

## Copolímero de plasma frío con actividad antimicrobiana depositado en tres sustratos diferentes

Jazmín Montes Hernández<sup>a</sup>, Rosa Idalia Narro Céspedes<sup>a</sup>, María Guadalupe Neira Velázquez<sup>b</sup>, Erick Osvaldo Martínez Ruiz<sup>b\*</sup>.

Afiliación (Arial 8, centrado): <sup>a)</sup> Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas, Boulevard Venustiano Carranza 935, República, 25280 Saltillo, Coahuila, <sup>b)</sup> Centro de Investigación en Química Aplicada, Enrique Reyna H. 140, San José de los Cerritos, 25294 Saltillo, Coahuila, erick.martinez@ciqa.edu.mx

**Resumen:** Una buena estrategia para prevenir la deposición temprana de bacterias que pueden formar biopelículas es la aplicación de recubrimientos antimicrobianos en superficies existentes, sin embargo, este campo ha sido poco explorado y los recubrimientos a menudo no son uniformes en grosor. Se depositó una película homogénea de R-Carvone-Octadieno ( $pp_{cop}$ ) en diferentes sustratos (portavidrio, portavidrio triturado y tela) mediante copolimerización por plasma frío para estudiar la influencia del sustrato en la actividad antimicrobiana. El  $pp_{cop}$  mostró mejores resultados de actividad antimicrobiana en el sustrato con mayor área de contacto efectiva, destacando la influencia de esta variable en la actividad antimicrobiana. El  $pp_{cop}$  depositado en portavidrio triturado mostró una inhibición de las bacterias *E. coli* y *S. aureus* en un 48.69% y 49.31% respectivamente.

### Introducción.

Se sabe bien que las biopelículas bacterianas son un problema importante en diversas áreas<sup>1</sup>. A pesar de los esfuerzos de investigación en este campo, sigue siendo una prioridad alta en la investigación. Se ha encontrado que hasta el 60% de las infecciones tratadas están relacionadas con la formación de biopelículas<sup>2</sup>. Este problema se agrava aún más con la aparición de bacterias con mayor tolerancia a biocidas y antibióticos<sup>3</sup>. Además, en este estado, los microorganismos son altamente resistentes al tratamiento antimicrobiano y se adhieren tenazmente a las superficies<sup>4</sup>. Actualmente, existen varios enfoques innovadores enfocados en el tratamiento de superficies para prevenir este problema mediante la mejora del rendimiento de las superficies antimicrobianas existentes, la aplicación de recubrimientos antimicrobianos o la modificación de la arquitectura de la superficie. Entre las modificaciones de superficie, la técnica de funcionalización con productos químicos ha sido una de las más estudiadas<sup>1</sup>. Se informa que los polímeros catiónicos, pequeños ligandos y biomoléculas son los que tienen la actividad y eficacia antimicrobiana más exitosa<sup>5-8</sup>.

Uno de los métodos más utilizados para la prevención de biopelículas en superficies es la aplicación de recubrimientos antimicrobianos,

que se pueden definir como la deposición de un material antimicrobiano en un sustrato<sup>9</sup>. Una estrategia comúnmente utilizada para obtener estos recubrimientos es la adhesión de un agente antimicrobiano a una matriz polimérica. Ejemplos exitosos incluyen el uso de compuestos de amonio cuaternario (QACs), cuya principal actividad antimicrobiana se asocia con su catión. Los recubrimientos de nano-plata se han utilizado ampliamente en dispositivos médicos, especialmente en catéteres, sin embargo, está claro que los iones de plata y las sales de plata tienen potenciales propiedades citotóxicas para las líneas celulares humanas<sup>10</sup>. Por lo tanto, sería adecuado buscar otras alternativas que no tengan este efecto negativo en los seres humanos, y el tratamiento con plasma puede ser una de estas alternativas. Se ha estudiado el concepto de una capa de difusión para controlar la liberación de antibióticos como ciprofloxacino de un poliuretano cargado con ciprofloxacino mediante el uso de polímero de plasma de n-butil metacrilato<sup>10</sup>.

Los recubrimientos antimicrobianos suelen ser mecánicamente deficientes, no uniformes en grosor y, en el caso de recubrimientos con agentes de liberación, la concentración óptima del ingrediente activo disminuye, lo que también reduce su eficiencia<sup>9</sup>. Una alternativa para obtener recubrimientos antimicrobianos

unimes con propiedades mecánicas aceptables es el uso de tecnología de plasma frío, que se utiliza para la polimerización de precursores orgánicos. Se han polimerizado por plasma monómeros como trimetilsilano [14], 1,1,1 triclorometano[15], R-carvone[16] y 1,8-cineol, un monómero natural, y se ha encontrado que tienen propiedades antibacterianas<sup>11</sup>. Una de las principales ventajas del uso de la polimerización por plasma es la gran capacidad de alterar la química superficial sin afectar las propiedades volumétricas del material y con una calidad reproducible durante la escala de fabricación<sup>12</sup>.

El objetivo principal de este trabajo fue la preparación de recubrimientos antibacterianos mediante copolimerización por plasma de dos precursores orgánicos: aceite esencial conocido como R-carvone y octadieno. El aceite esencial de R-carvone se extrae principalmente de plantas de menta verde y se ha informado en la literatura que posee propiedades antimicrobianas<sup>1,13-15</sup>. Estas propiedades se atribuyen principalmente a la presencia del grupo monoterpeno presente en su molécula<sup>14</sup>. En este estudio se investigó la actividad antimicrobiana de un copolímero (pp<sub>Cop</sub>) en la actividad bactericida en tres sustratos diferentes (portavidrios, portavidrios triturado y tela) bajo el protocolo de la Norma Industrial Japonesa Z280126, exponiendo la importancia del valor del área superficial del sustrato en la actividad antimicrobiana, cuya influencia ha sido poco estudiada<sup>9</sup>.

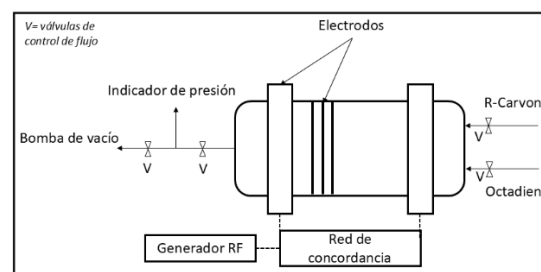
## Parte experimental.

### Materiales.

#### Reactor de plasma frío para reacciones de copolimerización

Un contenedor cilíndrico de vidrio con tapas de acero inoxidable se utilizó como reactor de plasma, como se muestra en la Figura 1. El reactor de plasma, a través de sus tapas de acero inoxidable, estaba conectado a un generador de radiofrecuencia (RF) de 13.56 MHz acoplado a una máquina de impedancia (modelo AT-6 Automatic Matching Network). El reactor operaba en condiciones de vacío mediante el uso de una bomba de vacío (Maxima C Plus Fisher Scientific™). Se utilizó un controlador-indicador de un solo canal ACS

2000 adixen de Alcatel Vacuum Technology para leer y monitorear la presión de vacío en el reactor.



**Figura 1.** Reactor plasma experimental.

Antes de la copolimerización por plasma, los sustratos, como los portavidrios de vidrio, se limpiaron ultrasónicamente en acetona y agua milli-Q, luego se secaron y se trataron con plasma de aire durante 1 minuto a 20 W y 45 Pa para eliminar contaminantes residuales. La copolimerización por plasma de carvone (98%, Sigma Aldrich, número de producto: 124931) y octadieno (98%, Sigma Aldrich, número de producto: O2501) se realizó en sustratos de 1 cm<sup>2</sup>. Los datos de presión se utilizaron para obtener la tasa de flujo correspondiente (Q) mediante el uso de la siguiente ecuación 1 (reportada en centímetros cúbicos estándar por minuto, sccm):

$$Q = \left(\frac{dp}{dt}\right) \left(16172 \frac{V}{T}\right) \dots \dots \dots (1)$$

Donde T = temperatura (295 K), P = presión (Pa), t = tiempo (s) y V = volumen del reactor de plasma (1.65 L). La cámara del reactor de plasma fue evacuada para alcanzar una presión de 38 Pa. Luego, los precursores (aceite de carvone y octadieno) se incorporaron al reactor a una tasa de flujo de 0.9 y 0.5 sccm respectivamente. La copolimerización por plasma se llevó a cabo a 20 W durante 60 minutos de deposición. Después de la interrupción del plasma, los precursores continuaron fluyendo en la cámara de plasma durante otros 2 minutos para apagar cualquier radical residual en el pp<sub>Cop</sub>.

### Reflexión total atenuada-Transformada infrarroja de Fourier (ATR-FTIR)

Se utilizó un sistema ATR-FTIR de Thermo Scientific (Nicolet IS 50 ATR) para obtener los espectros de pp<sub>Cop</sub>, octadieno y carvone. Una vez que el pp<sub>Cop</sub> fue depositado en el portavidrio y retirado con un bisturí, esta muestra se utilizó para la medición de FTIR. Para obtener los espectros, se realizaron 100 escaneos a una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>.

### Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Se han obtenido imágenes de las diferentes muestras de tela y portavidrio depositadas con pp<sub>Cop</sub> mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), utilizando el equipo JEOL 6000. Las muestras con pp<sub>Cop</sub> fueron previamente recubiertas con una capa de 10 nm de oro mediante un sistema de pulverización catódica por plasma y montadas en portaobjetos de aluminio.

### Actividad antimicrobiana del copolímero

La actividad antimicrobiana del pp<sub>Cop</sub> se evaluó según la Norma Industrial Japonesa Z280126. La evaluación se realizó utilizando dos microorganismos clínicamente importantes: *Escherichia coli* ATCC-25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC-29213. Para realizar la prueba, se prepararon telas y portavidrios recubiertos con pp<sub>Cop</sub> (cada uno con forma circular y un diámetro de 1.75 cm) bajo condiciones asépticas. Estas muestras fueron inoculadas con 4 mL de una suspensión que contenía los microorganismos en caldo de soja tripticasa. La concentración de la suspensión fue equivalente a 50,000 unidades formadoras de colonias por mL (CFU mL<sup>-1</sup>). Además, se preparó un tercer conjunto de portavidrios triturados (aproximadamente 0.1 g, equivalente a un portavidrio de 1.75 cm de diámetro) recubiertos con pp<sub>Cop</sub>, que se trataron de la misma manera que las muestras anteriores. Posteriormente, las muestras se incubaron en un ambiente controlado a una temperatura de 37 °C y con una humedad mantenida al 90% durante 24 horas. Después del período de incubación, se combinó una parte del inóculo (1 x 10<sup>6</sup> CFU mL<sup>-1</sup>) con nueve partes de agua mQ para preparar una concentración de inóculo de 1 x 10<sup>5</sup> CFU mL<sup>-1</sup>. Esta mezcla se diluyó aún más para lograr una concentración de inóculo de 1 x 10<sup>2</sup> CFU mL<sup>-1</sup>. Cada dilución se añadió a una placa de Petri que contenía 20 mL de agar BD BIOXON (modelo

BD210800). Las placas de Petri se dejaron a una temperatura de 37 °C durante 24 horas. Tras este período de incubación, se contaron las unidades formadoras de colonias (CFUs) con un microscopio para cada muestra, así como el control. La metodología descrita se llevó a cabo por triplicado para cada muestra tratada, seleccionada de tres ciclos diferentes de tratamiento con plasma.

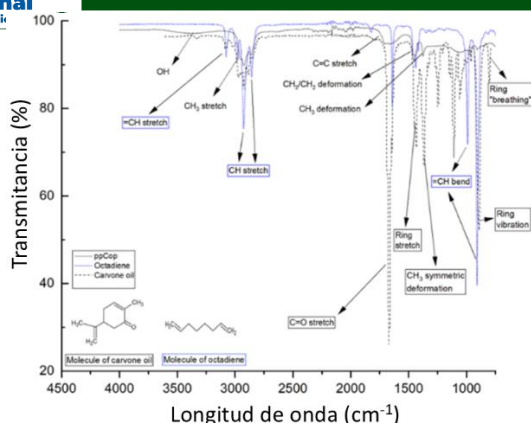
### Resultados y discusión.

#### Resultados ATR-FTIR

La técnica presentada identifica los grupos funcionales en la superficie de pp<sub>Cop</sub> y proporciona pistas sobre su ruta de copolimerización en el portavidrio. En la Figura 2, es posible observar los espectros ATR-FTIR de pp<sub>Cop</sub>, octadieno y aceite de carvone. Los espectros de pp<sub>Cop</sub> mostraron bandas anchas en comparación con sus precursores, que presentaron bandas nítidas y regulares; esto es característico de un polímero altamente reticulado<sup>16</sup>. Los polímeros altamente reticulados, como el pp<sub>Cop</sub>, podrían reducir la intensidad de las estructuras simétricas de los grupos funcionales como el CH<sub>3</sub> a 1371 cm<sup>-1</sup><sup>16</sup>.

La reducción considerable de las bandas de flexión =CH (990.28 y 908.80 cm<sup>-1</sup>) y de los enlaces de estiramiento (3079.33 cm<sup>-1</sup>) sugiere que la copolimerización también se lleva a cabo mediante la flexión =CH del octadieno. Esto sugiere la inserción de hidrocarburos de cadena larga, como -C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>, lo cual podría conferir flexibilidad al polímero e incrementar su rugosidad.

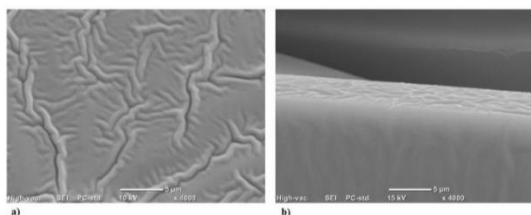
Sin embargo, las bandas de estiramiento, vibración y "respiración" (es decir, el estiramiento simultáneo de todos los enlaces C=C) del aceite de carvone a 1430.61, 893.70 y 802.20 cm<sup>-1</sup> no aparecieron en los espectros de IR de la carvone<sup>17</sup>. Esta ausencia sugiere que la estructura en anillo de la carvone, como se ilustra en la Figura 2, se disocia durante su copolimerización por plasma en el sustrato de portavidrio<sup>13</sup>.



**Figura 2.** Espectros ATR-FTIR de ppCOP, octadieno y R-carvone.

### Resultados SEM.

La Figura 3 muestra las imágenes SEM de ppCOP en a) portavidrio y b) tela. Es posible observar un depósito rugoso homogéneo en ambos sustratos. Estas imágenes refuerzan la evidencia de la rugosidad de ppCOP, apreciándose que el recubrimiento por plasma fue depositado homogéneamente en los dos sustratos.

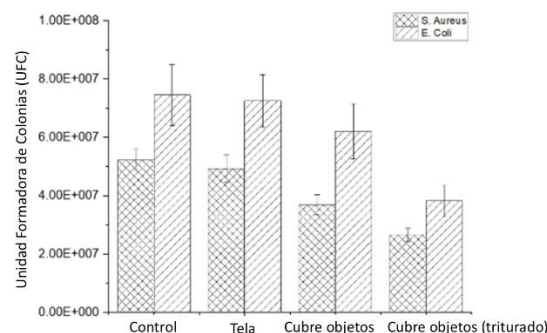


**Figura 3.** Imágenes SEM de ppCOP en portavidrio (barra de escala de 5 µm, a) y tela (barra de escala de 5 µm, b)).

### Resultados de Actividad antimicrobiana del copolímero

En la Figura 4 es posible observar las UFCs en presencia de ppCOP en tres sustratos diferentes (tela, portavidrio y portavidrio triturado) y el sustrato sin ppCOP (control) después de 24 horas de crecimiento bacteriano (*S. aureus* y *E. coli*). Los resultados muestran inhibición en el crecimiento de las UFC en comparación con el control. La inhibición más significativa en el crecimiento bacteriano se reporta en el ppCOP depositado sobre el portavidrio triturado (48 % para *E. coli* y 49 % para *S. aureus*), seguido del ppCOP depositado sobre el portavidrio (16 % para *E. coli* y 29 % para *S. aureus*) y, finalmente, la tela, con solo una inhibición del 3 % y 6 % para

*E. coli* y *S. aureus* respectivamente. La inhibición de las UFC podría deberse principalmente a la presencia de grupos oxidantes, como el carbonilo en el ppCOP.



**Figura 4.** UFC en presencia de ppCOP en tres sustratos diferentes (tela, portavidrio y portavidrio triturado) y sin la presencia de ppCOP (control) a las 24 horas de crecimiento bacteriano (*S. aureus* y *E. coli*).

La disminución de UFC respecto al control de la ppCOP depositada en tres sustratos diferentes (tela, portavidrio y portavidrio triturado) puede atribuirse a las diferentes áreas de contacto efectivas en los tres sustratos, siendo mayor en el portavidrio triturado, seguido del portavidrio y menor en la tela. Es importante mencionar que estas bacterias miden aproximadamente 0.5 µm de ancho por 2 µm de largo en el caso de *E. coli* y 1.5 µm de diámetro en el caso de *S. aureus*, que se considera inmóvil. Las dimensiones de las bacterias utilizadas limitan el área de contacto efectiva a dimensiones superiores a aproximadamente 4 µm² de superficie, lo que representa una dificultad para establecer un contacto efectivo de las bacterias con el ppCOP depositado en la tela, ya que este tipo de sustrato se caracteriza por tener una morfología con irregularidades de dimensiones menores al tamaño de las bacterias. Este hecho, junto con la incapacidad de las bacterias para migrar a estas irregularidades en la matriz debido a su escasa o nula movilidad (en el caso de *S. aureus*), dificulta el contacto efectivo de las bacterias con el ppCOP, lo que reduce la actividad antimicrobiana.

### Conclusiones.

Se realizó una copolimerización por plasma frío de R-carvone y octadieno para obtener un

polímero. La considerable reducción de la flexión  $\text{=CH}$  ( $990.28$  y  $908.80\text{ cm}^{-1}$ ) y los enlaces de estiramiento ( $3079.33\text{ cm}^{-1}$ ) del octadieno pueden sugerir la inserción de hidrocarburos de cadena larga, como  $\text{-C}_8\text{H}_{16}$ , lo que podría conferir flexibilidad al polímero y aumentar su rugosidad superficial. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para confirmar esto. La actividad antimicrobiana del  $\text{pp}_{\text{cop}}$  fue corroborada con resultados favorables observados en tres sustratos diferentes (portavidrio, portavidrio triturado y tela), siendo el sustrato de portavidrio triturado el que mostró mayor reducción de UFC, con una inhibición del  $48.69 \pm 0.08\%$  de *E. coli* y  $49.31 \pm 0.58\%$  de *S. aureus*. El resultado de GI más bajo fue en el sustrato de tela, con una inhibición del  $2.71 \pm 1.3\%$  de *E. coli* y  $5.76 \pm 2\%$  de *S. aureus*, destacando la influencia del área de contacto efectiva de cada sustrato en la actividad microbiana.

#### Agradecimientos.

Los autores desean agradecer la siguiente beca para este trabajo: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), beca postdoctoral 2020 (beca 6012) y al proyecto interno del Centro en Investigación en Química Aplicada (6749). También desean agradecer a M. García Zamora, María de Lourdes Guillén Cisneros, M. G. Mendez-Padilla por su apoyo técnico en algunas de las técnicas analíticas. Además, agradecen a L. López y O. Pérez Camacho (del Centro de Investigación en Química Aplicada) por sus comentarios en esta investigación.

#### Referencias.

- (1) De Carvalho, C. C. C. R.; Da Fonseca, M. M. R. Preventing Biofilm Formation: Promoting Cell Separation with Terpenes. *FEMS Microbiol Ecol* 2007, 61 (3), 406–413. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00352.x>.
- (2) Fux, C. A.; Costerton, J. W.; Stewart, P. S.; Stoodley, P. Survival Strategies of Infectious Biofilms. *Trends Microbiol* 2005, 13 (1), 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.010>.
- (3) Bahrami, A.; Delshadi, R.; Jafari, S. M. Active Delivery of Antimicrobial Nanoparticles into Microbial Cells through Surface Functionalization Strategies. *Trends Food Sci Technol* 2020, 99, 217–228. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.008>.
- (4) Donlan, R. Biofilms and Device-Associated Infections. *Emerg Infect Dis* 2001, 7 (2), 277–281. <https://doi.org/10.3201/eid0702.010226>.
- (5) Sunil, B. R.; Kranthi Kiran, A. S.; Ramakrishna, S. Surface Functionalized Titanium with Enhanced Bioactivity and Antimicrobial Properties through Surface Engineering Strategies for Bone Implant Applications. *Curr Opin Biomed Eng* 2022, 23, 100398. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2022.100398>.
- (6) Bouzaheur, A.; Bouchoucha, A.; Si Larbi, K.; Zaater, S. Experimental and DFT Studies of a Novel Schiff Base Sulfonamide Derivative Ligand and Its Palladium (II) and Platinum (IV) Complexes: Antimicrobial Activity, Cytotoxicity, and Molecular Docking Study. *J Mol Struct* 2022, 1261, 132811. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.132811>.
- (7) Xu, Q.; He, P.; Wang, J.; Chen, H.; Lv, F.; Liu, L.; Wang, S.; Yoon, J. Antimicrobial Activity of a Conjugated Polymer with Cationic Backbone. *Dyes and Pigments* 2019, 160, 519–523. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.08.049>.
- (8) Aslam, M.; Abdullah, A. Z.; Rafatullah, M. Recent Development in the Green Synthesis of Titanium Dioxide Nanoparticles Using Plant-Based Biomolecules for Environmental and Antimicrobial Applications. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2021, 98, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.04.010>.
- (9) Hasan, J.; Crawford, R. J.; Ivanova, E. P. Antibacterial Surfaces: The Quest for a New Generation of Biomaterials. *Trends Biotechnol* 2013, 31 (5), 295–304.

- <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.01.017>
- (10) Kwok, C. S.; Horbett, T. A.; Ratner, B. D. Design of Infection-Resistant Antibiotic-Releasing Polymers. *Journal of Controlled Release* 1999, 62 (3), 301–311.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00105-4](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00105-4).
- (11) Pegalajar-Jurado, A.; Easton, C. D.; Styan, K. E.; McArthur, S. L. Antibacterial Activity Studies of Plasma Polymerised Cineole Films. *J. Mater. Chem. B* 2014, 2 (31), 4993–5002.  
<https://doi.org/10.1039/C4TB00633J>.
- (12) Chu, P. Plasma-Surface Modification of Biomaterials. *Materials Science and Engineering: R: Reports* 2002, 36 (5–6), 143–206.  
[https://doi.org/10.1016/S0927-796X\(02\)00004-9](https://doi.org/10.1016/S0927-796X(02)00004-9).
- (13) Chan, Y. W.; Siow, K. S.; Ng, P. Y.; Gires, U.; Yeop Majlis, B. Plasma Polymerized Carvone as an Antibacterial and Biocompatible Coating. *Materials Science and Engineering: C* 2016, 68, 861–871.  
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.040>.
- (14) DECARVALHO, C.; DAFONSECA, M. Carvone: Why and How Should One Bother to Produce This Terpene. *Food Chem* 2006, 95 (3), 413–422.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.003>.
- (15) Castiglione, K.; Fu, Y.; Polte, I.; Leupold, S.; Meo, A.; Weuster-Botz, D. Asymmetric Whole-Cell Bioreduction of (R)-Carvone by Recombinant Escherichia Coli with in Situ Substrate Supply and Product Removal. *Biochem Eng J* 2017, 117, 102–111.  
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.10.002>.
- (16) Nambafu, G. S.; Kim, N.; Kim, J. Hydrophobic Coatings Prepared Using Various Dipodal Silane-Functionalized Polymer Precursors. *Applied Surface Science Advances* 2022, 7, 100207.  
<https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2021.100207>.
- (17) Ong, Y.-L.; Razatos, A.; Georgiou, G.; Sharma, M. M. Adhesion Forces between E. Coli Bacteria and Biomaterial Surfaces. *Langmuir* 1999, 15 (8), 2719–2725.  
<https://doi.org/10.1021/la981104e>.