocapa bajo las concentraciones, G2 y GK2, generó las coberturas bacterianas más altas, especialmente en el caso del entorno diabético patológico completo ( $81,1 \pm 0,3 \%$ ). Las bacterias cultivadas en el medio GK2 expusieron un mejor empaquetamiento de las células en la biocapa, y una extensión más eficiente en la superficie. Esto es debido a la fuerza de atracción hidrofóbica y la reducción de la repulsión electrostática entre ellas, consecuencia de la mayor hidrofobicidad y el menor potencial zeta negativo en valor absoluto entre los demás ambientes. Asimismo, no se puede descartar que la alta dispersión encontrada en los resultados de IS, y el menor porcentaje de cobertura para las biocapas creadas con el ambiente G2, fuesen debidos a las diferentes características superficiales de las bacterias cultivadas en G2 con respecto a GK2. Las bacterias cultivadas en el medio G2 sólo tuvieron un valor intermedio de hidrofobicidad, y una carga superficial negativa más alta en valor absoluto que las bacterias cultivadas en GK2. La repulsión electrostática más eficaz, y la menor atracción hidrofóbica entre las bacterias del cultivo G2 en comparación con las del GK2, podría haberse sido la causa que facilitara la eliminación irregular de las bacterias de la biocapa en la superficie de los pocillos de poliestireno.





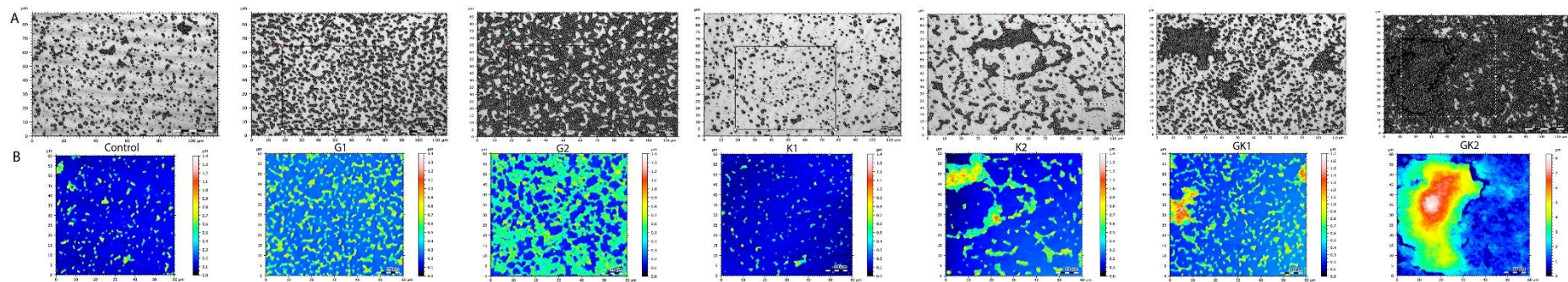
**Figura 4.16.** Imágenes SEM tomadas con aumentos de 150x a 50000x para las biocapas formadas por *S. aureus* en TSB enriquecido con los diferentes ambientes diabéticos. A, A-1 y A-2) Biocapa formada con el medio de control; B, B-1 y B-2) Biocapa formada con el medio G1; C, C-1, C-2) Biocapa formada con el medio G2; D, D-1, D-2) Biocapa formada con K1; E, E-1, E-2) Biocapa formada con el medio K2; F, F-1, F-2) Biocapa formada con medio GK1; G, G-1, G-2) Biocapa formada con el medio GK2.



#### IV. Resultados y Discusión

Las imágenes de perfilometría de la figura 4.17, confirmaron que las propiedades de la superficie de las bacterias crecidas bajo GK2 fueron óptimas para la virulencia del microorganismo, promoviendo una mejor cobertura y un mayor empaquetamiento bacteriano. Las imágenes topográficas mostraron que sólo en el caso de GK2 la escala Z cambió de 0 - 1,4/1,7 nm, para las biocapas crecidas en ambientes G2, a 0 - 8 nm para las de GK2. Lo que puede significar que teniendo en cuenta el diámetro bacteriano medio, las bacterias en las zonas de mayor acumulación de biocapa en el ambiente GK2 presentaron una configuración multicapa. En este sentido, también el biovolumen (tabla 4.5) ratificó la información topográfica visual. El valor obtenido para este parámetro en la biocapa cultivada con GK2 se duplicó con respecto al ambiente control, pasando de  $1,1 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$  a  $3,8 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ .

Los ambientes con una mezcla de ambos componentes presentaron una combinación de las características observadas en los casos con los compuestos por separado. La glucosa y los cuerpos cetónicos mostraron un efecto aditivo, siendo la formación de la biocapa mayor en el medio conjunto. En el caso de GK2, la hiperglucemia influyó para proporcionar una mejor cobertura de la superficie y la cetoacidosis el empaquetamiento de las células bacterianas en una configuración multicapa. Estos resultados confirman la importancia del entorno en el que crecen las bacterias, alterando su capacidad de crecimiento y sus propiedades superficiales de las mismas.



**Figure 4.17.** Imágenes de perfilometría de las biocapas formadas por *S. aureus* en diferentes ambientes diabéticos. A) Imágenes del perfilómetro de cada biocapa sin y con ambiente enriquecidos, tomadas a máximo aumento (objetivo 150x) donde se calculó el porcentaje de cobertura bacteriana. B) Área de 60 x 60 extraída de la imagen anterior donde se analiza el biovolumen. De izquierda a derecha aparecen las siete condiciones Control, G1, G2, K1, K2, GK1 y GK2

## IV.2.2. Colonización bacteriana sobre películas de ácido poliláctico en un entorno enriquecido con condiciones diabéticas

El ambiente diabético, como hemos observado, modifica las propiedades de la superficie bacteriana y la formación de biocapas. Además, como se indicó en la introducción existe la posibilidad de evaluar la influencia de cualquier componente biológico, en este caso entornos diabéticos, en un sistema más cercano al *in vivo* utilizando un modelo dinámico de adhesión. En el cuerpo humano es inusual encontrar un ambiente estrictamente estático. Si pensamos en el sistema circulatorio, respiratorio o incluso linfático, todos ellos se caracterizan por ser sistemas dinámicos donde el flujo es esencial. Por este motivo, en esta última sección hemos utilizado un método dinámico de adhesión bacteriana [65] para estudiar la colonización inicial de la superficie del PLA en ambientes diabéticos. Además, el estudio también incluirá ensayos de formación de biocapa sobre PLA considerando la influencia de los ambientes diabéticos en el proceso. El microorganismo seleccionado fue el utilizado en la sección anterior, *Staphylococcus aureus* ATCC29213 y el modelo de ambiente diabético seleccionado también fue el mismo que el utilizado en la sección anterior donde se trabajó con concentraciones de glucosa y cuerpos cetónicos presentes en individuos sanos y en personas diabéticas, ambas descritas en la *sección III.2.1*.

### IV.2.2.1. Caracterización superficial de películas de ácido poliláctico para colonización bacteriana en un entorno enriquecido con condiciones diabéticas

Para analizar, cómo influyen los ambientes diabéticos en un proceso dinámico de colonización, se utilizó una cámara de flujo de placas paralelas, como se describió en la *sección III.2.3.2*. A pesar de los beneficios que aporta este dispositivo en cuanto a la observación directa de la densidad bacteriana sobre la

superficie, objeto de estudio, a cualquier tiempo, una limitación importante viene dada por las características ópticas que necesita dicha superficie. En este sentido, es necesario que el material sea completamente especular para que la luz del microscopio pueda reflejarse sin dificultad y la observación de la superficie sea de calidad. El PLA que se utilizó en estudios anteriores no cumplía estrictamente este requisito y, por esta razón, se trabajó con un PLA de cristalinidad diferente (semicristalino) que permitió fabricar muestras con superficies altamente reflectantes.

Para valorar si existían otras diferencias significativas entre las superficies de ambos PLA, se hizo una caracterización previa para comparar la energía libre superficial y el potencial eléctrico de interacción de ambos materiales. La tabla 4.6 muestra los ángulos de contacto de agua, formamida y diiodometano de los dos polímeros, así como los valores de la tensión superficial total, sus componentes  $\gamma^{LW}$  y  $\gamma^{AB}$ , los parámetros electrón-aceptor ( $\gamma^-$ ) y electrón-donador ( $\gamma^+$ ), y el valor del potencial zeta ( $\zeta$ ).

**Tabla 4.6.** Ángulos de contacto ( $\theta_A$ : agua,  $\theta_F$ : formamida,  $\theta_D$ : diiodometano) energía libre superficial ( $\gamma^{TOT}$ ), componentes Lifshitz-van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ), ácido-base ( $\gamma^{AB}$ ), parámetros electrón-donador ( $\gamma^+$ ) y electrón aceptor ( $\gamma^-$ ) y el potencial zeta ( $\zeta$ ) del PLA utilizado en las secciones previas (cristalino) y del utilizado en este apartado (semicristalino).

Muestras	PLA Cristalino	PLA Semicristalino
$\theta_A$ : (°)	74 ± 4	80 ± 2
$\theta_F$ : (°)	62 ± 3	63 ± 5
$\theta_D$ : (°)	49 ± 3	43 ± 1
$\gamma^{TOT}$ (mJ·m <sup>-2</sup> )	34 ± 3	35 ± 2
$\gamma^{LW}$ (mJ·m <sup>-2</sup> )	30 ± 2	34 ± 1
$\gamma^{AB}$ (mJ·m <sup>-2</sup> )	3 ± 2	1 ± 2
$\gamma^+$ (mJ·m <sup>-2</sup> )	0,25 ± 0,30	0,04 ± 0,17
$\gamma^-$ (mJ·m <sup>-2</sup> )	12 ± 3	8 ± 3
$\zeta$ (mV)	-27,91 ± 1,05	-27,41 ± 0,07

#### IV. Resultados y Discusión

Los resultados mostraron valores similares en los ángulos de contacto para los dos PLA, dentro de la incertidumbre experimental. En particular, los dos materiales se presentaron como hidrófobos, con un valor del ángulo de contacto medio de  $77 \pm 4^\circ$ . Su tensión superficial fue del orden de  $35 \text{ mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ , siendo el carácter apolar (dispersivo) ( $\gamma^{LW} \approx 32 \text{ mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ) de la superficie, el que contribuyó fundamentalmente a este valor, frente al carácter polar ( $\gamma^{AB} \approx 2 \text{ mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ). Este débil carácter polar que se predice en las superficies vino determinado por el valor, prácticamente nulo, del parámetro  $\gamma^+$ . No obstante, también es importante destacar el valor del parámetro  $\gamma^-$ , que fue muy alto en relación con  $\gamma^+$ , indicando el carácter electro-negativo de las superficies, resultado que está de acuerdo con los valores negativos del potencial zeta ( $\zeta \approx -27 \text{ mV}$ ).

Con estos datos se puede concluir que el PLA semicristalino utilizado en películas finas sobre vidrio posee propiedades superficiales energéticas similares al PLA cristalino usado para las películas enriquecidas con Mg y CTAB. En la bibliografía se encontraron resultados en este sentido, donde, polímeros con diferente cristalinidad poseían superficies con características superficiales prácticamente iguales. En el trabajo Begic *et al.* [66] se analizaron dos tipos de membranas de politetrafluoroetileno denso (PTFE-W y PTFE-B), implicadas en la regeneración ósea guiada de un implante dental, para entender cómo contribuían las características del material en la adhesión microbiana. A pesar de la diferente cristalinidad, los resultados de ángulo de contacto fueron similares en las dos membranas, asociándose los cambios en la adhesión bacteriana a la presencia de microestructuras superficiales [66].

En otro trabajo reciente, también analizaron cómo la introducción de nanoquitosano (nCHS) en el PLA ocasionó diferencias en el grado de cristalinidad y en el diámetro de las fibras formadas con el PLA sin alterar las propiedades superficiales [67].

#### IV.2.2.2. Adhesión bacteriana en condiciones dinámicas sobre películas de ácido poliláctico en un entorno enriquecido con condiciones diabéticas

Los ensayos de adhesión en dinámico con sistemas enriquecidos con ambientes diabéticos mostraron una dinámica de adhesión muy reproducible para cada sistema.

Las gráficas de la adhesión en dinámico representan el número de bacterias adheridas por unidad de superficie (datos del orden de  $10^6 \cdot \text{bacterias}/\text{cm}^2$ ) en función del tiempo de adhesión. El alto número de puntos obtenidos permitió hacer un seguimiento muy preciso del proceso de “llenado” de la superficie.

Para analizar el comportamiento de los sistemas enriquecidos en los procesos de adhesión de esta tesis, se recurrió al trabajo de los profesores Henk Busscher y Henny van der Mei [68] (de la Universidad de Groningen, Holanda). Estos investigadores, pioneros en el estudio de la adhesión bacteriana en sistemas dinámicos han propuesto varias estrategias de análisis para estos procesos, utilizando en este trabajo dos de ellas:

La primera se basa en realizar una aproximación con todos los datos de la curva de adhesión. Este análisis tiene en cuenta el estado temporal de ocupación de la superficie, que a su vez es función de los cambios que experimenta en el tiempo la afinidad microorganismo–superficie ocupada. Muchos de estos sistemas siguen un comportamiento exponencial definido por la siguiente ecuación (24)

$$n(t) = n_{300} \left(1 - e^{-t/A}\right) \quad (24)$$

donde  $n_{300}$  es el número de bacterias adheridas al final del experimento,  $t$  el tiempo y  $A$  es el tiempo de adhesión característico del sistema e informa del

tiempo necesario para que  $n(t) = n_{300}$  si la velocidad inicial de llenado de la superficie fuese constante.

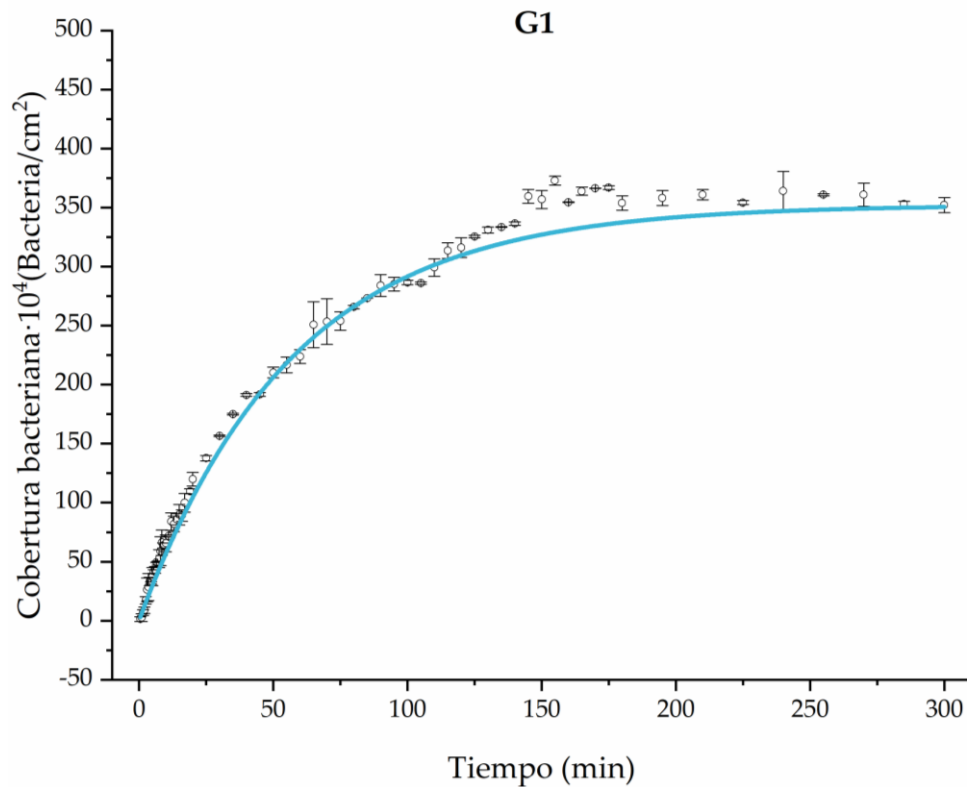
La segunda estrategia linealiza el primer tramo de la curva experimental  $n(t)$  y analiza la afinidad inicial bacteria-superficie a través de la tasa de adhesión inicial de adhesión ( $j_0$ ), que es la pendiente de dicho ajuste lineal. Además, se proporciona el número de bacterias adheridas cuando se alcanza la fase estacionaria de adhesión, es decir,  $n_e$ , siempre que este estado se consiga dentro del tiempo experimental. También resulta interesante evaluar la retención bacteriana en la superficie cuantificando el número final de bacterias adheridas tras el paso de una interfase líquido-aire y proporcionando una tasa de reducción-disminución bacteriana ( $D$ ).

#### **Primera estrategia de análisis: Aproximación exponencial**

Todas las curvas de adhesión se ajustaron a una exponencial creciente, según la ecuación (24). Un ejemplo de uno de los siete sistemas estudiados se muestra en la figura 4.18 donde se observa cómo la curva-ajuste describe bien los datos experimentales en casi todo el tramo temporal, desviándose ligeramente en la zona de inflexión de la curva, justo antes de la llegada al tramo estacionario. Conviene señalar que todas las curvas de adhesión experimentales aparecen en las figuras 4.19-25, no se incluyeron en este apartado para no duplicar información. El parámetro  $A$  de los ajustes, así como el valor  $n_{300}$  considerado en cada sistema, se especifica en las primeras dos columnas de la tabla 4.7.

El mayor número de bacterias adheridas tras 5 horas de adhesión ( $n_{300}$ ) se alcanzó en los sistemas control y GK2 (del orden de  $440 \cdot 10^4$  bacterias/cm<sup>2</sup>), en los demás casos se encontró aproximadamente un 20 % menos, siendo el menor valor para G2 ( $330 \pm 6 \cdot 10^4$  bacterias/cm<sup>2</sup>).





**Figura 4.18.** Ejemplo del ajuste exponencial del sistema enriquecido con 0,9 g·L<sup>-1</sup> de glucosa en el crecimiento y en la adhesión (G1).

El tiempo característico  $A$  indicó que el sistema sin enriquecimiento sería el que menos tiempo necesitaría ( $50,2 \pm 0,4$  minutos) para llegar a una densidad bacteriana igual a la obtenida al final del proceso de adhesión, si la velocidad de llenado inicial fuese constante. Muy cercanos a este tiempo se encontraron los valores calculados para los sistemas enriquecidos con la concentración de glucosa no patológica tanto sola como en el ambiente mixto (G1 y GK1). Sin embargo, en el resto de los ambientes el parámetro  $A$  fue mayor con respecto al sistema control, siendo máximo para GK2. Comparando los niveles de glucosa no patológicos con los de hiperglucemia, el proceso se vio ralentizado en G2 con relación al tiempo correspondiente para el sistema enriquecido con glucosa no patológica ( $A_{G2} > A_{G1}$ ). En el caso de los ambientes con cuerpos cetónicos se encontró un resultado diferente, donde el tiempo  $A$  fue similar y del orden de 72 minutos para los sistemas enriquecidos con las dos concentraciones de estos compuestos (K1 y K2). Por último, para los sistemas mixtos donde se encuentran la glucosa junto los cuerpos cetónicos, se obtuvieron valores de  $A$  diferentes en



función de las concentraciones de estos, pero se observó que el comportamiento de este ambiente se asemejó más al obtenidos en los sistemas enriquecidos sólo con glucosa. Es decir, en GK1 el tiempo característico  $A$  fue igual que en G1, y para GK2 este tiempo subió, como ocurría cuando se comparaba G2 con G1. Esto consiguió que el sistema con el mayor tiempo característico fuera el ambiente diabético completo, probablemente por una sinergia entre G2 y K2. Este hecho desfavoreció la colonización bacteriana inicial en el caso GK2 ya que, al aumentar el tiempo característico, se ralentizaría el recubrimiento bacteriano de la superficie.

**Tabla 4.7.** Parámetros obtenidos a partir de las dos estrategias de análisis de las curvas de adhesión: densidad bacteriana a los 300 min, ( $n_{300}$ ), tiempo característico del sistema en base al ajuste exponencial ( $A$ ), densidad bacteriana correspondiente al estado estacionario ( $n_e$ ), tasa inicial de adhesión durante los primeros 10 min ( $j_0$ ), tasa de adhesión al finalizar el experimento de adhesión ( $j_f$ ) y porcentaje de reducción-disminución ( $D$ ) en el número de bacterias adheridas a la superficie tras someterse a una interfase líquido-aire.

	Aproximación Exponencial		Aproximación por tramos			
	A (min)	$n_{300}$ ( $10^4$ ·bacteria / $cm^2$ )	$j_0$ ( $10^4$ ·bacteria / $cm^2$ ·min <sup>1</sup> )	$n_e$ ( $10^4$ ·bacteria / $cm^2$ )	$j_f$ ( $10^4$ ·bacteria / $cm^2$ ·min)	D (%)
<b>Control</b>	50,2 ± 0,4	439 ± 5	8,38 ± 0,14	-	0,18 ± 0,01	17,5 ± 0,6
<b>G1</b>	56,8 ± 0,1	352 ± 6	8,12 ± 0,23	358 ± 4	-	10 ± 3
<b>G2</b>	71,2 ± 0,5	330 ± 3	5,52 ± 0,17	326 ± 8	-	5,62 ± 0,05
<b>K1</b>	72,7 ± 0,8	386,3 ± 1,8	5,98 ± 0,16	387 ± 7	-	2 ± 3
<b>K2</b>	71,5 ± 0,1	386,6 ± 2,3	4,86 ± 0,09	383 ± 4	-	10 ± 1
<b>GK1</b>	58,3 ± 0,3	377,9 ± 1,9	5,32 ± 0,08	-	0,21 ± 0,05	8,6 ± 0,4
<b>GK2</b>	81,3 ± 0,6	445 ± 8	5,43 ± 0,05	-	1,25 ± 0,11	6,8 ± 0,6

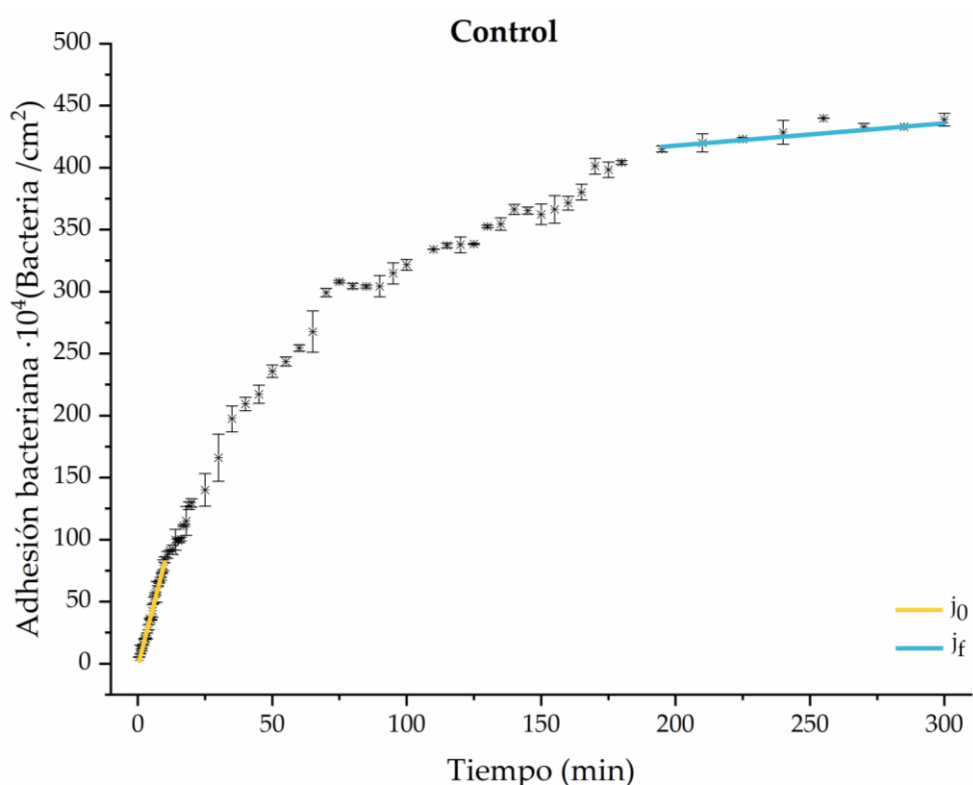
### Segunda estrategia de análisis: Aproximación por tramos

A través de la aproximación de las curvas de adhesión por tramos temporales también se obtuvo información del proceso de adhesión inicial. En el comienzo, los sistemas mostraron una tendencia lineal de adhesión durante, aproximadamente, los 10 primeros minutos, seguida de una subida exponencial

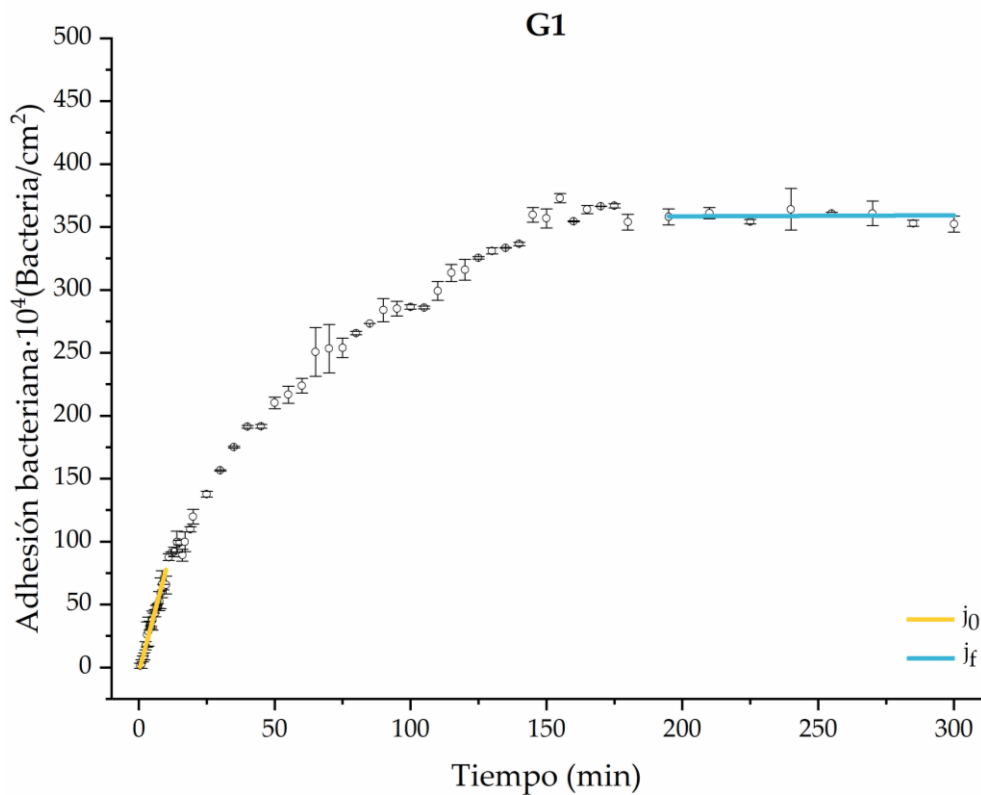
que daba paso, alrededor de los 180 min, a una fase estacionaria en algunos sistemas y, en otros, el comienzo de una nueva etapa de colonización.

Las figuras 4.19-25 muestran las curvas del número de bacterias adheridas en función del tiempo de adhesión para cada uno de los sistemas estudiados. Además, la información cuantitativa obtenida a partir de dichas gráficas está recogida en la tabla 4.7 (cuatro últimas columnas). En estas columnas se observan las tasas iniciales de adhesión ( $j_0$ ), el número de bacterias adheridas en el estado estacionario ( $n_e$ ), siempre que se consiga este estado y, en caso contrario, se presenta la tasa-velocidad de adhesión al comienzo de la nueva etapa de colonización, que corresponde con el final de la curva de adhesión ( $j_f$ ). Aparece también el porcentaje de reducción-disminución ( $D$ ) en el número de bacterias adheridas tras el paso de una interfase líquido-aire.

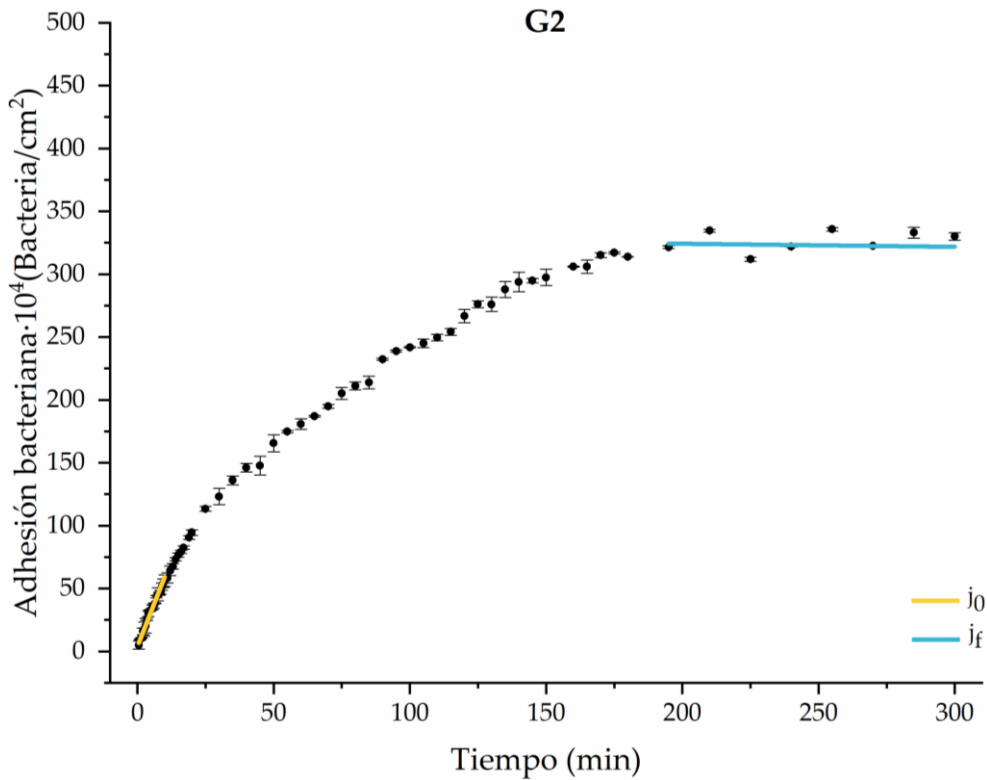
Los comportamientos adhesivos dependen en muchas ocasiones del tipo de material que se enfrente a las bacterias. Por ejemplo, en trabajos previos del grupo se ha visto que la curva de adhesión a materiales metálicos, como el Ti6Al4V, presentó un comportamiento lineal en casi todo el rango de tiempo estudiado, no siendo fácil encontrar estados estacionarios de adhesión [69].



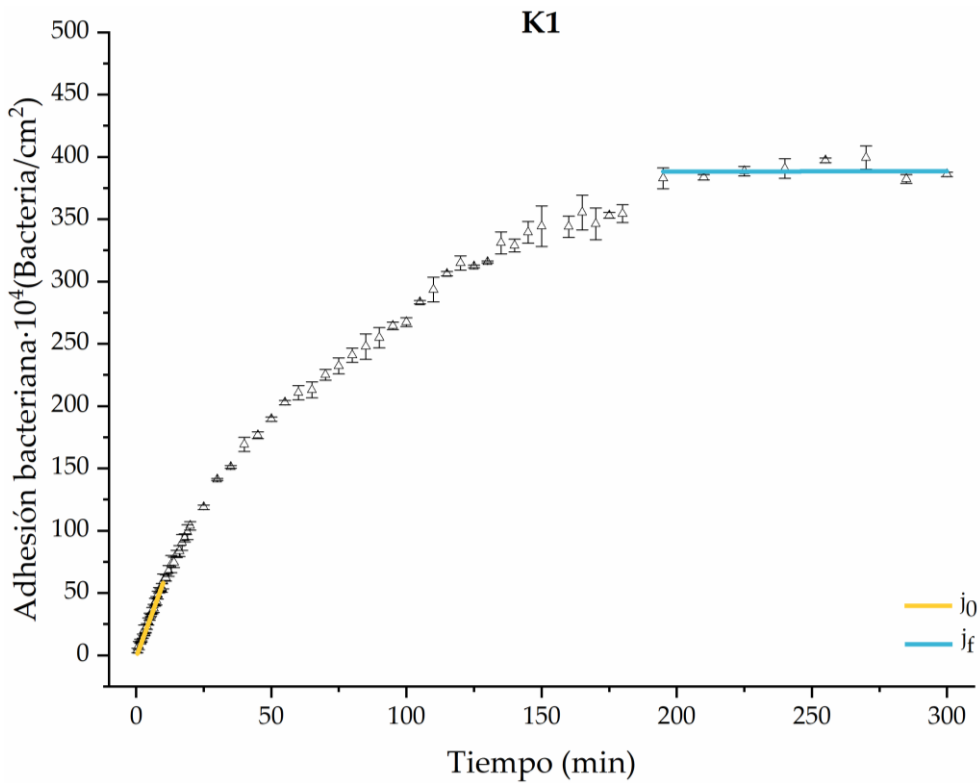
**Figura 4.19.** Estudio por tramos de la evolución de la adhesión bacteriana sobre PLA control (sin enriquecimiento diabético en el crecimiento ni en la adhesión).



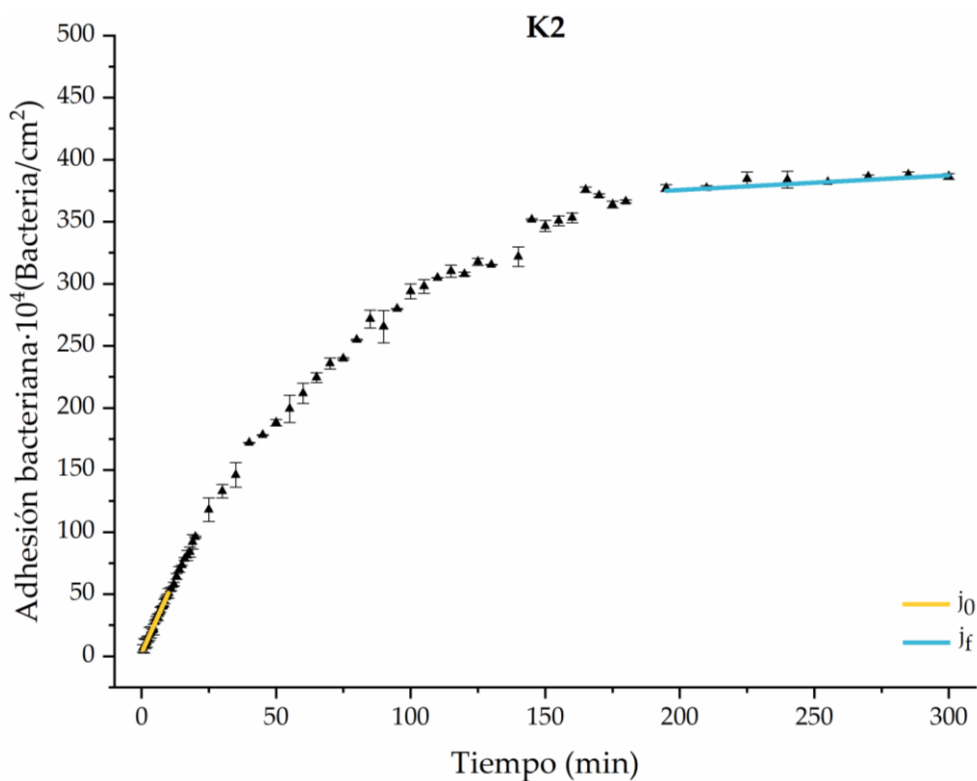
**Figura 4.20.** Estudio por tramos de la evolución de la adhesión bacteriana sobre PLA cuando se enriquece el crecimiento y la adhesión con 0,9 g·L<sup>-1</sup> de glucosa (G1).



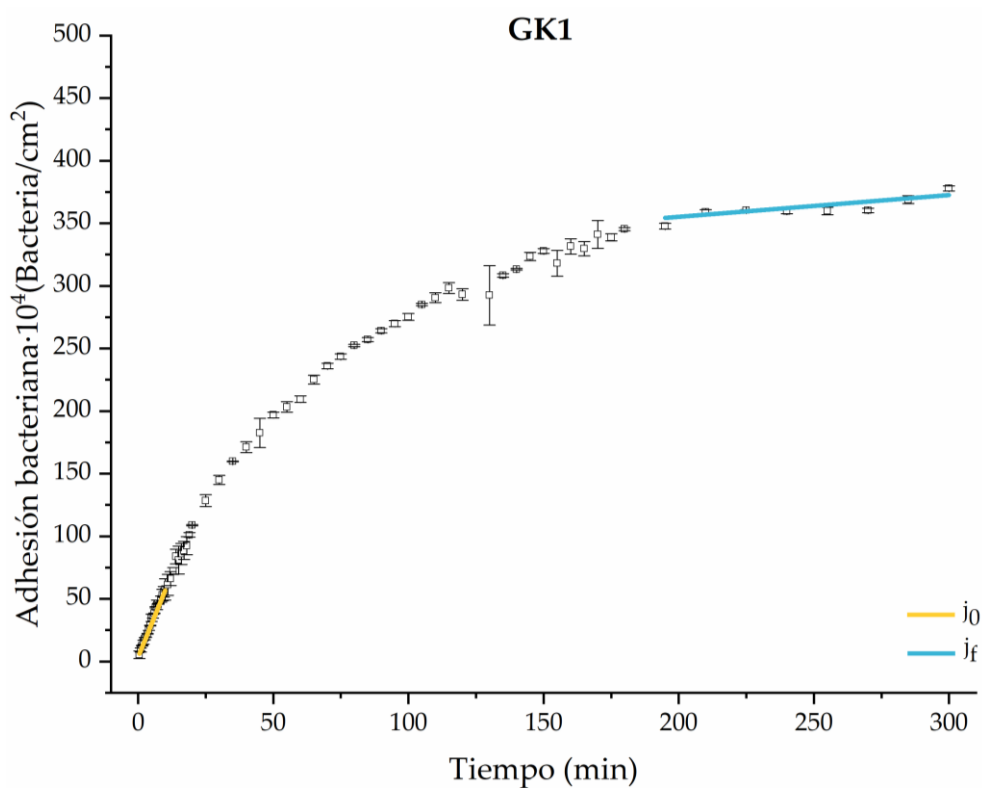
**Figura 4.21.** Estudio por tramos de la evolución de la adhesión bacteriana sobre PLA cuando se enriquece el crecimiento y la adhesión con 1,9 g·L<sup>-1</sup> de glucosa (G2).



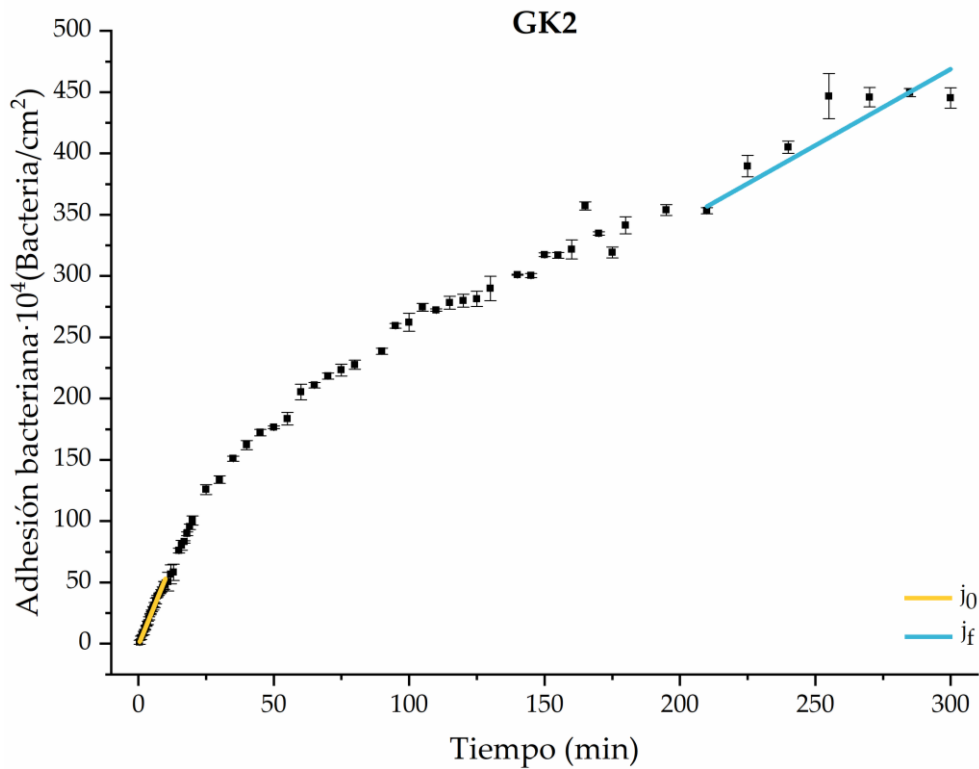
**Figura 4.22.** Estudio por tramos de la evolución de la adhesión bacteriana sobre PLA cuando se enriquece el crecimiento y la adhesión con 1 mmol·L<sup>-1</sup> de cuerpos cetónicos (K1).



**Figura 4.23.** Estudio por tramos de la evolución de la adhesión bacteriana sobre PLA cuando se enriquece el crecimiento y la adhesión con 9 mmol·L<sup>-1</sup> de cuerpos cetónicos (K2).



**Figura 4.24.** Estudio por tramos de la evolución de la adhesión bacteriana sobre PLA cuando se enriquece el crecimiento y la adhesión con 0,9 g·L<sup>-1</sup> de glucosa y 1 mmol·L<sup>-1</sup> de cuerpos cetónicos (GK1).



**Figura 4.25.** Estudio por tramos de la evolución de la adhesión bacteriana sobre PLA cuando se enriquece el crecimiento y la adhesión con  $1,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glucosa y  $9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de cuerpos cetónicos (GK2).

En el sistema control sin enriquecimiento o enriquecido con una concentración no patológica de glucosa (G1) se obtuvieron las tasas iniciales de adhesión más altas, siendo  $j_{0-c} = 8,38 \pm 0,14 \cdot 10^4 \text{ bacterias}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$  y  $j_{0-G1} = 8,12 \pm 0,24 \cdot 10^4 \text{ bacterias}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$  respectivamente. Estos resultados están de acuerdo con los valores obtenidos de los tiempos característicos ( $A$ ) en dichos ambientes, los cuales fueron los más bajos de todos los sistemas en la aproximación exponencial. A pesar de esta similitud inicial entre el sistema control y G1, a partir de 180 min de adhesión (figuras 4.19 y 4.20), se encontró un comportamiento diferente, ya que el sistema Control no alcanzó un número estacionario de bacterias, mientras que G1 sí ( $n_e = 358 \pm 4 \cdot 10^4 \text{ bacterias}/\text{cm}^2$ ).

En el caso de las bacterias expuestas a hiperglucemia (G2), la figura 4.22 y la tabla 4.7 muestran que la afinidad inicial bacteria-superficie fue menor que en el

#### IV. Resultados y Discusión

caso de G1 ( $j_{0-G2} = 5,52 \pm 0,17 \cdot 10^4 \text{ bacterias/cm}^2 \cdot \text{min}$ ) de acuerdo con el comportamiento indicado con el parámetro **A**. Sin embargo, esta tendencia lineal inicial se mantuvo durante más tiempo en G2 que en G1, hasta aproximadamente 10 min más de adhesión. Por otro lado, el ambiente hiperglucémico consiguió un estado estacionario de adhesión con un número promedio de bacterias adheridas al final del experimento de  $326 \pm 8 \cdot 10^4 \text{ bacterias/cm}^2$ , el más bajo de todos los casos estudiados.

Los sistemas enriquecidos con únicamente cuerpos cetónicos (figuras 4.23 y 4.24, tabla 4.7) tuvieron tasas iniciales de adhesión menores que el control, siendo  $5,98 \pm 0,16 \cdot 10^4 \text{ bacterias/cm}^2 \cdot \text{min}$  para el ambiente K1 y  $4,86 \pm 0,09 \cdot 10^4 \text{ bacterias/cm}^2 \cdot \text{min}$  para el K2, y ambos alcanzaron estados estacionarios de adhesión con un número de bacterias aproximado de  $380 \cdot 10^4 \text{ bacterias/cm}^2$ .

En el caso de los sistemas enriquecidos con los dos componentes, glucosa y cuerpo cetónico, se observaron comportamientos similares en el último tramo de adhesión, donde como hemos indicado existe un segundo proceso de colonización después de los 180 min. En la superficie sometida a la condición GK2, el segundo proceso de colonización comenzó de una forma muy marcada, con una tasa de adhesión  $j_{f-GK2} = 1,25 \pm 0,11 \cdot 10^4 \text{ bacterias/cm}^2 \cdot \text{min}$ , muy superior a la observada para el control y para GK1. Este hecho podría ayudar a entender por qué en las condiciones patológicas asociadas a la diabetes, sería muy difícil erradicar cualquier infección, ya que la colonización bacteriana estaría lejos de alcanzar un estado estacionario con un número “controlado” de bacterias adheridas. La tasa  $j_{f-GK2}$  fue la responsable de que en este sistema el número de bacterias adheridas a los 300 min fuera el más alto de todos los estudiados ( $n_{300} = 445 \pm 8 \cdot 10^4 \text{ bacterias/cm}^2$ ), a pesar de ser un sistema que arranca con una velocidad de adhesión baja ( $j_{0-GK2} = 5,53 \pm 0,05 \cdot 10^4 \text{ bacterias/cm}^2 \cdot \text{min}$ ).

El paso de una interfase líquido-aire al finalizar los procesos de adhesión arrojó información en cuanto a qué suplemento tiene más/menos capacidad para promover la fijación de bacterias a la superficie. Hay autores que han indicado que, además de las propiedades de la superficie de las bacterias y del sustrato, esta retención depende de la velocidad de paso de la interfase [70]. Los resultados, en cualquier caso, son comparativos si se mantiene la cinética de la interfase y, por tanto, los datos proporcionados son representativos de la fortaleza de la adhesión bacteria-sustrato. Resulta interesante observar que en el sistema control, sin suplemento, las bacterias fueron las que menos fijación tuvieron con la superficie. La adición de cualquier suplemento aumentó la retención bacteriana, encontrando la mayor fijación para las bacterias dentro del sistema K1. El resto de los valores estuvieron muy condicionados por la cantidad y el tipo de suplemento.

Los diferentes comportamientos adhesivos observados en los ambientes diabéticos seleccionados no deben estar ocasionados por un único factor, sino que deben ser consecuencia de una interrelación de diferentes mecanismos. Como hemos visto en la sección anterior, las bacterias crecidas en medios enriquecidos con glucosa, independientemente de la concentración introducida, aumentaron su hidrofobicidad ( $R \approx 48\%$ ) y, también, el valor absoluto de su potencial zeta negativo ( $\zeta \approx -48\text{ mV}$ ), con respecto a las bacterias cultivadas en el medio control ( $R \approx 7\%$  y  $\zeta \approx -38\text{ mV}$ ). Teniendo en cuenta que, desde un punto de vista teórico, una mayor hidrofobicidad bacteriana está asociada a una mayor adhesión a superficies hidrófobas, como es el caso del PLA, y que, una mayor carga negativa superficial implica más repulsión eléctrica entre superficies electronegativas, resulta complicado hacer una predicción teórica de lo que puede ocurrir en el caso de la suplementación con glucosa ya que las bacterias expuestas a glucosa aumentan su hidrofobicidad y, de forma simultánea, aumentan su carga eléctrica superficial negativa. De hecho, G1 y G2 se comportan



de forma muy diferente a pesar de que las bacterias en estas condiciones tienen propiedades físicas muy similares.

Algo parecido ocurrió en los sistemas enriquecidos con cuerpos cetónicos. En estos casos las bacterias cultivadas con K1 y K2, adquirieron valores de hidrofobicidad de alrededor el 77 %, y únicamente cambió su potencial zeta (-19 mV) respecto al control en el ambiente de cetoacidosis, K2. Este cambio en la carga eléctrica superficial teóricamente debe ser muy favorable en términos de adhesión, ya que la superficie de la bacteria se hace menos negativa. Sin embargo, no se encontró experimentalmente un mejor comportamiento adhesivo en este sistema, ni en las tasas iniciales de adhesión, ni en la densidad bacteriana de la superficie en la fase estacionaria.

Únicamente en el caso patológico GK2, un ambiente de hiperglucemia y de cetoacidosis combinado, la alta hidrofobicidad encontrada para las bacterias (82 %), junto con la reducción de la carga negativa superficial (-22 mV) parecieron guardar relación con la mayor inercia al llenado superficial a tiempos largos de adhesión.

La complejidad del comportamiento adhesivo de las bacterias también se encuentra en la bibliografía, cuando los microorganismos se someten a fluidos complejos como en esta tesis. Recientemente, Santore [71], en 2022, ha sugerido que las bacterias inmersas en un sistema dinámico de adhesión con un cizallamiento suave podrían verse más atraídas por la presencia de nutrientes en la suspensión que por la superficie de adhesión, debido al gradiente quimiotáctico. Esto podría explicar lo ocurrido con las bacterias en el sistema con concentraciones patológicas de glucosa, ya que en éste se presentaron tasas de adhesión más bajas y mayores tiempos de adhesión característicos,  $A$ , que en el sistema enriquecido con niveles de glucosa no patológicos. Asimismo, aunque las bacterias en el ambiente G2 generaron una adhesión baja con una

acumulación lenta, la fuerza de unión de las bacterias con el sustrato fue una de las mayores obtenida, con un porcentaje de reducción de  $5,62 \pm 0,05$  % (tabla 4.7). Los resultados de Boks *et al.* [72] están en la línea de nuestros resultados. Estos autores mostraron que las repulsiones electrostáticas en procesos de adhesión bacteriana originaron barreras energéticas que podían ser minimizadas a través de otros mecanismos como la disposición-orientación bacteriana [71], [72].

El enriquecimiento del medio de cultivo y el medio fisiológico de adhesión con cuerpos cetónicos, y su posible relación con procesos adhesivos, está poco presente en la bibliografía, pero diferentes autores están de acuerdo en que estos componentes no generan un ambiente cómodo para las bacterias [73].

El enriquecimiento con cuerpos cetónicos dio lugar a disminuciones de pH en las disoluciones adhesión (PBS), como ocurrió en los medios de cultivo enriquecidos con K1 y K2 estudiados en la sección anterior. Además, en la bibliografía se ha encontrado de forma detallada cómo la variación de pH u osmolaridad puede alterar los estados metabólicos y la fisiología de las bacterias [74]. Por otro lado, también existen investigaciones que indican variaciones posicionales de pH en el entorno de las bacterias. Por ejemplo, Russel *et al.* [75] describió cómo el pH cerca de las superficies negativas puede disminuir varios puntos con relación al pH del interior de la disolución. De igual modo, en el estudio de Kimkes *et al.* [74], se observó que el pH encontrado entre la bacteria (*E. coli*) y la superficie (óxido de silicio) fue más bajo cuanto más cerca de la superficie se midiera. Por ello, en una situación de cetoacidosis, donde la acidificación del ambiente ya es notable, encontraríamos que entre la bacteria inmersa en esta disolución y la superficie del PLA el pH podría ser varios puntos más ácido. Ante esta bajada, el estado metabólico, así como la membrana bacteriana, también podían sufrir alteraciones que afectarían directamente a la fuerza de adhesión bacteria sobre la superficie [30]. Luego, es probable que este

cambio de pH sea uno de los motivos por los que las bacterias sometidas a cetoacidosis tuvieron una menor fuerza de adhesión al PLA ( $D = 10 \pm 1 \%$ ).

Por otro lado, la hidrofobicidad superficial de las bacterias también parece ser un factor importante en la retención bacteriana a la superficie, aunque su papel en la adhesión aún no queda completamente definido. Por ejemplo, en el estudio Begic *et al.* [66] no se observó mayor adhesión en las bacterias más hidrófobas, debido a que estas poseían un carácter electrón donador mayoritario al igual que el sustrato utilizado, prediciendo una débil adhesión. Asimismo, también se han encontrado investigaciones que establecen relación entre una mayor retención de bacterias en las superficies con un aumento de la fuerza iónica, justificando tales cambios con la variación del potencial zeta de las bacterias y de los sustratos. El trabajo de Katsikogianni y Missirlis [76] se centró en realizar estudios de adhesión bacteriana mediante un modelo de colonización dinámico sobre vidrio funcionalizando con grupos metilo y amino autoensamblados en monocapas de alquilsilano. La colonización de dos cepas de *S. epidermidis* se estudió en medios con distinta fuerza iónica, concluyendo que el aumento de la fuerza iónica en la disolución incrementaba la adhesión, a través de la minimización de las interacciones repulsivas electrostáticas, como consecuencia de la compresión de las dobles capas eléctricas alrededor de las bacterias y la superficie de adhesión [76].

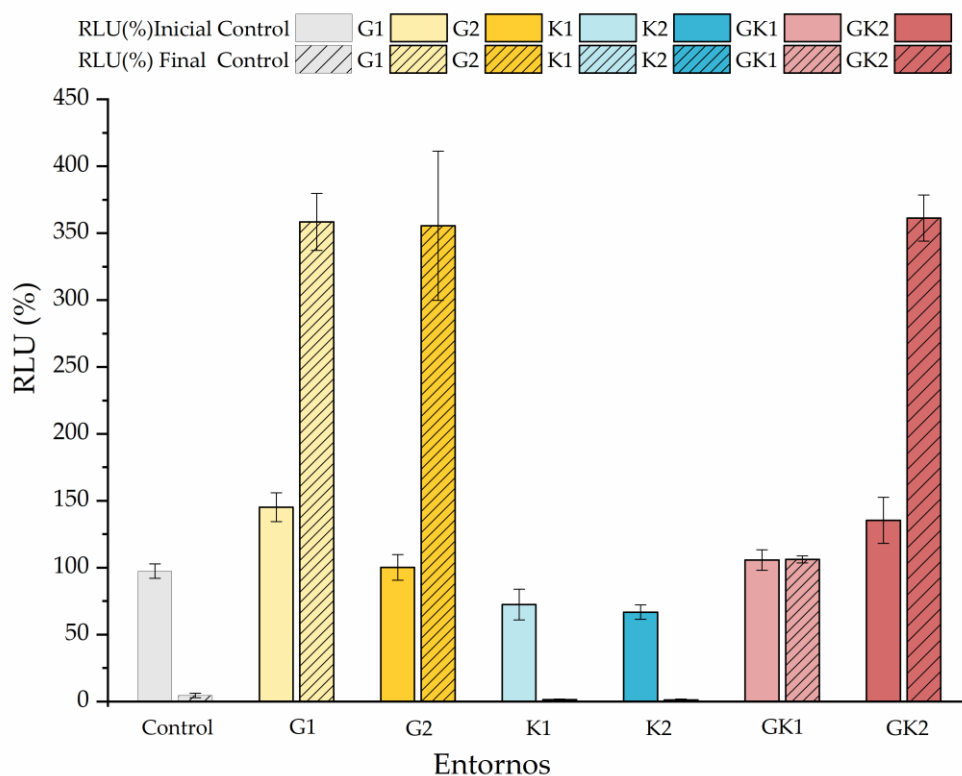
#### IV.2.2.3. Estado metabólico bacteriano en el proceso de adhesión en un entorno enriquecido con condiciones diabéticas

Hemos querido seguir profundizando en las posibles causas de los comportamientos adhesivos de las bacterias cuando éstas se someten a ambientes diabéticos. Para ello, uno de los ensayos realizados fue el estudio del estado metabólico de las bacterias al comienzo y al final del tiempo de adhesión. De modo que se examinó la cantidad relativa de ATP en las bacterias, de una manera

similar a la utilizada en los estudios de biocapas detallados en la *sección III.2.4.1* de esta tesis. Una vez crecidas las bacterias en los medios enriquecidos con los componentes diabéticos, se suspendieron en PBS enriquecido a una concentración del 63 % de transmitancia y se mantuvieron en una estufa a 37 °C durante 300 minutos, simulando la preparación y los parámetros seguidos para realizar los experimentos de adhesión con el modelo dinámico. Una vez pasado este tiempo, se extrajeron alícuotas de 600  $\mu\text{L}$  de cada sistema, echando 100  $\mu\text{L}$  por pocillos en una placa de microtitulación. A continuación, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de BacTiter-Glo a cada pocillo, y después de 5 minutos de incubación en oscuridad, se midió la luminiscencia emitida. La cantidad de luz relativa (RLU) detectada con este procedimiento se asocia directamente con el estado metabólico de las bacterias en cada sistema al final del proceso de adhesión.

La figura 4.26 muestra las medidas de las unidades relativas de luz (RLU) justo en el momento de poner en contacto las suspensiones de las bacterias con los suplementos diabéticos en PBS y después de 300 min de contacto. Los datos se muestran relativos a las unidades de luz de la bacteria cultivada y suspendida sin enriquecimiento, la denominada control, a la que se le asocia un valor de 100 %.

#### IV. Resultados y Discusión



**Figura 4.26.** Medida de las unidades relativas de luz (RLU %) de las bacterias antes y después de 300 min de contacto con PBS enriquecido con enriquecimiento diabéticos. Además, las bacterias también fueron cultivadas en dichos ambientes

Para los tiempos iniciales, aunque se encontraron diferencias en el estado metabólico bacteriano sometido a los distintos ambientes, ningún cambio fue tan importante como los obtenidos a los 300 min. Comenzando por los tiempos iniciales y las concentraciones correspondientes a individuos sanos, la actividad metabólica mayor se encontró cuando las bacterias se cultivaron y suspendieron en ambientes con niveles de glucosa no patológicos (G1:  $145 \pm 11$  % RLU), y la menor cuando se hizo en ambientes enriquecidos con cetónicos (K1:  $73 \pm 11$  % RLU). Además, siguiendo con los sistemas no patológicos, las bacterias del sistema mixto GK1 mostraron valores RLU similares al control (GK1:  $106 \pm 8$  % RLU). En el caso de los ambientes con concentraciones patológicas, para las bacterias del sistema G2 se midió una actividad metabólica igual que la del control ( $100 \pm 10$  % RLU), pero para las bacterias con cetoacidosis se halló una menor (K2:  $67 \pm 5$  % RLU) con respecto al control. El único caso en el

que las bacterias tuvieron una actividad metabólica mayor que en el control fue utilizando un ambiente mixto diabético (GK2:  $135 \pm 17$  % RLU).

Al finalizar el tiempo de adhesión, es decir, a los 300 min, el ATP medido en el sistema control y en los medios suplementados con cetónicos fue prácticamente nulo, indicando la ausencia de actividad metabólica en estos casos. El sistema GK1 no mostró cambios con relación a su valor a tiempo cero, pero los sistemas con glucosa, G1 y G2, y el sistema combinado GK2 mostraron un extraordinario aumento en su actividad metabólica, en relación a su estado inicial, encontrando incrementos de 147 % (G1), 255 % (G2) y 167 % (GK2). Únicamente en el caso de GK2 este aumento en la actividad metabólica de las bacterias, junto con sus cambios físicos superficiales favorables con relación a la adhesión, pueden justificar la peligrosa inercia adhesiva observada en las etapas finales de adhesión. Además, en este sistema mixto una de las características más significativas fue el bajo porcentaje de desprendimiento después de la interfase de aire-líquido ( $6,82 \pm 0,55$  %). Según Pan *et al.* [77] una capa de adhesión densa, como la generada por GK2, desarrollaría una estructura compacta que ayudaría a resistir las fuerzas de cizallamiento. Es muy probable que, en los otros casos de actividad metabólica marcada, es decir G1 y G2, la mayor repulsión eléctrica que mostró la superficie de la bacteria con el PLA fuese la responsable de “mantener” a estos dos sistemas con un comportamiento adhesivo moderado.

#### IV.2.2.4. Formación de biocapas sobre películas de ácido poliláctico en un entorno enriquecido con condiciones diabéticas

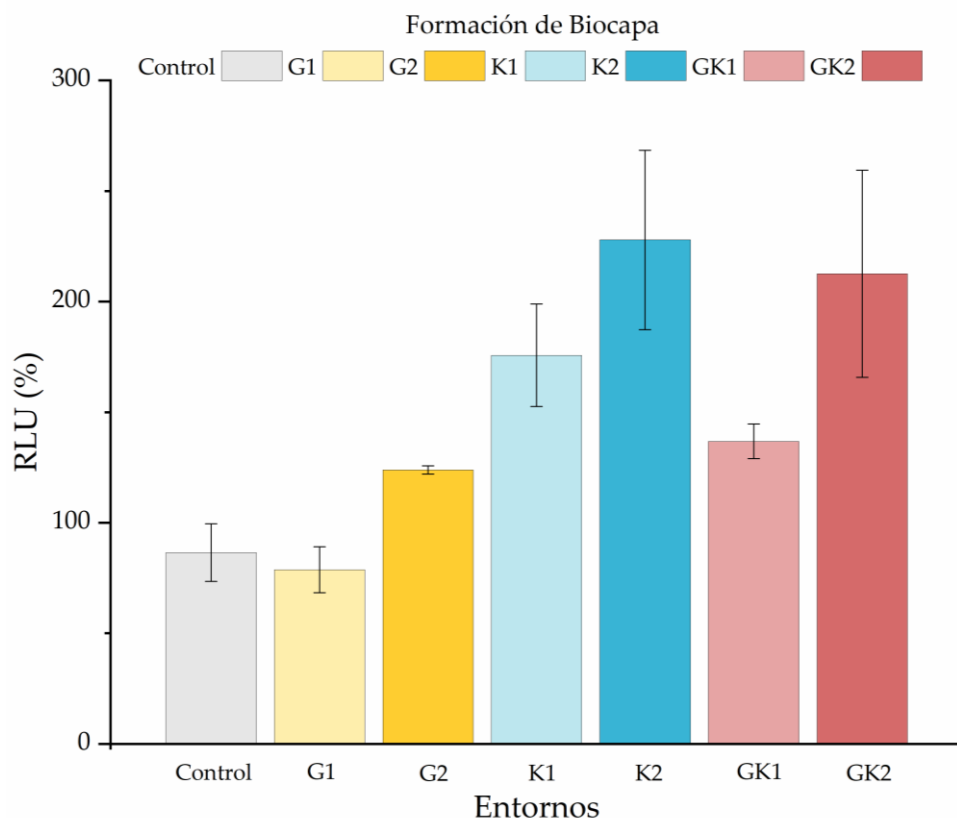
Además de las implicaciones que pueden tener los cambios metabólicos de las bacterias bajo un estado de estrés diabético en los procesos de adhesión en dinámico, también resulta conveniente conocer cómo estas bacterias pueden ser capaces de desarrollar biocapas sobre las superficies de PLA. Por esta razón, se

generaron biocapas sobre la superficie de PLA durante 24 horas, con un medio de cultivo enriquecido con los ambientes diabéticos ya utilizados.

Como hemos descrito en las secciones anteriores, para evaluar la creación de biocapa se utilizó el compuesto BacTiter-Glo, el cual permite cuantificar la biocapa midiendo la cantidad de ATP de las bacterias que se encuentran embebidas dentro de dicha biocapa. El procedimiento se describió en profundidad en la *sección III.2.4.1*.

La figura 4.27 muestra la cantidad de luz relativa obtenida con el luminómetro para todos los sistemas estudiados. En todos los casos se generaron biocapas sobre la superficie de PLA. La presencia de cualquier enriquecimiento, a excepción de G1, favoreció la formación de biocapa, y se debe señalar el efecto notable sobre la biocapa que ejercieron los cuerpos cetónicos, especialmente K2 ( $228 \pm 41 \%$ ). Este componente parece que fue el factor dominante en el aumento de la biocapa en el sistema GK2 ( $213 \pm 47 \%$ ).

Es interesante destacar los cambios que hemos visto en la actividad metabólica de las bacterias en estado planctónico, suspendidas en PBS, con la presencia de los suplementos diabéticos, y la actividad metabólica de las bacterias crecidas en el interior de una matriz-biocapa en presencia de los mismos componentes diabéticos. En este último caso, son los cuerpos cetónicos los que más favorecen la actividad metabólica dentro de la biocapa, mientras que en estado planctónico es la glucosa la que dispara la actividad metabólica, siendo prácticamente suprimida cuando los componentes cetónicos están únicamente presentes. Ambas informaciones deben ser complementarias para entender lo que puede ocurrir en un sistema real, donde las bacterias planctónicas son las que inicialmente colonizan una superficie y, posteriormente, son las bacterias adheridas las que acaban formando una biocapa.



**Figura 4.27.** Porcentaje de RLU obtenido de las biocapas relativizado al entorno sin enriquecimiento (control) para cada condición.

Estos resultados pueden ser un punto de partida en futuras investigaciones ya que, hasta donde hemos podido comprobar, no existen trabajos previos en relación con la influencia de los cuerpos cetónicos en la formación de biocapas, aunque sí está documentado el hecho de que un pH ácido puede potenciar su desarrollo. Esto ocurre porque la bajada de pH inhibe la producción de proteasas extracelulares [78], promueve la unión de proteínas de la matriz de la biocapa a las superficies celulares [79], [80] y estimula la formación de agregados microbianos. Sin embargo, como ya hemos mencionado en la sección anterior, existen estudios que relacionan la inhibición de la biocapa con la presencia de acetoacetato en bacterias Gram-negativas [64]. En el trabajo de Horne *et al.* [64] donde se estudió este efecto, la formación de biocapas se realizó sobre poliestileno, no sobre PLA y además la cantidad usada del cuerpo cetónico fue superior a la utilizada en este trabajo. Comparando con los resultados de esta tesis, la sobrexposición al acetoacetato, y la influencia de las características



superficiales de PLA pueden ser los causantes de la mayor formación de biocapa obtenida, comparando con los resultados obtenidos en Horne *et al.* [64].

En cuanto a la hiperglucemia, en la bibliografía se recoge que potencia la formación de biocapa, al igual que otros parámetros como la alcalinidad o presión osmótica [81]–[83]. En concreto, el estudio de Lade *et al.* [83] analizó el efecto de diferentes concentraciones de glucosa (0,5 % y 1 %) y NaCl añadidas al TSB en la formación de biocapas de diferentes cepas de *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y sensible a la meticilina (MSSA). Además, estos autores hicieron una caracterización genotípica y fenotípica de los aislados clínicos de *S. aureus* para determinar su influencia en la capacidad de formación de biocapas. Sus resultados mostraron que la suplementación con glucosa favoreció la formación de biocapas de todas las cepas analizadas y que la velocidad de formación dependía de la cepa utilizada. En el estudio de Lee *et al.* [84] se investigó la formación de biocapas de *S. aureus* sobre la superficie de diversos materiales enriqueciendo el TSB con glucosa al 1 % [84]. Estos autores mostraron cómo la formación de biocapa en entornos hiperglucémicos dependía en gran parte de las propiedades del sustrato, como la rugosidad, la humectabilidad o la hidrofobicidad [84]. También, el aumento en la formación de biocapa provocado por la hiperglucemia puede estar asociado a la disminución del pH del medio. Como se indicó en la sección anterior, el pH del medio GK2 presenta una disminución después de 24 horas de crecimiento bacteriano, relacionado con el metabolismo de la glucosa [85]. Como hemos mencionado anteriormente, esta bajada de pH en el entorno favorecería la formación de biocapa [81], [83], a pesar de que la presencia de altas concentraciones de glucosa provoque la inhibición de los sistemas de comunicación entre bacterias, específicamente el *agr* (gene accesorio regulador) [86]. Este sistema de comunicación QS es el encargado de introducir factores de virulencia, como adhesinas y otras proteínas de unión, que promueven la adhesión a las superficies. En concreto, varias investigaciones han

revelado que la formación de biocapa se potencia a pH 6, que es el obtenido en los medios de cultivo GK2 [81], [87].

El conjunto de los datos mostrados en esta investigación indica que la colonización de *S. aureus* de la superficie de PLA en presencia de componentes diabéticos como es la glucosa y/o cuerpos cetónicos no está asociada a un único factor, sino que es un proceso en el que se ponen en juego las propiedades de la superficie de la bacteria, del sustrato y del medio en el que se lleva a cabo el proceso de colonización. En cualquier caso, se ha puesto de manifiesto que cuando aparecen concentraciones patológicas de glucosa y cetónicos (GK2) los resultados de los diferentes ensayos apuntan hacia una mayor patogenicidad de las bacterias. Lejos de conseguir un estado estacionario de adhesión, el sistema GK2 activa un segundo proceso adhesivo justo antes de finalizar el tiempo de adhesión, motivado por un estado metabólico muy activo de las bacterias en este momento. Además, tras 24 h, GK2 dispara la formación de biocapa en un 200 %, aproximadamente, en relación a un sistema sin enriquecimientos diabéticos.

### IV.3. Bibliografía

- [1] J. Yang, J. Bei, y S. Wang, "Enhanced cell affinity of poly (d,l-lactide) by combining plasma treatment with collagen anchorage," *Biomaterials*, (2002), 23(12), pp. 2607–2614.
- [2] K. Cai, K. Yao, Y. Cui, Z. Yang, X. Li, H. Xie, T. Qing, y L Gao, "Influence of different surface modification treatments on poly(d,l-lactic acid) with silk fibroin and their effects on the culture of osteoblast in vitro," *Biomaterials*, (2002), 23(7), pp. 1603–1611.
- [3] O. C. Onder, M. A. Nazeer, E. Yilgör, Y I. Yilgör, "Spontaneous formation of microporous poly(lactic acid) coatings," *Prog. Org. Coatings*, (2018) 125, pp. 249–256.
- [4] J. Li, Z. Li, L. Ye, X. Zhao, P. Coates, y F. Caton-Rose, "Structure and biocompatibility improvement mechanism of highly oriented poly(lactic acid) produced by solid die drawing," *Eur. Polym. J.*, (2017), 97, pp. 68–76.
- [5] Z. Li, X. Zhao, L. Ye, P. Coates, F. Caton-Rose, y M. Martyn, "Fibrillation of chain branched poly (lactic acid) with improved blood compatibility and bionic structure," *Chem. Eng. J.*, (2015), 279, pp. 767–776.
- [6] T. Paragkumar N, D. Edith, y J. L. Six, "Surface characteristics of PLA and PLGA films," *Appl. Surf. Sci.*, (2006), 253(5), pp. 2758–2764.
- [7] C. J. van Oss, "Interfacial forces in aqueous media" (2006), pp. 1–438, CRC Press.

- [8] I. B. Gomes, M. Simões, y L. C. Simões, "The effects of sodium hypochlorite against selected drinking water-isolated bacteria in planktonic and sessile states," *Sci. Total Environ.*, (2016), 565, pp. 40–48.
- [9] Z. Kolská, N. S. Kasálková, J. Siegel, y V. Švorčík, "Electrokinetic Potential for Characterization of Nanostructured Solid Flat Surfaces," *J. Nano Res.*, (2013), 25, pp. 31–39.
- [10] K. Bastekova, O. Guselnikova, P. Postnikov, R. Elashnikov, M. Kunes, Z. Kolska, V. Švorčík, y O. Lyutakov, "Spatially selective modification of PLLA surface: From hydrophobic to hydrophilic or to repellent," *Appl. Surf. Sci.*, (2017), 397, pp. 226–234.
- [11] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, y T. Yamamuro, "Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3," *J. Biomed. Mater. Res.*, (1990), 24(6), pp. 721–734.
- [12] Z. X. Meng, H. F. Li, Z. Z. Sun, W. Zheng, y Y. F. Zheng, "Fabrication of mineralized electrospun PLGA and PLGA/gelatin nanofibers and their potential in bone tissue engineering," *Mater. Sci. Eng. C*, (2013), 33(2), pp. 699–706.
- [13] R. Zhang and X. P. Ma, "Porous poly(L-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 45, no. 4, pp. 285–293, May 1999.
- [14] X. Li, C. Qi, L. Han, C. Chu, J. Bai, C. Guo, F. Xue, B. Shen y P. K. Chu, "Influence of dynamic compressive loading on the in vitro degradation behavior of pure PLA and Mg/PLA composite," *Act. Biomat.*, (2017), 64, pp. 269–278.

- [15] E. Babaie, B. Lin, V. K. Goel, y S. B. Bhaduri, "Evaluation of amorphous magnesium phosphate (AMP) based non-exothermic orthopedic cements," *Biomed. Mater.*, (2016), 11(5), p. 055010.
- [16] E. Babaie, Y. Ren, y S. B. Bhaduri, "Microwave sintering of fine grained MgP and Mg substitutes with amorphous tricalcium phosphate: Structural, and mechanical characterization," *J. Mater. Res.*, (2016), 31(8), pp. 995–1003.
- [17] C. Combes y C. Rey, "Amorphous calcium phosphates: Synthesis, properties and uses in biomaterials," *Acta Biomater.*, (2010), 6(9), pp. 3362–3378.
- [18] F. Tamimi, D. Le Nihouannen, D. C. Bassett, S. Ibasco, U. Gbureck, J. Knowles, A. Wright, A. Flynn, S. V. Komarova, J. E. Barralet, "Biocompatibility of magnesium phosphate minerals and their stability under physiological conditions," *Acta Biomater.*, (2011), 7(6), pp. 2678–2685.
- [19] A. S. Gnedenkov, S. L. Sinebryukhov, V. S. Filonina, N. G. Plekhova, y S. V. Gnedenkov, "Smart composite antibacterial coatings with active corrosion protection of magnesium alloys," *J. Magnes. Alloy.*, (2022), 10(12), pp. 3589–3611.
- [20] V. Luque-Agudo, M. C. Fernández-Calderón, M. A. Pacha-Olivenza, C. Pérez-Giraldo, A. M. Gallardo-Moreno, y M. L. González-Martín, "The role of magnesium in biomaterials related infections," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, (2020), 191, pp. 110996.
- [21] X. Shen, , Y. Zhang, P. Ma, L. Sutrisno, Z. Luo, Y. Hu, Y. Yu, B. Tao, C. Li, y K. Cai "Fabrication of magnesium/zinc-metal organic framework on

- titanium implants to inhibit bacterial infection and promote bone regeneration," *Biomaterials*, (2019), 212, pp. 1–16.
- [22] M. Ma, M. Zhao, H. Deng, Z. Liu, L. Wang, y L. Ge, "Facile and versatile strategy for fabrication of highly bacteriostatic and biocompatible SLA-Ti surfaces with the regulation of Mg/Cu coimplantation ratio for dental implant applications," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, (2023), 23, pp. 113180.
- [23] J. Rodríguez-Sánchez, M. Á. Pacha-Olivenza, y M. L. González-Martín, "Bactericidal effect of magnesium ions over planktonic and sessile *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli*," *Mater. Chem. Phys.*, (2019), 221, pp. 342–348.
- [24] M. A. Goldberg, V. V. Smirnov, P. A. Krokhicheva, S. M. Barinov, y V. S. Komlev, "The Creation and Application Outlook of Calcium Phosphate and Magnesium Phosphate Bone Cements with Antimicrobial Properties (Review)," *Inorg. Mater. Appl. Res.*, (2001), 12(1), pp. 195–203.
- [25] M. Katsikogianni, Y. F. Missirlis, L. Harris, y J. Douglas, "Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions," *Eur. Cells Mater.*, (2004), 8, pp. 37–57.
- [26] A. M. Gallardo-Moreno, M. L. Navarro-Pérez, V. Vadillo-Rodríguez, J. M. Bruque, y M. L. González-Martín, "Insights into bacterial contact angles: Difficulties in defining hydrophobicity and surface Gibbs energy," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, (2011), 88(1), pp. 373–380.

- [27] M. Hierro-Oliva, V. Luque-Agudo, A. M. Gallardo-Moreno, y M. L. González-Martín, "Characterization of Magnesium-Polylactic Acid Films Casted on Different Substrates and Doped with Diverse Amounts of CTAB," *Molecules*. (2021) 26(16), pp. 4811.
- [28] A. M. Gallardo-Moreno, V. Luque-Agudo, M. L. González-Martín, y M. Hierro-Oliva, "Micro-structured and self-assembled patterns in PLA-cast films as a function of CTAB content, magnesium and substratum hydrophobicity," *Appl. Surf. Sci.*, (2022), 597, pp. 153676.
- [29] A. Abram, A. Zore, U. Lipovž, A. Košak, M. Gavras, Ž. Boltežar, y K. Bohinc, "Bacterial Adhesion on Prosthetic and Orthotic Material Surfaces," *Coatings* (2021), 11(12), pp. 1469.
- [30] A. H. Hogt, J. Dankert, y J. Feijen, "Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* to a hydrophobic biomaterial," *J. Gen. Microbiol.*,(1985), 131(9), pp. 2485–2491.
- [31] R. Oliveira, J. Azeredo, P. Teixeira, y A. P. Fonseca, "The role of hydrophobicity in bacterial adhesion." En P. Gilbert, D. Allison, M. Brading, J. Verran y J. Walker (Eds). *Biofilm Community Interactions: Chance or Necessity?* Cardiff (2001), pp.11-22, Bioline.
- [32] G. G. Sankar, P. S. Murthy, A. Das, S. Sathya, R. Nankar, V. P. Venugopalan, y M. Doble, "Polydimethyl siloxane based nanocomposites with antibiofilm properties for biomedical applications," *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, (2017), 105(5), pp. 1075–1082.

- [33] J. Azeredo, A. P. Pacheco, I. Lopes, R. Oliveira, y M. J. Vieira, "Monitoring cell detachment by surfactants in a parallel plate flow chamber," *Water Sci. Technol.*, (2003), 47(5), pp. 77–82.
- [34] G. McDonnell y A. D. Russell, "Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance," *Clin. Microbiol. Rev.*, (1999), 12(1), pp. 147.
- [35] R. Briandet, T. Meylheuc, C. Maher, y M. N. Bellon-Fontaine, "Listeria monocytogenes Scott A: Cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions," *Appl. Environ. Microbiol.*, (1999), 65(12), pp. 5328–5333.
- [36] W. Cullmann y H. Schlunegger, "Influence of exogenous factors and antibiotics on the cytoplasmic membrane proteins of *Staphylococcus aureus*," *Chemotherapy*, (1992), 38(4), pp. 211–217.
- [37] R. El Othmany, H. Zahir, C. Zanane, M. El Louali, y H. Latrache, "Influence of consistency and composition of growth medium on surface physicochemical properties of streptomyces," *J. Pure Appl. Microbiol.*, (2021), 15(3), pp. 1705–1715.
- [38] J. D. Oliver, "The viable but nonculturable state in bacteria," *J. Microbiol.*, (2005), 43, pp. 93–100.
- [39] S. Sathya, P. S. Murthy, V. D. Devi, A. Das, B. Anandkumar, V. Sathyaseelan, M. Doble, y V. Venugopalan, "Antibacterial and cytotoxic assessment of poly (methyl methacrylate) based hybrid nanocomposites," *Mater. Sci. Eng. C*, (2019), 100, pp. 886–896.



- [40] J. Du, Y. Li, J. Wang, C. Wang, D. Liu, G. Wang, y S. Liu, "Mechanically Robust, Self-Healing, Polymer Blends and Polymer/Small Molecule Blend Materials with High Antibacterial Activity," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, (2020), 12(24), pp. 26966–26972.
- [41] A. Ferrandez-Montero, M. Lieblich, R. Benavente, J. L. González-Carrasco, y B. Ferrari, "New approach to improve polymer-Mg interface in biodegradable PLA/Mg composites through particle surface modification," *Surf. Coatings Technol.*, (2020), 383, pp. 125285.
- [42] S. W. Lee, K. S. Phillips, H. Gu, M. Kazemzadeh-Narbat, y D. Ren, "How microbes read the map: Effects of implant topography on bacterial adhesion and biofilm formation," *Biomaterials*, (2021), 268, pp. 120595.
- [43] A. K. Meinshausen, M. Herbster, C. Zwahr, M. Soldera, A. Müller, T. Halle, A. F. Lasagni, y J. Bertrand, "Aspect ratio of nano/microstructures determines Staphylococcus aureus adhesion on PET and titanium surfaces," *J. Appl. Microbiol.*, (2021), 131(3), pp. 1498–1514.
- [44] S. Wu, B. Zhang, Y. Liu, X. Suo, y H. Li, "Influence of surface topography on bacterial adhesion: A review," *Biointerphases*, (2018), 13(6), pp. 060801.
- [45] A. Francone, S. Merino, A. Retolaza, J. Ramiro, S. A. Alves, J. V. de Castro, N. M. Neves, A. Arana, J. M. Marimon, y C. M. S. Torres "Impact of surface topography on the bacterial attachment to micro- and nano-patterned polymer films," *Surfaces and Interfaces*, (2021), 27, pp. 101494.
- [46] K. Wojciechowski, M. Kaczorowski, J. Mierzejewska, y P. Parzuchowski, "Antimicrobial dispersions and films from positively charged styrene and

- acrylic copolymers," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, (2018), 172, pp. 532–540.
- [47] R. T. Ribeiro, C. N. Galvão, Y. P. Betancourt, B. I. Mathiazzi, y A. M. Carmona-Ribeiro, "Microbicidal Dispersions and Coatings from Hybrid Nanoparticles of Poly (Methyl Methacrylate), Poly (Diallyl Dimethyl Ammonium) Chloride, Lipids, and Surfactants," *Int. J. Mol. Sci.*, (2019), 20(24), pp. 6150.
- [48] A. F. Naves, R. R. Palombo, L. D. M. Carrasco, y A. M. Carmona-Ribeiro, "Antimicrobial particles from emulsion polymerization of methyl methacrylate in the presence of quaternary ammonium surfactants," *Langmuir*, (2013), 29(31), pp. 9677–9684.
- [49] H. Oknin, D. Steinberg, y M. Shemesh, "Magnesium ions mitigate biofilm formation of *Bacillus* species via downregulation of matrix genes expression," *Front. Microbiol.*, (2015), 6, pp. 152869.
- [50] B. Song y L. G. Leff, "Influence of magnesium ions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*," *Microbiol. Res.*, (2006), 161(4), pp. 355–361.
- [51] F. Reffuveille, J. Josse, F. Velard, F. Lamret, J. Varin-Simon, M. Dubus, E. F. Haney, R. Hancock, C. Mongaret, y S. C. Gangloff, "Bone environment influences irreversible adhesion of a methicillin-susceptible staphylococcus aureus strain," *Front. Microbiol.*, (2018), 9, pp. 400406.
- [52] M. C. Fernández-Calderón, D. Romero-Guzmán, A. Ferrández-Montero, C. Pérez-Giraldo, J. L. González-Carrasco, M. Lieblich, R. Benavente, B. Ferrari, M. L. González-Martín, y A. M. Gallardo-Moreno, "Impact of

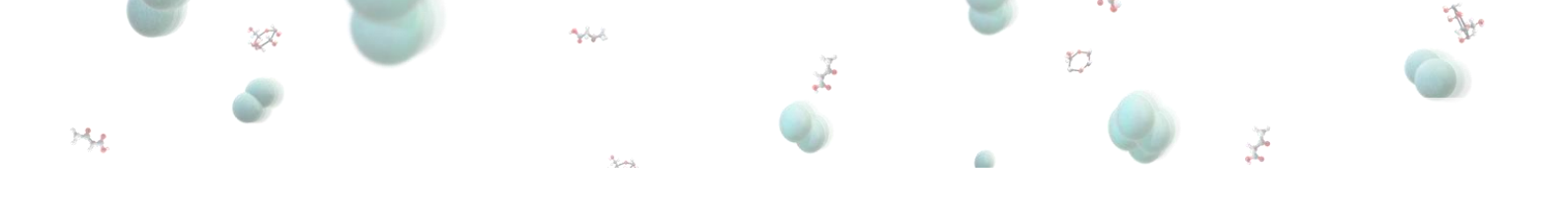
- PLA/Mg films degradation on surface physical properties and biofilm survival," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, (2020), 185, pp. 110617.
- [53] Y. Xie, J. Chen, A. Xiao, y L. Liu, "Antibacterial Activity of Polyphenols: Structure-Activity Relationship and Influence of Hyperglycemic Condition," *Molecules*. (2017), 22(11), pp. 1913.
- [54] G. F. Cahill, "Fuel Metabolism in Starvation," *Annu. Rev. Nutr.*, (2006), 26(1), pp. 1–22.
- [55] R. J. Dubos, "Effect of Ketone Bodies and Other Metabolites on the Survival and Multiplication of Staphylococci and Tubercle Bacilli," *J. Exp. Med.*, (1953), 98(2), pp. 145–155.
- [56] P. Aneja, R. Dziak, G. Q. Cai, y T. C. Charles, "Identification of an acetoacetyl coenzyme A synthetase-dependent pathway for utilization of L-(+)-3-hydroxybutyrate in *Sinorhizobium meliloti*," *J. Bacteriol.*, (2002), 184(6), pp. 1571–1577.
- [57] N. Potezny, E. R. Atkinson, A. M. Rofe, y R. A. J. Conyers, "The inhibition of bacterial cell growth by ketone bodies," *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, (1981), 59(5), pp. 639–649.
- [58] Y. Koga, K. Nishikawa, y P. Westh, "Relative hydrophobicity/hydrophilicity of fructose, glucose, sucrose and trehalose as probed by 1-propanol: A differential approach in solution thermodynamics," *J. Phys. Chem. B*, (2007), 111(50), pp. 13943–13948.
- [59] M. Madigan, K. Bender, D. Buckley, W. M. Sattley, y D. Stahl, "Brock Biology of Microorganisms" (2019), 15th edition. *Pearson education Lmtd.*

- [60] R. Djeribi, Z. Bouchloukh, W. Zouaoui, H. Latrache, F. Hamadi, y B. Mena, "A study of pH effects on the bacterial surface physicochemical properties of *Acinetobacter baumannii*," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, (2013), 102, pp. 540–545.
- [61] V. Vadillo-Rodríguez, M. A. Cavagnola, C. Pérez-Giraldo, y M. C. Fernández-Calderón, "A physico-chemical study of the interaction of ethanolic extracts of propolis with bacterial cells," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, (2021), 200, pp. 111571.
- [62] Y. Liu, A. M. Gallardo-Moreno, P. A. Pinzon-Arango, Y. Reynolds, G. Rodriguez, y T. A. Camesano, "Cranberry changes the physicochemical surface properties of *E. coli* and adhesion with uroepithelial cells," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, (2008), 65(1), pp. 35–42.
- [63] P. A. C. McPherson, "Ketone Bodies," *Encycl. Food Heal.*, (2016) pp. 483–489.
- [64] S. M. Horne, M. Schroeder, J. Murphy, y B. M. Prüß, "Acetoacetate and ethyl acetoacetate as novel inhibitors of bacterial biofilm," *Lett. Appl. Microbiol.*, (2018), 66(4), pp. 329–339.
- [65] A. M. Gallardo-Moreno M. A. Pacha-Olivenza, L. Saldaña, C. Pérez-Giraldo, J. M. Bruque, N. Vilaboa, y M. L. González-Martín "In vitro biocompatibility and bacterial adhesion of physico-chemically modified Ti6Al4V surface by means of UV irradiation," *Acta Biomater.*, (2009), 5(1), pp. 181–192.
- [66] G. Begić, M. Petković Didović, S. Lučić Blagojević, I. Jelovica Badovinac, J. Žigon, M. Perčić, O. Cvijanović Pelosa, y L. Gobin, "Adhesion of Oral

- Bacteria to Commercial d-PTFE Membranes: Polymer Microstructure Makes a Difference," *Int. J. Mol. Sci.*, (2022), 23(6), pp. 2983.
- [67] M. S. Thomas, P. K. S. Pillai, M. Faria, N. Cordeiro, L. Kailas, N. Kalarikkal, S. Thomas, y L. A. Pothen "Polylactic acid/nano chitosan composite fibers and their morphological, physical characterization for the removal of cadmium(II) from water," *J. Appl. Polym. Sci.*, (2020), 137(34), pp. 48993.
- [68] H. J. Busscher y H. C. Van Der Mei, "Microbial Adhesion in Flow Displacement Systems," *Clin. Microbiol. Rev.*, (2006), 19(1), pp. 127.
- [69] M. Á. Pacha Olivenza, "Caracterización y respuesta antibacteriana de la superficie del biomaterial Ti6AL4V sometido a diferentes modificaciones físicas," (2012). [Tesis de doctorado, Universidad de Extremadura]. *Dehesa*. Repositorio Institucional de la Universidad de Extremadura.
- [70] N. Cerca, G. B. Pier, R. Oliveira, y J. Azeredo, "Comparative evaluation of coagulase-negative staphylococci (CoNS) adherence to acrylic by a static method and a parallel-plate flow dynamic method," *Res. Microbiol.*, (2004), 155(9), pp. 755–760.
- [71] M. M. Santore, "Interplay of physico-chemical and mechanical bacteria-surface interactions with transport processes controls early biofilm growth: A review," *Adv. Colloid Interface Sci.*, (2022), 304, pp. 102665.
- [72] N. P. Boks, H. J. Busscher, H. C. Van Der Mei, y W. Norde, "Bond-strengthening in staphylococcal adhesion to hydrophilic and hydrophobic surfaces using atomic-force microscopy," *Langmuir*, (2008), 24(22), pp. 12990–12994.

- [73] M. Fernández-Grajera, M. A. Pacha-Olivenza, A. M. Gallardo-Moreno, M. L. González-Martín, C. Pérez-Giraldo, y M. C. Fernández-Calderón, "Modification of physico-chemical surface properties and growth of *Staphylococcus aureus* under hyperglycemia and ketoacidosis conditions," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, (2022), 209, pp. 112137.
- [74] T. E. P. Kimkes y M. Heinemann, "How bacteria recognise and respond to surface contact," *FEMS Microbiol. Rev.*, (2020), 44(1), pp. 106.
- [75] W. B. Russel, D. A. Saville, y W. Schowalter, "Colloidal Dispersions" (1989), *Cambridge University Press*.
- [76] M. G. Katsikogianni y Y. F. Missirlis, "Interactions of bacteria with specific biomaterial surface chemistries under flow conditions," *Acta Biomater.*, (2010), 6(3), pp. 1107–1118.
- [77] M. Pan, H. Li, X. Han, W. Ma, X. Li, Q. Guo, B. Yang, C. Ding, y Y. Ma "Effects of hydrodynamic conditions on the composition, spatiotemporal distribution of different extracellular polymeric substances and the architecture of biofilms," *Chemosphere*, (2022), 307, pp. 135965..
- [78] B. R. Boles y A. R. Horswill, "Staphylococcal biofilm disassembly," *Trends Microbiol.*, (2011), 19(9), pp. 449.
- [79] V. Dengler, L. Foulston, A. S. DeFrancesco, y R. Losick, "An Electrostatic Net Model for the Role of Extracellular DNA in Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus*," *J. Bacteriol.*, (2015), 197(24), pp. 3779.
- [80] L. Foulston, A. K. W. Elsholz, A. S. DeFrancesco, y R. Losick, "The Extracellular Matrix of *Staphylococcus aureus* Biofilms Comprises

- Cytoplasmic Proteins That Associate with the Cell Surface in Response to Decreasing pH," *mBio*, (2014), 5(5).
- [81] V. Silva, J. E. Pereira, L. Maltez, P. Poeta, y G. Igrejas, "Influence of Environmental Factors on Biofilm Formation of Staphylococci Isolated from Wastewater and Surface Water," *Pathogens*, (2022), 11(10), pp. 1069.
- [82] Y. Liu, J. Zhang, y Y. Ji, "Environmental factors modulate biofilm formation by *Staphylococcus aureus*," *Sci. Prog.*, (2020), 103(1).
- [83] H. Lade, J.H. Park, S. H. Chung, I. H. Kim, J. M. Kim, H. S. Joo, y J. S. Kim, "Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates is Differentially Affected by Glucose and Sodium Chloride Supplemented Culture Media," *J. Clin. Med.* (2019), 8(11), pp. 1853.
- [84] J. S. Lee, Y. M. Bae, S. Y. Lee, y S. Y. Lee, "Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* on Various Surfaces and Their Resistance to Chlorine Sanitizer," *J. Food Sci.*, (2015), 80(10), pp. M2279–M2286.
- [85] M. E. Olson, J. M. King, T. L. Yahr, y A. R. Horswill, "Sialic Acid Catabolism in *Staphylococcus aureus*," *J. Bacteriol.*, (2013), 195(8), pp. 1779.
- [86] L. B. Regassa, R. P. Novick, y M. J. Betley, "Glucose and nonmaintained pH decrease expression of the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*," *Infect. Immun.*, (1992), 60(8), pp. 3381.
- [87] R. Djeribi, Z. Bouchloukh, W. Zouaoui, H. Latrache, F. Hamadi, y B. Mena, "A study of pH effects on the bacterial surface physicochemical properties of *Acinetobacter baumannii*," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, (2013), 102, pp. 540–545.

The top corners of the page are decorated with several 3D molecular models. These models consist of small spheres (atoms) in various colors (red, white, grey, blue) connected by thin lines (bonds). Some models are larger and more complex, while others are smaller and simpler. They are scattered across the top edge, with a higher concentration on the left and right sides.

«Todos tenemos luz y oscuridad en nuestro interior, lo que importa es qué parte elegimos potenciar»

(S. Black, *“Harry Potter y La orden del Fenix”*)



# Capítulo V. Conclusiones Generales

## V. Conclusiones Generales

El análisis de los resultados de esta tesis ha permitido extraer las siguientes conclusiones relativas a la consecución del *objetivo 1*:

- Se ha logrado fabricar biomateriales basados en ácido poliláctico con propiedades superficiales diferentes y con distintas respuestas frente a la colonización bacteriana enriqueciendo las matrices poliméricas con Mg y/o CTAB.
  1. El magnesio se distribuye de forma homogénea en la matriz del ácido poliláctico, disminuyendo su alta hidrofobicidad y aumentando su rugosidad superficial.
  2. La presencia de CTAB mejora la humectabilidad del polímero y genera, de forma espontánea, una superficie microestructurada de huecos.
  3. La degradación de las películas con Mg provoca la liberación de cationes  $Mg^{2+}$  al medio, favoreciendo la formación sobre su superficie de una capa de fosfato de magnesio biocompatible que disminuye la hidrofobicidad, modera la rugosidad superficial y hace más positiva la superficie de los materiales.
  4. La degradación de las películas con CTAB ocasiona la liberación al medio del tensioactivo, especialmente a tiempos cortos, manteniéndose la microestructura de huecos. Este hecho favorece la continua liberación del tensioactivo a pesar del envejecimiento del polímero.

- La adhesión bacteriana sobre las muestras de PLA es el resultado de múltiples factores entre los que resulta complejo determinar a *priori* el impacto de fuerzas físicas como las hidrofóbicas y eléctricas, haciéndose más evidente este hecho cuando el polímero está enriquecido con sustancias activas.
  1. Las películas con magnesio muestran una adhesión bacteriana favorecida por el acercamiento electrostático, promovido por la liberación de cationes  $Mg^{2+}$  desde la matriz. Sin embargo, la corrosión del Mg hace que las superficies sean altamente bactericidas.
  2. El enriquecimiento con CTAB reduce la adhesión bacteriana a la superficie y causa daños en la membrana de las bacterias adheridas. Estas películas son completamente antibacteriano en todos los casos sin degradación. Cuando las muestras son degradadas, se sigue observando la inhibición total de la biocapa con las concentraciones más altas de tensioactivo.

En relación al *objetivo 2* planteado, las conclusiones son las siguientes:

- La adhesión bacteriana y la formación de biocapas sobre la superficie de PLA se ve alterada por la presencia de componentes del entorno diabético como la glucosa y/o los cuerpos cetónicos. Estos aditivos también modifican las propiedades físicas de la superficie de las bacterias y su patrón de crecimiento.

1. La hiperglucemia es la condición que provoca el mayor aumento de la población bacteriana, a pesar de mostrar una cinética de crecimiento más lenta. En este entorno, las bacterias aumentan su hidrofobicidad y su carga negativa superficial en relación a un medio sin glucosa. Este enriquecimiento es lo que provoca que las bacterias produzcan más índice de *slime* cuando se analiza la formación de biocapas sobre una superficie estándar.
2. La cetoacidosis aumenta la hidrofobicidad superficial de las bacterias, pero disminuye significativamente su carga negativa superficial, favoreciendo la agregación bacteriana.
3. Un sistema mixto de patología diabética con hiperglucemia y cetoacidosis representa el peor escenario frente a la colonización en los materiales poliméricos utilizados. Lejos de alcanzar un estado estacionario de adhesión en condiciones dinámicas, las bacterias encuentran en este entorno un impulso en su actividad metabólica que potencia la afinidad bacteria-superficie. Además, la biocapa formada sobre PLA es máxima y, estructuralmente, corresponde con la de mayor espesor y densidad.



# Anexos

Article

# Aging of Solvent-Casting PLA-Mg Hydrophobic Films: Impact on Bacterial Adhesion and Viability

Verónica Luque-Agudo <sup>1,2,3</sup>, Daniel Romero-Guzmán <sup>1,2,3</sup>, María Fernández-Grajera <sup>1,2,3</sup>, M. Luisa González-Martín <sup>1,2,3,\*</sup> and Amparo M. Gallardo-Moreno <sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Department of Applied Physics, University of Extremadura, 06006 Badajoz, Spain; vluque@unex.es (V.L.-A.); daniromero@unex.es (D.R.-G.); mariafg@unex.es (M.F.-G.); amparogm@unex.es (A.M.G.-M.)

<sup>2</sup> Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), 06006 Badajoz, Spain

<sup>3</sup> University Institute of Extremadura Sanity Research (iNube), 06006 Badajoz, Spain

\* Correspondence: mlglez@unex.es; Tel.: +34-92426727

Received: 31 October 2019; Accepted: 29 November 2019; Published: 2 December 2019



**Abstract:** Biomaterials used for the manufacture of biomedical devices must have suitable surface properties avoiding bacterial colonization and/or proliferation. Most biomaterial-related infections start during the surgery. Bacteria can begin colonization of the surface of a device right after implantation or in the next few hours. This time may also be sufficient to begin the deterioration of a biodegradable implant. This work explores the surface changes that hydrophobic films of poly(lactic) acid reinforced with Mg particles, prepared by solvent-casting, undergone after in vitro degradation at different times. Hydrophobicity, surface tension, zeta potential, topography, and elemental composition were obtained from new and aged films. The initial degradation for 4 h was combined with unspecific bacterial adhesion and viability tests to check if degraded films are more or less susceptible to be contaminated. The degradation of the films decreases their hydrophobicity and causes the appearance of a biocompatible layer, composed mainly of magnesium phosphate. The release of Mg<sup>2+</sup> is very acute at the beginning of the degradation process, and such positive charges may favor the electrostatic approach and attachment of *Staphylococci*. However, all bacteria attached on the films containing Mg particles appeared damaged, ensuring the bacteriostatic effect of these films, even after the first hours of their degradation.

**Keywords:** poly(lactic) acid; hydrophobicity; solvent-casting; *S. epidermidis*; bacterial adhesion

## 1. Introduction

Composite materials based on polymers provide an excellent platform for tailoring properties according to specific applications. Poly(lactic) acid (PLA) is one of the mostly used polymers in the market of biodegradable medical devices. The interest arises from its appropriate combination of biocompatibility and biodegradability rate. Nevertheless, some drawbacks limit its use. Poor compressive strength and the generation of acidic products during degradation limit the range of its applications [1,2]. To overcome these flaws several composites of PLA are being developed, based on copolymerization, reinforcement with carbon fibers, carbon nanotubes, hydroxyapatite (HA) or metallic particles [3–6].

Magnesium, Mg<sup>2+</sup>, is the fourth most present cation in human body. It has an essential role in the physiology of brain, heart, and skeletal muscles. It plays relevant functions in intracellular processes, as enzymatic activities, DNA repair and exchange of sodium and potassium through membranes. 99% of magnesium in body is found in bone, muscles and non-muscular soft tissue, and approximately 50%–60% of magnesium appears as surface substituent of the bone hydroxyapatite [7].

Despite the adequate biocompatibility of magnesium, its use as biomaterial is limited because its low surface stability and its fast corrosion rate in aqueous media, especially when media contain chloride. Degradation of magnesium leads to hydrogen release and increase of the pH. Moreover, fast corrosion can untimely deteriorate implants before tissue has healed. Therefore, development of biocompatible materials that slow down the production of  $Mg^{2+}$  and  $H_2$  bubbles is an interesting and important field of research [8,9].

To this purpose, new composites have been developed to improve the mechanical properties of PLA. These composites incorporate magnesium in the form of needles, wires, nanoparticles, particles [10,11], alloy fibers [12], and oxides [13,14]. Creep strength, hardness, and rigidity [15] are the main mechanical properties of PLA enhanced by these inclusions of magnesium.

In addition, the manufacturing method provides these composites with different surface properties depending on the protocol followed [1,2,10,16,17].

Surface properties, together with bulk and mechanics characteristics of the material, must be considered in detail for a successful design of an implant as far as interaction between the implant and the biological medium happens through the surface. Properties such as topography, surface electrical potential, hydrophobicity, and surface free energy can modulate the formation of a precursor layer of proteins and the subsequent adhesion and proliferation of cells [18]. Moreover, in the case of degradable materials, whose surface is continuously altered, it is necessary to follow the evolution of their surface properties with aging.

One of the most detrimental factors that can affect an implant is its colonization with bacteria, as it is the origin of infectious processes. Infection is one of the main causes, along with debridement for joint implants, leading to the removal of an implant. Half of the device-related infections are nosocomial [19], being the microbial contamination acquired along the surgical procedure. The patient's own skin, clothing and surgical instruments inside the operating room are a source of contamination. This implies that the implant can enter already contaminated in the patient or that the bacteria, through the open wound in surgery, can access the implant a few hours after placement.

Although magnesium is an essential ion for the enzymes activity and can enhance coating formation on bacterial biofilms, it has also interesting properties against bacteria contamination [20–23]. The mechanisms behind this antibacterial effect are the alkalization of the surrounding media and the great osmotic stress originated on the cells by the ingestion of magnesium ions [22–24].

As for pure magnesium, composites materials using this metal also present these effects [25,26]. In a previous study on extruded bars of Mg with PLA, we proved that bacteria adhered on the surface of the composite were damaged [27].

In the present work we study the surface properties, degradation and bacterial response of thin films of PLA reinforced with 10% (*w/w*) of Mg particles prepared by solvent casting. According to Cifuentes et al. [11] this Mg proportion is a compromise solution between two factors: the generation of acidic products by the degradation of PLA, that decreases the pH, and the alkalization due to Mg corrosion. Films of this composite were manufactured following a different procedure [28] and provided rough surfaces with water contact angle below  $90^\circ$  that could favor cell interactions. Our purpose is the analysis of films that could be used as coating for other supports to protect them against bacterial contaminations, avoiding the use of antibiotics and within a biocompatible environment. Contamination of the films with *Staphylococcus epidermidis*, one of the main microorganisms responsible of nosocomial infections [29] on new and aged surfaces, to simulate two possible scenarios for the contamination of the implant was investigated.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Sample Preparation

The poly(lactic acid) (PLA) particles (PLA2003D, with D-isomer content of 4.25%, purchased from NatureWorks LLC, Blair, NE, USA) were dissolved in chloroform (5% *w/v*) using a rotator



stirrer (JP Selecta, Abrera, Barcelona, Spain). For preparation of films with magnesium (PLA10Mg), magnesium particles ( $\leq 50 \mu\text{m}$ , Nitroparis, Castellón, Spain) were added (10% *w/w*) to the solved polymer and stirred until complete homogenization. 1 mL of mixture, with and without magnesium, was placed in casts of 30 mm in diameter and left at room temperature for 8 h. After that, films were dried at 70 °C in an oven for 48 h, to completely remove any remaining solvent. Disks of 25 mm diameter were cut to perform further experiments.

## 2.2. Surface Structure Characterization

Morphology of surface of PLA films was evaluated by using an atomic force microscope (AFM) (Agilent AFM 5500, Agilent Technologies, California, CA, USA) operating at room temperature. Rectangular silicon cantilevers used have a nominal spring constant of  $0.03 \text{ N m}^{-1}$  and a specified tip radius of  $\sim 8 \text{ nm}$  (CSC38/Cr-AIBs series, MikroMash, Sofia, Bulgaria). The quantification of the surface roughness was made through the root mean square (RMS) parameter and for this purpose images of  $15 \times 15 \mu\text{m}^2$  were scanned. Distribution of magnesium particles in the composite was observed with a scanning electron microscope (SEM, FEI Company, Quanta 3D FEG, Hillsboro, OR, USA). The operation was done under low vacuum conditions, avoiding any metallic coating of the films. Images were taken in the backscattered electron detector (BSED) mode and energy dispersive X-Ray (EDX) mode was used to provide the elemental analysis of the films.

## 2.3. X-Ray Diffraction

XRD was performed using a Bruker D8 Advance (Rheinstetten, Germany), with Bragg–Brentano geometry and  $\text{CuK } \alpha_1$  radiation ( $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ).

## 2.4. Surface Tension

The surface tension components of PLA and PLA10Mg films were evaluated using contact angle determinations under ambient conditions.

The measurements were carried out with a Krüss goniometer (Krüss, Hamburg, Germany) by the sessile drop method and using the Drop Shape Analyser software (Krüss GmbH, Hamburg, Germany). The values of contact angle are the average of at least nine drops deposited on different samples and reported with the standard deviation.

In the experiment, three liquids were used: deionized water, formamide, and diiodomethane, whose surface tension components are well-known [30].

The surface tension components of the films were calculated with Equation (1) using the approach of van Oss et al. [31–33].

$$(1 + \cos \theta) \gamma_i^{TOT} = 2 \left( \sqrt{\gamma_i^{LW} \gamma_s^{LW}} + \sqrt{\gamma_i^- \gamma_s^+} + \sqrt{\gamma_i^+ \gamma_s^-} \right), \quad (1)$$

where  $\theta$  is the contact angle between the liquid and the surface,  $\gamma^{LW}$  is the Lifshitz–van der Waals surface tension component,  $\gamma^+$  represents the electron acceptor parameter,  $\gamma^-$  represents the electron donor parameter,  $\gamma^{TOT} = \gamma^{AB} + \gamma^{LW}$  is the total surface tension component and  $\gamma^{AB}$  is the Lewis acid-base component, with  $\gamma^{AB} = 2 \sqrt{\gamma^+ \gamma^-}$ . The subindex  $i$  represents the surface tension component of the liquids and subindex  $s$  the surface tension component of the surface.

The degree of hydrophobicity of a material can be estimated as the free energy of interaction between two surfaces of the same material immersed in water:  $\Delta G_{sws}$  (Equation (2)) [34]. In this approach, if  $\Delta G_{sws} < 0 \text{ mJ/m}^2$ , the material is considered hydrophobic and if  $\Delta G_{sws} > 0 \text{ mJ/m}^2$ , the material is considered hydrophilic.

$$\Delta G_{sws} = -2 \left( \sqrt{\gamma_s^{LW}} - \sqrt{\gamma_w^{LW}} \right)^2 + 4 \left( \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_w^-} + \sqrt{\gamma_s^- \gamma_w^+} - \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-} - \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_w^-} \right) \quad (2)$$

### 2.5. Surface Charge

The surface charge was analysed through streaming potential and streaming current measurements by an electrokinetic analyzer (EKA) (Anton Paar, Austria). The experiments were carried out with a symmetrical cell using two identical films (25 mm of diameter). The zeta potential was calculated using the Helmholtz–Smoluchowsky equation:

$$\zeta = \frac{\eta}{\varepsilon_0 \varepsilon_r} \frac{L}{Q} \frac{dI_{str}}{dp} = \frac{\eta}{\varepsilon_0 \varepsilon_r} K \frac{dV_{str}}{dp} \quad (3)$$

where  $I_{str}$  and  $V_{str}$  were the streaming current and streaming potential;  $p$  is the channel pressure;  $\eta$  and  $\varepsilon_r$  are the dynamic viscosity and the permittivity of the fluid, respectively;  $\varepsilon_0$  is the permittivity of vacuum;  $K$  is the conductivity of the channel; and  $L$  and  $Q$  are the length and cross-section of the channel. All measurements were made with the same compression conditions inside the electrokinetic channel and the geometrical factor  $L/Q$  was obtained as previously described [35]. Each streaming current or potential measurement involved four cycles, two in each flow direction. The pressure was applied in a ramp form, from 0 to 600 mbar. KCl 1 mM was used as the electrolyte solution with pH 5.6.

### 2.6. In Vitro Degradation Evaluation

Degradation of PLA and PLA10Mg films was evaluated by immersion (by triplicate) of samples of 25 mm of diameter in 50 mL of phosphate buffer saline (PBS) at 37 °C for 4 and 8 h and 1, 7, 14, 21 and 28 days. The pH of the starting PBS solution was 6.67, and after four weeks, pH increased to 6.91. After degradation, films were dried with nitrogen and stored for at least 24 h in a desiccator. Changes in the morphology of surfaces were analyzed again by AFM and SEM. Inductively coupled plasma-mass spectroscopy (ICP-MS, 7900 Agilent Technologies, California, CA, USA) was used to quantify the amount of Mg released to the PBS.

To simulate the degradation conditions in which bacterial adhesion was performed, PLA and PLA10Mg films were exposed (by triplicate) to 0.9 mL of PBS at 37 °C for 4 h with the help of reusable silicone adhesion chambers (flexiPERM, Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany). Then, films were dried with nitrogen and stored for at least 24 h in a desiccator. AFM and SEM were used to assess the changes in topography and ICP-MS was used to determine the magnesium concentration.

### 2.7. Bacterial Adhesion Assays

*Staphylococcus epidermidis* ATCC 35983 (ATCC, American Type Collection Culture) was obtained. The strain was stored at –80 °C in porous beads (Microbank, ProLab Diagnostics, Richmond Hill, Ontario, Canada). From the frozen stock, blood agar plates (OXOID Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) were inoculated and incubated at 37 °C for 24 h to obtain cultures. The strain was then grown in trypticase soy broth (TSB) (BBL, Becton Dickinson and Company, Sparks, Franklin Lakes, New Jersey, USA) for different bacterial assays. For adhesion studies, bacteria were grown in TSB and resuspended in PBS to a final concentration of  $3 \cdot 10^8$  bacteria/mL, then a volume of 0.9 mL was added to the PLA and PLA10Mg films with the help of reusable silicone adhesion chambers, previously described, and subjected to slight orbital shaking of 20 rpm, for 4 h at 37 °C. Quantification of the density of the bacteria was carried out with an epifluorescence microscope (Leitz DIAPLAN, Wetzlar, Germany) by staining the adhered microorganisms with the kit Live/Dead BacLight L-7012 (Invitrogen SA, Eugene, Oregon, USA). Bacteria were counted with the software NIS-Elements BR 4.10 (Nikon Instruments Inc., Melville, USA). These experiments provided the total number of bacteria adhered to the surface of the samples, and the viability of the cells. Bacteria appearing as red-orange have their viability compromised, whereas green bacteria are not damaged. Images were acquired from random surface positions for each sample.

The experiments were carried out in triplicate and repeated at least three times with independent cultures in order to confirm reproducibility.

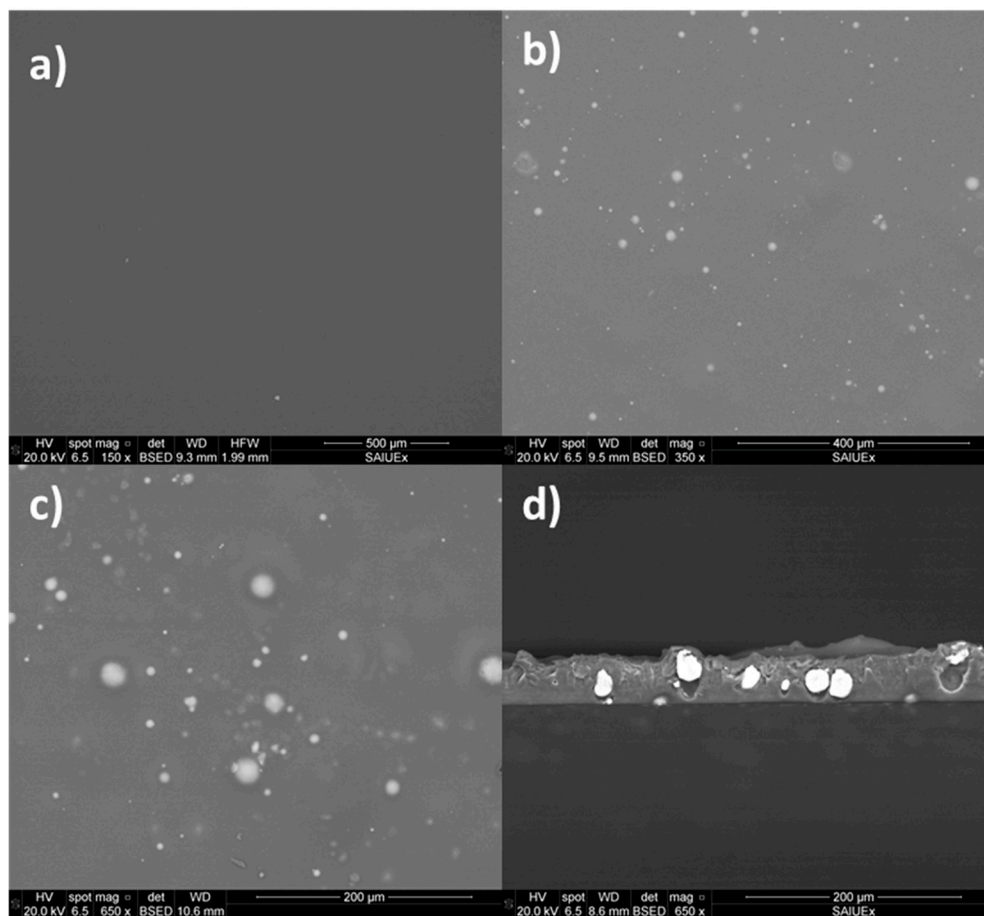
## 2.8. Statistical Analyses

For adhesion assays, the data were reported as mean values  $\pm$  S.D. from at least three independent experiments. The differences between groups were evaluated by Wilcoxon test. All statistical analyses were performed using the free software R, version 3.5.0. Differences were considered statistically significant at  $p$ -values  $\leq 0.05$ .

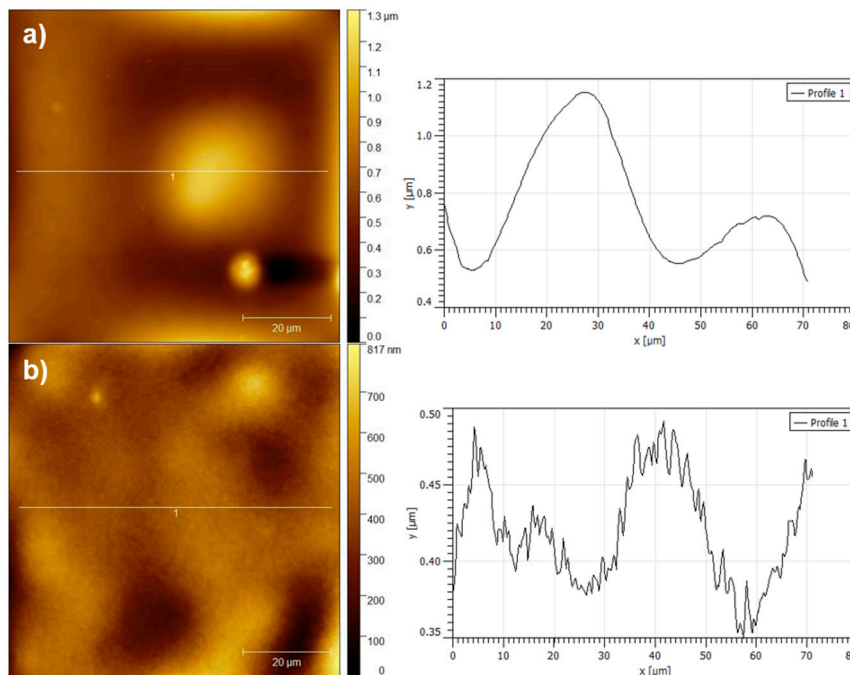
## 3. Results and Discussion

### 3.1. Surface of Films Characterization

BSED images of the surface and of a transversal section of a PLA10Mg film are presented in Figure 1. Transversal section of films had a thickness comprised between 40 and 50  $\mu\text{m}$ . Magnesium particles were well dispersed, without presence of aggregates or clusters. Some particles protruded from the film plane, but they stayed wrapped with a thin polymer layer. AFM images (Figure 2) confirmed the morphology of films. Profiles taken from images of PLA10Mg (Figure 2a) and PLA (Figure 2b) films gave roughness values of  $45 \pm 15$  nm and  $12 \pm 5$  nm, respectively. However, the larger RMS of PLA10Mg films was mainly related to the contribution of bumps due to particles. PLA film profile showed features no higher than 0.16  $\mu\text{m}$ . PLA10Mg profile had larger features due to magnesium protuberances, particularly, in the case of the image, they could reach to ca. 0.64  $\mu\text{m}$  height, but the surface topography between the Mg bumps was like that of the PLA film.

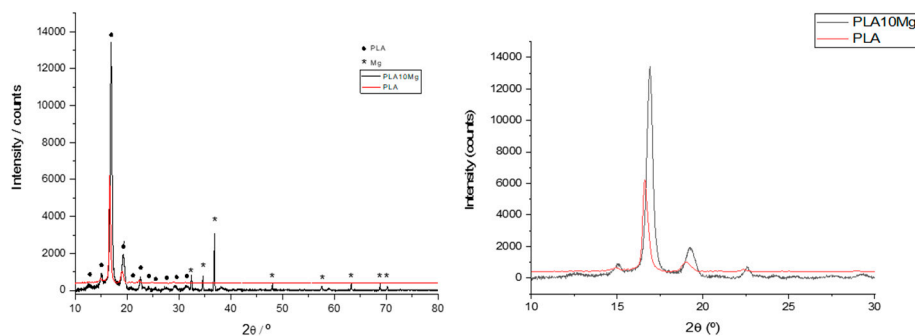


**Figure 1.** Backscattered electron detector (BSED) images from SEM of the surface of a poly(lactic acid) (PLA) film (a), a PLA10Mg film (b,c) and a cross-section of a PLA10Mg film (d). Scale bars are included at the bottom of the images. Different colours indicate different atomic numbers. In this case, white spots are related to Mg particles and grey background is related to polymer.



**Figure 2.** Atomic force microscope (AFM) topographical images and a representative profile (white line in topographical images) of (a) PLA10Mg film and (b) and PLA film. As it can be seen from the scale, different colors represent different heights: dark colors indicate hollows and lighter colors indicate higher areas.

The crystallinity of PLA10Mg and PLA films was evaluated by XRD (Figure 3). Diffractograms presented well defined peaks, indicating that microcrystallinity was present in both types of films. PLA film showed a pair of peaks at  $16.6^\circ$  and  $19.0^\circ$ . PLA10Mg peaks were slightly displaced to  $16.9^\circ$  and  $19.2^\circ$ .



**Figure 3.** X-Ray diffractogram of PLA10Mg and PLA films. Peaks have been assigned for the polymer and for the Mg particles. PLA10Mg (black line) and PLA (red line) presents peaks at  $14.4^\circ$  and  $22.5^\circ$ , characteristics of  $\alpha$  crystalline phase.

Both films had peaks at  $14.4^\circ$  and  $22.5^\circ$ , characteristics of  $\alpha$  crystalline phase, thus discarding the  $\delta$  phase. The small displacements of peaks may be due to some distortion in the polymer chain, but within the same crystalline phase, caused by the presence of Mg particles. This affects the packaging and spacing between chains and, therefore, the distance between reflection planes.

Contact angle of water,  $\theta_w$ , formamide,  $\theta_F$ , and diiodomethane,  $\theta_D$ , on PLA10Mg and PLA films are listed in Table 1. Within the experimental uncertainty, water and formamide contact angle were identical for both materials. Differences in roughness of both films were not reflected in the value of

the contact angle of sessile drops. Water contact angle obtained was higher than referred by other authors [36,37].

**Table 1.** Contact angles ( $\theta_w$ : water,  $\theta_F$ : formamide,  $\theta_D$ : diiodomethane) of PLA10Mg and PLA new and aged films and surface free energy ( $\gamma^T$ ), components ( $\gamma^{LW}$ : Lifshitz–van der Waals,  $\gamma^{AB}$ : acid–base) and surface free energy of interaction of surfaces immersed in water ( $\Delta G_{SWS}$ ).

Sample		$\theta_w$ [°]	$\theta_F$ [°]	$\theta_D$ [°]	$\gamma^T$ ( $\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ )	$\gamma^{LW}$ ( $\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ )	$\gamma^{AB}$ ( $\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ )	$\Delta G_{SWS}$ ( $\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ )
New film	PLA10Mg	106 ± 1	88 ± 1	58 ± 3	30 ± 3	28 ± 2	1.9 ± 0.6	−67 ± 5
	PLA	106 ± 2	90 ± 4	66 ± 2	25 ± 2	24 ± 1	1.2 ± 1.0	−70 ± 10
Aged film	PLA10Mg	97 ± 4	86 ± 4	63 ± 7	28 ± 4	25 ± 3	2.9 ± 2.5	−48 ± 14
	PLA	98 ± 4	89 ± 4	64 ± 2	27 ± 3	24 ± 2	3.4 ± 2.3	−46 ± 15

Onder et al. [38] reported contact angles of 109.1° in PLA films prepared under a relative humidity of 33%, conditions in which the PLA surface is microporous. Authors point out that the presence of air pockets in these pores is the reason why the surface becomes hydrophobic, in agreement with conditions for superhydrophobic surfaces. The analysis of the SEM images shows that these micropores had not been formed on the surface of our PLA films and, therefore, the air pockets could not be the cause of the high hydrophobicity. On the other hand, Li et al. [39] indicated that the hydrophobicity of PLA increased when its crystallinity did, due to the orientation of the methyl groups on its surface. Thus, these authors presented for PLA a  $\theta_w$  of 78.1° and 107.5° before and after orienting these groups, respectively. After orientation, the crystallinity of the PLA samples increased significantly, leading to a higher content of methyl groups on the surface and, therefore, to an increase of hydrophobicity. Nevertheless, surface orientation depended on the process of fabrication and thickness of the layer, among other factors [40,41], which suggests that the experimental process is decisive for modulating the final behavior of the surface hydrophobicity. In the same line, manufacturing method could also affect the arrangement and conformation of the polymer chains, within the same crystalline phase, and therefore determines the orientation of the functional groups most exposed to the surface, thus influencing hydrophobicity.

It appears that the contact angle of the apolar liquid diiodomethane was slightly lower on the PLA10Mg than on the PLA film. The higher interaction of the non-polar liquid with PLA10Mg than with PLA may be related with the slightly distortion in the crystalline phase of films, where a change in the ordination of polymer can slightly increase the number of non-polar methyl groups exposed in the surface. Nevertheless, this redistribution did not seem to be important enough to alter the interaction with water and formamide so much that  $\theta_w$  and  $\theta_F$  were modified. Table 1 includes the total surface free energy ( $\gamma^T$ ) and its Lifshitz–van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ) and acid–base ( $\gamma^{AB}$ ) components for both films. According to the differences in  $\theta_D$ ,  $\gamma^{LW}$  of PLA10Mg film seemed larger than for PLA, and, since there were no differences in polar interactions, total surface energy was slightly higher for the composite film. The interaction free energy of two equal surfaces immersed in water,  $\Delta G_{SWS}$ , provides a measure of the interplay of material and water, and an accurate quantification of the hydrophobicity of the material [42]. A more negative value of  $\Delta G_{SWS}$ , indicated that interaction between the surfaces of the material or the ordination in water was favored over the interaction of surfaces with water. PLA10Mg and PLA films presented the same  $\Delta G_{SWS}$  (Table 1), within the experimental uncertainty, which confirms the same hydrophobicity for both films. However, it cannot be discarded that some magnesium ions were displaced out of the surface, being the highly hydrated  $\text{Mg}^{2+}$  ions favoring water–water ordering.

Zeta potential ( $\zeta$ ) provides information of the surface electrical property of the samples. Using the Helmholtz–Smoluchowski approach, the values were  $-26.0 \pm 0.6$  mV for PLA10Mg and  $-35 \pm 3$  mV for PLA. The absolute value for the PLA film was slightly lower to the obtained by Kolska et al. [43]. They measured  $\zeta$  for different polymers after and before various surface treatments and pH. In the

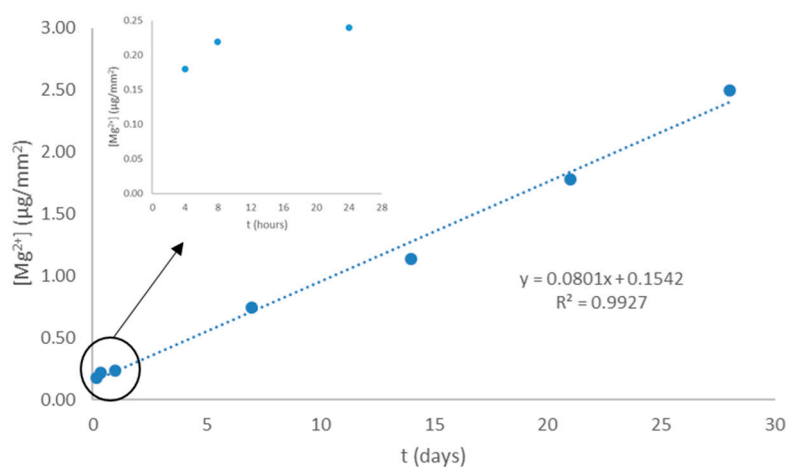


case of pristine PLA the value was  $-47.5$  mV at pH 7. However, Bastekova et al. [44] got for their films, whose contact angle was  $74.5^\circ \pm 5.8^\circ$ , a  $\zeta$  value of  $-67.2 \pm 5.0$  mV, measured at pH 6.5, that indicates an important negatively-charged surface. Differences in zeta potential have to be associated with the different preparation methods. On the other hand, the less negative zeta potential of PLA10Mg can be related with the release of  $Mg^{2+}$  cations to the surrounding media during the measuring process with the EKA. Positive ions can be retained within the double layer of the material, decreasing its measured zeta potential.

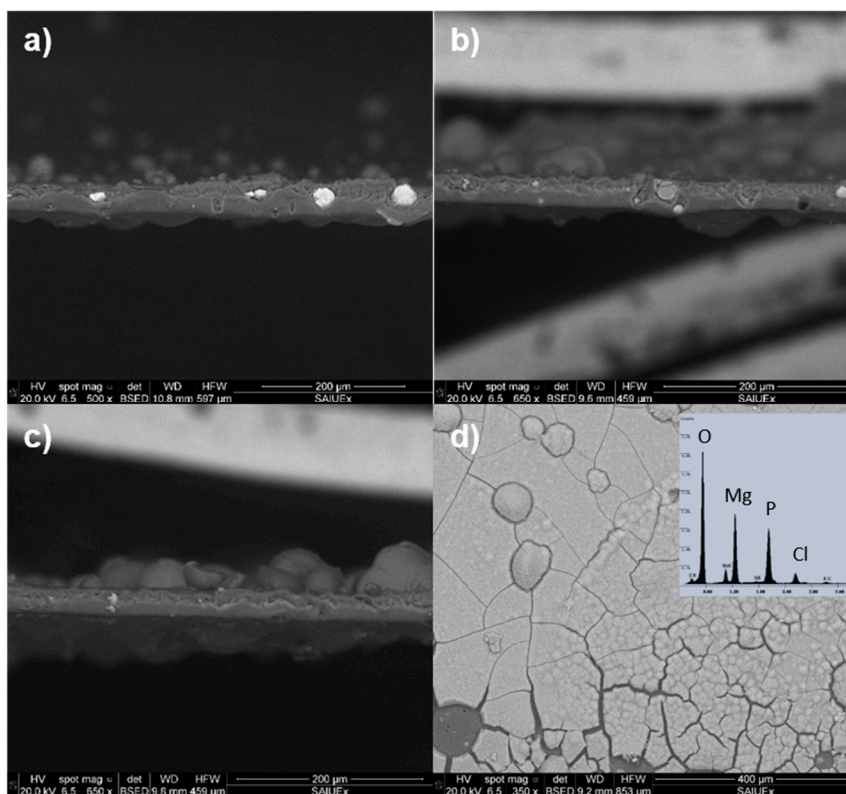
We have followed the release of magnesium ions from PLA10Mg films for a period of 28 days (Figure 4). Within the first 4 h of surface immersion in PBS, the  $Mg^{2+}$  liberation is very fast and afterwards the ions release per unit area of the film progresses linearly with time (release rate equal to  $0.080 \mu\text{g}/(\text{mm}^2\cdot\text{day})$  or  $0.003 \mu\text{g}/(\text{mm}^2\cdot\text{h})$ ). The liberation of magnesium ions to the PBS media, rich in phosphate salts, allows the formation of the very insoluble magnesium phosphate. Images of transversal sections of films after 7 (Figure 5a), 14 (Figure 5b) and 21 (Figure 5c) days allowed us to visualize the progressive formation of the deposited layer on the PLA10Mg films. Figure 5d displays the extension of the deposit on the PLA10Mg film surface after 28 days of immersion. EDX analysis confirms that this layer was formed mainly by magnesium phosphate (Figure 5d, inset).

Zhang and Ma reported [45] that PLA was able to form apatite once incubated in simulated body fluid (SBF) because of the carboxylic acid groups generated during hydrolysis. This process charged the surface negatively, and thus promoted the binding to  $Ca^{2+}$  via electrostatic forces and hydrogen bonding. Previously, it had been reported that by soaking the material in SBF, a calcium phosphate layer was formed [46,47]. The appearance of a white precipitate was already observed by Li et al. [16] when immersing PLA samples in PBS in a dynamic system, applying a load frequency of 2.5 Hz. In their case, the layer was composed of calcium and phosphor, while in ours the alkaline-earth metal is magnesium. From the study of Li et al. it can be concluded that the salt precipitates if the PLA is submerged in PBS in both static and dynamic methods, due to the poor solubility of phosphates in aqueous medium.

Amorphous magnesium phosphate (AMP) has suitable properties such as biocompatibility, biodegradability, and bioactivity [48–51]. Also, it can provide efficient protection against Mg and polymer degradation. Water contact angle measured on the PLA10Mg films aged for 28 days in PBS was  $71^\circ \pm 20^\circ$ . The large experimental uncertainty for this angle is due to the irregularities of the surface layer, as far as the deposit does not cover uniformly the film. Despite uncertainty, it appears that the presence of this deposit on the PLA10Mg film reduces its hydrophobicity.



**Figure 4.**  $Mg^{2+}$  release from PLA10Mg films immersed in phosphate buffer saline (PBS) over time.



**Figure 5.** SEM images of PLA10Mg films after (a) 7, (b) 14, (c) 21 and (d) 28 days of degradation. (a–c) are cross-section images, and (d) is a surface image. In (d), the EDX spectrum of the surface is included, confirming that the layer is composed of magnesium phosphate.

### 3.2. Bacterial Adhesion

Infection is one of the main detrimental processes that can compromise implanted devices. In most cases, the bacterial contamination of the devices occurs right at the time of surgery. It takes a few hours for bacteria to bind to the surface and grow to form a biofilm. Consequently, any degradable material or coverage is intended to resist bacterial colonization when degradation has not yet started or after a short period of time after it begins. To simulate such situations two different experiments of bacterial adhesion were designed. These experiments consisted in the contact for 4 h of a suspension of *S. epidermidis* with PLA10Mg film and PLA film. In one case these films were new and in the other case the films were previously aged by immersion in PBS at 37 °C for 4 h. The density of adhered bacteria and viability in both experiments are shown in Table 2. The adhesion of *S. epidermidis* on new films of PLA10Mg was slightly lower than on new PLA films ( $p$ -value < 0.05, according to Wilcoxon test), but the opposite tendency happened on aged films ( $p$ -value < 0.05, according to Wilcoxon test). In relation to viability, there were huge changes when comparing the films without and with Mg particles: in both cases, new and aged films, it is remarkable that all bacteria adhered on the PLA10Mg surface appeared damaged after the adhesion experiment ( $p$ -value < 0.05 in both comparisons: new films and aged films, according to Wilcoxon test). Magnesium-based materials are bacteriostatic. Mechanisms behind this characteristic are related to the joint action of magnesium ions and the modification of the pH of the surrounding media, especially in a local range near the surface. The pH and the concentration of  $Mg^{2+}$  ions that could have some impact on bacterial adhesion have been measured. New and aged films of PLA10Mg were immersed in PBS (pH 6.64) for 4 h, the same time as the bacterial adhesion experiments lasted. After that time, the pH and concentration of  $Mg^{2+}$  ions were measured. The results for both experiments listed in Table 2 are similar. This is due to the low solubility of magnesium phosphates in aqueous media, leading to their saturation. The pH increase was only 0.13 units, despite the high

density of  $Mg^{2+}$  ions in the medium. It is in accordance with the important role that the polymeric matrix plays controlling the corrosion of Mg particles, hindering the alkalization of the media.

**Table 2.** Number of adhered bacteria to surfaces, viability of adhered bacteria,  $Mg^{2+}$  concentration and pH of PLA10Mg new and aged films.

		Adhesion of <i>S. Epidermidis</i> (Bacteria·10 <sup>4</sup> per cm <sup>2</sup> )	Viability (%)	[Mg <sup>2+</sup> ] (ppm)	pH
New Film	PLA10Mg	110 ± 2	0	14.33 ± 0.92	6.77 ± 0.02
	PLA	129 ± 1	100	-	6.61 ± 0.01
Aged Film	PLA10Mg	138 ± 2	0	14.79 ± 0.54	6.77 ± 0.01
	PLA	120 ± 5	100	-	6.60 ± 0.01

Immersion of PLA and PLA10Mg films in PBS for 4 h was sufficient to initiate the surface degradation. The RMS obtained from AFM images on PLA degraded samples increased to almost three times in relation to non-aged samples (32 ± 9 nm versus 12 ± 5 nm). However, this roughness change is not enough to affect the contact angle measurements. There are not differences between contact angles on PLA10Mg and PLA aged surfaces (Table 1). Water contact angle slightly decreases respect to the new surfaces, but no changes are obtained in formamide or diiodomethane with respect to the new PLA film. Nevertheless, it can be expected that the cations released during the ageing process, highly hydrated, retained within the Helmholtz plane will remain deposited on the surfaces when films are removed from PBS for contact angle measurements. In addition, the deposition of some precipitates on the film surface begins once degradation starts, decreasing also the hydrophobicity of the surface and the contact angle of water. Some authors have stated that hydrophobicity of the material surface plays an important role in bacterial adhesion, more than bacterial surface hydrophobicity [52]. In our case, this is difficult to confirm since similar changes in hydrophobicity, as the values of  $\Delta G_{SWS}$  in Table 1 show, in PLA and PLA10Mg before and after 4h degradation give opposite changes in bacterial adhesion: on PLA10Mg increases and on PLA decreases. As has already been suggested, the  $Mg^{2+}$  cations released and trapped at the PLA10Mg films interface after degradation would favor the electrostatic approach and further attachment of the negative charged bacterial cells [53], increasing the number of the bacterial adhesion in 25% (Table 2). These results reinforce the idea that bacterial adhesion is the result of the joint action of different factors where it is difficult to ponder the impact of hydrophobic or electrical forces.

#### 4. Conclusions

Thin films of a composite of PLA with a proportion of 10% (*w/v*) of magnesium particles, manufactured by solvent casting, exhibited high hydrophobicity and intense bacteriostatic behavior. The degradation of the films allowed the appearance of a biocompatible layer, composed mainly by magnesium phosphates, decreasing the hydrophobicity of the film. The release of Mg cations was carried out at a constant rate throughout the period studied, except within the first hours of degradation, when the release was very acute.

Since bacteria may begin colonization of the implants surface during the surgery or after a few hours, when a biodegradable material would have already begun to deteriorate, bacterial tests on few hours aged films provide relevant information about the material performance. *S. epidermidis* adhesion on PLA10Mg aged films increases respect to the new ones probably due to the favorable electrostatic interaction between the negatively charged cells and the more positively charged surface, because of released  $Mg^{2+}$  ions, despite the lower hydrophobicity of degraded films. Nevertheless, the strong initial release of Mg ions from PLA10Mg films ensures that the bacteriostatic effect observed on new prepared films also takes place on aged surfaces for the first hours.



**Author Contributions:** Conceptualization, V.L.-A., M.L.G.-M., and A.M.G.-M.; formal analysis, V.L.-A., D.R.-G., M.F.-G., M.L.G.-M., and A.M.G.-M.; funding acquisition, M.L.G.-M. and A.M.G.-M.; investigation, V.L.-A., D.R.-G., and M.F.-G.; methodology, M.L.G.-M. and A.M.G.-M.; supervision, M.L.G.-M. and A.M.G.-M.; writing—original draft, V.L.-A. and D.R.-G.; writing—review and editing, M.L.G.-M. and A.M.G.-M.

**Funding:** This research was funded by Junta de Extremadura and FEDER, grant numbers GR15089 and GR18153, and project number IB16117, and by Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España, project numbers MAT2015-63974-C4-3-R, PCIN-2016-146 and RTI2018-096862-B-I00.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Wan, P.; Yuan, C.; Tan, L.L.; Li, Q.; Yang, K. Fabrication and evaluation of bioresorbable PLLA/magnesium and PLLA/magnesium fluoride hybrid composites for orthopedic implants. *Compos. Sci. Technol.* **2014**, *98*, 36–43. [[CrossRef](#)]
2. Swaroop, C.; Shukla, M. Nano-magnesium oxide reinforced polylactic acid biofilms for food packaging applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *113*, 729–736. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Shen, L.; Yang, H.; Ying, J.; Qiao, F.; Peng, M. Preparation and mechanical properties of carbon fiber reinforced hydroxyapatite/polylactide biocomposites. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2009**, *20*, 2259–2265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Zhang, D.; Kandadai, M.A.; Cech, J.; Roth, S.; Curran, S.A. Poly(L-lactide) (PLLA)/Multiwalled Carbon Nanotube (MWCNT) Composite: Characterization and Biocompatibility Evaluation. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 12910–12915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Hamada, Y.; Fujitani, W.; Kawaguchi, N.; Daito, K.; Niido, T.; Uchinaka, A.; Mori, S.; Kojima, Y.; Manabe, M.; Nishida, K.; et al. The preparation of PLLA/calcium phosphate hybrid composite and its evaluation of biocompatibility. *Dent. Mater. J.* **2012**, *31*, 1087–1096. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Murariu, M.; Dubois, P. PLA composites: From production to properties. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *107*, 17–46. [[CrossRef](#)]
7. De Baaij, J.H.F.; Hoenderop, J.G.J.; Bindels, R.J.M. Magnesium in man: Implications for health and disease. *Physiol. Rev.* **2015**, *95*, 1–46. [[CrossRef](#)]
8. Felfel, R.M.; Hossain, K.M.Z.; Parsons, A.J.; Rudd, C.D.; Ahmed, I. Accelerated in vitro degradation properties of polylactic acid/phosphate glass fibre composites. *J. Mater. Sci.* **2015**, *50*, 3942–3955. [[CrossRef](#)]
9. Abdal-Hay, A.; Dewidar, M.; Lim, J.; Lim, J.K. Enhanced biocorrosion resistance of surface modified magnesium alloys using inorganic/organic composite layer for biomedical applications. *Ceram. Int.* **2014**, *40*, 2237–2247. [[CrossRef](#)]
10. Cifuentes, S.C.; Gavilán, R.; Lieblich, M.; Benavente, R.; González-Carrasco, J.L. In vitro degradation of biodegradable polylactic acid/magnesium composites: Relevance of Mg particle shape. *Acta Biomater.* **2016**, *32*, 348–357. [[CrossRef](#)]
11. Cifuentes, S.C.; Frutos, E.; González-Carrasco, J.L.; Muñoz, M.; Multigner, M.; Chao, J.; Benavente, R.; Lieblich, M. Novel PLLA/magnesium composite for orthopedic applications: A proof of concept. *Mater. Lett.* **2012**, *74*, 239–242. [[CrossRef](#)]
12. Wu, Y.H.; Li, N.; Cheng, Y.; Zheng, Y.F.; Han, Y. In vitro Study on Biodegradable AZ31 Magnesium Alloy Fibers Reinforced PLGA Composite. *J. Mater. Sci. Technol.* **2013**, *29*, 545–550. [[CrossRef](#)]
13. Sawai, J.; Kojima, H.; Igarashi, H.; Hashimoto, A.; Shoji, S.; Sawaki, T.; Hakoda, A.; Kawada, E.; Kokugan, T.; Shimizu, M. Antibacterial characteristics of magnesium oxide powder. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *16*, 187–194. [[CrossRef](#)]
14. Coelho, C.C.; Araújo, R.; Quadros, P.A.; Sousa, S.R.; Monteiro, F.J. Antibacterial bone substitute of hydroxyapatite and magnesium oxide to prevent dental and orthopaedic infections. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *97*, 529–538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Li, X.; Chu, C.; Zhou, L.; Bai, J.; Guo, C.; Xue, F.; Lin, P.; Chu, P.K. Fully degradable PLA-based composite reinforced with 2D-braided Mg wires for orthopedic implants. *Compos. Sci. Technol.* **2017**, *142*, 180–188. [[CrossRef](#)]
16. Zhao, C.; Wu, H.; Ni, J.; Zhang, S.; Zhang, X. Development of PLA/Mg composite for orthopedic implant: Tunable degradation and enhanced mineralization. *Compos. Sci. Technol.* **2017**, *147*, 8–15. [[CrossRef](#)]

17. Li, X.; Guo, C.; Liu, X.; Liu, L.; Bai, J.; Xue, F.; Lin, P.; Chu, C. Impact behaviors of poly-lactic acid based biocomposite reinforced with unidirectional high-strength magnesium alloy wires. *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.* **2014**, *24*, 472–478. [[CrossRef](#)]
18. Wilson, C.J.; Clegg, R.E.; Leavesley, D.I.; Pearcy, M.J. Mediation of Biomaterial–Cell Interactions by Adsorbed Proteins: A Review. *Tissue Eng.* **2005**, *11*, 1–18. [[CrossRef](#)]
19. Falde, E.J.; Yohe, S.T.; Colson, Y.L.; Grinstaff, M.W. Superhydrophobic materials for biomedical applications. *Biomaterials* **2016**, *104*, 87–103. [[CrossRef](#)]
20. Li, Y.; Liu, G.; Zhai, Z.; Liu, L.; Li, H.; Yang, K.; Tan, L.; Wan, P.; Liu, X.; Ouyang, Z.; et al. Antibacterial properties of magnesium in vitro and in an in vivo model of implant-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 7586–7591. [[CrossRef](#)]
21. Robinson, D.A.; Griffith, R.W.; Shechtman, D.; Evans, R.B.; Conzemi, M.G. In vitro antibacterial properties of magnesium metal against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 1869–1877. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Rahim, M.I.; Eifler, R.; Rais, B.; Mueller, P.P. Alkalinization is responsible for antibacterial effects of corroding magnesium. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2015**, *103*, 3526–3532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Qin, H.; Zhao, Y.; Cheng, M.; Wang, Q.; Wang, Q.; Wang, J.; Jiang, Y.; An, Z.; Zhang, X. Anti-biofilm properties of magnesium metal via alkaline pH. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 21434–21444. [[CrossRef](#)]
24. Rodríguez-Sánchez, J.; Pacha-Olivenza, M.Á.; González-Martín, M.L. Bactericidal effect of magnesium ions over planktonic and sessile *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli*. *Mater. Chem. Phys.* **2019**, *221*, 342–348. [[CrossRef](#)]
25. Hickey, D.J.; Muthusamy, D.; Webster, T.J. Electrophoretic deposition of MgO nanoparticles imparts antibacterial properties to poly-L-lactic acid for orthopedic applications. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2017**, *105*, 3136–3147. [[CrossRef](#)]
26. Ma, R.; Lai, Y.X.; Li, L.; Tan, H.L.; Wang, J.L.; Li, Y.; Tang, T.T.; Qin, L. Bacterial inhibition potential of 3D rapid-prototyped magnesium-based porous composite scaffolds—An in vitro efficacy study. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 13775. [[CrossRef](#)]
27. Fernández-Calderón, M.C.; Cifuentes, S.C.; Pacha-Olivenza, M.A.; Gallardo-Moreno, A.M.; Saldaña, L.; González-Carrasco, J.L.; Blanco, M.T.; Vilaboa, N.; González-Martín, M.L.; Pérez-Giraldo, C. Antibacterial effect of novel biodegradable and bioresorbable PLDA/Mg composites. *Biomed. Mater.* **2017**, *12*, 015025. [[CrossRef](#)]
28. Ferrández-Montero, A.; Lieblich, M.; González-Carrasco, J.L.; Benavente, R.; Lorenzo, V.; Detsch, R.; Boccaccini, A.R.; Ferrari, B. Development of biocompatible and fully bioabsorbable PLA/Mg films for tissue regeneration applications. *Acta Biomater.* **2019**. [[CrossRef](#)]
29. Harris, L.G.; Richards, R.G. Staphylococci and implant surfaces: A review. *Injury* **2006**, *37*, S3–S14. [[CrossRef](#)]
30. Pacha-Olivenza, M.A.; Gallardo-Moreno, A.M.; Méndez-Vilas, A.; Bruque, J.M.; González-Carrasco, J.L.; González-Martín, M.L. Effect of UV irradiation on the surface Gibbs energy of Ti6Al4V and thermally oxidized Ti6Al4V. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *320*, 117–124. [[CrossRef](#)]
31. Van Oss, C.J.; Chaudhury, M.K.; Good, R.J. Monopolar surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1987**, *28*, 35–64. [[CrossRef](#)]
32. Van Oss, C.J.; Good, R.J.; Chaudhury, M.K. Additive and nonadditive surface tension components and the interpretation of contact angles. *Langmuir* **1988**, *4*, 884–891. [[CrossRef](#)]
33. Van Oss, C.J.; Ju, L.; Chaudhury, M.K.; Good, R.J. Estimation of the polar parameters of the surface tension of liquids by contact angle measurements on gels. *J. Colloid Interface Sci.* **1989**, *128*, 313–319. [[CrossRef](#)]
34. Gomes, I.B.; Simões, M.; Simões, L.C. The effects of sodium hypochlorite against selected drinking water-isolated bacteria in planktonic and sessile states. *Sci. Total Environ.* **2016**, *565*, 40–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Gallardo-Moreno, A.M.; Vadillo-Rodríguez, V.; Perera-Núñez, J.; Bruque, J.M.; González-Martín, M.L. The zeta potential of extended dielectrics and conductors in terms of streaming potential and streaming current measurements. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 9758–9767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Yang, J.; Bei, J.; Wang, S. Enhanced cell affinity of poly (D,L-lactide) by combining plasma treatment with collagen anchorage. *Biomaterials* **2002**, *23*, 2607–2614. [[CrossRef](#)]

37. Cai, K.; Yao, K.; Cui, Y.; Yang, Z.; Li, X.; Xie, H.; Qing, T.; Gao, L. Influence of different surface modification treatments on poly(D,L-lactic acid) with silk fibroin and their effects on the culture of osteoblast in vitro. *Biomaterials* **2002**, *23*, 1603–1611. [[CrossRef](#)]
38. Onder, O.C.; Nazeer, M.A.; Yilgör, E.; Yilgör, I. Spontaneous formation of microporous poly(lactic acid) coatings. *Prog. Org. Coat.* **2018**, *125*, 249–256. [[CrossRef](#)]
39. Li, J.; Li, Z.; Ye, L.; Zhao, X.; Coates, P.; Caton-Rose, F. Structure and biocompatibility improvement mechanism of highly oriented poly(lactic acid) produced by solid die drawing. *Eur. Polym. J.* **2017**, *97*, 68–76. [[CrossRef](#)]
40. Li, Z.; Zhao, X.; Ye, L.; Coates, P.; Caton-Rose, F.; Martyn, M. Fibrillation of chain branched poly(lactic acid) with improved blood compatibility and bionic structure. *Chem. Eng. J.* **2015**, *279*, 767–776. [[CrossRef](#)]
41. Paragkumar, N.T.; Edith, D.; Six, J.L. Surface characteristics of PLA and PLGA films. *Appl. Surf. Sci.* **2006**, *253*, 2758–2764. [[CrossRef](#)]
42. Van Oss, C.J. *Interfacial Forces in Aqueous Media*, 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2006.
43. Kolská, Z.; Kasálková, N.S.; Siegel, J.; Švorčík, V. Electrokinetic Potential for Characterization of Nanostructured Solid Flat Surfaces. *J. Nano Res.* **2013**, *25*, 31–39. [[CrossRef](#)]
44. Bastekova, K.; Guselnicova, O.; Postnikov, P.; Elashnikov, R.; Kunes, M.; Kolska, Z.; Švorčík, V.; Lyutakov, O. Spatially selective modification of PLLA surface: From hydrophobic to hydrophilic or to repellent. *Appl. Surf. Sci.* **2017**, *397*, 226–234. [[CrossRef](#)]
45. Zhang, R.; Ma, P.X. Porous poly(L-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process. *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, *45*, 285–293. [[CrossRef](#)]
46. Kokubo, T.; Kushitani, H.; Sakka, S.; Kitsugi, T.; Yamamuro, T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. *J. Biomed. Mater. Res.* **1990**, *24*, 721–734. [[CrossRef](#)]
47. Meng, Z.X.; Li, H.F.; Sun, Z.Z.; Zheng, W.; Zheng, Y.F. Fabrication of mineralized electrospun PLGA and PLGA/gelatin nanofibers and their potential in bone tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33*, 699–706. [[CrossRef](#)]
48. Babaie, E.; Ren, Y.; Bhaduri, S.B. Microwave sintering of fine grained MgP and Mg substitutes with amorphous tricalcium phosphate: Structural, and mechanical characterization. *J. Mater. Res.* **2016**, *31*, 995–1003. [[CrossRef](#)]
49. Babaie, E.; Lin, B.; Goel, V.K.; Bhaduri, S.B. Evaluation of amorphous magnesium phosphate (AMP) based non-exothermic orthopedic cements. *Biomed. Mater.* **2016**, *11*, 055010. [[CrossRef](#)]
50. Combes, C.; Rey, C. Amorphous calcium phosphates: Synthesis, properties and uses in biomaterials. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 3362–3378. [[CrossRef](#)]
51. Tamimi, F.; Le Nihouannen, D.; Bassett, D.C.; Ibasco, S.; Gbureck, U.; Knowles, J.; Wright, A.; Flynn, A.; Komarova, S.V.; Barralet, J.E. Biocompatibility of magnesium phosphate minerals and their stability under physiological conditions. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 2678–2685. [[CrossRef](#)]
52. Katsikogianni, M.; Missirlis, Y.F.; Harris, L.; Douglas, J. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur. Cells Mater.* **2004**, *8*, 37–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Gallardo-Moreno, A.M.; Navarro-Pérez, M.L.; Vadillo-Rodríguez, V.; Bruque, J.M.; González-Martín, M.L. Insights into bacterial contact angles: Difficulties in defining hydrophobicity and surface Gibbs energy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2011**, *88*, 373–380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]





## Protocols

## Modification of physico-chemical surface properties and growth of *Staphylococcus aureus* under hyperglycemia and ketoacidosis conditions

María Fernández-Grajera<sup>a,b</sup>, Miguel A. Pacha-Olivenza<sup>c,b,d,\*</sup>, Amparo M. Gallardo-Moreno<sup>a,b,d</sup>,  
M. Luisa González-Martín<sup>a,b,d</sup>, Ciro Pérez-Giraldo<sup>c,b,d</sup>, M. Coronada Fernández-Calderón<sup>c,b,d</sup>

<sup>a</sup> University of Extremadura, Department of Applied Physics, Badajoz, Spain

<sup>b</sup> University Institute of Extremadura Sanity Research (INUBE), Badajoz, Spain

<sup>c</sup> University of Extremadura, Department of Biomedical Science, Badajoz, Spain

<sup>d</sup> Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Badajoz, Spain



## ARTICLE INFO

## Keywords:

Infections

*Staphylococcus aureus*

Hyperglycemia

Ketoacidosis

Zeta Potential

Hydrophobicity

## ABSTRACT

Diabetes is a widely spread disease affecting the quality of life of millions of people around the world and is associated to a higher risk of developing infections in different parts of the body. The reasons why diabetes enhances infection episodes are not entirely clear; in this study our aim was to explore the changes that one of the most frequently pathogenic bacteria undergoes when exposed to hyperglycemia and ketoacidosis conditions. Physical surface properties such as hydrophobicity and surface electrical charge are related to bacterial growth behavior and the ability of *Staphylococcus aureus* to form biofilms. The addition of glucose made bacteria more negatively charged and with moderate-intermediate hydrophobicity. Ketone bodies increased hydrophobicity to approximately 75% and pathological concentrations hindered some of the bacterial surface charge by decreasing the negative zeta potential of cells. When both components were present, the bacterial physical surface changes were more similar to those observed in ketone bodies, suggesting a preferential adsorption of ketone bodies over glucose because of the more favorable solubility of glucose in water.

Glucose diabetic concentrations gave the highest number of bacteria in the stationary phase of growth and provoked an increase in the biofilm slime index of around 400% in relation to the control state. Also, this situation is related with an increase of bacterial coverage. The combination of a high concentration of glucose and ketone bodies, which corresponds to a poorly controlled diabetic situation, appears associated with an early infection phase; increased hydrophobic attractive force and reduced electrostatic repulsion between cells results in better packing of cells within the biofilm and more efficient retention to the host surface.

Knowledge of bacterial response in high amount of glucose and ketoacidosis environments can serve as a basis for designing strategies to prevent bacterial adhesion, biofilm formation and, consequently, the development of infections.

### 1. Introduction

How bacteria can begin the colonization of any material -biotic or abiotic- or even how they interact with each other is initially directed by interfacial properties such as hydrophobicity and the electrical charge of the surface. The balance between repulsive electrostatic forces and the hydrophobic attractive force has a major role in dictating the way bacteria interact with their surroundings. On the other hand, the stronger the attraction between bacteria, the more compact the layers they form on a surface, giving the bacteria the advantage of being able to resist

external attacks or to make a more effective colonization of other nearby surfaces.

Teichoic and lipoteichoic acids, in addition to a thick layer of cross-linked peptidoglycans and other polysaccharides, form the surface of Gram positive bacteria [1]. These acids are composed of repeating units of ribitol phosphate, which are substituted with D-alanine and N-acetylglucosamine. They have a zwitterionic character because of the negatively charged phosphodiester and the D-alanine ester modifications that are positively charged. However, the specific composition of the surface of bacteria is dependent on the strain, and different degrees

\* Corresponding author at: Department of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, University of Extremadura, Avda de Elvas s/n, 06006 Badajoz, Spain.

E-mail address: [mpacoli@unex.es](mailto:mpacoli@unex.es) (M.A. Pacha-Olivenza).

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112137>

Received 31 May 2021; Received in revised form 24 August 2021; Accepted 23 September 2021

Available online 28 September 2021

0927-7765/© 2021 The Author(s).

Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

of substitutions in the wall of the teichoic acids cause differences between surface properties of different bacterial strains. Nevertheless, in addition to these characteristics of the surface of the microorganisms, the composition of the media where cells are suspended has a relevant role in the interfacial behavior of bacteria. Retention of solutes on the very active surface of the bacteria can modify its hydrophobicity as well as its surface charge, or zeta potential, and in turn its interfacial behavior.

Diabetes mellitus is a chronic metabolic disorder characterized by the increase of blood glucose above the levels of healthy individuals, which are in the range of 0.70–0.99 g/L [2]. It is a wide-spread disease and a global problem affecting the quality of life of many patients. According to WHO, diabetes caused in 2016 1.6 million deaths directly related with this disease and a rise in prevalence is expected to affect 629 million people by 2045 [3].

Glucose provides the energy that the organism needs, and insulin facilitates its delivery to cells [4]. The reasons for high concentration of glucose or hyperglycemia, therefore, may be either due to an insufficient production of insulin, or because the insulin produced not functioning properly [5]. Poorly controlled diabetes is also associated to ketoacidosis. Insulin is responsible for the mobilization of glucose to tissues or organs, but in the case of insufficient insulin level, cells replace with fatty acids the lack of glucose as a source of energy. The results of this optional metabolic route are ketone bodies, which in turn can be metabolized.

Several authors [6–13] have shown that diabetes is linked to a higher risk of developing infections [14] in different parts of the body. There are several reasons behind the promotion or enhancement of infections by diabetes. Hyperglycemia adversely affect neutrophilic chemotaxis and phagocytosis, decreasing defenses of the immune system and making wound healing more difficult [15]. Experimental models have also evidenced deficient angiogenesis, reduced growth factor levels, poor vascularization and maintenance of a chronic inflammatory state limiting healing capacity [2]. However, very little attention has been paid to the possible impact that diabetic alterations, such as hyperglycemia and ketoacidosis, exert on the pathogenic bacteria, directly responsible for the infections.

*Staphylococci* is one of the most frequently isolated genera in infections in the context of diabetes [16–20], and in particular, the species *Staphylococcus aureus*. Casqueiro et al. review the pathogenesis of diabetic's infections. Within this extensive study, the authors found that *S. aureus* was the most common microorganism responsible for skin and soft tissue infections, especially in diabetic feet [21]. Additionally, due to its relevance in this context, *S. aureus* is the standard species selected for different *in vivo* animal studies to investigate the connection between infections and diabetes [22–25]. The success of microorganisms in colonizing a niche depends on their ability to change and adapt the expression of their virulence factors to their surroundings [26]. Temperature, pH and availability of nutrients from the media impose conditions on the metabolic activity of the cell [26], and in turn the waste products of the metabolism modify the surrounding pH and composition.

Several studies show the importance of microbial hydrophobicity and electrical surface charge to define the virulence and success of a bacterial infection, and also how they are changed because of the characteristics of the surrounding media [27–34]. Within this context, this work will address the changes that *S. aureus* undergoes after being subjected to high concentrations of glucose and ketone bodies (hyperglycemia and ketoacidosis). We focus on how these conditions modify its growth behavior, its virulence factors such as hydrophobicity and surface electrical charge, and its capacity to form biofilms. This information may provide some clues to prevent infections in persons suffering from diabetic disorders.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strain and media

Gram-positive *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, obtained from The American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), was used in this study. *S. aureus* was stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in porous beds (Microbank Pro-Lab Diagnostics, Austin, TX, USA). From the frozen stock, blood agar plates (OXOID Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK) were inoculated and incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Bacteria taken from these plates were incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 9 h with Trypticase Soy Broth (TSB) (OXOID Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK). To inoculate 50 mL of TSB glucose-free (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with or without supplements, 25  $\mu\text{L}$  of this pre-culture was used as described below. These cultures were incubated for about 14 h at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  to perform surface characterization experiments. Incubation time coincides with almost the end of the exponential phase of each supplemented growth medium.

To analyze the effect on *S. aureus* of high concentration of glucose and ketone bodies that could occur in diabetic environments, six supplements for culture mediums and/or suspending solutions were prepared based on glucose-free TSB. The choice of these concentrations was based on previous studies performed (data not shown) and on the literature where glucose and ketone body levels are indicated [35–37]. Fasting blood glucose values for diagnosis of diabetes indicate that a concentration  $< 1\text{ g/L}$  is considered non-diabetic, and if it is  $> 1.26\text{ g/L}$  it is diagnosed as diabetes, and it is called hyperglycemia. The glucose levels in growth media or suspensions were reached with glucose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) added at a concentration of 0.9 g/L (normal level, G1) or 1.9 g/L (hyperglycemic level, G2). Regarding ketone body concentrations, the procedures were the same as for glucose. The levels were taken from the literature [38,39] and then bacterial growth tests (not shown) were performed to choose the concentrations of this study. Normal ketone body levels for diagnosis are  $\leq 1\text{ mmol/L}$  and for ketoacidosis concentration is found to be  $\geq 3\text{ mmol/L}$ , as literature shows. The presence of ketone bodies in media was modeled by mixing acetone (Panreac Chemistry SLU, Barcelona, Spain), methyl acetoacetate (ACE) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and hydroxybutyric acid (HA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at a ratio of 1:6 for HA:ACE and a 2% amount of acetone [39,40]. Level of ketone bodies was studied in growth media or solutions by adding this mixture at 1 mmol/L (normal level, K1) or 9 mmol/L (ketoacidosis level, K2). The combined action of glucose and ketone bodies was studied in media or solutions with added glucose at 0.9 g/L and ketone bodies at 1 mmol/L (GK1) or with added glucose at 1.9 g/L and ketone bodies at 9 mmol/L (GK2). The mixture of these concentrations was done because the clinical relevance sought, where low concentrations of the components could appear in non-pathological conditions. The high concentration combination was chosen based on bibliography [35,36], setting a diagnosis blood glucose level (1.9 g/L) and bearing in mind patients of uncontrolled levels of hyperglycemia with high ketoacidosis risk (9 mmol/L). Media or solutions to which neither glucose nor ketone bodies were added were taken as control (C). All the media were sterilized before use.

pH measurements of culture media and bacterial suspension with and without supplements were determined at  $21\text{ }^{\circ}\text{C}$  with a pH-meter GLP 21 (Crison Instruments™, MO, Italy). The pH data are reported as mean values  $\pm$  standard error (SD) of the mean. The statistical analysis was done with the GraphPad InStat 3.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego California USA), using multiple comparisons procedure, Dunnett's test.

### 2.2. Bacterial growth curve

Growth curves of *S. aureus* cultivated with and without the above-mentioned supplements were studied. For this purpose, microorganisms were resuspended in tubes with 3 mL of TSB with and without



supplements at 63% transmittance at 492 nm measured in a horizontal-light spectrophotometer (Helios Epsilon, Thermo Fisher Scientific Inc., UK). Tubes were incubated with shaking at 37 °C in a Hotcold (J. P. Selecta, Barcelona, Spain). Bacterial growth was evaluated by the optical density of the culture in the tubes. Measurements were made at regular time intervals up to 10 h of incubation.

### 2.3. Biofilms assay

For biofilms analysis, microorganisms were resuspended in 9.5 mL glucose-free TSB at 63% transmittance at 492 nm with a  $1 \times 10^6$  CFU/mL. The bacterial growth procedure was similar as that explained in “Bacterial strain and media” section. Then, 100 µL of this bacterial suspension and 100 µL of TSB supplemented with different conditions were added to polystyrene flat-bottomed 96-well microtiter plates (Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany). After 24 h of bacterial growth with shaking at 37 °C O.D. of microtiter plate were measured. The measurements were carried out with a microplate spectrophotometer reader (ELx800; Bio-Tek Instruments, Inc. Winooski, VT, USA). This O.D. data was called OD-growth, because it represents the measure of culture growth by estimating the increase in the medium turbidity. Next, wells were washed three times with phosphate buffered saline (PBS) with and without supplements to remove the non-adherent bacteria. The adhered biofilms were heat-dried and stained with violet crystal (Panreac Chemistry Barcelona, Spain). Excess of dye was eliminated by rinsing the plate with water. Once the dye was dried, 200 µL of 33% (v/v) glacial acetic acid (Panreac Chemistry. Barcelona, Spain) were added. OD-biofilm is the measurement made to this violet crystal at 492 nm. This value of OD-biofilm was associated to the amount of biofilm formed in each well. The experiments were carried out in duplicate and repeated at least four times with independent cultures to confirm reproducibility.

Slime index (SI) was determined to reveal differences in biofilm due to the action of supplements. It was obtained from the ratio between the OD-biofilm and OD-growth and the result was expressed as a percentage relative to the control without supplementation, according to equation [2.1]

$$SI = 100 \frac{\left( \frac{OD\text{-biofilm with supplement}}{OD\text{-growth with supplement}} \right)}{\left( \frac{OD\text{-biofilm without supplement}}{OD\text{-growth without supplement}} \right)} \quad [2.1]$$

Biofilm formation was estimated and was reported as mean values  $\pm$  standard deviation of the mean (SD). The statistical analysis was done with the GraphPad InStat 3.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego California USA), using unpaired samples T-student. Differences were considered statistically significant at p values  $\leq 0.05$ .

### 2.4. Bacteria surface characterization

The effect of supplements on the adhesive capacity of bacteria was evaluated by the Microbial Adhesion to Hydrocarbons (MATH) test. To prepare bacterial suspensions for MATH assays, bacteria were grown in culture medium with or without supplementation. After approximately 14 h, all cultures were near to the end of their exponential phase. Then the bacterial cultures were centrifuged for 5 min at 1000 g (Sorvall TC6, Dulont, Newtown, Pennsylvania, USA) and washed three times with potassium chloride 0.1 mM conditioned at 37 °C. Next, bacteria were resuspended with 3 mL of potassium chloride (KCl) without supplement at an initial optical density ( $A_0$ ) at 492 nm comprised between 0.6 and 0.9. Afterwards, 150 µL n-hexadecane was added to the tube and was vortexed for 1 min, allowed to settle for 10 min and the optical absorbance ( $A_f$ ) measured. The relative hydrophobicity index, R, was calculated according to equation [2.2]

$$R = \left( \frac{A_f - A_o}{A_o} * 100 \right) \quad [2.2]$$

The statistical analysis was done with the GraphPad InStat 3.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego California USA), using Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test.

Zeta potential of *S. aureus* growth in media with or without supplements was measured by electrophoresis with a Zetasizer Nano ZS, (Malvern Instruments, United Kingdom). To prepare bacterial suspensions for zeta potential assays, the bacterial growth was the same as in the MATH procedure. After growth, the bacterial suspension was centrifuged for 5 min at 1000 g and washed three times with potassium chloride (0.1 mM) conditioned at 37 °C. Next, bacteria were resuspended in KCl without supplements. 1 mL of this KCl suspension at an O. D. at 492 nm of 63% was used to fill the measurement cell of the Zetasizer.

The experiments were carried out in duplicate and repeated at least three times with independent cultures to confirm reproducibility. The statistical analysis was done with the GraphPad InStat 3.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego California USA), using compare selected pairs of columns procedure, Bonferroni's test.

### 2.5. Profilometry and Scanning Electron Microscopy (SEM)

Profilometry and Scanning Electron Microscopy experiments were carried out on the biofilms. After the biofilm formation on 22 mm diameter polystyrene samples, samples were washed twice with tempered TSB. Afterwards, these samples were fixed at room temperature with 3 wt% glutaraldehyde around 12–15 h, gently washed with PSB for 5 min and passed down with an ethanol gradient from 30 to 100 vol% for 1 h each.

Profilometry study was made with a confocal profilometer Leica DCM8 and images were analyzed with LeicaMap®. The topography of each biofilm condition was studied from a  $60 \times 60 \mu\text{m}^2$  area image taken at the highest magnification of the equipment (150x objective). In addition, to determine the bacterial packing-stacking caused by aggregates, the parameter biovolume ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) was used. This parameter is used in different researches as a measure of biofilm [41–43], in addition, we will use this parameter to give information on the average thickness (or average height) of single bacteria or aggregates appearing in the biofilm coated surface.

SEM experiments were performed with a scanning electron microscope Quanta 3D FEG (FEI, Hillsboro, US). Before imaging samples were subjected to the same fixation process described in Profilometry, then samples were subsequently vacuum-dried, sputter-coated with Au prior to be inserted in the high-vacuum electron chamber. Images with magnifications ranging from 150x to 50000x were taken randomly in different sections of the samples.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Bacterial growth

Fig. 1 shows the growth curves of *S. aureus* in the conditions studied. In general, for all the media, the lag phase was almost finished after 90 min from the beginning of the culture, giving way to the appearance of the exponential growth phase which lasted for about 300 min. After this time, a quasi-plateau of the curve indicates the period of the stationary phase of growth.

The stationary phase in supplemented growth media attained higher bacterial concentration values (in optical density) than in the control (Fig. 1), and appeared to be highest for the medium with the highest concentration of glucose, G2. It should be noted that results in the growth curve corresponding to this period were affected by a high experimental uncertainty. This was especially important in the case of media where ketone bodies were present because of the formation of lumps of the planktonic bacteria which could not be dispersed even by vortexing. Tentatively, the order in the concentrations of *S. aureus* in the stationary phase can be given as:  $G2 > GK2 > G1 > GK1 > K1 > K2 > C$ .

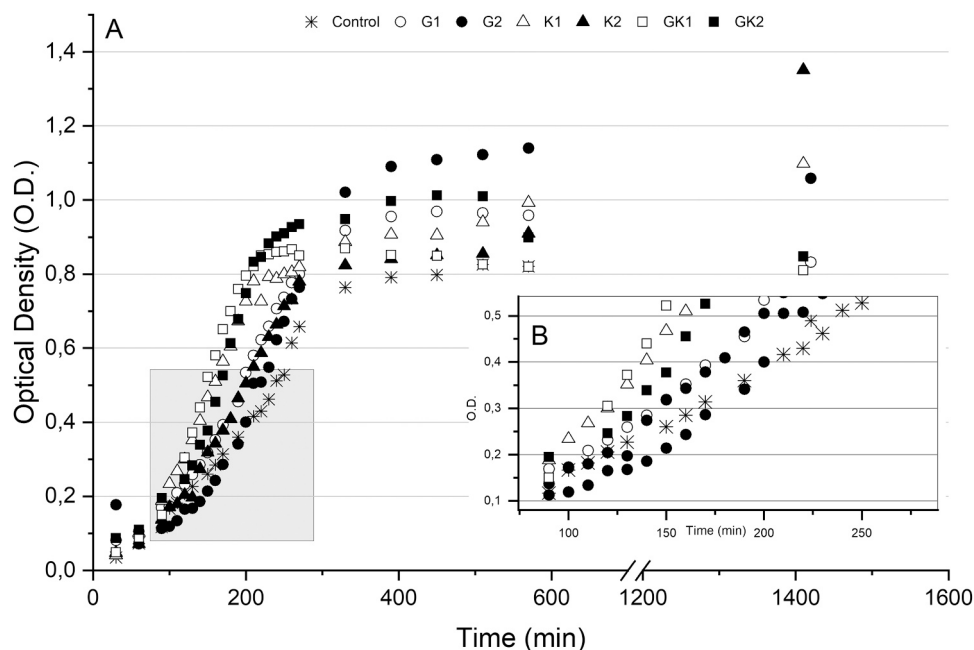


Fig. 1. A) Representative *S. aureus* growth curves in each culture media; B) Zoom of the exponential phase of bacterial growth.

Additionally, in order to consider any change in the OD due to the bacterial size, the diameters of the bacteria grown in the different culture media were measured by profilometry. Table 1 shows the mean diameters with the standard deviations, and it can be observed that the size of all bacteria is the same within experimental uncertainty, consequently, not affecting to the OD measured after growth.

Fig. 1 A shows the growth curves of *S. aureus* for each culture medium, and moreover in Fig. 1B we can see in more detail the exponential growth phase for each one. The exponential phase of bacterial growth has different slopes depending on the nutrients in the media (Fig. 1B), indicating that the rates of proliferation of bacteria in each media were different. Exponential growth phase can be characterized by the following equation [3.1]:

$$\log N = \log N_0 - \mu * (t_f - t_0) \tag{3.1}$$

Where N is the final absorbance of growth, N<sub>0</sub> the initial absorbance of bacterial growth, μ an index of growth rate which is called the specific growth rate constant and has units of the inverse of time (min<sup>-1</sup>). In our case, it was more informative to obtain the generation time (g), which is an indicator of the observed behavior. The parameter g was obtained with the following equation [3.2]:

$$g = \frac{0.693}{\mu} \tag{3.2}$$

This variable (g) gives the time it takes for the population to double (Fig. 2).

Fig. 2 shows that, within the experimental uncertainty, generation

times were between ca. 75 min for control and 47 min for GK1 medium. Addition of glucose to the growth media increased the rate of *S. aureus* growth respect to control, but g for G1 and G2 were not statistically different. Thus, the rate of growth in glucose does not appear to be dependent on the amount of glucose in the medium. This unbiased behavior indicates that even the low amount of glucose in the G1 medium, which corresponds to the concentration present in TSB in a non-pathological state, is sufficient to trigger the fast growth rate of *S. aureus* when glucose is its single nutrient. This behavior agrees with the observations of Xie et al., who found that the rate of growth in the exponential phase and also the level found in the stationary phase of *S. aureus* was mostly independent of the concentrations of glucose in media of between 2 and 8 g/L [44]. However, we found that bacterial growth, as shown by the level in the stationary phase, was favored in the media with a hyperglycemic concentration, G2, over G1 media.

Ketone bodies are known as alternative energy reserves for several microorganisms [45–47] and according to Fig. 2 they appear to provide a faster growth rate in K1 than glucose. Interestingly, media in which ketone bodies and glucose were added together, GK1 and GK2, decreased the generation time compared to media within only ketone bodies, K1 and K2, in the same proportion as did the addition of glucose on the g in the control medium, respectively. The highest rate of *S. aureus* growth corresponded to the GK1 medium, the generation time in this medium being about 28% less than for control media.

Effect of ketone bodies on microorganisms appears to be dependent on the bacteria and the concentration in the suspension. Potezny et al. found that ketone bodies act as bactericide for the gram-negative

Table 1

Zeta potential (mV) and hydrophobicity (%) values for *S. aureus* grown in the different supplemented culture media are in the table. In addition, pH values and the means diameters of the bacteria belonging to the different biofilms are shown. Significant differences (p < 0.05) are indicated by: + for initial values with respect to the control; ^ for values after bacterial growth; \* within each supplemented medium to compare before and after bacterial growth effect. For significant differences (p < 0.05) with respect to the control in zeta potential and hydrophobicity, it marked with \*\*.

	C	G1	G2	K1	K2	GK1	GK2
Relative Hydrophobicity (%)	7 ± 6	49 ± 5**	47 ± 5**	75 ± 4**	77 ± 10**	72 ± 3**	82 ± 3**
Zeta potential (mV)	-39 ± 2	-47 ± 2**	-49 ± 5**	-38 ± 2	-19 ± 5**	-39 ± 4	-22 ± 8**
pH before growth	7.3 ± 0.09	7.2 ± 0.05 <sup>+</sup> *	7.1 ± 0.05 <sup>+</sup> *	7.2 ± 0.02 <sup>+</sup>	6.0 ± 0.04 <sup>+</sup> *	7.0 ± 0.08 <sup>+</sup> *	5.9 ± 0.03 <sup>+</sup> *
pH after growth	7.3 ± 0.02	5.4 ± 0.02 <sup>*</sup>	4.9 ± 0.03 <sup>*</sup>	7.2 ± 0.01	6.6 ± 0.03 <sup>*</sup>	5.5 ± 0.28 <sup>*</sup>	4.9 ± 0.007 <sup>*</sup>
Mean Diameters (μm)	0.98 ± 0.06	1.02 ± 0.07	0.98 ± 0.09	1.07 ± 0.14	1.02 ± 0.08	0.95 ± 0.12	0.92 ± 0.14

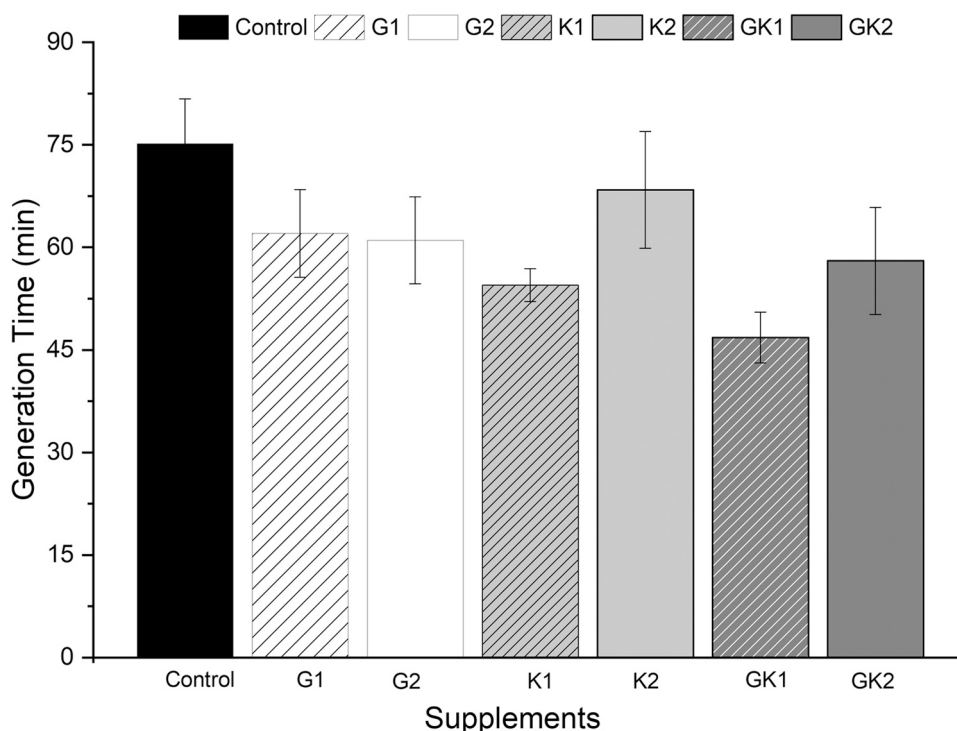


Fig. 2. Generation time of *S. aureus* in each culture media.

bacteria *E. coli* [48]. Nevertheless, growth of *S. aureus* with ketone bodies was enhanced with respect to the control medium, in agreement with the results of Dubos et al. who found that *S. aureus* can grow better in a medium with ketone bodies at pH as low as 5.5 than in a medium without extra nutrients [47]. But in spite of the high rate of growth of *S. aureus* because of the consumption of these metabolites, the total quantity yielded in the stationary phase in K1 and K2 have the lowest values, except for C, which means that ketone bodies are not as effective as glucose in increasing the population of bacteria despite the faster growth rate they provide to the cells.

### 3.2. Surface properties

Table 1 summarizes the relative hydrophobicity and zeta potential of *S. aureus* grown in media with and without supplements after 14 h of growth (the end of exponential growth phase with 50 mL of culture medium). This table also contains information about the pH of the culture medium, before and after bacterial growth. It should be noted that when the bacterial culture is in the exponential phase, the suspension media still have a large amount of nutrients to maintain bacterial proliferation, but they also contain waste compounds produced by the metabolic activity of the bacteria due to their growth.

Bacteria growth in the control medium does not modify the pH of the medium. Also, the cells grown in this condition appears very hydrophilic and with a negative surface charge. However, these properties are modified if the cells grow in supplemented media. Addition of glucose to the media in concentrations equivalent to healthy or hyperglycemic conditions results in bacteria with a moderate-intermediate hydrophobicity (ca. 50%), and with a more negatively charged surface than control bacteria. The structure of glucose provides the molecule with an electronegative and amphiphilic character, which makes glucose with a moderate hydrophobicity [49]. These properties appear to be transferred to the bacteria because of retention on their surface of glucose from the media. The pH of TSB does not change through the incorporation of glucose to the media, but the pH of the suspension after bacterial growth drops 1.8 and 2.2 points in G1 and G2 media, respectively, compared to the control media. A waste product of metabolism of

glucose by bacteria is lactic acid [50], so it was to be expected that the observed change of pH was related to the presence of this acid in the media. Consequently, it cannot be discarded that some of these waste molecules were also present in the interfacial layer on the cell. The influence of these parameters has been studied by Djerebi et al. [51]. In their work they analysed how pH influences the physico-chemical properties of *Acinetobacter baumannii*. Their results show how pH influences the hydrophobicity of the microorganism and consequently bacterial adhesion.

The sole presence in the growth media of the hydrophobic molecules of ketone bodies caused the surface of bacteria to increase its hydrophobicity, up to values of around 75%. When retained on the bacteria, the lower polarity of these molecules made the zeta potential of cells to decrease, probably because the adsorbed molecules hindered some of the charge of the molecules in the cell wall [32,52]. Nevertheless, the modification of the zeta potential respect to control bacteria was observed only in the media with the highest concentration of ketone bodies (K2), the zeta potential change being from  $-39 \pm 2$  mV for control bacteria to  $-19 \pm 5$  mV for bacteria grown in a medium rich in ketone bodies. It is likely that the concentration of ketone bodies in the range simulating healthy conditions, K1, was not able to sufficiently affect the bacterial surface charge. Acetoacetate and (R)-3-hydroxybutyric acid, whose pKa were 3.58 and 4.7, respectively are relatively strong acids [53]. When they were added to the media in the concentration of K2, it caused the pH to drop by up to 1.3 points, despite the buffering ability of TSB, unlike in glucose concentrations where the drop in pH occurs due to bacterial growth caused by glucose metabolism. However, the lower concentration of ketone bodies in K1 was not sufficient to decrease the pH of TSB. The pH in bacterial suspensions in the exponential phase in the media K2 increased by 0.6 respect to the initial suspension, probably because of the withdrawal of some ketone bodies due to their metabolic consumption by bacteria. As expected, no change was detected for the pH of the K1 media after bacterial growth, because there was no change in pH in the initial suspension either. Therefore, the modification of pH because of the metabolism of ketone bodies confirms again the higher consumption of these metabolites in K2 than in K1. The waste products of metabolism of ketone bodies appear to have a more



basic pH than the ketone bodies themselves. However, their release by cells growth or removal of the ketone bodies from the medium, due to their consumption, do not seem to be sufficient in K1 to overcome the initial pH, but to slightly increase the pH in K2 medium.

For bacteria in mixed media, hydrophobicity and zeta potential values are similar to those for bacteria growth in ketone bodies as a single nutrient. This suggests that there is a preferential adsorption of ketone bodies over glucose on the bacterial surface because of the more favorable solubility of glucose in water. As in the case of suspensions in the exponential phase with glucose as a single additive, the pH of the suspensions with both glucose and ketone bodies in the exponential phase drops as a result of the lactic acid produced by the metabolism of glucose by bacteria. In the medium with low concentration of glucose and ketone bodies, GK1, there was a drop of pH of 1.5 points, close to the pH drop produced in G1 medium, which was 1.7. For the medium with the highest concentration of glucose and ketone bodies, GK2, the pH after bacterial growth dropped to 4.9, the same value as in medium G2, even though the initial pH in G2 and GK2 differed by 1.2 units. The highest hydrophobicity as well as the lowest absolute zeta potential are associated with the highest amount of ketone bodies and, within the experimental uncertainty, the presence of glucose in mixed media did not cause any significant difference.

### 3.3. Biofilm formation

Fig. 3 shows the results on the study of biofilm formation. These data provide further information on the influence of glucose and ketone supplements.

The ability of *S. aureus* to form biofilms in each media was analyzed through the Slime Index, which provides information about the relative capacity for biofilm creation independent of bacterial growth (Fig. 3), and it is useful to study the influence of supplements on biofilm creation with respect to the control. Additionally, the use of SEM images (Fig. 4) can provide a qualitative idea of the biofilm configuration on the surface, and the use of profilometry images (Fig. 5) can help in the quantification of the bacterial biofilm coverage and the biofilm biovolume (Table 2).

The addition of any supplement increased the Slime Index of biofilms. This effect was especially noticeable in the case of the pathological glucose concentration, G2. Despite differences in metabolism between planktonic and sessile bacteria, consumption of glucose favored a higher production of poly-N-acetyl- $\beta$ -(1-6)-glucosamine (PNAG) [46], essential in the virulence of *S. aureus* biofilm, as denoted by the SI (Fig. 3), and a higher biofilm settlement (Fig. 4). The higher percentage on the SI under the G2 condition than under G1 indicates that availability of glucose is also decisive in the production of slime in the biofilm. Profilometry analysis (Table 2) also provided a higher bacterial coverage in G2,  $65.3 \pm 0.8\%$ , than in G1,  $32.3 \pm 0.3\%$ .

The impact of ketone bodies on biofilm formation has been analyzed for some Gram-negative bacteria and acetoacetate, and they have been described as an inhibitor of biofilm formation by some Gram-negative strains [48]. Horne et al. studied the action of acetoacetate and ethyl acetoacetate on biofilms of three different pathogenic bacterial strains [54]. They observed that a high concentration of acetoacetate, about 20 and 35 mg/mL depending on the strain, caused an inhibitory effect on biofilm growth, despite the fact that a moderate concentration would cause an increase in biofilm. In our research, biofilms grown with the sole presence of ketone bodies as nutrient had lower bacterial coverage than for the biofilm grown in the control media, as shown by SEM images (Fig. 4) but their slime index was even higher than for biofilm grown under healthy glucose conditions (G1) (Fig. 3). Quantitatively, in K1 the percentage of bacterial coverage is lower than in the control (Table 2) but in the case of K2 the percentage of bacterial coverage is similar to G1 and it is the 3rd highest ( $33\% \pm 8$ ), similar to the “position” occupied in the SI results. This behavior suggests that concentration of ketone bodies plays a role in the fixation of biofilm to the substrata, although in the case of planktonic bacterial growth (Fig. 1) ketone bodies had the lowest values of optical densities in the stationary phase (excluding cultures in control media).

Biofilms growth under the highest glucose concentrations, G2 and GK2, had the highest bacterial coverages, especially in the case of the biofilm growth in GK2 ( $81.1\% \pm 0.3$ ). Cells grown in GK2 media showed the highest hydrophobicity and the lowest negative zeta potential among the different cultures. The hydrophobic attractive force and a

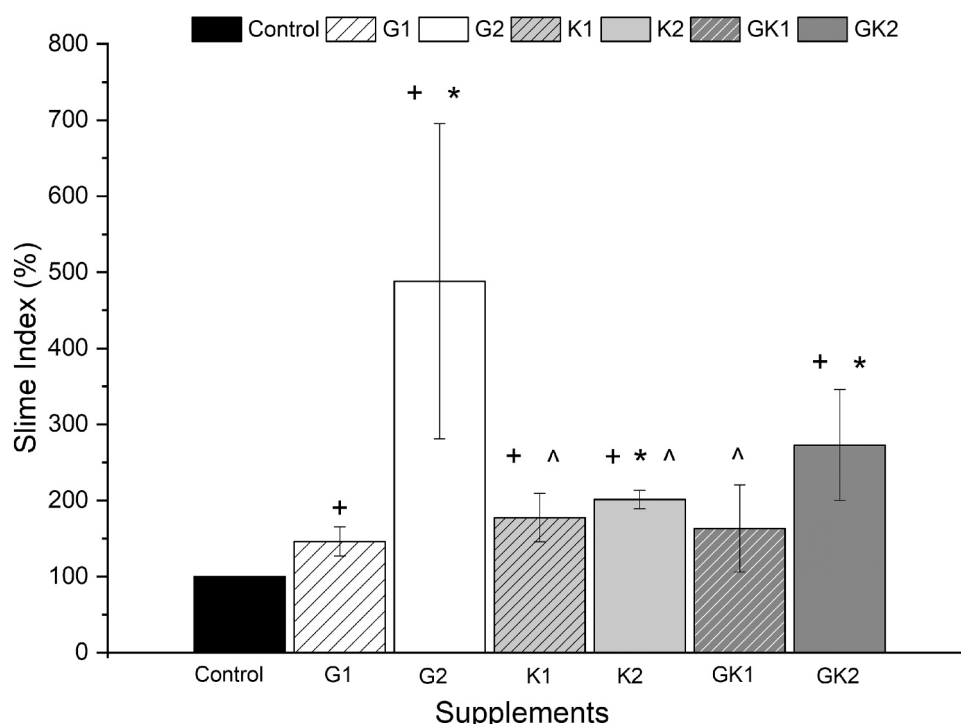
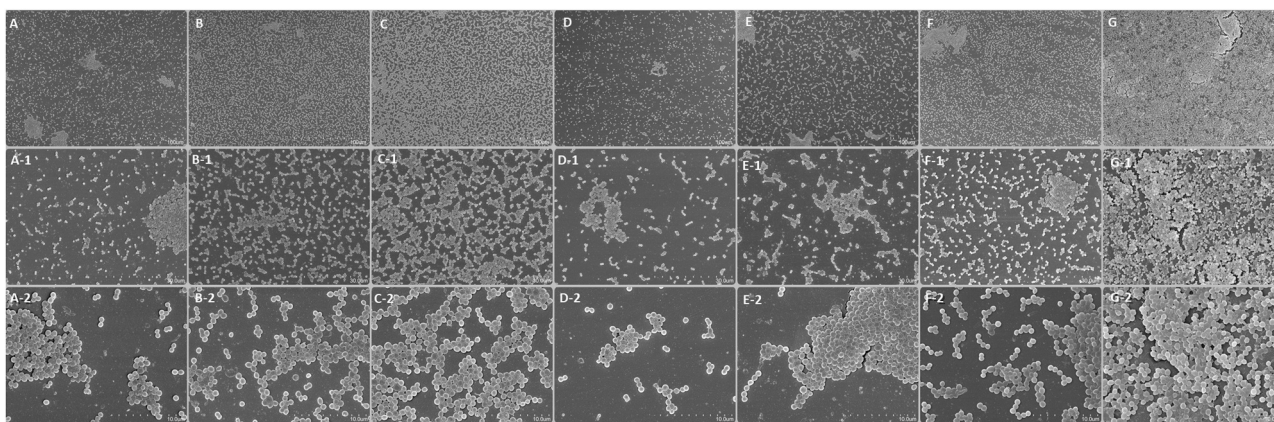
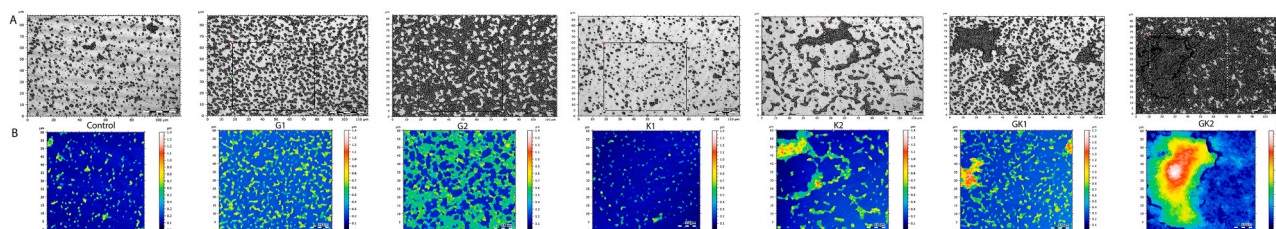


Fig. 3. Percentage of SI obtained for each condition. Significant differences  $p < 0.05$  from control (+), from G1 (\*), from G2(^).



**Fig. 4.** SEM images taken at 100, 30 and 10  $\mu\text{m}$  magnification for the biofilms formed by *S. aureus* in TSB supplemented with the different concentrations. A, A-1 and A-2, for biofilm formed with control medium; B, B-1 and B-2 for biofilm formed with G1 medium; C, C-1, C-2 for biofilm formed with G2 medium; D, D-1, D-2 for biofilm formed with K1; E, E-1, E-2, are from the biofilm made with K2 medium; F, F-1, F-2, are from GK1 medium; and finally images G, G-1, G-2 are from the biofilm created by the bacteria in GK2 medium.



**Fig. 5.** A) Confocal Profilometer images of each biofilm without and with supplements, taken at maximum magnification (150x objective) B)  $60 \times 60$  area extracted from the, previous image where the topography is analyzed. From left to right we find the biofilm images of the Control, G1, G2, K1, K2, GK1 and GK2 supplements.

**Table 2**

Bacterial coverage (%) and biovolume ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) measured on profilometry images of bacterial biofilms created with different culture media. Significant differences ( $p < 0.05$ ) are indicated by: a with respect to the control; b with respect to the G1, c with respect to the G2; d with respect to the K1; e with respect to the K2; f with respect to the GK1.

	C	G1	G2	K1	K2	GK1	GK2
<b>Bacterial coverage (%)</b>	$16.1 \pm 0.4$	$32.4 \pm 0.3^{a,b}$	$65.3 \pm 0.8^{a,b}$	$5.5 \pm 0.8^{a,b,c}$	$33 \pm 8^{a,c,d}$	$23.5 \pm 0.8^{a,b,c,d}$	$81.1 \pm 0.3^{a,b,c,d,e,f}$
<b>Biovolume (<math>\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2</math>)</b>	$1.1 \pm 0.1$	$1.08 \pm 0.01$	$1.3 \pm 0.4$	$0.94 \pm 0.07$	$0.96 \pm 0.02$	$1.4 \pm 0.1$	$3.8 \pm 1.9$

reduction of the electrostatic repulsion among cells allow better packing of cells in biofilm and a more efficient retention on the surface. It cannot be ruled out that the wide dispersion in SI results for biofilm growth in G2 and low biofilm retention observed by SEM for these cultures could be due to the very different surface characteristics of G2 respect to GK2. This lower retention results in less bacteria on the surface: bacteria grown in G2 medium had only an intermediate value of hydrophobicity and a very much higher negative surface charge than bacteria grown in GK2. The more efficient electrostatic repulsion and the lower hydrophobic attraction among bacteria from G2 culture compared to those from the GK2, make it easier for the cells to be unexpectedly removed from the biofilm on the surface of the polystyrene wells. A complementary information can be extracted from the profilometry images of Fig. 5, which support the idea that surface properties of bacteria under GK2 are optimal for virulence, promoting bacterial coverage and packing. Topographical images show that only in the case of GK2 the Z-scale changes from 0 to 1.4/1.7 nm to 0–8 nm, which means that bacteria in the zones of higher accumulations of GK2 have a multi-layer configuration, bearing in mind the mean bacterial diameter. In this sense, also the biofilm biovolume (Table 2) matches with the visual topographical information: it increases from a biovolume of about  $1.1 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$  to  $3.8 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ , which is about a 245% of increment.

The treatments with a mixture of both components have a

combination of the characteristics observed in the treatments with the single supplements: The additive activity of glucose and ketone bodies forms stronger biofilm. In the case of GK2, hyperglycemia provides better surface coverage and ketoacidosis increases the packing of the bacterial cells in a multi-layered configuration.

From these results the importance of the role played by the medium in which bacteria grow can be confirmed, since it alters the growing capabilities and surface properties of bacteria. Glucose is an effective nutrient for *S. aureus* as it favors its growth as well as biofilm formation. Ketone bodies can also be used by the cells as nutrients and appear to provide energy to cells at a higher rate than glucose. However, despite the fact that it is not so favorable for the metabolism of bacteria it makes the surface of bacteria very hydrophobic and with a lower electrical charge, thus providing more virulence to the bacteria.

#### 4. Conclusions

In the pathological situation in which hyperglycemia and ketoacidosis are acting together, a combined action from the availability of both nutrients on bacteria appears. On the one hand, the activity of bacteria, as reflected in its growth and biofilm formation capacity, appears to be determined by the availability of glucose in the media. The level of bacteria production reached in the stationary phase was similar for

cultures in GK2 and G2, but higher than in K2. pH after growth in medium GK2 was almost the same level as for G2 medium, even taking into account the basification that the metabolism of ketone bodies produced, as shown by the pH change which occurred in the medium K2. However, surface characteristics such as hydrophobicity and zeta potential appear to be determined by the metabolism of the ketone bodies. Under the pathological environment GK2 *S. aureus* takes advantage of a high capacity for growth of the glucose metabolite, but the intervention of the ketone bodies causes significant modifications in the surface properties of the bacteria, giving way to the most compact and thickest biofilm, which is likely to have the worst infection evolution.

#### CRedit authorship contribution statement

María Fernández-Grajera: Conceptualization, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - Original Draft and Review & Editing and Funding acquisition. Miguel A. Pacha-Olivenza: Methodology, Writing - Original Draft, Project administration and Funding acquisition. Amparo M. Gallardo-Moreno: Writing - Original Draft and Review & Editing, Project administration, Data Curation and Funding acquisition. M. Luisa González-Martín: Writing - Original Draft and Review & Editing, Supervision and Funding acquisition. Ciro Pérez-Giraldo: Resources, Writing - Review & Editing and Funding acquisition. M. Coronada Fernández-Calderón: Resources, Writing - Original Draft and Review & Editing, and Supervision.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgement

Authors are grateful to Junta de Extremadura and FEDER (grant numbers GR18153, GR18096 and IB20092), project RTI2018-096862-B-I00, supported by FEDER (European Regional Development Fund "Una Manera de hacer Europa"), Ministry of Science and Innovation of the Government of Spain, Spanish Research Agency, respectively. Also, MFG, would like to thank the Junta de Extremadura and the European Social Fund for its grant PD16055. Thanks also to D. Romero-Guzmán for his assistance in profilometry measurements and analysis, and to James Mc-Cue for assistance in language editing.

#### References

- [1] C. Weidenmaier, J.C. Lee, Structure and function of surface polysaccharides of *Staphylococcus aureus*, in: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 409, Springer Verlag, 2017, pp. 57–93.
- [2] M. Fernandes-Gomes, J.B. Amorim, L.C. Giannas, M.A. Castillo-Salgado, Biomaterials for tissue engineering applications in diabetes mellitus, in: L. A. Dobrzański (Ed.), *Biomater. in Regen. Med.*, InTech, 2018, pp. 409–435.
- [3] International Diabetes Federation, *IDF Diabetes Atlas Eighth edition 2017*, 8th ed. 2017.
- [4] G. Wilcox, *Insulin and Insulin*, *Clin. Biochem. Rev.* 26 (2) (2005) 19–39.
- [5] A.K. Prajapati, Urinary tract infection in diabetics, in: Payam Behzadi (Ed.), *Microbiology of Urinary Tract Infections - Microbial Agents and Predisposing Factors*, 30, IntechOpen, 2018, pp. 2–5.
- [6] H. Brem, M. Tomic-Canic, Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes, *J. Clin. Investig.* 117 (5) (2007) 1219–1222.
- [7] H.M. Calvet, T.T. Yoshikawa, Infections in diabetes, *Infect. Dis. Clin. North Am.* 15 (2) (2001) 407–421.
- [8] F. López-Simarro, E. Redondo Margüello, J.J. Mediavilla Bravo, T. Soriano Llorca, J. Iturralde Iriso, A.H. Pozo, Prevención y tratamiento de la enfermedad infecciosa en personas con diabetes, *SEMERGEN* 45 (2) (2019) 117–127.
- [9] M. Board, C. Lopez, C. van den Bos, R. Callaghan, K. Clarke, C. Carr, Acetoacetate is a more efficient energy-yielding substrate for human mesenchymal stem cells than glucose and generates fewer reactive oxygen species, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 88 (2017) 75–83.
- [10] T. Richard, F. Buttafuoco, M. Vanhaeverbeek, S. Cherifi, Association between diabetes mellitus and infection: which evidence for a causal role of hyperglycemia? *Rev. Med. Brux.* 39 (6) (2018) 495–504.
- [11] A. Sultan, B. Bauduceau, Infectious risk in diabetes: let's talk about it!, *Med. des Mal. Metab.* 14 (1) (2020) 13–20.
- [12] E.J. Hamilton, N. Martin, A. Makepeace, B.A. Sillars, W.A. Davis, T.M.E. Davis, Incidence and predictors of hospitalization for bacterial infection in community-based patients with type 2 diabetes: the fremantle diabetes study, *PLoS One.* 8 (3) (2013), e60502.
- [13] I.M. Carey, J.A. Critchley, S. Dewilde, T. Harris, F.J. Hosking, D.G. Cook, Risk of infection in type 1 and type 2 diabetes compared with the general population: a matched cohort study, *Diabetes Care* 41 (3) (2018) 513–521.
- [14] D.J. Gehling, B. Lecka-Czernik, N.A. Ebraheim, Orthopedic complications in diabetes, *Bone* 82 (2016) 79–92.
- [15] T.W.K. Kok, N. Agrawal, S.S. Sathappan, W.K. Chen, Risk factors for early implant-related surgical site infection, *J. Orthop. Surg.* 24 (1) (2016) 72–76.
- [16] L. Hakeem, R.B. Laing, I. Tonna, J.G. Douglas, A.R. Mackenzie, Invasive *Staphylococcus aureus* infections in diabetes mellitus, *Br. J. Diabetes Vasc. Dis.* 13 (4) (2013) 164–177.
- [17] E.N. Menne, et al., *Staphylococcus aureus* infections in pediatric patients with diabetes mellitus, *J. Infect.* 65 (2) (2012) 135–141.
- [18] M.L.U. Hansen, N. Gotland, N. Mejer, A. Petersen, A.R. Larsen, T. Benfield, Diabetes increases the risk of disease and death due to *Staphylococcus aureus* bacteremia. A matched case-control and cohort study, *Infect. Dis. (Auckl)*. 49 (9) (2017) 689–697.
- [19] E.J. Boyko, et al., NIDDM and prevalence of nasal *Staphylococcus aureus* colonization. San Luis Valley Diabetes Study, *Diabetes Care* 12 (3) (1989) 189–192.
- [20] J. Smit, M. Sogaard, H.C. Schönheyder, H. Nielsen, T. Frøsløv, R.W. Thomsen, Diabetes and risk of community-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia: a population-based case-control study, *Eur. J. Endocrinol* 174 (5) (2016) 631–639.
- [21] C. Alves, J. Casqueiro, J. Casqueiro, Infections in patients with diabetes mellitus: a review of pathogenesis, *Indian J. Endocrinol. Metab.* 16 (7) (2012) 27.
- [22] A.B. Lovati, C.L. Romanò, L. Monti, C. Vassena, S. Previdi, L. Drago, Does PGE1 vasodilator prevent orthopaedic implant-related infection in diabetes? Preliminary results in a mouse model, *PLoS One* 9 (4) (2014), e94758.
- [23] S.A. Montelongo, T. Guda, J. Ong, Bone graft for craniofacial applications. *Translating Biomaterials for Bone Graft: Bench-top to Clinical Applica*, CRC Press - Taylor&Francis Group, 2017, p. 14.
- [24] R. Jacquet, A.E. LaBauve, L. Akoolo, S. Patel, A.A. Alqarzaee, T.W. Fok Lung, K. Poorey, T.P. Stinear, V.C. Thomas, R.J. Meagher, D. Parker, Dual gene expression analysis identifies factors associated with *Staphylococcus aureus* virulence in diabetic mice, *Infect. Immun.* 87 (5) (2019), e00163-19.
- [25] M. Croes, B.C.H. Wal, H.C. Vogely, Impact of bacterial infections on osteogenesis: evidence from in vivo studies, *J. Orthop. Res.* 37 (10) (2019) 2067–2076.
- [26] M. Geoghegan, J.S. Andrews, C.A. Biggs, K.E. Eboigbodin, D.R. Elliott, S. Rolfe, J. Scholes, J.J. Ojeda, M.E. Romero-González, R.G.J. Edyvean, L. Swanson, R. Rutkaite, R. Fernando, Y. Pen, Z. Zhang, S.A. Banwart, The polymer physics and chemistry of microbial cell attachment and adhesion, *Faraday Discuss.* 139 (2008) 85–103.
- [27] M.A. Pacha-Olivenza, A. Rodríguez-Cano, M.L. González-Martín, A.M. Gallardo-Moreno, Kinetic of adhesion of *S. epidermidis* with different EPS production on Ti6Al4V surfaces, *Biomed. Res. Int.* 2019 (2019), 1437806.
- [28] S.O. Khelissa, C. Jama, M. Abdallah, R. Boukherroub, C. Faille, N.E. Chihib, Effect of incubation duration, growth temperature, and abiotic surface type on cell surface properties, adhesion and pathogenicity of biofilm-detached *Staphylococcus aureus* cells, *AMB Express* 7 (1) (2017) 191.
- [29] P. Lather, A.K. Mohanty, P. Jha, A.K. Garsa, Contribution of cell surface hydrophobicity in the resistance of *Staphylococcus aureus* against antimicrobial agents, *Biochem. Res. Int.* vol. 2016 (2016), 109290.
- [30] A.M. Gallardo-Moreno, M.L. González-Martín, J.M. Bruque, C. Pérez-Giraldo, R. Sánchez-Silos, A.C. Gómez-García, Influence of the growth medium, suspending liquid and measurement temperature on the physico-chemical surface properties of two enterococci strains, *J. Adhes. Sci. Technol.* 17 (14) (2003) 1877–1887.
- [31] Y. Oogai, M. Matsuo, M. Hashimoto, F. Kato, M. Sugai, H. Komatsuzawa, Expression of virulence factors by *Staphylococcus aureus* grown in Serum, *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (22) (2011) 8097–8105.
- [32] Y. Liu, A.M. Gallardo-Moreno, P.A. Pinzon-Arango, Y. Reynolds, G. Rodriguez, T. A. Gamesano, Cranberry changes the physicochemical surface properties of *E. coli* and adhesion with uroepithelial cells, *Colloids Surf. B* 65 (1) (2008) 35–42.
- [33] Y. Liu, P.A. Pinzón-Arango, T.A. Gamesano, Impact of cranberry juice and proanthocyanidins (PACs) on the zeta potentials of *Escherichia coli* and uroepithelial cells, *Acta Hort.* 841 (2009) 259–263.
- [34] A.Y. Rad, H. Ayhan, E. Piskin, Adhesion of different bacterial strains to low-temperature plasma-treated sutures, *J. Biomed. Mater. Res.* 41 (3) (1998) 349–358.
- [35] A.D. Association, 2. Classification and diagnosis of diabetes, *Diabetes Care* 39 (1) (2016) S13–S22.
- [36] P. Ezkurra-Loiola, Guía de actualización en diabetes mellitus tipo 2, *Fundación* (2016).
- [37] F.F. Ferri, Ferri's Clinical Advisor 2021, Elsevier, 2021, p. 2123.
- [38] U. Dashora, A. Gallagher, K. Dhataria, P. Winocour, R. Gregory, Association of British Clinical Diabetologists (ABCD) position statement on the risk of diabetic ketoacidosis associated with the use of sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors, *Br. J. Diabetes Vasc. Dis.* 16 (4) (2016) 206–209.
- [39] J. Brooke, M. Stiehl, O. Ojo, Evaluation of the accuracy of capillary hydroxybutyrate measurement compared with other measurements in the diagnosis of diabetic ketoacidosis: a systematic review, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13 (9) (2016) 837.
- [40] L. Laffel, Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes, *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 15 (6) (1999) 412–426.



- [41] C. Rodríguez-Melcón, C. Alonso-Calleja, R. Capita, Architecture and viability of the biofilms formed by nine listeria strains on various hydrophobic and hydrophilic materials, *Appl. Sci* 9 (2019) 5256.
- [42] B.H. D. Panariello, M.I. Klein, A.C. Pavarina, S. Duarte, Inactivation of genes *TEC1* and *EFG1* in *Candida albicans* influences extracellular matrix composition and biofilm, morphology 9 (1) (2017) 1385372.
- [43] K. Henriksen, et al., *P. aeruginosa* flow-cell biofilms are enhanced by repeated phage treatments but can be eradicated by phage–ciprofloxacin combination—monitoring the phage–*P. aeruginosa* biofilms interactions, *Pathog. Dis.* 77 (2) (2019).
- [44] Y. Xie, J. Chen, A. Xiao, L. Liu, Antibacterial activity of polyphenols: structure-activity relationship and influence of hyperglycemic condition, *Molecules* 22 (11) (2017) 1913.
- [45] P. Aneja, R. Dziak, G.Q. Cai, T.C. Charles, Identification of an acetoacetyl coenzyme A synthetase-dependent pathway for utilization of L-(+)-3-hydroxybutyrate in *Sinorhizobium meliloti*, *J. Bacteriol.* 184 (6) (2002) 1571–1577.
- [46] G.F. Cahill, Fuel metabolism in starvation, *Annu. Rev. Nutr.* 26 (1) (2006) 1–22.
- [47] R.J. Dubos, Effect of Ketone Bodies and other metabolites on the survival and multiplication of *Staphylococci* and *Tubercle Bacilli*, *J. Exp. Med* 98 (2) (1953) 145–155.
- [48] N. Potezny, E.R. Atkinson, A.M. Rofe, R.A. Conyers, The inhibition of Bacterial cell growth by ketone bodies, *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 59 (5) (1981) 639–649.
- [49] Y. Koga, K. Nishikawa, P. Westh, Relative hydrophobicity/hydrophilicity of fructose, glucose, sucrose and trehalose as probed by 1-propanol: A differential approach in solution thermodynamics, *J. Phys. Chem. B* 111 (50) (2007) 13943–13948.
- [50] M.T. Madigan, T.D. Brock, J.M. Martinko. *Brock Biologia of Microorganisms*, fourteenth edition., Pearson Education Ltd., 2015.
- [51] R. Djeribi, Z. Bouchloukh, W. Zouaoui, H. Latrache, F. Hamadi, B. Mena, A study of pH effects on the bacterial surface physicochemical properties of *Acinetobacter baumannii*, *Colloids Surf. B* 102 (2013) 540–545.
- [52] V. Vadillo-Rodríguez, M.A. Cavagnola, C. Pérez-Giraldo, M.C. Fernández-Calderón, A physico-chemical study of the interaction of ethanolic extracts of propolis with bacterial cells, *Colloids Surf. B, Biointerfaces* 200 (2021), 111571.
- [53] P.A.C. McPherson, Ketone bodies. *Encyclopedia of Food and Health*, Elsevier Inc., 2015, pp. 483–489.
- [54] S.M. Horne, M. Schroeder, J. Murphy, B.M. Prüß, Acetoacetate and ethyl acetoacetate as novel inhibitors of bacterial biofilm, *Lett. Appl. Microbiol.* 66 (4) (2018) 329–339.

## Article

# Bacterial Response to the Surface Aging of PLA Matrices Loaded with Active Compounds

María Fernández-Grajera<sup>1,2</sup>, Amparo María Gallardo-Moreno<sup>1,2,3</sup>, Verónica Luque-Agudo<sup>4,\*</sup> ,  
María Luisa González-Martín<sup>1,2,3</sup> and Margarita Hierro-Oliva<sup>1,2,3</sup> 

<sup>1</sup> Department of Applied Physics, Faculty of Science, University of Extremadura, 06006 Badajoz, Spain

<sup>2</sup> University Institute of Extremadura Sanitary Research (INUBE), 06006 Badajoz, Spain

<sup>3</sup> Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), 06006 Badajoz, Spain

<sup>4</sup> Department of Natural Systems and Resources, E.T.S.I. of Forestry, Forestry and Natural Environment, Polytechnic University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

\* Correspondence: v.luque@upm.es

**Abstract:** The use of active components in biomaterials improves the properties of existing ones and makes it possible to obtain new devices with antibacterial properties that prevent infections after implantation, thus guaranteeing the success of the implant. In this work, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and magnesium particles were incorporated into polylactic acid (PLA) films to assess the extent to which progressive aging of the new surfaces resists bacterial colonization processes. For this purpose, the films' surface was characterized by contact angle measurements, ToF-SIMS and AFM, and adhesion, viability and biofilm growth of *Staphylococcus epidermidis* bacteria on these films were also evaluated. The results show that the inclusion of Mg and CTAB in PLA films changes their surface properties both before and after aging and also modifies bacterial adhesion on the polymer. Complete bactericidal activity is exhibited on non-degraded films and films with CTAB. This antibacterial behavior is maintained after degradation for three months in the case of films containing a higher amount of CTAB.

**Keywords:** biomaterial; polylactic acid; surface characterization; surface aging; *Staphylococcus epidermidis*; antimicrobial compounds; magnesium; cetyltrimethylammonium bromide



**Citation:** Fernández-Grajera, M.; Gallardo-Moreno, A.M.; Luque-Agudo, V.; González-Martín, M.L.; Hierro-Oliva, M. Bacterial Response to the Surface Aging of PLA Matrices Loaded with Active Compounds. *Polymers* **2022**, *14*, 4976. <https://doi.org/10.3390/polym14224976>

Academic Editors: Azeem Ullah, Ick-Soo Kim and Muzamil Khatri

Received: 19 October 2022

Accepted: 15 November 2022

Published: 17 November 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The design and manufacture of new biomaterials for implant purposes is a field in constant development and has grown exponentially in recent years [1]. Parallel to this important progress is the inevitable increase of resistant microorganisms, which causes serious problems of infections in biomaterials used as implants [2]. Antibacterial treatment, once the infection has spread on these devices, is ineffective, since this procedure acts mainly on planktonic bacteria and not on those that are embedded and protected within a biofilm, a network-like structure unequivocally associated with infection [3–5]. The only way to solve the problem of implant infections is to replace the infected device by a new one, with the consequent health risks and economic implications for health systems [6].

One of the opportunistic bacteria present in a large number of nosocomial infections is *Staphylococcus epidermidis* [7,8]. These bacteria can colonize the surface of a biomaterial some time after implantation, due to the dissemination of bacteria from an active focus of infection, or during the implantation process, as a result of failures in the aseptic protocol [9], which means that the implant is already contaminated when it enters the patient [10,11].

For this reason, the development of new biomaterials and the improvement of existing ones to achieve devices with new antibacterial properties to prevent infections after implantation, and thus ensure the success of the implant, is a challenge [12]. In this context,

biodegradable implants are ideal for preventing the development of latent infections since, once living tissue is restored, they disappear from the human body.

One of the biodegradable materials with lowest toxicity and highest sustainability and biocompatibility is polylactic acid (PLA). As with other polyesters, the polymeric structure that makes up PLA-based materials also has the advantage that it can be doped with different compounds to improve both the mechanical properties of the polymer and its response to bacterial colonization [13].

PLA's weaknesses in mechanical properties are solved by including magnesium particles in the polymer matrix [14,15]. This metal, besides being biocompatible and having antibacterial activity, improves the Young's modulus of PLA and, although it might seem unsuitable due to its corrosiveness and the generation of hydroxide ions, this is compensated with the acidification of the medium while PLA degradation occurs [11,16–18].

In addition to magnesium, some metal ions or atoms, such as silver [19,20], zinc [20] or copper [20–22] are also used to give PLA antibacterial properties. In this respect, the bibliography illustrates the use of other dopants of the matrix [13] by reinforcing or by impregnating it [23], such as antibiotics [24,25], surfactants [26–28], nanoparticles [29–31] and natural biological materials [32,33].

Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) is a cationic surfactant which has shown a double benefit in that it is able to reduce biofilm formation [26–28] and to improve the dispersion of magnesium particles within PLA matrices [34].

Unavoidably, any dopant introduced into the matrix can alter not only the physical properties of the bulk but also the surface properties. For example, the hydrophilicity of PLA can be improved by including CTAB on its surface [34]. The surface properties regulate the interaction between the implant and the surrounding physiological environment. Thus, the hydrophobicity of the material, its surface free energy or its topography are key in determining whether bacterial adhesion and proliferation, which is undesirable, and the formation of a protein layer that facilitates cell adhesion and proliferation, which is desirable, will occur [11,35]. Although it is difficult to find a general rule that describes the degree of involvement of each surface property in the bacterial colonization process, recently, Pahlevanzadeh et al. have indicated that hydrophilic, hydrated and non-charged surfaces have the lowest bacterial adhesion capacity [1]. This does not mean that hydrophobic materials are not suitable for medical use, since the final result, in terms of bacterial adhesion, is dictated not only by the overall surface properties of the material but also by the surface properties of the microbial. With regard to topography, its influence on bacterial adhesion processes is related to the shape, size and arrangement of surface structures. In general, in porous surfaces, if the pore size is smaller than the size of the bacteria, the number of bacteria adhering to the surface will be low [36]. On the other hand, certain surface structures, both random and ordered, do not promote bacterial adhesion [37–39]. Recently, it has been reported that porous and rough surfaces favor bacterial interaction and adhesion [1]. Furthermore, Tebbs et al. also reported that reduced roughness of biomedical implants results in less bacterial adhesion than in implants with irregular surfaces [40].

The passing of time can significantly change the surface of a material. This surface aging is especially important in biomaterials inserted inside the human body and, even more so in the case of biodegradable materials such as PLA. Therefore, the *in vitro* study of the surface properties should be carried out both on the recently prepared material and after an aging-degradation process that approximates *in vivo* conditions, taking into account that physiological fluids contain salts and other compounds that can chemically attack the surface of the implant and so its surface properties can be significantly altered [23]. It is therefore reasonable to assume that there may be a time dependence between the surface properties of a material and its response to bacterial colonization and growth [11]. A material that is initially smooth and not prone to bacterial adhesion may become rough after degradation, thus favoring adhesion. The process can be even more complex when the materials are loaded with active compounds: the degradation of such biomaterials assists

in the progressive release of antibacterial dopants from the matrix, altering the response of the biomaterial to bacterial and cell adhesion [41].

In this scenario, the antibacterial response of the PLA surface, fabricated without and with active components, before and after being degraded for different periods of time, was evaluated. To this end, PLA films doped with magnesium particles and different amounts of CTAB were prepared, and adhesion, viability and biofilm growth of *S. epidermidis* bacteria on these films before and after degradation in PBS for 1 and 3 months was evaluated. Our study also includes the analysis of the surface properties (hydrophobicity, surface free energy, surface chemical composition and topography) of the samples before and after degradation, in order to check whether aging of the material affects the bacterial surface coating.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials and Chemical Reagents

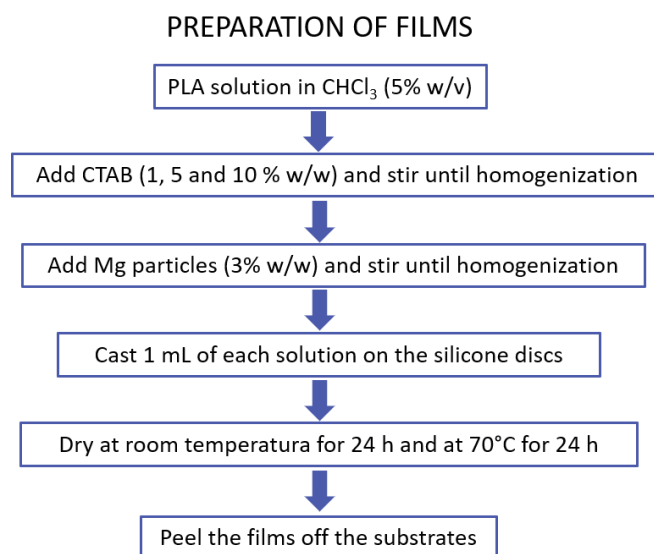
PLA particles PLA2003D, with a D-isomer content of 4.25%, were purchased from NatureWorks LLC (Blair, NE, USA). Chloroform and CTAB were purchased from Sigma-Aldrich (Merck, Darmstadt, Germany) and magnesium particles ( $\leq 50 \mu\text{m}$ ) are from NitroParis (Castellón, Spain). For contact angle measurements, deionized water (Milli-Q Integral 5 System, Merck, Darmstadt, Germany) and diiodomethane (Fluka, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were used. For bacterial assays, Tryptic Soy Broth (TSB) medium was purchased from BBL, Becton Dickinson and Company (Sparks, Franklin Lakes, NJ, USA) and viable biofilms were quantified using BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay (Promega Corporation, Madison, WI, USA).

### 2.2. Preparation of Films

PLA films were prepared on silicone supports, with different amounts of CTAB and magnesium particles, as detailed in our previous work [34]. Briefly, the silicone discs to be used as supports were first cleaned with absolute ethanol and then dried with a flow of  $\text{N}_2$ . Thereafter, the PLA particles were dissolved in chloroform (5% *w/v*) using a rotary stirrer (JP Selecta, Barcelona, Spain). Different amounts of CTAB (0, 1 and 5% *w/w* relative to PLA) were then added and the solutions were homogenized by stirring. To prepare the magnesium-containing solutions, magnesium particles ( $\leq 50 \mu\text{m}$ ) were added and stirred to a final concentration of 3% *w/w* relative to PLA. After preparing all the solutions, 1 mL of each solution was deposited on the silicone substrates and dried at room temperature for 24 h. The films were then dried in an oven at 70 °C for 24 h, in order to completely remove any remaining solvent. These films were peeled off from the silicone after drying. The process is depicted in the scheme shown in Figure 1.

### 2.3. In Vitro Degradation

The films were degraded by immersing them vertically in 100 mL of phosphate buffered saline (PBS) at 37 °C with the help of small hanger hooks. Two degradation times were selected: 1 and 3 months. After these times, the films were dried with a flow of  $\text{N}_2$  and stored in a desiccator until use. Because of all the variables involved in each sample and to better follow the results, the notation used is the following:  $X/Y_Z$ , where X refers to the amount of magnesium added (0 or 3% *w/w*), Y the amount of surfactant added (0, 1 or 5% *w/w*) and Z the number of months of degradation (1 or 3).



**Figure 1.** Preparation of films containing CTAB and magnesium particles.

#### 2.4. Contact Angle Measurements and Determination of Surface Tension

Contact angle measurements of deionized water and diiodomethane were carried out with a Drop Shape Analyzer—DSA100E (Krüss, Hamburg, Germany) by the sessile drop method at room temperature under ambient conditions. Drops of 5  $\mu\text{L}$  of deionized water and 2  $\mu\text{L}$  of diiodomethane were placed at different positions on the surface of the samples and recorded 15 s after the complete deposition of each drop. The results of the contact angles were averaged values of at least three independent films for each of the studied conditions. The measured contact angles of the two liquids were used to calculate the surface tension and components of the samples using the Owens–Wendt–Kaelble (OWK) approach [42,43].

#### 2.5. Surface Chemical Composition

Surface samples analyses by time of flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) were performed with a ToF-SIMS<sup>5</sup> (ION TOF, Münster, Germany) using a  $\text{Bi}_3^{2+}$  as primary gun, operating at 25 keV under high vacuum conditions ( $2.4 \times 10^{-9}$  mbar). Negative spectra were recorded with a total ion dose above  $10^{12}$  ions/ $\text{cm}^2$ . For each mass spectrum, a spot size of  $200 \times 200 \mu\text{m}^2$  with a resolution of  $128 \times 128$  pixels was used. The mode of operation used was HC-BUNCHED with lateral resolution of 1  $\mu\text{m}$  and a pulsed low energy electron flood gun was also used for charge neutralization. Spectra were collected with a cycle time of 100  $\mu\text{s}$ .

#### 2.6. Surface Topography Characterization

Surface topography of the PLA films was evaluated using an atomic force microscope (AFM) (Agilent AFM 5500, Agilent Technologies, California, CA, USA) operating at room temperature and in contact mode. Rectangular cantilevers (FMV-PT, Bruker, Billerica, MA, USA) were used with a nominal spring constant of 75 kHz and a force constant of 2.8 N/m. Images were taken for two scanning lengths ( $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  and  $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ ) and in each scanning area, topographical, deflection and friction images were acquired. Experiments were performed in triplicate, studying three different films for each condition. Roughness is a scale-dependent function and therefore all comparisons were made with the mean roughness parameter ( $S_a$ ) always obtained from  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  images. Results are presented as mean values and standard deviations.

#### 2.7. Bacterial Strains and Culture

*Staphylococcus epidermidis* ATCC 35983 (ATCC, American Type Collection Culture) was the bacterium used to perform the biofilm assays on PLA films. The pathogen was taken from



stock at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in porous beads (Microbank, ProLab Diagnostics, Richmond Hill, ON, Canada) and cultured on blood agar plates (OXOID Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) for 24 h at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . To grow the bacteria in liquid medium, a colony was inoculated in Tryptic Soy Broth (TSB) medium overnight at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.7.1. Adhesion Experiments

Once the *Staphylococcus epidermidis* culture reached the exponential phase, bacteria were centrifuged (5 min at  $1000\times g$ ) and washed in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) three times. Then, they were resuspended in PBS at a concentration of  $3 \times 10^8$  bacteria/mL. Films were fixed to a flat support with double side sticky tape and then 1 mL of the bacterial suspension was kept in contact with the samples, with the help of silicone adhesion chambers, for 4 h at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  under orbital shaking. Quantification of adhesion, after removal of loosely bound bacteria, was carried out on an epifluorescence microscope (Leitz DIAPLAN, Wetzlar, Germany) by staining adherent microorganisms with the Live/Dead BacLight L-7012 kit (Invitrogen SA, Eugene, OR, USA). Bacteria were counted with NIS-Elements BR 4.10 software (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA). Green-colored bacteria are considered to be alive and those colored in red are associated with damaged or dead bacteria. Experiments were performed in triplicate and with independent cultures to confirm reproducibility.

### 2.7.2. Biofilms Formation

The protocol detailed in previous studies [18,44] was followed to analyze the formation of biofilm on PLA. Specifically, after growth, bacterial suspension was set at 82% of transmittance at 492 nm using a horizontal light spectrophotometer (Helios epsilon model, Thermo Spectronic, Thermo Fisher Scientific Inc., Cambridge, UK), and then was diluted 1/100 to obtain a concentration of  $10^6$  CFU/mL. After that, PLA samples were placed in a 24-well plate and 1 mL of the bacterial suspension was deposited on the surface of each PLA film for 24 h at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  with gentle shaking. After the incubation time, the supernatant was removed from each sample and carefully washed twice with TSB to remove unattached bacteria. Viable biofilm-forming bacteria were then quantified using BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay. After 5 min in darkness and light agitation, the supernatant was transferred to a 96-well white polystyrene flat-bottom microtiter plate (Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany) and the emitted light was quantified with a fluorescence microplate reader (FLx800; Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Experiments were performed in triplicate and with independent cultures to confirm reproducibility.

### 2.8. Static Analysis

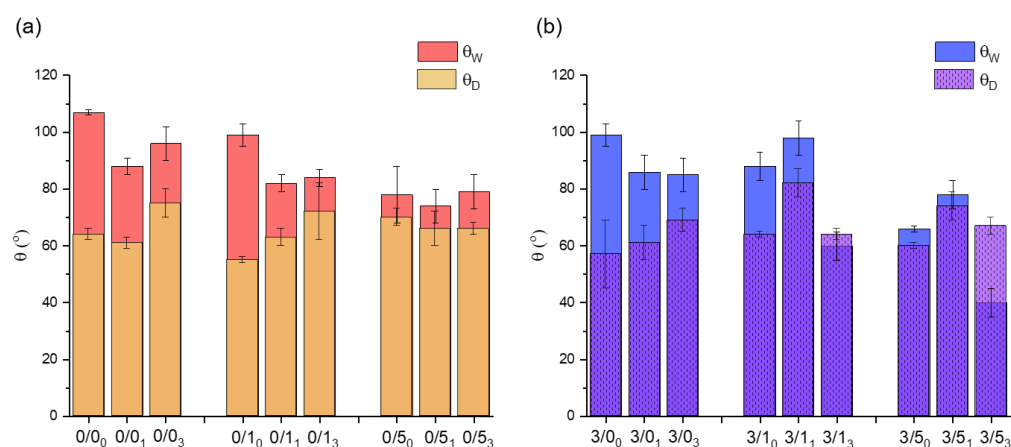
Results are presented as mean  $\pm$  SD. Statistical analysis was carried out with R statistical software package (The R Foundation for Statistical Computing, [www.r-project.org](http://www.r-project.org) accessed on 10 September 2022—R Core Team, 2014). Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) with a Tukey post-hoc test. All analyses were performed at a significance level of  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Films' Surface Characterization

#### 3.1.1. Contact Angle Measurements

The water ( $\theta_W$ ) and diiodomethane ( $\theta_D$ ) contact angles of the prepared polymeric films are summarized in Figure 2. In order to make the results clearer, they are presented as a function of whether or not they contain magnesium and CTAB, and also as a function of degradation over time.



**Figure 2.** Contact angles of water ( $\theta_W$ ) and diiodomethane ( $\theta_D$ ) on films made of PLA, Mg particles and CTAB for non-degraded and degraded samples for 1 and 3 months. **(a)** Non-containing magnesium films; **(b)** magnesium-containing films. The texture of  $\theta_D$  is included to differentiate more clearly between cases in which  $\theta_D > \theta_W$ . All data are given as mean and standard deviation.

- **Magnesium effect**

In most cases, the addition of 3% (*w/w*) magnesium particles to PLA films results in a decrease of  $\theta_W$  (Figure 2). Nevertheless, the samples degraded for 1 month do not follow the described trend (3/1<sub>1</sub> and 3/5<sub>1</sub>). On the other hand, no clear tendency can be deduced with respect to  $\theta_D$ , as in some cases, the value decreases with the addition of magnesium (0/0 vs. 3/0, whatever the degradation time and 0/5<sub>0</sub> vs. 3/5<sub>0</sub>). In others cases, it increases slightly (0/1 vs. 3/1, except 0/1<sub>3</sub> vs. 3/1<sub>3</sub>). Only for the case of samples degraded for 1 month is there a considerable increase in the value of the diiodomethane contact angle with Mg addition.

- **CTAB effect**

With non-degraded films, regardless of whether the films contained magnesium particles or not, doping the films with CTAB results in a decrease in  $\theta_W$ , with the films being more hydrophilic the higher the CTAB content (Figure 2). Thus, there was a decrease of about 29° and about 33° in  $\theta_W$  with respect to the control for films doped with 5% (*w/w*) CTAB, without and with magnesium, respectively: 0/5<sub>0</sub> vs. 0/0<sub>0</sub> and 3/5<sub>0</sub> vs. 3/0<sub>0</sub>. The opposite trend was observed for  $\theta_D$  values. In these cases, there was a slight increase with respect to the controls (0/0 and 3/0) as the CTAB content in the films increased (0/5<sub>0</sub> vs. 0/0<sub>0</sub> and 3/5<sub>0</sub> vs. 3/0<sub>0</sub>), with the exception of the 0/1<sub>0</sub> film, where  $\theta_D$  decreased slightly.

In the case of degraded films, the addition of CTAB also made the surfaces less hydrophobic on average, especially in films with 5% (*w/w*) CTAB.

- **Degradation effect**

For magnesium-free films (Figure 2a), degradation of films immersed in PBS for 1 and 3 months resulted in a decrease of  $\theta_W$ , compared to non-degraded films, in the cases of zero or a low amount of CTAB, i.e., 0/0 and 0/1. Moreover, this decrease in hydrophobicity was much more evident in the first 4 weeks than in the remaining 8 weeks. In the case of 0/5, the hydrophobicity of the films was similar before and after degradation. In addition, after 3 months degradation (0/0<sub>3</sub>, 0/1<sub>3</sub> and 0/5<sub>3</sub>), the average  $\theta_W$  seemed to increase slightly with respect to the degraded films for 1 month. When magnesium was present in the films (Figure 2b),  $\theta_W$  also decreased for samples degraded for 1 and 3 months, except for samples degraded for 1 month and containing 1% and 5% (*w/w*) CTAB. In this sense, the  $\theta_W$  for the 3/1<sub>1</sub> sample was higher than for the 3/1<sub>0</sub> sample, and was also much higher than for the rest of the samples degraded for 1 month with different amounts of CTAB (3/0<sub>1</sub> and 3/5<sub>1</sub>).

In relation to the contact angle values of diiodomethane, degradation caused different trends depending on the presence or absence of magnesium and surfactant. In the samples without CTAB, 0/0 and 3/0, degradation after 1 month did not cause significant changes in  $\theta_D$ , but it did after 3 months, at which time the  $\theta_D$  increased significantly with respect to the non-degraded samples.

In the samples without Mg and with small amounts of CTAB (0/1, Figure 2a), the average value of  $\theta_D$  seemed to rise with the degradation time, while when more CTAB was added (0/5), the values of the angles were very similar with time, as was the case with  $\theta_W$ .

In the samples with Mg (Figure 2b),  $\theta_D$ , irrespective of the amount of CTAB, increased after 1 month of degradation, relative to the non-degraded samples, and equaled the original  $\theta_D$  value after 3 months of degradation.

### 3.1.2. Surface Tension

After applying the Owens–Wendt–Kaelble (OWK) approximation with the contact angle data of water and diiodomethane, the surface tension of the solid ( $\gamma_s$ ) and the dispersive ( $\gamma^d$ ) and non-dispersive ( $\gamma^{nd}$ ) components were obtained (Table 1).

**Table 1.** Dispersive ( $\gamma^d$ ) and non-dispersive ( $\gamma^{nd}$ ) components of the surface tension, the total surface tension of the solid ( $\gamma_s$ ), calculated using the Owens–Wendt–Kaelble (OWK) approach and the free energy of interaction between two surfaces ( $\Delta G_{SWS}$ ). All data are given as mean and standard deviation.

Sample	$\gamma^d$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma^{nd}$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma_s$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\Delta G_{SWS}$ (mJ/m <sup>2</sup> )	Sample	$\gamma^d$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma^{nd}$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma_s$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\Delta G_{SWS}$ (mJ/m <sup>2</sup> )
0/0 <sub>0</sub>	26 ± 1	0 ± 0	26 ± 1	−94 ± 3	3/0 <sub>0</sub>	30 ± 7	1 ± 1	31 ± 8	−84 ± 17
0/0 <sub>1</sub>	28 ± 3	3 ± 2	31 ± 4	−70 ± 9	3/0 <sub>1</sub>	28 ± 3	4 ± 3	32 ± 6	−68 ± 14
0/0 <sub>3</sub>	20 ± 3	3 ± 2	23 ± 5	−80 ± 13	3/0 <sub>3</sub>	23 ± 2	6 ± 3	29 ± 5	−66 ± 12
0/1 <sub>0</sub>	31 ± 1	0 ± 1	32 ± 1	−84 ± 6	3/1 <sub>0</sub>	26 ± 1	4 ± 2	30 ± 2	−70 ± 7
0/1 <sub>1</sub>	27 ± 2	6 ± 2	33 ± 4	−63 ± 7	3/1 <sub>1</sub>	16 ± 3	3 ± 3	19 ± 5	−83 ± 13
0/1 <sub>3</sub>	22 ± 6	7 ± 3	28 ± 9	−65 ± 15	3/1 <sub>3</sub>	26 ± 1	18 ± 4	45 ± 5	−36 ± 8
0/5 <sub>0</sub>	23 ± 2	9 ± 6	32 ± 8	−58 ± 16	3/5 <sub>0</sub>	29 ± 1	13 ± 1	42 ± 1	−43 ± 2
0/5 <sub>1</sub>	25 ± 3	10 ± 5	36 ± 8	−53 ± 14	3/5 <sub>1</sub>	21 ± 3	10 ± 4	31 ± 7	−58 ± 12
0/5 <sub>3</sub>	25 ± 1	8 ± 3	33 ± 4	−59 ± 10	3/5 <sub>3</sub>	25 ± 2	33 ± 5	58 ± 6	−17 ± 7

- Magnesium effect

Regardless of the sample selected, the total surface tension of the films was modulated by  $\gamma^d$  and  $\gamma^{nd}$  values. In the cases without Mg, the sum of both components gave  $\gamma_s$  values very similar to each other, taking into account experimental uncertainty. For the cases with Mg, there was more variability in  $\gamma_s$ . The lowest value of 3/1<sub>1</sub> and the highest value of 3/5<sub>3</sub> are noteworthy, and in turn correspond to the highest value of  $\theta_D$  and the lowest value of  $\theta_W$ , respectively.

There were noticeable differences in the non-dispersive component,  $\gamma^{nd}$ . In the case of non-degraded samples, magnesium-containing samples without or with small amounts of CTAB (3/0<sub>0</sub> and 3/1<sub>0</sub>) had a low, but non-zero  $\gamma^{nd}$  value, which infers a certain polarity to the surface, while those non-containing magnesium (0/0<sub>0</sub> and 0/1<sub>0</sub>) were non-polar ( $\gamma^{nd} = 0$  mJ/m<sup>2</sup>).

Table 1 also shows the free energy of interaction between two surfaces ( $\Delta G_{SWS}$ ), which provides the degree of hydrophobicity of a surface when immersed in water. Taking this parameter into account, a surface is considered hydrophobic when  $\Delta G_{SWS} < 0$  mJ/m<sup>2</sup> and hydrophilic when  $\Delta G_{SWS} > 0$  mJ/m<sup>2</sup> [45]. Thus, the more negative this value is, the more hydrophobic the material. In general, the 0/Y<sub>Z</sub> films have lower  $\Delta G_{SWS}$  values than the 3/Y<sub>Z</sub> films and therefore interaction with water is not favored in them, with the exception of 0/1<sub>1</sub> vs. 3/1<sub>1</sub>.

- CTAB effect

The addition of 1% *w/w* CTAB did not produce significant differences in most of the parameters presented in Table 1, bearing in mind the results uncertainty. An exception to this is the non-dispersive component, which increased in value when 1% *w/w* CTAB was added to PLA films, without Mg. Another exception occurred for sample 3/1<sub>1</sub> where the decrease in the dispersive surface tension component provoked the described decrease in  $\gamma_s$  and the increase in  $\Delta G_{SWS}$ .

However, in most of the cases, and irrespective of the starting value, an important increase of the non-dispersive component was observed when 5% *w/w* CTAB was added, and this was especially noticeable in magnesium-containing samples.

As described above, all the films examined had a hydrophobic character ( $\Delta G_{SWS} < 0 \text{ mJ/m}^2$ ), but an appreciable decrease was noted as the amount of CTAB increased, especially when comparing 5% *w/w* CTAB with samples without CTAB.

- Degradation effect

After degradation, higher values of the non-dispersive component seemed to be appreciated, although it is difficult to establish a time dependence. This was especially noticeable for the 3/Y<sub>3</sub> (where Y is 0, 1 or 5) samples, whose value of the non-dispersive component is four times higher on average than for the non-degraded samples. These changes are reflected in the total surface tension of the solid, which, if taking into account the uncertainties associated with each value (as mentioned above), is generally higher for magnesium-containing films than for non-containing magnesium films, especially for the samples with the highest amount of CTAB.

On comparing magnesium-containing samples before and after 3 months of degradation, the polarity of the samples increased by 350% for 3/1<sub>3</sub> and 153% for 3/5<sub>3</sub>.

Regarding  $\Delta G_{SWS}$ , a decrease in hydrophobic character was also observed after the samples were subjected to degradation, in particular for magnesium-containing samples. Again, it is worth noting the case of 3/5<sub>3</sub> with the lowest hydrophobicity found, according to its maximum surface energy ( $\gamma_s = 58 \pm 6 \text{ mJ/m}^2$ ).

### 3.1.3. Compositional Changes after Film Degradation

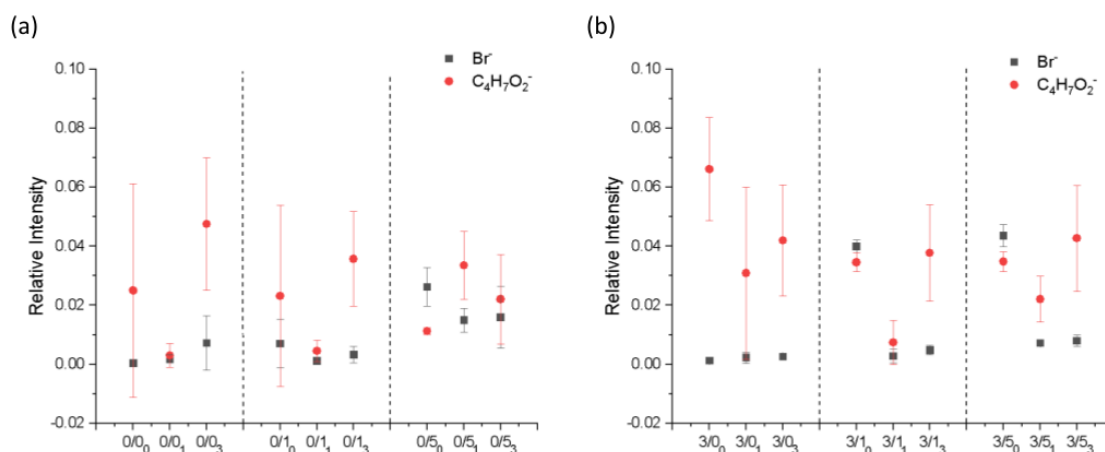
The surface composition of the films after degradation for 1 and 3 months was evaluated by ToF-SIMS surface mass spectra analysis. A similar analysis was performed for the non-degraded samples, published in a previous work carried out by our research group [34]. Data for non-degraded films have been included in the results for better comparison. Figure 3 shows the relative intensities of the characteristic ions of the surfactant (the bromide ion, Br<sup>-</sup>, was chosen) and the polymer (the C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup> fragment was selected) as a function of sample type. Both CTAB and PLA have hydrocarbon moieties in their structures, but the one considered for the analysis was unequivocally assigned to PLA and not to CTAB as it contains oxygen and no nitrogen.

- Magnesium effect

In the case of non-degraded samples [34], the presence of Mg in PLA films made CTAB more significantly detectable on the surface of the samples, the change being more evident for lower concentrations of CTAB. The presence of magnesium in the films of PLA seemed to reduce the amount of surfactant on the surface of the degraded samples. This was more evident in samples with a higher amount of CTAB (0/5 vs. 3/5).

- CTAB effect

As was the case for the non-degraded samples, in general, the bromide ion was barely detectable on the surface of films prepared with low concentrations of CTAB, and when the surfactant concentration increased, the presence of the surfactant became noticeable on the surface.



**Figure 3.** Relative intensities of Br<sup>-</sup> and C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup> ions as a function of sample type for PLA films after degradation for 1 and 3 months. (a) PLA doped with CTAB; (b) PLA doped with magnesium and CTAB. All data are given as mean and standard deviation.

- Degradation effect

Based on the results, after degradation, the amount of CTAB on the surface significantly decreased, regardless of whether the sample had been 1 month or 3 months under degradation.

### 3.1.4. Topography of PLA Films

A recently published study carried out by our research group showed in great detail the topography that appears on PLA films depending on the amount of CTAB contained in the film, the substrate on which it was cast and whether or not it contained magnesium [41]. The present study also works with those films degraded for 1 month and adds a longer degradation time of 3 months. By this reason, the information presented in the present work will serve to complete the previous topographic analysis and, therefore, some previous results will be mentioned to better understand the current data.

- Magnesium effect

We observed in the previous work [41] that the topography of films fabricated on silicone was not affected by the single addition of Mg, that it was affected when this Mg was combined with CTAB, or the films were subjected to degradation. This observation was also evidenced when comparing 0/5<sub>3</sub> and 3/5<sub>3</sub> where a more uniform hole-like distribution appeared in the presence of Mg. In the cases of 0/1<sub>3</sub> vs. 3/1<sub>3</sub>, images were similar with no change associated to Mg.

- CTAB effect

Samples without CTAB did not present holes on their surface, but the addition of 1% *w/w* CTAB provoked the appearance of small holes, without or with Mg, as described in the previous publication [41]. Moreover, the size of these microstructures increased with the CTAB content in the range of 1 to 5 μm [41]. In the cases under study (Figure 4), holes were only present in 0/5<sub>3</sub> and 3/5<sub>3</sub>.

Figure 4 shows the new AFM images after 3 months degradation for samples without and with Mg and with the different amounts of CTAB.

- Degradation effect

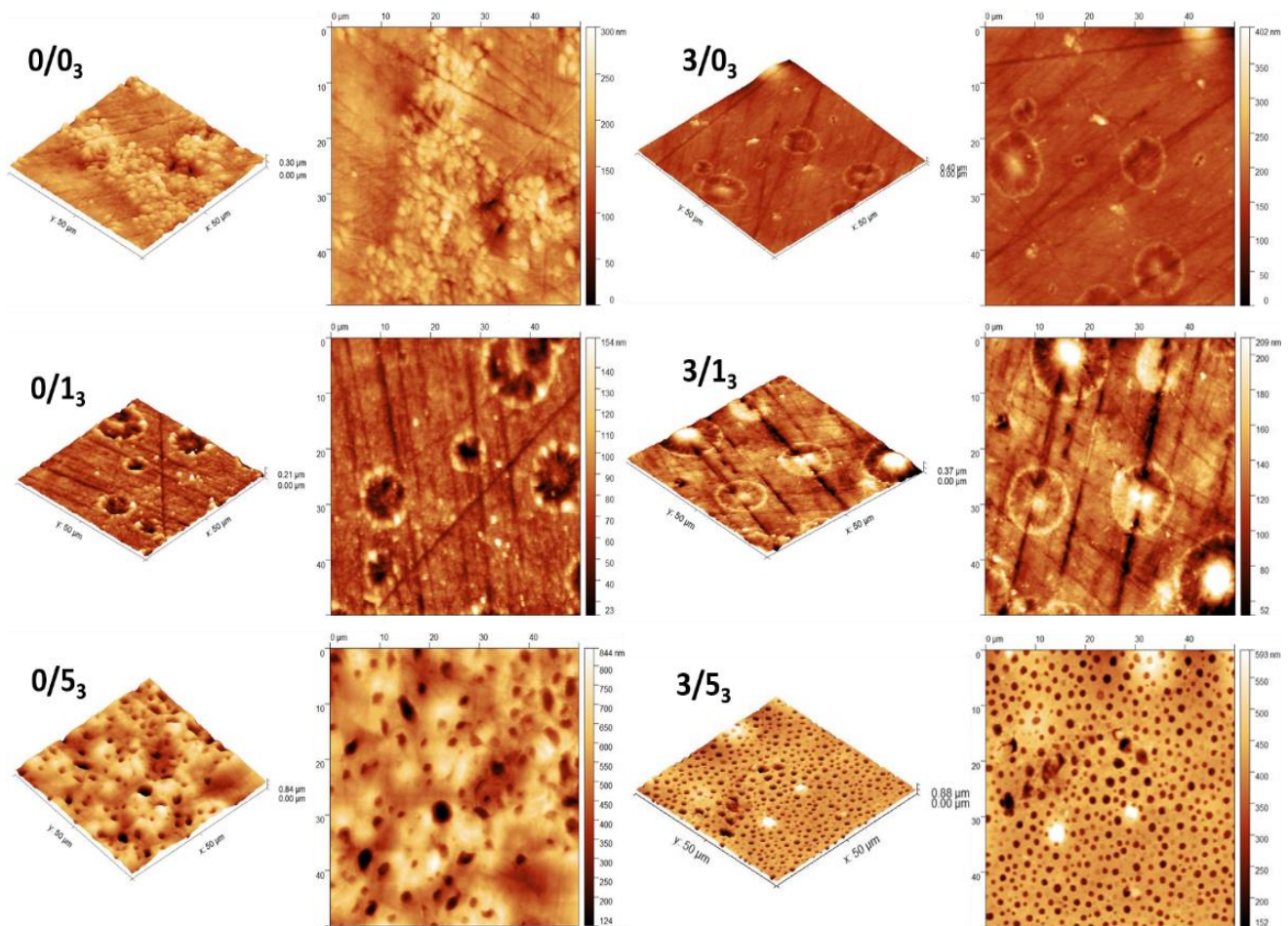
Figure 4 shows the presence of holes on the surface of the films with the highest amount of CTAB after 3 months degradation (0/5<sub>3</sub> and 3/5<sub>3</sub>) without or with Mg. However, for non-containing CTAB films (0/0<sub>3</sub> and 3/0<sub>3</sub>) or with 1% (*w/w*) CTAB (0/1<sub>3</sub> and 3/1<sub>3</sub>), circular-like deposited clusters appeared on the surface.

Previous work [41] has shown that for non-containing-magnesium samples, the degradation after 1 month did not significantly affect the holes formed on the surface of



the films when the amount of CTAB was higher than 5% (0/5), but in the case of samples with a lower amount of CTAB (0/1), these holes disappeared. Conversely, the presence of magnesium in the films degraded for 1 month seemed to affect the topography in the case of the high CTAB-content samples: some structures became wider and deeper than in the case of non-degraded film. In the case under study, after 3 months of degradation (Figure 4), the behavior was similar to 1 month: the surface of the films with low amounts of CTAB (0/1<sub>3</sub> and 3/1<sub>3</sub>) did not show any holes after degradation, regardless of whether the films contained magnesium or not. For the samples with the highest amount of CTAB (0/5 and 3/5), those holes observed on the surface at 1 month degradation were still observed after 3 months of degradation, with the particularity that magnesium made the distribution of the structures more uniform, as we have already mentioned.

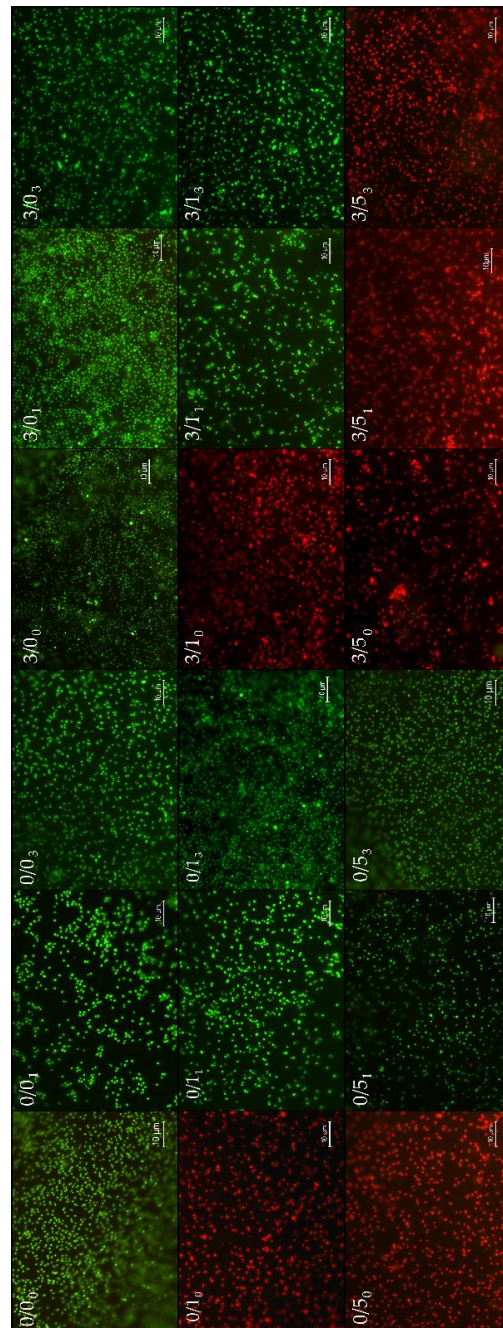
Comparing these images with those already analyzed (0/5<sub>3</sub> vs. 0/5<sub>0</sub>) [41], in the non-containing-magnesium samples with the highest amount of CTAB and degraded for 3 months (0/5<sub>3</sub>), there was a considerable increase in the width and depth of these holes, becoming, in the most extreme cases, 170% wider and 250% deeper on average (holes were on average  $5 \pm 0.6 \mu\text{m}$  wide and  $500 \pm 30 \text{ nm}$  deep). On the other hand, for samples containing magnesium and the highest amount of CTAB (3/5<sub>3</sub>), there was no difference in the width and depth of the holes after 3 months of degradation compared to 1 month (holes were on average  $1.9 \pm 0.2 \mu\text{m}$  wide and  $183 \pm 40 \text{ nm}$  deep).



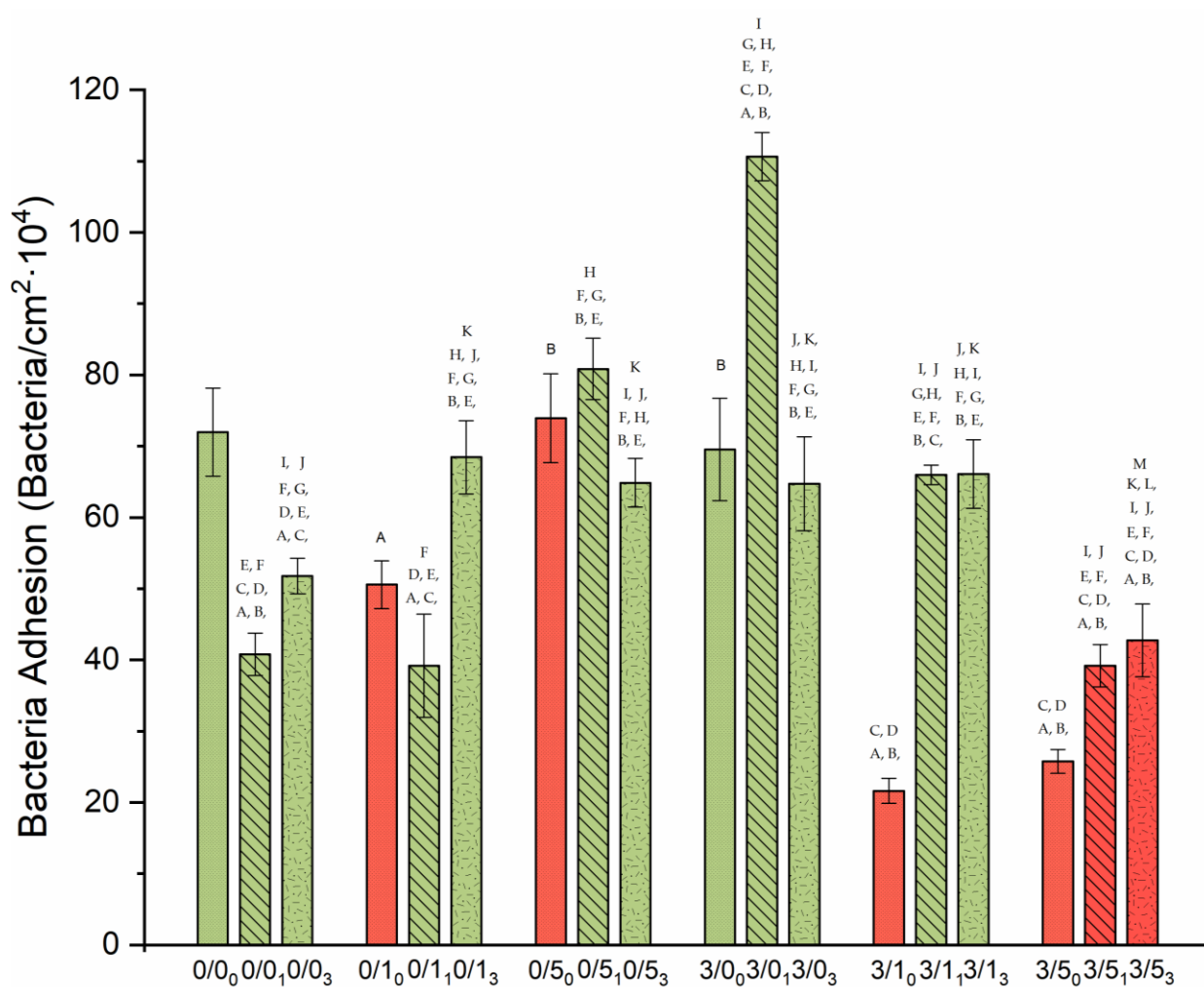
**Figure 4.** AFM images of films non-magnesium-containing and magnesium-containing and with CTAB after degradation for 3 months. For each kind of sample, left and right images are topographical and deflection images, respectively.

### 3.2. Bacterial Adhesion and Viability of Adhered Bacteria

To have a visual perspective of the bacterial adhesion performance, Figure 5 presents a collage of the most representative images of each one of the surfaces, for short adhesion times (4 h). Figure 6 quantifies that adhesion process with two complementary information: number of adhered bacteria to the different films (read from the Y-axis) and viability of these adhered microorganisms inferred from the bar color, i.e., green (live) and red (damaged or dead).



**Figure 5.** Representative fluorescence microscopy images of every PLA surfaces after bacterial adhesion. In the first row, we find the samples without CTAB from left to right 0/0<sub>0</sub>, 0/0<sub>1</sub>, 0/0<sub>3</sub>, 3/0<sub>0</sub>, 3/0<sub>1</sub> y 3/0<sub>0</sub>. In the second row, the samples with 1%/w/w), the same from left to right 0/1<sub>0</sub>, 0/1<sub>1</sub>, 0/1<sub>3</sub>, 3/1<sub>0</sub>, 3/1<sub>1</sub> y 3/1<sub>3</sub>. Then, in the last row are located the samples with 5% (w/w) CTAB from left to right 0/5<sub>0</sub>, 0/5<sub>1</sub>, 0/5<sub>3</sub>, 3/5<sub>0</sub>, 3/5<sub>1</sub> y 3/5<sub>3</sub>. Green colored bacteria indicate that they are alive, and when bacteria show a red color they are damaged or not dead.



**Figure 6.** Bacterial density adhered to the surface of the PLA samples. The smooth bars are those given to the non-degraded samples, the diagonally hatched bars are for the samples degraded for one month, and lastly, the notched bars are for the samples degraded for 3 months. Likewise, the color given to each bar represents the viability of the adhered bacteria, green for the viable ones and red for the damaged ones. Statistical difference ( $p < 0.05$ ) is marked with the different letters depending on which sample it is compared with. The letters **A** is used to 0/0<sub>0</sub>; **B** is used to 0/1<sub>0</sub>; **C** is used to 0/5<sub>0</sub>; **D** is used to 3/0<sub>0</sub>; **E** is used to 3/1<sub>0</sub>; **F** is used to 3/5<sub>0</sub>; **G** is used to 0/0<sub>1</sub>; **H** is used to 0/1<sub>1</sub>; **I** is used to 0/5<sub>1</sub>; **J** is used to 3/0<sub>1</sub>; **K** is used to 0/0<sub>3</sub>; **L** is used to 0/5<sub>3</sub>; **M** is used to 3/0<sub>3</sub>.

- **Magnesium effect**

The single addition of Mg to PLA films showed no significant change ( $p$ -value  $> 0.05$ ) in bacterial adhesion (comparisons between 0/0<sub>0</sub> and 3/0<sub>0</sub>). However, when this addition was made in the presence of CTAB, the number of adhered bacteria decreased significantly ( $p$ -value  $< 0.05$ ), regardless of the amount of CTAB: comparisons between 0/1<sub>0</sub> and 3/1<sub>0</sub> (from  $51 \pm 2 \times 10^4$  to  $21 \pm 1 \times 10^4$  n.° bacteria/cm<sup>2</sup>) and 0/5<sub>0</sub> and 3/5<sub>0</sub> (from  $70 \pm 6 \cdot 10^4$  to  $26 \pm 2 \cdot 10^4$  n.° bacteria/cm<sup>2</sup>). Additionally, it is important to point out that bacteria adhered to 0/1<sub>0</sub>, 3/1<sub>0</sub>, 0/5<sub>0</sub> and 3/5<sub>0</sub> were damaged or dead due to the red-like color present after staining.

When Mg was present in degraded samples, it was not possible to describe a general behavior. After 1 month, Mg addition caused a significantly increase ( $p < 0.05$ ) in the number of adhered bacteria (0/0<sub>1</sub> vs. 3/0<sub>1</sub> and 0/1<sub>1</sub> vs. 3/1<sub>1</sub>), except for those with 5% ( $w/w$ ) CTAB, where there was a significant reduction ( $p < 0.05$ ). In the case of degradation for 3 months, the adhesion was maintained, without and with Mg, within the experimental error (0/0<sub>3</sub> vs. 3/0<sub>3</sub> and 0/1<sub>3</sub> vs. 3/1<sub>3</sub>), the behavior of the samples



again being different with 5% (*w/w*) CTAB, which generated significantly less  $p < 0.05$ ) adhesion with degradation.

- CTAB effect

The presence of 1% (*w/w*) CTAB in the samples without and with Mg caused a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in bacterial adhesion: between 0/0<sub>0</sub> and 0/1<sub>0</sub> (from  $72 \pm 7 \times 10^4$  to  $50 \pm 2 \times 10^4$  bacteria/cm<sup>2</sup>) and between 3/0<sub>0</sub> and 3/1<sub>0</sub> (from  $68 \pm 6 \times 10^4$  to  $21 \pm 1 \times 10^4$  bacteria/cm<sup>2</sup>). In addition, as mentioned before, with these amounts of CTAB, the films always presented bactericidal activity in the adhered microorganisms.

When films had high concentrations of CTAB (0/5<sub>0</sub>), the number of adhered bacteria was statistically equal to the “control” (0/0<sub>0</sub>) in the cases without Mg, but the bactericidal surface activity was, again, only associated to CTAB presence. If magnesium was present, in addition to the bactericidal effect associated with CTAB, adhesion was significantly reduced ( $p < 0.05$ ) (compare 3/0<sub>0</sub> with 3/5<sub>0</sub>: from  $68 \pm 6 \times 10^4$  to  $26 \pm 2 \times 10^4$  bacteria/cm<sup>2</sup>).

Another comparison was made within samples with both amounts of CTAB. Figure 4 shows that in the cases without Mg (0/1<sub>0</sub> and 0/5<sub>0</sub>), the higher the CTAB concentration, the greater the adhesion ( $p < 0.05$ ). In the cases with Mg (3/1<sub>0</sub> and 3/5<sub>0</sub>), the average adhesion values were very similar, although adhesion also seemed to increase with concentration. However, what is most noticeable in these compared cases is the bactericidal power of the surface.

In the cases of degraded samples, the addition of 5% (*w/w*) surfactant always caused a significant increase ( $p < 0.05$ ) in adhesion without Mg (0/0<sub>1</sub> vs. 0/5<sub>1</sub> and 0/0<sub>3</sub> vs. 0/5<sub>3</sub>), whereas when Mg was present, it significantly decreased ( $p < 0.05$ ) adhesion (3/0<sub>1</sub> vs. 3/5<sub>1</sub> and 3/0<sub>3</sub> vs. 3/5<sub>3</sub>). In the case of 1% (*w/w*) CTAB, the coverage increased significantly  $p < 0.05$ , decreased or remained constant depending on the film additive and degradation time.

- Degradation effect

Overall, degradation alters the bacterial surface coating, however, it is not possible to describe a generalized trend for all the systems studied. This means that the presence of magnesium and/or the presence of different amounts of CTAB are able to modulate bacterial adhesion and viability in different ways with time.

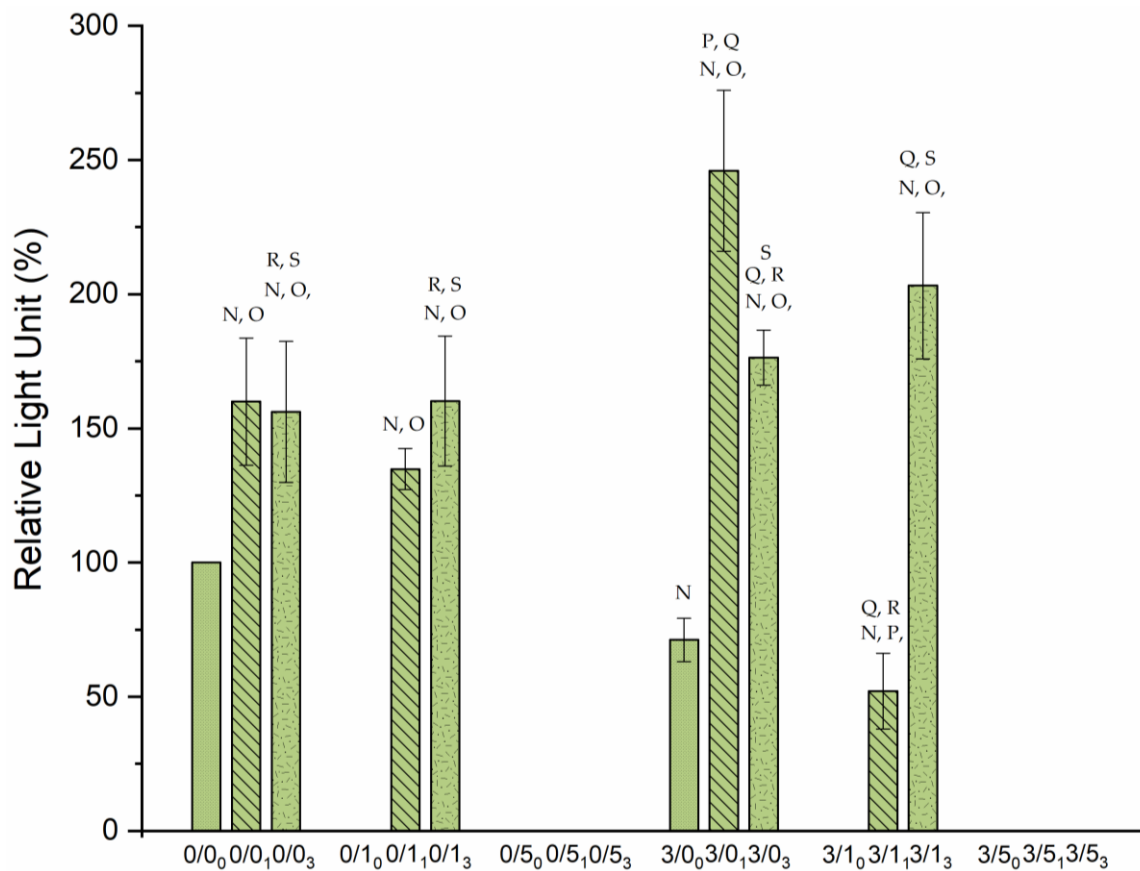
Figure 6 shows the comparison with the non-degraded films, and that after 1 month degradation, the bacterial adhesion was significantly decreased ( $p < 0.05$ ) in one case 0/0<sub>1</sub> ( $41 \pm 3 \times 10^4$  bacteria/cm<sup>2</sup>), remained unchanged in 0/1<sub>1</sub> and 0/5<sub>1</sub> and increased ( $p$ -value  $< 0.05$ ) in all Mg-containing films, 3/0<sub>1</sub> ( $111 \pm 4 \times 10^4$  bacteria/cm<sup>2</sup>), 3/1<sub>1</sub> ( $66 \pm 1 \times 10^4$  bacteria/cm<sup>2</sup>) and 3/5<sub>1</sub> ( $39 \pm 3 \times 10^4$  bacteria/cm<sup>2</sup>). This degradation time was also crucial for the bactericidal effect initially shown in the 0/1<sub>0</sub>, 0/5<sub>0</sub> and 3/1<sub>0</sub> systems to disappear. The bactericidal capacity of the surfaces was only maintained after 1 month of degradation time for films with 5% (*w/w*) CTAB, i.e., 3/5<sub>1</sub>. After 3 months degradation, compared with non-degraded films, bacterial adhesion also decreased in the system 0/0<sub>3</sub> (from  $53 \pm 2 \times 10^4$  bacteria/cm<sup>2</sup> to  $72 \pm 7 \times 10^4$  bacteria/cm<sup>2</sup>), while in the case 0/1<sub>3</sub>, it increased ( $68 \pm 5 \times 10^4$  bacteria/cm<sup>2</sup>), but not significantly ( $p$ -value  $> 0.05$ ). The film 0/5<sub>3</sub> slightly decreased significantly ( $p < 0.05$ ) the number of adhered bacteria, around 10 fewer bacteria/cm<sup>2</sup>. In the magnesium cases, for 3/0<sub>3</sub>, despite the large increase after 1 month of degradation, after 3 months of degradation, the bacterial coverage was similar to 3/0<sub>0</sub>. A different behavior was seen for 3/1 and 3/5, where 3/1<sub>3</sub> and 3/5<sub>3</sub> films had significantly ( $p$ -value  $< 0.05$ ) more bacteria coverage than their non-degraded systems. Again, the bactericidal capacity of the 3/5 film surface even after 3 months degradation is noteworthy.

In samples without Mg, there was an increase in bacterial coverage on the surface in 0/0 and 0/1 samples related to the significant increase ( $p < 0.05$ ) in degradation time (0/0<sub>1</sub> vs. 0/0<sub>3</sub> and 0/1<sub>1</sub> vs. 0/1<sub>3</sub>). However, in 0/5 films, degradation generated the

opposite effect, where less degradation was associated with significantly higher ( $p < 0.05$ ) bacterial adhesion ( $0/5_1$  vs.  $0/5_3$ ). In the cases with Mg, for  $3/1$  and  $3/5$  films, a similar coverage was found after 1 and 3 months of degradation. In the case of sample  $3/0$ , the longer the degradation time, the lower the bacterial adhesion.

### 3.3. Biofilms Formation

As with the bacterial adhesion experiments, biofilm formation on the PLA surface depended on the three variables under study: Mg, CTAB and degradation time. In this technique, the ATP amount released from bacterial cells was estimated by measuring the relative light units (RLU) to quantify the biofilm created during 24 h so, information from viable microorganisms was extracted. All the data shown in Figure 7 are relativized to the  $0/0_0$  sample, which fits 100%.



**Figure 7.** Biofilm viability results created on PLA film in percentage of relative light units. The smooth bars are for non-degraded samples, the diagonally hatched bars are for the samples degraded for one month, and the notched bars are for the samples degraded for 3 months. Statistical difference ( $p < 0.05$ ) is marked with the different letters depending on which sample it is compared with. The letters <sup>N</sup> is used to  $0/0_0$ ; <sup>O</sup> is used to  $3/0_0$ ; <sup>P</sup> is used to  $0/0_1$ ; <sup>Q</sup> is used to  $0/1_1$ ; <sup>R</sup> is used to  $3/0_1$ ; <sup>S</sup> is used to  $3/1_1$ .

- Magnesium effect:

The single addition of magnesium (without any CTAB) to the PLA films resulted in a decrease of biofilm on their surface when samples were not degraded ( $0/0_0$  vs.  $3/0_0$ ). In the case of degraded samples, Mg made the biofilm significantly increase ( $p < 0.05$ ), especially after 1 month degradation ( $0/0_1$  vs.  $3/0_1$ ).

In the case of the addition of magnesium together with CTAB ( $3/1_0$  or  $3/5_0$ ), Figure 6 shows that no viable biofilm was found.

Biofilm creation in degraded samples exhibited different behavior depending on the presence of Mg in the sample. In the samples containing 1% (*w/w*) CTAB, when films suffered degradation, Mg significantly decreased ( $p < 0.05$ ) biofilm after 1 month (0/1<sub>1</sub> vs. 3/1<sub>1</sub>) and it practically remained constant after 3 months (0/1<sub>3</sub> vs. 3/1<sub>3</sub>). In the samples with 5% (*w/w*) CTAB, Mg presence was not relevant since biofilm was suppressed at this surfactant concentration.

- CTAB effect

As already mentioned, the presence of CTAB in non-degraded films, whatever the amount, did not generate viable biofilm. This bactericidal effect was always maintained in 5% (*w/w*) regardless of further degradation undergone.

In samples degraded for 1 month, the addition of 1% (*w/w*) CTAB caused a significant reduction ( $p < 0.05$ ) in biofilm formation only in the presence of Mg: from  $243 \pm 30\%$  RLU (3/0<sub>1</sub>) to  $52 \pm 14\%$  RLU (3/1<sub>1</sub>).

- Degradation effect

Degradation time did not affect biofilm formation in the same way for the different samples. A general observation is that degradation leads to an increase in biofilm formation, although this absolute increase is not a function of degradation time. Samples with 5% (*w/w*) CTAB, either with or without Mg, did not participate in any degradation trend as they did not form biofilm on their surface. Focusing on the samples with 1% (*w/w*) CTAB, it was found that all the samples showed a significant increase ( $p < 0.05$ ) in biofilm formation with increased degradation time, especially with Mg doping. Likewise, samples containing neither CTAB nor Mg exhibited the same affinity for biofilm formation at both degradation times. In contrast, in the films 3/0, the maximum biofilm formation occurred after one month of degradation. In particular, the evolution was from  $71 \pm 8\%$  RLU to  $246 \pm 30\%$  RLU after 1 month. These changes were significantly larger for both sample 3/0<sub>0</sub> and sample 3/0<sub>1</sub>. Specifically, samples subjected to a degradation of 3 months generated a similar biofilm coating on their surfaces, within the experimental error, although the highest average value was for 3/1<sub>3</sub>.

Comparisons between both degradation times show that degradation processes did not affect the biofilms obtained in the samples without magnesium (0/0<sub>1</sub> vs. 0/0<sub>3</sub> and 0/1<sub>1</sub> vs. 0/1<sub>3</sub>). However, a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in biofilm was observed in 3/0 with increased degradation time (about 70 units), and a significant increase ( $p < 0.05$ ) in biofilm was observed in 3/1 with increased degradation time (about 150 units).

#### 4. Discussion

The presence of surfactants and metallic particles, such as CTAB and Mg, respectively, changes the surface properties of PLA films [34,41]. In addition to these surface changes, substances embedded in the matrix, that can alter the response of these materials to bacterial colonization and material degradation, is a new variable for modifying the adhesive scenario of any microorganism. The results shown in this work have approximated that possible real situation.

In relation to physical surface properties, degradation for 1 and 3 months for magnesium-free films makes the surfaces less hydrophobic in the cases without or with a low amount of CTAB (Figure 2a). In any case, the change is much more noticeable at short degradation periods (after 1 month); in fact, after 3 months of degradation, the films recover some of the hydrophobicity lost after the first month of degradation. This effect may be related to the fast adsorption of the PBS salts on the surface of the films.

The presence of CTAB has a singular influence on the hydrophobicity of aged films containing Mg. In these cases, the initial decrease in hydrophobicity associated with degradation is not observed, but the initial release of CTAB, both at 1% (*w/w*) and 5% (*w/w*), significantly increases the hydrophobicity of the films and, after three months,

the hydrophobicity decreases very significantly, making them, interestingly, the least hydrophobic surfaces of all the cases studied. This may be due to the fact that in the 3/1 and 3/5 films, in addition to the release of CTAB, the release of Mg particles must be taken into account, which react with the phosphates present in the PBS, creating a magnesium phosphate (MgP) layer that can act as a barrier for the diffusion of the surfactant. Even so, this layer absorbs water, so a decrease in  $\theta_W$  is observed as time passes.

From an energetic point of view, if significant changes in the surface tension of the samples and/or their components are desired to be achieved, it is necessary to dope the material with Mg and CTAB (Table 1). These changes are especially significant after three months of degradation and always greater in the 3/5 samples. The large increase in surface tension in 3/1<sub>3</sub> and 3/5<sub>3</sub> agrees with the lower hydrophobicity of these samples and their extremely low  $\Delta G_{SWS}$  value.

The compositional characterization of the samples (Figure 3), coupled with the previous thermodynamic characterization of the surfaces, reinforces the idea that the release of CTAB from the surface of the films to the degradation medium occurs mainly during the first weeks of contact with the medium. After 1 month, the surfactant is still released into the medium, but at a slower rate. This could be accounted for by the difficulty in diffusion of CTAB into the medium in the salts adsorbed on the surface of the films and the magnesium phosphate layer (in the case of magnesium-containing films). Additional compositional tests using EDX analysis on the surfaces of the samples degraded for 3 months (data not shown) have revealed that the circular clusters detected in AFM images (Figure 4) are salts from the degradation medium. In the case of magnesium-free films, they are mostly sodium chloride crystals, and in the case of the magnesium-containing samples, they are magnesium phosphates.

Bacterial adhesion and biofilm formation are affected not only by the physical surface properties of the films but also by the chemical activity of the polymeric matrix.

In theory, bacterial adhesion at short times can best be related to the physical surface properties of the material, but its quantification can also be strongly affected by the experimental protocol. In this case, surface washings after the 4 h adhesion process may detach the weakly adhered bacteria and, in the end, what is evaluated is a compromise between adhesion and bacterial retention to the surface.

Hydrophobicity has been a parameter closely related to such adhesion and retention, so that more hydrophobic surfaces have been shown to be more capable of retaining microorganisms [46–48]. This relationship is well verified on the three PLA surfaces without additives (0/0, 0/0<sub>1</sub>, 0/0<sub>3</sub>): when plotting the number of adhered bacteria against  $\theta_W$  or  $\Delta G_{SWS}$ , the linear fit shows an  $R^2$  equal to 0.9985 and 0.9989, respectively (data not shown). The addition of Mg and/or CTAB causes the surfaces to change compositionally and/or topographically, which makes it more difficult to find such a direct relationship between adhesion and hydrophobicity. In these cases, the release of positive ions by Mg and/or CTAB may not only alter the electrical interaction between bacteria and surface but also the viable state of the microorganisms, making the final adhesion behavior less predictable.

Working with another polymer, Sankar et al. [49] showed, in their analysis of polydimethylsiloxane (PDMS) doped with CuO-CTAB and ZnO, a decrease in staphylococcal colonization as the hydrophobicity of the polymer decreased. In that study, the presence of CTAB changed the contact angle from 90° to 73° and adhesion decreased by 87%. In our case, we also observed a decrease in the contact angle of PLA + CTAB films and a significant decrease in bacterial adhesion in all CTAB cases with Mg, probably because the Mg<sup>2+</sup> cations promote the lower adhesion observed. The justification for this can be found in the smaller size of the Mg<sup>2+</sup> ions compared to the CTAB molecule: Mg<sup>2+</sup> ions have a greater capacity to penetrate the electrical double layer of bacteria and/or surfaces, compressing and destabilizing them, similar to what can be caused by divalent Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> cations on the surfaces in the study by Sankar et al. For this reason, when CTAB is only found in the PLA matrix (without Mg), the reduction in adhesion is not so evident. In line with these results is the work of Azeredo et al. [50]. These authors used a parallel

plate flow chamber to evaluate not only the adhesion of *P. fluorescens*, but also the bacterial retention to the surfaces. The results show that CTAB did not promote significant surface removal in contrast to the anionic surfactant SDS (sodium dodecyl sulfate), which was very effective in detaching bacteria from the surface. Their explanation was based on the physico-chemical surface changes provoked by both surfactants: SDS caused an increase in the absolute negative zeta potential and a decrease in hydrophilicity, which explained its high efficiency in removing bacteria from the surface. However, CTAB promoted a fast cell membrane electrical disorganization [51] due to the attractive forces between positive ends of CTAB and negative bacterial surface charge.

In any case, the presence of CTAB on the surface of the films causes significant damage to the viability of the attached bacteria. During the fabrication process, in the drying of the films, part of the surfactant is exuded to the surface [34] and this produces a significant initial bactericidal action, as evidenced by samples 0/1<sub>0</sub>, 0/5<sub>0</sub>, 3/1<sub>0</sub> and 3/5<sub>0</sub>. This implies that at least a concentration similar to or higher than the minimum inhibitory concentration (MIC) (0.02 µg/mL, explicitly determined for the strain under study) is currently being released. For guidance, the estimated accumulated amount of CTAB in solution after one month of degradation is 0.37 µg/mL, 0.74 µg/mL, 6.6 µg/mL and 35 µg/mL for 0/1<sub>1</sub>, 3/1<sub>1</sub>, 0/5<sub>1</sub> and 3/5<sub>1</sub>, respectively [41].

The interaction of CTAB with the bacterial membrane affects its viability, as do the pH and osmolarity of the medium, starvation, extreme temperatures, oxygen concentration, amount of glucose, bactericidal agents or the bacterial metabolic state itself [52–55]. In particular, in the study by Sathya et al. [56], the effects of CTAB nanocomposites on the bacterial surface structure were investigated using strains with different surface properties. One interesting conclusion was that the bactericidal efficacy depended on the surface composition of the bacterial surface. CTAB-based surfaces, therefore, were more effective against Gram-positive bacteria, in particular bacteria from the *Staphylococcus* genus, due their thick peptidoglycan layer, which provides sites for effective attachment to CTAB nanocomposites. In contrast, Gram-negative bacteria were less vulnerable to them.

Another factor to consider is how surface degradation affects adhesion. In the topographical analysis of the films, it was found that degradation alters the initial topography [41], mainly at the highest CTAB concentrations, in our work at 5% (*w/w*) CTAB. The deposition of salts, the appearance of holes on some surfaces and the release of active substances from the films constitute a scenario in which practically every surface has a different identity. Nevertheless, if we have to highlight some positive behavior with degradation against infections, it is the decrease in the number of bacteria adhered to the 0/0 control surfaces and the non-viability, regardless of the degradation time, of the bacteria adhered to the 3/5 samples. The other samples with CTAB lose their initial bactericidal action after degradation. Magnesium helps both the dispersion of the CTAB in the polymeric matrix and the subsequent release of the surfactant [14]. Additionally, the high density of regular and structured holes of width  $1.9 \pm 0.2$  µm on 3/5 may favor the diffusion of Mg<sup>2+</sup> ions and CTAB, while this topography may hinder bacterial attachment-retention, as it is the surface with the lowest number of bacteria bound at three months [37,38,57,58].

The complexity of these systems to describe a single antimicrobial behavior is reflected in the work of Wojciechowski et al. [59], who working with a copolymer of methyl methacrylate-ethyl acrylate and styrene-ethyl acrylate with CTAB, observed scattered values in antimicrobial activity after surface degradation. Therefore, more research is needed on the use of CTAB in polymeric films for bactericidal purposes, as the focus so far has been on nanoparticles [60] and emulsions [61].

Biofilm formation on surfaces provides complementary information to adhesion. In adhesion, bacteria are suspended in a physiological buffer where their metabolic activity is suppressed, whereas in biofilms, bacteria are in an active metabolic state, quantified by the amount of ATP produced.

The first relevant aspect in the biofilm formation assays (Figure 5) is the complete suppression of biofilm in those samples where bacteria lost their viability after 4 h of



adhesion (Figure 5). In addition to these cases, the 0/5 degraded samples also inhibit biofilm formation, demonstrating that the concentration of CTAB molecules released at these long times are able to inhibit bacterial growth on the material, but do not significantly affect the adhesion behavior of the bacteria in a latent state in PBS.

Also of interest in Figure 6 is the increased biofilm formation on aged surfaces (with the exception of 0/5 and 3/5 where there is no biofilm), irrespective of degradation time. It is likely that bacterial anchorage and subsequent proliferation in nutrient-rich media is favored by salt deposition after degradation and, in some cases, by surface hydrophilization and topographical changes [41].

Focusing on Mg, without CTAB, its effect on biofilm formation is dual: on the one hand, it decreases by 28.8% when the surface is not degraded, but after degradation, Mg surfaces have a higher biofilm formation capacity. Previous work with Mg shows not very conclusive results in this respect. It is probably the combination of the concentration and the way the Mg is released that is responsible for the different information found in the literature [62–64]. In particular, our group has shown that concentrations of 10% Mg in PLA films are able to initially reduce biofilm formation after 8 h, due to the local change in pH associated with the very fast release of  $Mg^{2+}$  but, after 24 h, the subinhibitory concentrations of  $Mg^{2+}$  ions provoke a significant increase in biofilm [18].

The literature stresses the need for self-healing materials that can prevent bacterial or fungal infections and this fact is evident in different works, such as the recent one by Du et al. [65]. In this research, a detailed study of the bactericidal activity of a polymeric material (PETU, poly(ether-thioureas)) doped with the antimicrobial compounds PEI (poly(ethylene imine)) and CTAB is carried out. With CTAB, bactericidal effects are achieved at lower concentrations than those used in the present work and mechanisms of action are proposed depending on the type of bacteria used. In particular, for Gram-positive bacteria, CTAB causes destruction of the bacterial surface structures, leading to a significant collapse of the bacteria and leakage of the cytoplasm. However, this bacterial killing does not appear to be cytotoxic in fibroblastic cell assays, and the concentration of CTAB 1% *w/w* seems to be the ideal concentration in this polymer for self-healing [65].

We are aware that the type of polymer, its manufacturing process and its final geometry are decisive in the amount of active substances released into the environment and, in addition, as we have verified, aging of the surface is a new factor to be taken into account when designing biodegradable materials with self-healing properties.

## 5. Conclusions

This work marks a new step towards the design of self-healing biodegradable materials. The results have shown that the presence of Mg and CTAB changes the surface properties of PLA before and after aging and modifies bacterial colonization on the polymer. Bacterial adhesion and biofilm formation are affected by both the physical properties of the surface and the chemical activity of the polymer matrix.

Changes in hydrophobicity are well correlated with adhesion in the absence of active substances in the matrix. In particular, films with CTAB without degradation are completely bactericidal, and this activity is maintained after degradation in cases of higher concentration. The dispersive action of Mg, in terms of the distribution of CTAB within the PLA matrix, turns the 3/5 sample into a highly surface-structured sample that intensifies its antimicrobial action even after degradation.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.F.-G., A.M.G.-M., V.L.-A., M.L.G.-M. and M.H.-O.; Formal analysis, M.F.-G., A.M.G.-M., V.L.-A., M.L.G.-M. and M.H.-O.; Funding acquisition, A.M.G.-M. and M.L.G.-M.; Investigation, M.F.-G., A.M.G.-M., V.L.-A. and M.H.-O.; Methodology, A.M.G.-M., V.L.-A. and M.H.-O.; Project administration, A.M.G.-M. and M.L.G.-M.; Supervision, A.M.G.-M., M.L.G.-M. and M.H.-O.; Writing—original draft, M.F.-G., A.M.G.-M., V.L.-A. and M.H.-O.; Writing—review and editing, A.M.G.-M., V.L.-A. and M.H.-O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Authors are grateful for projects GR21119 and IB20092 supported by Government of Extremadura. Thanks to support from Consejería de Sanidad y Servicios Sociales, Government of Extremadura. Thanks also to project RTI2018-096862-B-I00, supported by MCIN/AEI/10.13039/501100011033, FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional “Una manera de hacer Europa”). Also, M.F.-G., would like to thank the Government of Extremadura and the European Social Fund for its grant PD16055.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data are contained within the article.

**Acknowledgments:** Contact angle measurements and ToF-SIMS were performed by the ICTS “NANBIOSIS”, more specifically by the Surface Characterization and Calorimetry Unit of the CIBER in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN) and the SACSS-SAIUEx of the University of Extremadura (UEX). Special appreciation to James Mc-Cue for assistance in language editing.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Pahlevanzadeh, F.; Setayeshmehr, M.; Bakhsheshi-Rad, H.R.; Emadi, R.; Kharaziha, M.; Poursamar, S.A.; Ismail, A.F.; Sharif, S.; Chen, X.; Berto, F. A Review on Antibacterial Biomaterials in Biomedical Applications: From Materials Perspective to Bioinks Design. *Polymers* **2022**, *14*, 2238. [[CrossRef](#)]
2. Cheeseman, S.; Christofferson, A.J.; Kariuki, R.; Cozzolino, D.; Daeneke, T.; Crawford, R.J.; Truong, V.K.; Chapman, J.; Elbourne, A. Antimicrobial Metal Nanomaterials: From Passive to Stimuli-Activated Applications. *Adv. Sci.* **2020**, *7*, 1902913. [[CrossRef](#)]
3. Mah, T.-F.C.; O’Toole, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* **2001**, *9*, 34–39. [[CrossRef](#)]
4. Stewart, P.S.; Costerton, J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **2001**, *358*, 135–138. [[CrossRef](#)]
5. Roy, R.; Tiwari, M.; Donelli, G.; Tiwari, V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence* **2018**, *9*, 522–554. [[CrossRef](#)]
6. Bazaka, K.; Jacob, M.; Crawford, R.J.; Ivanova, E.P. Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *95*, 299–311. [[CrossRef](#)]
7. Lopes, N.; Freitas, A.; Ramos, H.; Vasconcelos, C. *S. epidermidis* Isolates from a Tertiary Care Portuguese Hospital Show Very High Antibiotic Non-Susceptible Rates and Significant Ability to Form Biofilms. *Appl. Microbiol.* **2021**, *1*, 150–161. [[CrossRef](#)]
8. Carcione, D.; Leccese, G.; Conte, G.; Rossi, E.; Intra, J.; Bonomi, A.; Sabella, S.; Moreo, M.; Landini, P.; Brillì, M.; et al. Lack of Direct Correlation between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance in Clinical *Staphylococcus epidermidis* Isolates from an Italian Hospital. *Microorganisms* **2022**, *10*, 1163. [[CrossRef](#)]
9. Donlan, R.M. Special Issue Characteristics of Biofilms on Indwelling Medical Devices. *Emerg. Infect. Dis.* **2001**, *7*, 277–281. [[CrossRef](#)]
10. Falde, E.J.; Yohe, S.T.; Colson, Y.L.; Grinstaff, M.W. Superhydrophobic materials for biomedical applications. *Biomaterials* **2016**, *104*, 87–103. [[CrossRef](#)]
11. Luque-Agudo, V.; Romero-Guzmán, D.; Fernández-Grajera, M.; González-Martín, M.L.; Gallardo-Moreno, A.M. Aging of Solvent-Casting PLA-Mg Hydrophobic Films: Impact on Bacterial Adhesion and Viability. *Coatings* **2019**, *9*, 814. [[CrossRef](#)]
12. Przekora, A. Current Trends in Fabrication of Biomaterials for Bone and Cartilage Regeneration: Materials Modifications and Biophysical Stimulations. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 435. [[CrossRef](#)]
13. Murariu, M.; Dubois, P. PLA composites: From production to properties. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *107*, 17–46. [[CrossRef](#)]
14. Ferrández-Montero, A.; Lieblich, M.; Benavente, R.; González-Carrasco, J.L.; Ferrari, B. New approach to improve polymer-Mg interface in biodegradable PLA/Mg composites through particle surface modification. *Surf. Coatings Technol.* **2020**, *383*, 125285. [[CrossRef](#)]
15. Ferrández-Montero, A.; Lieblich, M.; Benavente, R.; González-Carrasco, J.; Ferrari, B. Study of the matrix-filler interface in PLA/Mg composites manufactured by Material Extrusion using a colloidal feedstock. *Addit. Manuf.* **2020**, *33*, 101142. [[CrossRef](#)]
16. Wan, P.; Yuan, C.; Tan, L.; Li, Q.; Yang, K. Fabrication and evaluation of bioresorbable PLLA/magnesium and PLLA/magnesium fluoride hybrid composites for orthopedic implants. *Compos. Sci. Technol.* **2014**, *98*, 36–43. [[CrossRef](#)]
17. Swaroop, C.; Shukla, M. Nano-magnesium oxide reinforced polylactic acid biofilms for food packaging applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *113*, 729–736. [[CrossRef](#)]
18. Fernández-Calderón, M.; Romero-Guzmán, D.; Ferrández-Montero, A.; Pérez-Giraldo, C.; González-Carrasco, J.L.; Lieblich, M.; Benavente, R.; Ferrari, B.; González-Martín, M.; Gallardo-Moreno, A.M. Impact of PLA/Mg films degradation on surface physical properties and biofilm survival. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2020**, *185*, 110617. [[CrossRef](#)]
19. Demchenko, V.; Mamunya, Y.; Kobylinskyi, S.; Riabov, S.; Naumenko, K.; Zahorodnia, S.; Povnitsa, O.; Rybalchenko, N.; Iurzhenko, M.; Adamus, G.; et al. Structure-Morphology-Antimicrobial and Antiviral Activity Relationship in Silver-Containing Nanocomposites Based on Polylactide. *Molecules* **2022**, *27*, 3769. [[CrossRef](#)]

20. McFarland, A.W.; Elumalai, A.; Miller, C.C.; Humayun, A.; Mills, D.K. Effectiveness and Applications of a Metal-Coated HNT/Poly(lactic acid) Antimicrobial Filtration System. *Polymers* **2022**, *14*, 1603. [[CrossRef](#)]
21. Kudzin, M.H.; Mrozińska, Z.; Kaczmarek, A.; Lisiak-Kucińska, A. Deposition of Copper on Poly(Lactide) Non-Woven Fabrics by Magnetron Sputtering—Fabrication of New Multi-Functional, Antimicrobial Composite Materials. *Materials* **2020**, *13*, 3971. [[CrossRef](#)]
22. Liu, Z.; Ye, J.; Rauf, A.; Zhang, S.; Wang, G.; Shi, S.; Ning, G. A flexible fibrous membrane based on copper(ii) metal–organic framework/poly(lactic acid) composites with superior antibacterial performance. *Biomater. Sci.* **2021**, *9*, 3851–3859. [[CrossRef](#)]
23. Aggarwal, D.; Kumar, V.; Sharma, S. Drug-loaded biomaterials for orthopedic applications: A review. *J. Control Release* **2022**, *344*, 113–133. [[CrossRef](#)]
24. Seo, K.H.; Lee, K.E.; Yanilmaz, M.; Kim, J. Exploring the Diverse Morphology of Porous Poly(Lactic Acid) Fibers for Developing Long-Term Controlled Antibiotic Delivery Systems. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1272. [[CrossRef](#)]
25. Suner, S.C.; Yildirim, Y.; Yurt, F.; Ozel, D.; Oral, A.; Ozturk, I. Antibiotic loaded electrospun poly (lactic acid) nanofiber mats for drug delivery system. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2022**, *71*, 103263. [[CrossRef](#)]
26. Tezel, U.; Pavlostathis, S.G. Quaternary ammonium disinfectants: Microbial adaptation, degradation and ecology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *33*, 296–304. [[CrossRef](#)]
27. Nakata, K.; Tsuchido, T.; Matsumura, Y. Antimicrobial cationic surfactant, cetyltrimethylammonium bromide, induces superoxide stress in *Escherichia coli* cells. *J. Appl. Microbiol.* **2011**, *110*, 568–579. [[CrossRef](#)]
28. Chen, P.; Lang, J.; Franklin, T.; Yu, Z.; Yang, R. Reduced Biofilm Formation at the Air–Liquid–Solid Interface via Introduction of Surfactants. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2021**. [[CrossRef](#)]
29. Ahmed, J.; Arfat, Y.A.; Castro-Aguirre, E.; Auras, R. Thermal properties of ZnO and bimetallic Ag–Cu alloy reinforced poly(lactic acid) nanocomposite films. *J. Therm. Anal.* **2016**, *125*, 205–214. [[CrossRef](#)]
30. Črešnar, K.P.; Aulova, A.; Bikiaris, D.; Lambropoulou, D.; Kuzmič, K.; Zemljič, L.F. Incorporation of Metal-Based Nanoadditives into the PLA Matrix: Effect of Surface Properties on Antibacterial Activity and Mechanical Performance of PLA Nanoadditive Films. *Molecules* **2021**, *26*, 4161. [[CrossRef](#)]
31. Chong, W.J.; Shen, S.; Li, Y.; Trinci, A.; Pejak, D.; Kyratzis, I.; Sola, A.; Wen, C. Additive manufacturing of antibacterial PLA–ZnO nanocomposites: Benefits, limitations and open challenges. *J. Mater. Sci. Technol.* **2022**, *111*, 120–151. [[CrossRef](#)]
32. Karakurt, I.; Ozaltin, K.; Pištěková, H.; Vesela, D.; Michael-Lindhard, J.; Humpolíček, P.; Mozetič, M.; Lehocky, M. Effect of Saccharides Coating on Antibacterial Potential and Drug Loading and Releasing Capability of Plasma Treated Poly(lactic acid) Films. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 8821. [[CrossRef](#)]
33. Huang, X.; Ge, X.; Zhou, L.; Wang, Y. Eugenol embedded zein and poly(lactic acid) film as active food packaging: Formation, characterization, and antimicrobial effects. *Food Chem.* **2022**, *384*, 132482. [[CrossRef](#)]
34. Hierro-Oliva, M.; Luque-Agudo, V.; Gallardo-Moreno, A.; González-Martín, M. Characterization of Magnesium-Poly(lactic acid) Films Casted on Different Substrates and Doped with Diverse Amounts of CTAB. *Molecules* **2021**, *26*, 4811. [[CrossRef](#)]
35. Wilson, C.J.; Clegg, R.E.; Leavesley, D.I.; Percy, M.J. Mediation of Biomaterial–Cell Interactions by Adsorbed Proteins: A Review. *Tissue Eng.* **2005**, *11*, 1–18. [[CrossRef](#)]
36. Lu, N.; Zhang, W.; Weng, Y.; Chen, X.; Cheng, Y.; Zhou, P. Fabrication of PDMS surfaces with micro patterns and the effect of pattern sizes on bacteria adhesion. *Food Control* **2016**, *68*, 344–351. [[CrossRef](#)]
37. Lee, S.W.; Phillips, K.S.; Gu, H.; Kazemzadeh-Narbat, M.; Ren, D. How microbes read the map: Effects of implant topography on bacterial adhesion and biofilm formation. *Biomaterials* **2021**, *268*, 120595. [[CrossRef](#)]
38. Francone, A.; Merino, S.; Retolaza, A.; Ramiro, J.; Alves, S.A.; de Castro, J.V.; Neves, N.M.; Arana, A.; Marimon, J.M.; Torres, C.M.S.; et al. Impact of surface topography on the bacterial attachment to micro- and nano-patterned polymer films. *Surfaces Interfaces* **2021**, *27*, 101494. [[CrossRef](#)]
39. Perera-Costa, D.; Bruque, J.M.; González-Martín, M.L.; Gómez-García, A.C.; Vellido-Rodríguez, V. Studying the Influence of Surface Topography on Bacterial Adhesion using Spatially Organized Microtopographic Surface Patterns. *Langmuir* **2014**, *30*, 4633–4641. [[CrossRef](#)]
40. Tebbs, S.E.; Sawyer, A.; Elliott, T.S.J. Influence of Surface Morphology on in Vitro Bacterial Adherence to Central Venous Catheters. *BJA Br. J. Anaesth.* **1994**, *72*, 587–591. [[CrossRef](#)]
41. Gallardo-Moreno, A.M.; Luque-Agudo, V.; González-Martín, M.L.; Hierro-Oliva, M. Micro-structured and self-assembled patterns in PLA-cast films as a function of CTAB content, magnesium and substratum hydrophobicity. *Appl. Surf. Sci.* **2022**, *597*, 153676. [[CrossRef](#)]
42. Owens, D.K.; Wendt, R.C. Estimation of the surface free energy of polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* **1969**, *13*, 1741–1747. [[CrossRef](#)]
43. Kaelble, D.H. Dispersion-polar surface tension properties of organic solids. *J. Adhes.* **1970**, *2*, 66–81. [[CrossRef](#)]
44. Fernández-Calderón, M.C.; Cifuentes, S.C.; Pacha-Olivenza, M.A.; Gallardo-Moreno, A.M.; Saldaña, L.; González-Carrasco, J.L.; Blanco, M.T.; Vilaboa, N.; González-Martín, M.L.; Pérez-Giraldo, C. Antibacterial effect of novel biodegradable and bioresorbable PLDA/Mg composites. *Biomed. Mater.* **2017**, *12*, 015025. [[CrossRef](#)]
45. Gomes, I.; Simões, M.; Simões, L. The effects of sodium hypochlorite against selected drinking water-isolated bacteria in planktonic and sessile states. *Sci. Total Environ.* **2016**, *565*, 40–48. [[CrossRef](#)]
46. Oliveira, R.; Azeredo, J.; Teixeira, P.; Fonseca, A.P. *The Role of Hydrophobicity in Bacterial Adhesion*; Bionline: Cardiff, UK, 2001; pp. 11–22.



47. Abram, A.; Zore, A.; Lipovž, U.; Košak, A.; Gavras, M.; Boltežar, Ž.; Bohinc, K. Bacterial Adhesion on Prosthetic and Orthotic Material Surfaces. *Coatings* **2021**, *11*, 1469. [[CrossRef](#)]
48. Hogt, A.H.; Dankert, J.; Feijen, J. Adhesion of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus saprophyticus to a Hydrophobic Biomaterial. *Microbiology* **1985**, *131*, 2485–2491. [[CrossRef](#)]
49. Sankar, G.G.; Murthy, P.S.; Das, A.; Sathya, S.; Nankar, R.; Venugopalan, V.P.; Doble, M. Polydimethyl siloxane based nanocomposites with antibiofilm properties for biomedical applications. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2017**, *105*, 1075–1082. [[CrossRef](#)]
50. Azeredo, J.; Pacheco, A.; Lopes, I.; Oliveira, R.; Vieira, M.J. Monitoring cell detachment by surfactants in a parallel plate flow chamber. *Water Sci. Technol.* **2003**, *47*, 77–82. [[CrossRef](#)]
51. McDonnell, G.; Russell, A.D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, *12*, 147–179. [[CrossRef](#)]
52. Cullmann, W.; Schlunegger, H. Influence of Exogenous Factors and Antibiotics on the Cytoplasmic Membrane Proteins of Staphylococcus Aureus. *Microbiol. Chemother.* **1992**, *38*, 211–217. [[CrossRef](#)]
53. Briandet, R.; Meylheuc, T.; Maher, C.; Noë, M.N.; Bellon-Fontaine, N. Listeria Monocytogenes Scott A: Cell Surface Charge, Hydrophobicity, and Electron Donor and Acceptor Characteristics under Different Environmental Growth Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 5328–5333. [[CrossRef](#)]
54. Oliver, J.D. The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* **2005**, *43*, 93–100.
55. EL Othmany, R.; Zahir, H.; Zanane, C.; El Louali, M.; Latrache, H. Influence of Consistency and Composition of Growth Medium on Surface Physicochemical Properties of Streptomyces. *J. Pure Appl. Microbiol.* **2021**, *15*, 1705–1715. [[CrossRef](#)]
56. Sathya, S.; Murthy, P.S.; Devi, V.G.; Das, A.; Anandkumar, B.; Sathyaseelan, V.; Doble, M.; Venugopalan, V. Antibacterial and cytotoxic assessment of poly (methyl methacrylate) based hybrid nanocomposites. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *100*, 886–896. [[CrossRef](#)]
57. Wu, S.; Zhang, B.; Liu, Y.; Suo, X.; Li, H. Influence of surface topography on bacterial adhesion: A review (Review). *Biointerphases* **2018**, *13*, 060801. [[CrossRef](#)]
58. Meinshausen, A.-K.; Herbster, M.; Zwahr, C.; Soldera, M.; Müller, A.; Halle, T.; Lasagni, A.F.; Bertrand, J. Aspect ratio of nano/microstructures determines Staphylococcus aureus adhesion on PET and titanium surfaces. *J. Appl. Microbiol.* **2021**, *131*, 1498–1514. [[CrossRef](#)]
59. Wojciechowski, K.; Kaczorowski, M.; Mierzejewska, J.; Parzuchowski, P. Antimicrobial dispersions and films from positively charged styrene and acrylic copolymers. *Colloids Surf. B Biointerphases* **2018**, *172*, 532–540. [[CrossRef](#)]
60. Ribeiro, R.T.; Galvão, C.N.; Betancourt, Y.P.; Mathiazzi, B.I.; Carmona-Ribeiro, A.M. Microbicidal Dispersions and Coatings from Hybrid Nanoparticles of Poly (Methyl Methacrylate), Poly (Diallyl Dimethyl Ammonium) Chloride, Lipids, and Surfactants. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 6150. [[CrossRef](#)]
61. Naves, A.F.; Palombo, R.R.; Carrasco, L.D.; Carmona-Ribeiro, A.M. Antimicrobial Particles from Emulsion Polymerization of Methyl Methacrylate in the Presence of Quaternary Ammonium Surfactants. *Langmuir* **2013**, *29*, 9677–9684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Eoknin, H.; Esteinberg, D.; Eshemesh, M. Magnesium ions mitigate biofilm formation of Bacillus species via downregulation of matrix genes expression. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 907. [[CrossRef](#)]
63. Song, B.; Leff, L.G. Influence of magnesium ions on biofilm formation by Pseudomonas fluorescens. *Microbiol. Res.* **2006**, *161*, 355–361. [[CrossRef](#)]
64. Reffuveille, F.; Josse, J.; Velard, F.; Lamret, F.; Varin-Simon, J.; Dubus, M.; Haney, E.F.; Hancock, R.; Mongaret, C.; Gangloff, S.C. Bone Environment Influences Irreversible Adhesion of a Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus Strain. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2865. [[CrossRef](#)]
65. Du, J.; Li, Y.; Wang, J.; Wang, C.; Liu, D.; Wang, G.; Liu, S. Mechanically Robust, Self-Healing, Polymer Blends and Polymer/Small Molecule Blend Materials with High Antibacterial Activity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 26966–26972. [[CrossRef](#)]

