



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

Título
Recubrimientos anti-biofilm aplicados mediante plasma-polimerización destinados a la industria de manipulación de alimentos y al sector médico
Autor/es
Ignacio Muro Fraguas
Director/es
Fernando Alba Elías, Ana González Marcos y Rodolfo Múgica Vidal
Facultad
Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial
Titulación
Departamento
Ingeniería Mecánica
Curso Académico

Tesis presentada como compendio de publicaciones. La edición en abierto de la misma NO incluye las partes afectadas por cesión de derechos



Recubrimientos anti-biofilm aplicados mediante plasma-polimerización destinados a la industria de manipulación de alimentos y al sector médico, tesis doctoral de Ignacio Muro Fraguas, dirigida por Fernando Alba Elías, Ana González Marcos y Rodolfo Múgica Vidal (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.

Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

- © El autor
- © Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones, 2022
publicaciones.unirioja.es
E-mail: publicaciones@unirioja.es

UNIVERSITY OF LA RIOJA

Doctoral Thesis 2022

Anti-biofilm coatings applied by plasma-polymerization for the food processing and medical industry

Ignacio Muro Fraguas

Doctoral Dissertation guided by

Dr. Fernando Alba Elías

Dra. Ana González Marcos

Dr. Rodolfo Múgica Vidal



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**

Logroño, May 2022

ACKNOWLEDGEMENTS

En primer lugar, me gustaría expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis, Fernando Alba Elías, Ana González Marcos y Rodolfo Múgica Vidal, quienes con su conocimiento, paciencia y dedicación me ayudaron a lo largo de esta etapa. Gracias por la confianza ofrecida desde el primer día.

Asimismo, agradecer al resto de mis compañeras del grupo de investigación, Elisa Sainz García y Ana Sainz García, el buen ambiente creado en el laboratorio.

Por último y no por ello menos importante, gracias a mis familiares y amigos por su apoyo incondicional, educación y cariño durante toda mi vida, y en especial a mis padres, pues convivir con un doctorando no es tarea sencilla.

Todos habéis contribuido en que esta tesis salga adelante.

Ignacio Muro.

ABSTRACT

Bacterial biofilms formation in food processing industries and medical applications is a matter of concern due to its ability to adhere and reproduce in different environments, materials and surfaces. Pathogenic microorganisms can easily attach to a surface, develop biofilms, survive at refrigeration temperatures or desiccation conditions and resist to disinfectants; which makes them very hard to eradicate. All these problems related to biofilms formation cause cross contamination of products, waste and food spoilage, damages of industrial equipment, economic losses for producers and health risks for consumers. Conventional methods for disinfection, in addition to employ high concentrations of toxic chemicals, are frequently inefficient because they do not achieve a complete eradication of biofilms, increasing the problems with the possible generation of bacterial resistance. Therefore, researches and companies are making great efforts to remove biofilms from production environments. Atmospheric pressure plasma technology with a Dielectric Barrier Discharge (DBD) was used in this thesis to generate anti-biofilm coatings.

In the first group of two scientific publications, the objective was to reduce bacterial biofilms formation. Plasma-polymerized coatings based on acrylic acid (AcAc) and tetraethyl orthosilicate (TEOS) were applied on 3D printed polylactic acid (PLA) samples. The high speed development of 3D printing technology for food contact (ergonomic cutely for disabled people) and medical applications (implants, prosthesis and protection devices), make interesting the use of 3D printed PLA as a substrate. However, the use of PLA and 3D printing technology are being limited due to the ease of bacterial proliferation due to its surface roughness and the impossibility of subjecting to sterilization process because of the low fusion temperature of PLA. The influence of the precursor liquid and number of passes were characterized by Atomic Force Microscopy (AFM), Scanning Electron Microscopy (SEM), X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) measurements and biofilm quantification. The mechanism of adhesion and bacterial proliferation were identified. The biofilm formation is caused by a combined effect of the chemical and morphological surface properties. Generally, the more hydrophilic and roughness surfaces, the better the anti-biofilm capacity of the coatings. It was concluded that AcAc coatings are more effective than TEOS coatings. However, no specific number of passes could be defined as the best, since it depends on the shape and size of the bacteria. AcAc plasma-polymerized coatings reduced biofilm formation more than 50% against *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, regarding the untreated 3D printed PLA samples.

In real industrial environments, multiple bacterial strains coexist, and the coated surfaces require periodical sanitization to prevent long-term bacterial accumulation and cross-contamination of food products. For that, in the third publication, with the purpose of taking one more step towards the industrial scaling, the aims were to analyze the anti-biofilm character of a plasma-polymerized coating based on (3-Aminopropyl) triethoxysilane (APTES) and AcAc exposed to a multi-strain cocktail of *Listeria monocytogenes* (one of the most difficult bacteria to control and eliminate); as well as its durability after repeated 5 cycles of sanitization with commonly used disinfectants, such as sodium hypochlorite and peracetic acid, was also assessed. The coatings were applied on stainless steel (SS) samples (material most commonly used in food industry). Coated samples achieved to reduce the biofilm production more than 85% and remained at levels of 72% after sanitization cycles with sodium hypochlorite. The anti-biofilm effectiveness after sanitization with sodium hypochlorite was due to the high pH of this solution, which caused a deprotonation of the carboxylic acid groups of the functional coating. This fact conferred it a strong hydrophilicity and negatively charged its surface, which was favorable for preventing bacterial attachment and biofilm formation. However, this anti-biofilm capacity lost effectivity when peracetic acid was employed as disinfection solution.

It is considered that the proposed objectives have been successfully fulfilled. The coatings applied in this thesis not only reduce the biofilm generated by different bacteria present in food and clinical field, but they are also durable against disinfecting processes with alkaline sanitizers. Therefore, this demonstrates the promising applications of atmospheric pressure plasma technology in food processing and medical industries and it could be an innovative alternative to the current industrial solutions.

RESUMEN

La formación de biofilm en las industrias de manipulación de alimentos y en aplicaciones médicas es un motivo de preocupación debido a la capacidad de las bacterias para adherirse y reproducirse en diferentes entornos, materiales y superficies. Los microorganismos patógenos son muy difíciles de erradicar, puesto que pueden adherirse fácilmente a una superficie, desarrollar biofilm, sobrevivir a temperaturas extremas de refrigeración o condiciones de desecación y resistir a los desinfectantes. Todos estos problemas relacionados con la formación de biofilms provocan contaminación cruzada de productos, desechos y deterioro de alimentos, riesgos para la salud de los consumidores, daños en los equipos industriales y grandes pérdidas económicas para los productores. El inconveniente de los métodos convencionales de desinfección es que, además de emplear altas concentraciones de productos químicos tóxicos, son frecuentemente ineficientes ya que no logran la erradicación completa de los biofilms, aumentando así los problemas asociados con la posible generación de resistencia bacteriana. Por lo tanto, los investigadores y las empresas están realizando grandes esfuerzos para tratar de eliminar los biofilms de los entornos de producción. En esta tesis se ha empleado la tecnología de plasma a presión atmosférica con Descarga de Barrera Dieléctrica (*Dielectric Barrier Discharge*, DBD) para generar recubrimientos anti-biofilm.

En las dos primeras publicaciones científicas, el principal objetivo era la reducción del biofilm generado. Para ello, se aplicaron recubrimientos plasma-polimerizados a base de ácido acrílico (*Acrylic acid*, AcAc) y tetraetilo ortosilicato (*Tetraethyl orthosilicate*, TEOS) sobre muestras de ácido poli láctico (*Poly-lactic acid*, PLA) impresas en 3D. El rápido desarrollo de la tecnología de impresión 3D, y específicamente de los filamentos de PLA, para aplicaciones médicas (implantes, prótesis y dispositivos de protección) y en contacto con alimentos (utensilios de cocina con un diseño ergonómico para personas con problemas de movilidad), hace muy interesante el uso del PLA impreso en 3D como sustrato en esta tesis. Sin embargo, el empleo del PLA y de la tecnología de impresión 3D se están viendo limitados debido a la facilidad de proliferación bacteriana y la imposibilidad de someter las piezas impresas a un proceso de esterilización; provocados por la característica rugosidad superficial de las piezas impresas en 3D y la baja temperatura de fusión del PLA, respectivamente. La influencia del líquido precursor y el número de pasadas se caracterizaron mediante ensayos de microscopía de fuerza atómica (*Atomic Force Microscopy*, AFM), microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscopy*, SEM), espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*, XPS) y ensayos microbiológicos de cuantificación de biofilm. Se identificaron los mecanismos de adhesión y proliferación bacteriana. La formación de biofilm se debe a un efecto combinado de las propiedades químicas y morfológicas de la superficie del sustrato. En general, conforme mayor es la rugosidad y la hidrofiliidad de la superficie, mayor será la capacidad anti-biofilm de los recubrimientos generados. Se puede concluir que los recubrimientos basados en AcAc resultaron más efectivos que los de TEOS. Sin embargo, no se puede establecer un número de pasadas específico como el mejor, puesto que la capacidad anti-biofilm de los recubrimientos se ve influenciada por la forma y el tamaño de las bacterias que conforman el biofilm. Los recubrimientos de AcAc plasma-polimerizados más exitosos, redujeron la formación de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en más de un 50%, con respecto a las muestras de PLA sin tratar con plasma.

En los entornos industriales, coexisten múltiples cepas bacterianas y las superficies recubiertas requieren una higienización periódica para evitar la acumulación de bacterias a largo plazo y la contaminación cruzada de los productos alimenticios. Por ello, con el fin de dar un paso más hacia el escalado industrial, los objetivos fijados en la tercera publicación se basaron en analizar la magnitud y durabilidad de las propiedades anti-biofilm de un recubrimiento plasma-polimerizado expuesto a un cóctel de múltiples cepas de *Listeria monocytogenes* (una de las bacterias más difíciles de controlar y eliminar). La durabilidad del recubrimiento bicapa, a base de aminopropiltriethoxysilano (*Aminopropyltriethoxysilane*, APTES) y AcAc, se evaluó sometiendo las muestras recubiertas a 5 ciclos de limpieza con desinfectantes de uso común, como el hipoclorito de sodio y el ácido peracético. Los recubrimientos se aplicaron sobre muestras de acero inoxidable (material predominante en las líneas de producción alimentaria). Las muestras recubiertas lograron reducir la producción de biofilm en más del 85% y se mantuvieron en niveles del 72% después de aplicar los ciclos de limpieza con hipoclorito de sodio. La efectividad anti-biofilm después de la higienización con hipoclorito de sodio se debió al alto pH de dicha solución, que provocó una desprotonación de los grupos ácido carboxílico del recubrimiento funcional. Ello dotó a la superficie de una fuerte hidrofiliidad con carga negativa, favorable para prevenir la adhesión bacteriana y la formación

de biofilm. Sin embargo, la capacidad anti-biofilm perdió efectividad cuando se empleó ácido peracético como solución desinfectante.

Se considera que se ha cumplido con los objetivos propuestos. Los recubrimientos aplicados en esta tesis no solo reducen el biofilm generado por diferentes bacterias presentes en instalaciones de manipulación de alimentos y en el ámbito clínico, sino que además son duraderos frente a procesos de limpieza con desinfectantes alcalinos. De modo que la tecnología de plasma a presión atmosférica se puede convertir en una alternativa innovadora a las soluciones actuales para aplicaciones de desinfección en la industria médica y alimentaria.

ABBREVIATIONS

ABS	Acrylonitrile Butadiene Styrene
AcAc	Acrylic Acid
AFM	Atomic Force Microscopy
APPJ	Atmospheric Pressure Plasma Jet
APTES	Aminopropyltriethoxysilane
BHI	Brain Heart Infusion
CV	Crystal Violet
DBD	Dielectric Barrier Discharge
EDX	Energy Dispersive X-ray
EPS	Extracellular Polymeric Substance
EtO	Ethylene Oxide
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
FTIR-ATR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflectance
MH	Mueller Hinton
PBS	Phosphate Buffer Saline
PEGMA	Polyethylene glycol methyl ether methacrylate
PE	Polyethylene
PLA	Polylactic Acid
PP	Polypropylene
pp	Plasma Polymerization
PS	Polystyrene
PZC	Point of Zero Charge
Ra	Roughness average
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
SEM	Scanning Electron Microscopy
SS	Stainless Steel
Sdr	Developed Interfacial Area Ratio
TEOS	Tetraethyl Orthosilicate
WCA	Water Contact Angle
WHO	World Health Organization
XPS	X-ray Photoelectron Spectroscopy

CONTENTS

ACKNOWLEDGEMENTS	III
ABSTRACT	V
RESUMEN	VII
ABBREVIATIONS	IX
CHAPTER 1. INTRODUCTION	1
1.1. Background.....	1
1.1.1. Plasma technology.....	1
1.1.2. Disinfection activities in the medical and food processing field.....	2
1.1.3. 3D Printing.....	4
1.2. Motivation and Objectives.....	5
1.3. Thesis Contributions.....	5
1.3.1. Scientific Publications.....	6
1.3.2. Topic of the thesis.....	8
1.4. Structure of the document.....	9
CHAPTER 2. EXPERIMENTAL	11
2.1. Materials.....	11
2.1.1. Substrates.....	11
2.1.2. Selection of liquid precursors.....	12
2.2. Plasma-polymerization process.....	13
2.3. Sample Characterization Techniques.....	14
2.3.1. Scanning Electron Microscopy (SEM).....	15
2.3.2. Atomic Force Microscopy (AFM).....	16
2.3.3. X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS).....	17
2.3.4. Fourier Transform Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflectance (FTIR-ATR).....	18
2.3.5. Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDX).....	19
2.3.6. Water Contact Angle (WCA) Measurement.....	20
2.3.7. Biofilm formation quantification by Crystal Violet (CV) staining.....	21
2.3.8. Evaluation of the anti-biofilm coatings durability.....	23
CHAPTER 3. RESULTS AND DISCUSSION	25
3.1. Application of anti-biofilm plasma-polymerized coatings.....	25
3.2. Durability evaluation of the anti-biofilm capacity of the plasma-polymerized coatings.....	30
CHAPTER 4. CONCLUSIONS AND FUTURE RESEARCH	37
4.1. Conclusions.....	37
4.2. Future research.....	38
4.2.1. Toxicity evaluation of the anti-biofilm coatings developed.....	38
4.2.2. Improvement of the anti-biofilm character of the coatings.....	39
4.2.3. Evaluation of the anti-biofilm character of the coatings against other bacteria.....	39
4.2.4. Evaluation of the anti-biofilm character of the coatings over other substrates.....	39
REFERENCES	41

LIST OF FIGURES

Fig. 1.1. Schematic illustration of source configuration for: [a] Corona discharge, [b] Dielectric barrier discharge (DBD) and [c] Atmospheric pressure plasma jet (APPJ).....	2
Fig. 1.2. Phases of biofilm formation: [a] Bacterial adhesion, [b] Proliferation and biofilm maturation and [c] Biofilm dispersal [14]	3
Fig. 1.3. Applications of 3D printing technology in the food processing industry and medical field	4
Fig. 1.4. Graphical abstract of I. Muro-Fraguas et al. [41].....	6
Fig. 1.5. Graphical abstract of I. Muro-Fraguas et al. [45].....	7
Fig. 1.6. Graphical abstract of I. Muro-Fraguas et al. [49].....	8
Fig. 2.1. Manufacturing process of: [a] 3D-printed PLA and [b] Stainless steel (SS) Petri dishes used as substrates on which to apply the plasma-polymerized coatings.....	11
Fig. 2.2. Precursor molecules of: [a] AcAc, [b] TEOS and [c] APTES.....	13
Fig. 2.3. APPJ system: [a] Plasma gun and [b] Schematic diagram of the PlasmaSpot500 equipment	13
Fig. 2.4. SEM characterization: [a] Hitachi S-2.400 equipment, [b] Working principle of SEM assays and [c,d] SEM images of non-coated and plasma polymerized SS sample after 5 disinfection cycles with NaOCl (0,05%) [49]	16
Fig. 2.5. AFM characterization: [a] AFM Multimode Bruker Nanoscope V equipment, [b] Working principle of AFM assays, [c] AFM image of AcAc pp sample [41] and [d] Cross section of AcAc pp sample [41].....	17
Fig. 2.6. XPS characterization: [a] XPS Kratos AXIS Supra equipment, [b] Working principle of XPS essays, [c] Wide spectra of non-coated and AcAc pp samples [41] and [d,e] C1s signal deconvolutions of non-coated and AcAc pp samples, respectively [41]	18
Fig. 2.7. FTIR-ATM characterization: [a] Spectrum Two FT-IR spectrometer, [b] FTIR spectra of the coating non-sanitized and after sanitization cycles [49] and [c] Working principle of FTIR-ATR analysis.	19
Fig. 2.8. EDX maps (x2.000) of [a] Sodium, [b] Chlorine and [c] Overlapped with the SEM image of the non-coated SS samples [49].....	20
Fig. 2.9. WCA measurement: [a] WCA equipment with a close view of the image obtained and [b] Evolution of the WCA of coated and non-coated SS samples along successive sanitization cycles [49]	20
Fig. 2.10. Biofilm quantification method: [a] Biofilm formation [b] Samples stained by crystal violet, [c] Samples after CV excess removed, [d] Absorbance measures by POLARstar Omega plate reader generated on coated 3D printed PLA samples [45].....	23
Fig. 2.11. Durability characterization: [a] Plasma-polymerization coatings, [b] SEM Images and Biofilm quantification before the sanitization process, [c] Sanitization process and [d] SEM Images and Biofilm quantification after the sanitization process [49].....	24
Fig. 3.1. Relative biofilm production generated on coated 3D printed PLA samples by <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Listeria monocytogenes</i> [41]	26
Fig. 3.2. XPS characterization: [a] Atomic percentage of C1s and O1s and [b] Relative percentages of groups found in the C1s signal of non-coated and coated samples [41]	26
Fig. 3.3. Morphology characterization: [a] Scanning electron microscopy (SEM) images (x2.000), [b] Atomic force microscopy (AFM) images (40x40 μ m) and [c] Profiles (d=distance between peaks, μ m) of non-coated and AcAc coated PLA samples [41].....	27
Fig. 3.4. Relative biofilm production generated on coated 3D printed PLA samples by <i>P. aeruginosa</i> and <i>S. aureus</i> strains [45].....	28
Fig. 3.5. Average roughness (Ra, nm) and developed interfacial area ratio (Sdr, %) of non-coated and AcAc plasma-polymerized samples [45]	29
Fig. 3.6. Scheme of [1] round and [2] bacillus-shape bacteria adhesion according to the physicochemical properties of [a] Non-coated and [b-d] AcAc coated samples [41,45].....	30
Fig. 3.7. Relative biofilm production of the three-strain <i>L. monocytogenes</i> cocktail on non-coated and coated samples under the two different sanitization scenarios [49].....	31

Fig. 3.8. [1] SEM images (x2.000) and [2] AFM images (40x40 μ m) of the [a-c] non-coated and [d-f] coated samples before and after the sanitization cycles [49].....	32
Fig. 3.9. Relative percentages of surface chemical groups in the C1s XPS region of the analyzed samples [49]..	33
Fig. 3.10. FTIR-ATR spectra and close view of the region related with the presence of COOH groups and COO- anions, of the coated sample (AP10+AA) before and after the sanitization processes [49].....	34
Fig. 3.11. Evolution of the WCA of the non-coated and coated samples subjected to five sanitization cycles with peracetic acid and sodium hypochlorite [49].....	35
Fig. 4.1. Future substrates: [a] AISI316 Exchanger plate and [b] Polymeric cheese making mold.....	40

LIST OF TABLES

Table 1. Plasma-polymerization process parameters.....	14
Table 2. Characterization assays carried out in each of the scientific publications	15
Table 3. Bacterial strains used to perform the biofilm analysis for each study	21
Table 4. Sample identification, number of passes and precursor used [41].....	25
Table 5. Sample identification and number of passes applied [45]	28
Table 6. Sample identification and number of passes applied for each precursor [49]	30
Table 7. Elemental composition of the analyzed surfaces [49].....	33

Chapter 1. INTRODUCTION

1.1. Background

1.1.1. Plasma technology

El plasma es un término acuñado por primera vez en 1928 por el físico y novel en Química Irving Langmuir. Definido como el cuarto estado de agregación de la materia (tras sólido, líquido y gaseoso), el plasma es un gas parcialmente ionizado compuesto por partículas cargadas (iones positivos y negativos), moléculas excitadas, radicales libres, átomos, partículas ultravioleta, etc. Este proceso de ionización se logra cuando se aplica una energía lo suficientemente elevada como para producir la disociación de sus moléculas. Es decir, que los electrones se desprendan de los átomos formando iones con carga positiva o negativa. La energía necesaria para pasar de un estado de la materia a otro y finalmente generar el plasma puede ser suministrada mediante calor, radiación láser o descargas electromagnéticas.

Ante la gran variedad de tipos de plasma que existen, establecer una clasificación no es una tarea sencilla. La densidad de electrones y la temperatura son los principales parámetros que se atienden a la hora de clasificar los tipos de plasma. La densidad de electrones hace referencia al grado de ionización del plasma. Mientras que, atendiendo a la temperatura alcanzada se diferencia entre *plasmas calientes o térmicos* y *plasmas fríos o no térmicos*. Los *plasmas térmicos* se caracterizan por un alto grado de ionización, en el que todas sus partículas se encuentran en equilibrio termodinámico. Para ello, las temperaturas alcanzadas son muy elevadas (20.000K). Por el contrario, en los *plasmas fríos* únicamente una pequeña fracción de sus átomos están ionizados. En este caso, no se produce un estado de equilibrio térmico ya que la temperatura de los electrones es mucho más elevada que la de las especies más pesadas como los iones. La temperatura final del plasma no supera los 100°C [1,2].

Los plasmas fríos se pueden aplicar sobre una gran variedad de materiales, tales como metales, polímeros, cerámica, textiles, papel, materiales orgánicos y biológicos, etc. sin provocar un deterioro térmico. Con la ventaja de que las propiedades internas de los substratos expuestos no se ven alteradas, ya que los procesos físico-químicos activados por las especies generadas sólo penetran hasta una profundidad de 10 micras. A su vez, los plasmas fríos pueden ser generados a *baja presión* o a *presión atmosférica*. Desde el punto de vista de implementación industrial, la tecnología de plasma frío a presión atmosférica es considerada más ventajosa que la de baja presión. La ausencia de cámaras de vacío reducen las limitaciones de espacio y costes económicos [3]. Por ello, el empleo de dicha tecnología se ha incrementado notablemente en la última década. Los principales sectores industriales en los que se aplican sistemas de plasma atmosférico frío son: medicina, procesado de alimentos, electrónica, automoción, óptica, mecánica de precisión, textiles, adhesivos, etc. [1,4,5].

Existen diversas fuentes para la generación de plasma atmosférico, entre las que destacan: descarga de barrera dieléctrica (*Dielectric Barrier Discharge*, DBD), chorro de plasma (*Atmospheric Pressure Plasma Jet*, APPJ) y descarga de corona [6].

- **Corona:** la región de plasma se genera entre dos electrodos metálicos desnudos (sin revestimiento dieléctrico), uno conectado a tierra (ánodo) y otro a alto voltaje (cátodo), y dispuestos de manera perpendicular. La falta de uniformidad del campo eléctrico generado limita la ionización a la zona local junto al electrodo de alto voltaje [3].
- **DBD:** consta de dos electrodos metálicos colocados en paralelo, con una distancia entre ambos de unos pocos milímetros y donde al menos uno de ellos está cubierto con material dieléctrico. Al limitar la corriente de descarga, el material dieléctrico solventa los problemas de estabilidad que se dan en los generadores de tipo corona. La descarga tiene lugar cuando el voltaje aplicado al gas, el cual fluye entre los electrodos, supera el voltaje de ruptura del mismo (producto de la presión del gas y la distancia entre electrodos). Los generadores DBD están limitados por la distancia entre el electrodo y el material a tratar [7].

- **APPJ**: el gas del plasma circula a través de dos electrodos coaxiales, separados por un material dieléctrico, generando un chorro de plasma que impacta perpendicularmente sobre la superficie del sustrato. Este sistema supera las limitaciones del tipo DBD al producir la descarga de plasma en un espacio abierto. A pesar del empleo de gases nobles, He y Ar principalmente, la interacción del chorro de plasma con la atmósfera circundante da lugar a la generación de especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) y nitrógeno (*Reactive Nitrogen Species*, RNS); clave en aplicaciones de inactivación bacteriana. Las especies del plasma generadas, transportadas a lo largo del tubo de descarga, interactúan directamente con la superficie a tratar [3].

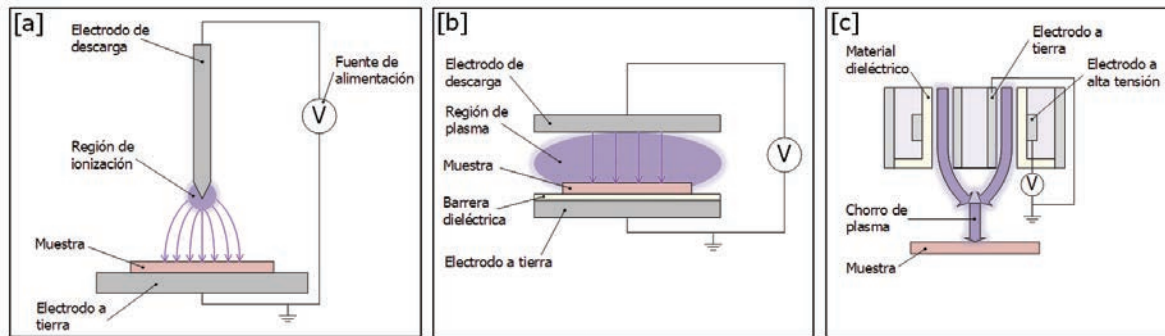


Fig. 1.1. Schematic illustration of source configuration for: [a] Corona discharge, [b] Dielectric barrier discharge (DBD) and [c] Atmospheric pressure plasma jet (APPJ)

Generalmente, se producen dos procesos de modificación cuando la superficie de un material se expone a tratamientos de plasma atmosférico frío: activación y plasma-polimerización. Tras unos pocos segundos de exposición, se puede lograr la activación con el objetivo de que el área tratada se vuelva más propensa a tratamientos posteriores. La colisión entre los electrones del plasma y el sustrato a tratar desencadena en la deposición de radicales libres sobre la superficie del material, transfiriendo energía a la misma y por consiguiente mejorando su capacidad adhesiva superficial [8]. La plasma-polimerización se basa en la aplicación de uno o varios monómeros líquidos para generar una película delgada sobre el sustrato. Las propiedades físico-químicas de la superficie generada dependen tanto del precursor líquido empleado como de los parámetros del proceso de plasma aplicados (potencia, tipo y flujo de gas, tiempo de exposición, etc.). La correcta selección de dichos parámetros es un aspecto clave para dotar a la superficie de las nuevas características deseadas sin influir negativamente en las propiedades intrínsecas del material [9].

En esta tesis se emplea la tecnología de chorro de plasma a presión atmosférica mediante el equipo PlasmaSpot500® (MPG, Luxemburgo) con el objetivo de generar recubrimientos anti-biofilm sobre materiales presentes en el ámbito médico y en líneas de procesamiento de alimentos. Como se ha mencionado anteriormente, el sistema APPJ no requiere de cámaras de vacío por lo que los costes de procesamiento son bajos y la introducción en las líneas de producción existentes es relativamente sencilla, es un proceso limpio y respetuoso con el medio ambiente que solo emplea reducidas cantidades de precursores químicos, es adecuado para tratar materiales sensibles al calor como el PLA puesto que la temperatura permanece próxima a la temperatura ambiente y es una tecnología versátil y flexible que permite modificar las propiedades físico-químicas de la superficie del sustrato gracias a la modificación de los parámetros del proceso [3,10].

1.1.2. Disinfection activities in the medical and food processing field

La desinfección microbiana hace referencia a los tratamientos físicos o químicos capaces de eliminar los microorganismos patógenos (bacterias, hongos, virus, protozoos y priones) presentes en una superficie. Generalmente, dichos microorganismos suelen estar presentes en forma de biofilm, lo que aumenta las capacidades de supervivencia gracias a la mejora en su grado de protección frente a biocidas, disponibilidad de nutrientes, aprovechamiento de agua y transferencia de material genético. Un biofilm es una colonia de microorganismos estructurados y altamente complejos adheridos a una superficie, los cuales crecen en el interior de una matriz polimérica extracelular (*Extracellular Polymeric Substance*, EPS) generada por ellos mismos. Los biofilms están compuestos mayoritariamente por agua (97%), células bacterianas, exopolisacáridos, proteínas, DNA, etc. [11].

El ciclo de vida de los biofilms consta de tres etapas (unión bacteriana, proliferación y maduración del biofilm y dispersión) que son una interacción entre las bacterias, el sustrato y el medio circundante [12–14]. En primer lugar, se forma una capa de acondicionamiento a partir de proteínas y moléculas de polisacáridos absorbidas por el sustrato sobre la que comienza a producirse una adhesión reversible entre las células en estado planctónico y la superficie del sustrato (Fig. 1.2[a]). Dicha interacción depende de las fuerzas de atracción/repulsión generadas por ambas superficies, rugosidad superficial, humectabilidad, pH, temperatura, etc. Posteriormente, tiene lugar la proliferación bacteriana. En esta fase los microorganismos se unen a la superficie de manera permanente gracias a la producción de EPS. El EPS es clave para la adhesión, reconocimiento entre células, formación de biofilms, retención de agua, protección bacteriana y captura de nutrientes [15]. La formación de EPS se regula mediante el llamado *quorum sensing*, mecanismo de señalización célula a célula. A lo largo de esta etapa, continúa el crecimiento de microorganismos y la producción de EPS, que contribuye a la estabilización de la comunidad frente a cualquier estrés ambiental (Fig. 1.2[b]). Finalmente, las modificaciones en el entorno, como el estrés antimicrobiano y la falta de nutrientes, provocan que las bacterias se despeguen de las microcolonias y se adhieran a nuevas zonas del sustrato (Fig. 1.2[c]).

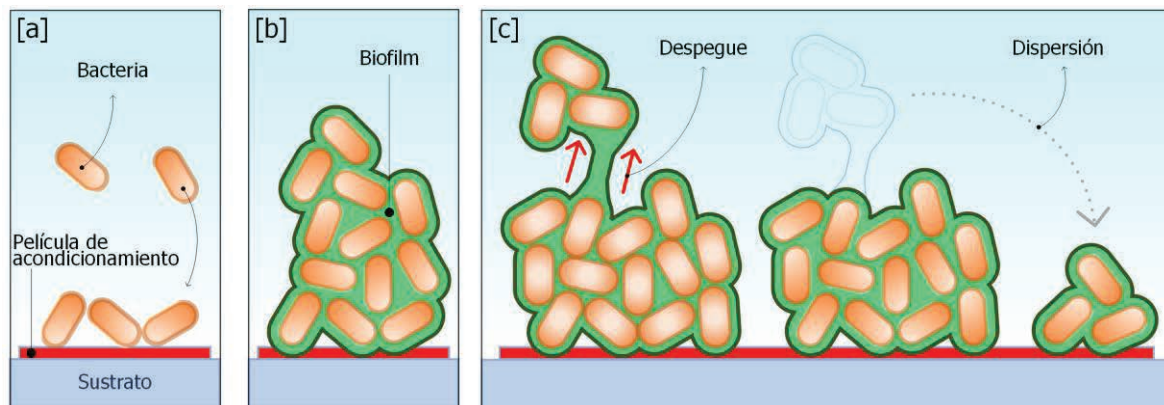


Fig. 1.2. Phases of biofilm formation: [a] Bacterial adhesion, [b] Proliferation and biofilm maturation and [c] Biofilm dispersal [14]

El control y eliminación de biofilms es muy importante en las industrias de manipulación de alimentos y en el sector médico debido a las consecuencias negativas que tiene sobre la salud pública.

Los residuos de alimentos presentes en las líneas de producción favorecen la formación de biofilms, constituyendo una continua fuente de contaminación cruzada entre equipos y alimentos [13,16]. Según estudios anteriores, los biofilms son el origen del 60% de las enfermedades transmitidas por los alimentos [17]. Además de los riesgos para la salud, los biofilms afectan a la calidad y consecuente rechazo de los alimentos. A su vez, la presencia de biofilms en los equipos de las líneas de producción disminuye su eficiencia al incrementar la corrosión del material y obstrucción de los mismos. Todo ello, se traduce en grandes pérdidas económicas [11,18]. Hasta día de hoy, la erradicación de biofilms se ha llevado a cabo mediante lavado y uso periódico de biocidas entre los que destacan: hipocloritos (ej.: hipoclorito de sodio (NaOCl)), agentes oxidantes (ej.: peróxido de hidrógeno (H_2O_2)), compuestos ácidos (ej.: ácido peracético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_3$)), alcoholes y el amonio cuaternario [19,20]. La facilidad de aplicación, bajo precio, disponibilidad y el amplio campo de acción, hacen que el NaOCl sea el agente antimicrobiano más empleado [21]. Sin embargo, en ocasiones dichos desinfectantes resultan ineficaces frente a biofilms maduros requiriendo mayores concentraciones y tiempos de exposición [14]. La supervivencia de los microorganismos por una desinfección insuficiente puede derivar en un aumento de la resistencia bacteriana frente los agentes biocidas [19]. Además, el empleo de elevadas concentraciones de productos químicos tóxicos implica riesgos para la salud humana y el medio ambiente [21].

En el ámbito clínico-sanitario, uno de los principales problemas son las infecciones nosocomiales o intrahospitalarias, aquellas contraídas durante la estancia en el centro hospitalario y que no son la causa de la enfermedad de ingreso del paciente. La contaminación bacteriana se genera sobre dispositivos médicos de diversa índole. Se han reportado casos de producción de biofilm sobre la superficie de catéteres, implantes, estetoscopios, válvulas cardíacas, marcapasos, lentes de contacto, etc. [22]. *P. aeruginosa* y *S. aureus* son dos de los patógenos oportunistas más importantes en el campo clínico. La contaminación del tejido humano derivado de la presencia

de biofilms en los instrumentos médicos es la causa principal de infecciones persistentes y enfermedades potencialmente mortales, como la fibrosis quística, la otitis o la periodontitis [23,24]. La esterilización es el procedimiento de referencia empleado para la eliminación de biofilms en el sector médico. La esterilización consiste en la destrucción completa de todos los microorganismos presentes en una determinada superficie. Los principales métodos de esterilización son por calor húmedo (autoclave) y mediante óxido de etileno (*Ethylene Oxide*, EtO) [25,26]. Sin embargo, existe cierta controversia con el empleo de dichos procedimientos debido a los inconvenientes y limitaciones que presentan. La esterilización por autoclave es incompatible con polímeros termosensibles debido a las altas temperaturas alcanzadas durante el proceso (120°C – 140°C). Los instrumentos metálicos cortantes también se ven afectados por el autoclave, ya que pueden sufrir corrosión y perder el afilado [26,27]. Estos inconvenientes se solventan empleando EtO. Sin embargo, el EtO es un gas inflamable y muy tóxico, cuyo proceso de esterilización deriva en un método muy costoso y con largos tiempos de procesamiento [25,26].

Por todo ello, la proliferación de biofilms constituye graves riesgos y es la principal preocupación en las líneas de producción y en el ámbito hospitalario. Actualmente, se están realizando grandes esfuerzos para definir protocolos y métodos eficaces de limpieza y descontaminación bacteriana [28]. Un enfoque interesante es prevenir la formación de biofilm evitando la adhesión bacteriana inicial gracias a la modificación de la morfología y de las propiedades fisicoquímicas de los materiales [14,29].

1.1.3. 3D Printing

La impresión 3D, también conocida como fabricación aditiva, consiste en la creación de un objeto tridimensional mediante la superposición del material capa a capa. El empleo de la tecnología de impresión 3D se ha ido desarrollando desde principios de los años 90, pero ha sido en la última década cuando ha experimentado un significativo incremento en aplicaciones médicas y de contacto con alimentos gracias a la disminución de precios, el desarrollo de impresoras 3D de escritorio y la mayor capacidad para fabricar estructuras geoméricamente complejas con gran precisión [30,31]. Concretamente, el PLA es el material más empleado [30,32]. Es un termoplástico biodegradable que se obtiene a partir del maíz y la caña de azúcar. La impresión de PLA es muy sencilla gracias a su bajo coeficiente de expansión térmica; obteniéndose piezas con gran precisión y calidad superficial. Además, a diferencia de los materiales derivados de combustibles fósiles (como el acrilonitrilo butadieno estireno – *Acrylonitrile Butadiene Styrene*, ABS), genera bajos niveles de toxicidad.

Las aplicaciones de la impresión 3D en contacto con alimentos están enfocadas en mejorar la calidad de vida de las personas que sufren dificultades de movilidad manual, amputaciones, Parkinson, etc. Actualmente, se están generando utensilios de cocina y recipientes personalizados con mejoras ergonómicas adaptadas a cada individuo [33].

En el ámbito médico, los dispositivos impresos en 3D abarcan un amplio rango de aplicaciones, desde educación y planificación preoperatoria hasta su uso en quirófanos. Entre los instrumentos impresos en 3D empleados directamente en contacto con tejidos humanos destacan, implantes, prótesis, guías quirúrgicas de corte y posicionamiento y dispositivos de protección [34].



Fig. 1.3. Applications of 3D printing technology in the food processing industry and medical field

Sin embargo, existen dos limitaciones a tener en cuenta a la hora de emplear la tecnología aditiva en aplicaciones clínicas y alimentarias. La deposición capa a capa del material, inherente del proceso de impresión 3D da lugar a piezas rugosas, con surcos y agujeros; patrón que favorece la adhesión bacteriana y posterior generación de biofilms [33]. La segunda desventaja está relacionada con la limpieza de las mismas. El PLA comienza a deformarse y fundirse a temperaturas relativamente bajas (60°C), lo que imposibilita el empleo de sistemas de limpieza húmedos y de alta temperatura; como el lavavajillas o procesos de autoclave [28]. Este último, es requerido cuando los instrumentos impresos van a estar en contacto con tejidos humanos [35].

Hoy en día, se están comercializando herramientas impresas en 3D con recubrimientos para solventar los problemas de proliferación bacteriana. Diversos estudios declaran que la baja durabilidad de los mismos puede limitar su eficacia, ya que puede dar lugar a que la superficie original quede expuesta y se convierta en un potencial foco de contaminación [36].

1.2. Motivation and Objectives

La contaminación microbiológica asociada con la formación de biofilms está limitando el empleo de nuevos materiales y tecnologías para aplicaciones médicas y en contacto con alimentos. A su vez, las infecciones bacterianas derivadas de la contaminación cruzada en las industrias de procesado de alimentos suponen una gran preocupación debido a los riesgos para la salud de los consumidores y las pérdidas económicas para los productores que generan.

En esta tesis se investiga el uso de la tecnología APPJ con el fin de aplicar recubrimientos con capacidad anti-biofilm sobre materiales impresos en 3D y superficies de acero inoxidable. La tecnología APPJ es un método respetuoso con el medio ambiente, a bajo coste y con temperaturas máximas muy próximas a la temperatura ambiente, lo que permite el tratamiento de materiales polímeros termo sensibles impresos en 3D. En la literatura existente hasta la fecha no se han reportado estudios que apliquen recubrimientos plasma-polimerizados con capacidad anti-biofilm sobre muestras impresas en 3D. No es el caso del acero inoxidable, donde ya existen experiencias previas que emplean la tecnología APPJ como generador de películas antibacterianas. En este caso el estudio resulta interesante para tratar de incrementar la durabilidad de los recubrimientos y superar así las limitaciones de los métodos de desinfección comúnmente empleados en las líneas de manipulación de alimentos, donde el acero inoxidable es el material predominante. La tecnología de plasma produce modificaciones en las propiedades físico-químicas de la superficie, lo que limita la adhesión bacteriana. En contraposición con los procesos alternativos de desinfección mediante agentes biocidas que únicamente inactivan aquellas ya adheridas. Ello daría lugar a una menor frecuencia en la desinfección de cintas transportadoras, mesas, elevadores y demás equipos presentes en las líneas de manipulación de alimentos, y por consiguiente, reducciones en la cantidad de compuestos químicos tóxicos empleados. Además, su implementación en las actuales líneas de fabricación es muy sencilla.

La presente tesis engloba los resultados de tres trabajos de investigación desarrollados a lo largo de los tres últimos años y con ello se pretende la consecución de los siguientes objetivos:

- **Objetivo 1:** Identificación de los mecanismos de crecimiento, variables óptimas y valores de los diversos parámetros del proceso de plasma-polimerización que promuevan recubrimientos anti-biofilm aplicados sobre nuevos materiales avanzados empleados en la industria médica y de alimentos: PLA impreso en 3D y acero inoxidable.
- **Objetivo 2:** Evaluación de la durabilidad de los recubrimientos anti-biofilm aplicados mediante la tecnología de plasma atmosférico frío sobre superficies de acero inoxidable.

1.3. Thesis Contributions

A continuación, se desarrollan las tres publicaciones científicas realizadas para la consecución de los objetivos previamente mencionados.

1.3.1. Scientific Publications

- **Atmospheric pressure cold plasma anti-biofilm coatings for 3D printed food tools.** I. Muro-Fraguas, A. Sainz-García, P. Fernández-Gómez, M. López, R. Múgica-Vidal, E. Sainz-García, P. Toledano, Y. Sáenz, M. López, M. González-Raurich, M. Prieto, A. Álvarez-Ordoñez, A. González-Marcos y F. Alba-Elías. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 64 (2.020) 102404.

En este trabajo, se aplicaron recubrimientos con distinto número de pasadas empleando AcAc y TEOS con el fin de reducir la formación de biofilms en discos Petri de PLA impresos en 3D. Para el análisis microbiológico, se utilizaron cepas de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Escherichia coli* CECT515 y *Listeria monocytogenes* CECT911, principales especies capaces de generar biofilms en la industria alimentaria [16,37]. Los recubrimientos de AcAc fueron más efectivos que los recubrimientos de TEOS. El carácter anti-biofilm es un efecto conjunto de la naturaleza química, de la morfología de las superficies y del tamaño y forma de la bacteria. Por un lado, los ensayos de ángulo de contacto (WCA) mostraron que los recubrimientos de AcAc y TEOS aumentaron significativamente la hidrofiliidad de la superficie (en mayor grado en los recubrimientos basados en AcAc) debido a la incorporación de grupos polares de oxígeno (C-O y O-C=O). Los recubrimientos hidrófilos promueven la generación de una capa de hidratación, la cual provoca una fuerza repulsiva en la superficie del material, reduciendo así la adhesión bacteriana y la posterior formación de biofilm [38]. Por otro lado, los recubrimientos generaron un patrón rugoso en función del número de pasadas aplicadas, configuración que también limita el grado de adhesión bacteriana. Se sabe que cuando la distancia entre picos es 2-3 veces menor que el tamaño de la bacteria, la adhesión se reduce debido a un menor área de contacto entre la bacteria y el recubrimiento, ruptura y muerte celular [39,40]. El recubrimiento más exitoso fue aquel en el que únicamente se aplicó una pasada de AcAc. Dicho recubrimiento logró reducir los niveles de biofilm un 53.3% para *L. monocytogenes*, un 49,6% para *P. aeruginosa* y un 35,9% para *E. coli*, en comparación con las muestras no tratadas.

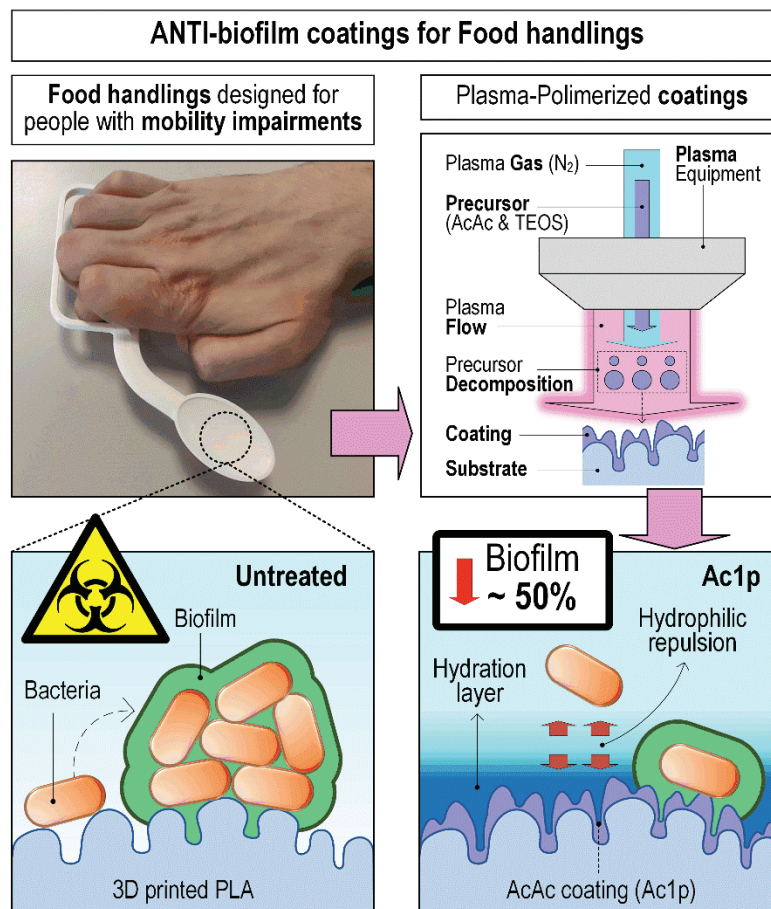


Fig. 1.1. Graphical abstract of I. Muro-Fraguas et al. [41]

- **Antibiofilm coatings through atmospheric pressure plasma for 3D printed surgical instruments.** I. Muro-Fraguas, A. Sainz-García, M. López, B. Rojo-Bezares, R. Múgica-Vidal, E. Sainz-García, P. Toledano, Y. Sáenz, A. González-Marcos y F. Alba-Elías. *Surface & Coatings Technology* 399 (2.020) 126163.

En este estudio, los recubrimientos más exitosos obtenidos en el trabajo anterior (AcAc) fueron plasma-polimerizados sobre placas Petri de PLA impresos en 3D. Se analizó la influencia del número de pasadas de los tratamientos con las nuevas bacterias ensayadas. En este caso, el foco fue puesto en el sector hospitalario. Por tanto, se analizaron seis cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* resistentes a múltiples fármacos, más las cepas de control: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y *Staphylococcus aureus* ATCC29213. Se trata de dos de los patógenos oportunistas más importantes en el ámbito clínico, capaces de causar una amplia gama de infecciones nosocomiales y problemas respiratorios [42,43]. Como ya fue reportado en el estudio anterior, los recubrimientos de AcAc proporcionaron una mayor cantidad de grupos carboxilo ($\text{O}-\text{C}=\text{O}$), incrementando así el grado de oxidación superficial y por consiguiente el carácter hidrófilo de la superficie; lo que provocó la generación de la capa de hidratación. La naturaleza química de la superficie plasma-polimerizada se mantuvo estable independientemente del número de pasadas aplicadas. Por lo que es necesario atender a la morfología superficial para explicar el comportamiento de generación de biofilm. Los recubrimientos aumentaron la rugosidad de la superficie y disminuyeron la distancia entre picos. Acorde con el modelo de Wenzel [44], las superficies hidrófilas magnifican su carácter a medida que aumenta su rugosidad, dificultando la adhesión bacteriana. Los resultados microbiológicos mostraron una influencia del tamaño y forma de las cepas bacterianas con la adhesión inicial. La forma de bacilo de las cepas de *P. aeruginosa* en comparación con la forma circular de las de *S. aureus*, favoreció la deformación y ruptura de la membrana celular. Los recubrimientos con menor número de pasadas fueron más efectivos y mostraron una reducción del biofilm del 50% en comparación con las placas de control.

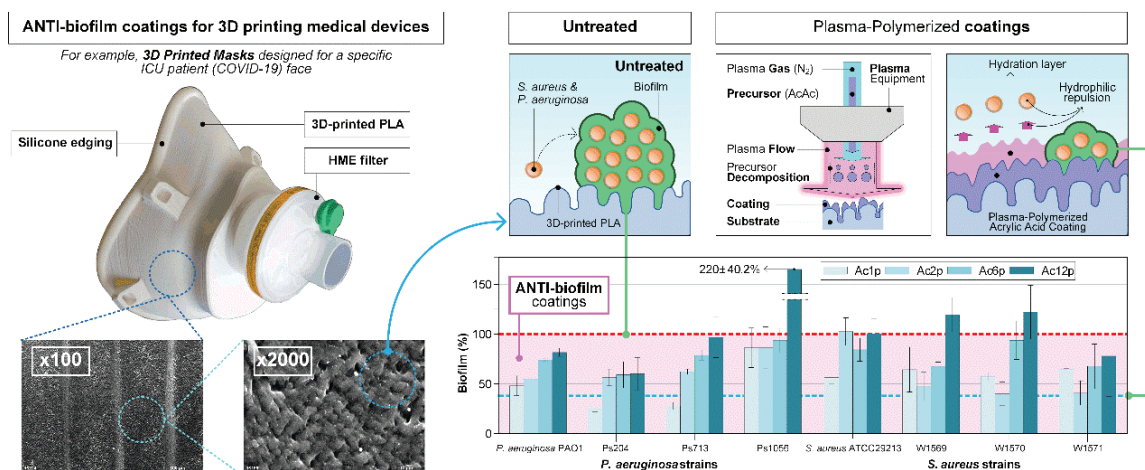


Fig. 1.2. Graphical abstract of I. Muro-Fraguas et al. [45]

- **Durability assessment of a plasma-polymerized coating with anti-biofilm activity against *L. monocytogenes* subjected to repeated sanitization.** I. Muro-Fraguas, P. Fernández-Gómez, R. Múgica-Vidal, A. Sainz-García, E. Sainz-García, M. Oliveira, M. González-Raurich, M. López, B. Rojo-Bezares, M. López y F. Alba-Elías. *Foods* 10 (2.021) 2849.

El objetivo se centró en analizar la durabilidad de un recubrimiento plasma-polimerizado a base de APTES y AcAc sobre placas de acero inoxidable AISI 316 después de 5 ciclos de limpieza con desinfectantes de uso común (NaOCl y $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_3$) [20], simulando las condiciones de trabajo de las plantas de procesamiento de alimentos. El acero inoxidable es el material de contacto con alimentos más empleado en la industria alimentaria gracias a su facilidad de limpieza, resistencia a la corrosión y durabilidad [46]. La capacidad anti-biofilm del recubrimiento depositado fue evaluada previamente en el estudio de P. Fernández-Gómez et al. [19], de autoría compartida. En dicha publicación, las muestras fueron infectadas de manera independiente con biofilms generados por *E. coli* CECT515 y *L. monocytogenes* CECT911 durante 24h. *Listeria* es un patógeno comúnmente identificado en el entorno y en equipos de procesamiento de alimentos, capaz de formar biofilms que provocan la contaminación en las distintas etapas de la cadena de fabricación, afectando negativamente a mujeres embarazadas, recién nacidos e

inmunodeprimidos [47,48]. En entornos industriales reales, coexisten múltiples cepas bacterianas. Por lo tanto, en este estudio, las superficies tratadas fueron contaminadas con un cóctel de tres cepas de *L. monocytogenes* a 12°C durante 6 días. Antes de los ciclos de limpieza, el biofilm generado sobre la superficie recubierta se redujo un 85,4% en comparación con las muestras sin tratar. Al igual que lo observado en los estudios anteriores, la efectividad anti-biofilm del tratamiento estuvo relacionada con la hidrofiliidad de la superficie, incrementada por la mayor proporción de grupos carboxilo. La durabilidad de los mismos varió en función del desinfectante empleado. Cuando se aplicó NaOCl las reducciones de biofilm alcanzaron valores del 72,1%, mientras que tras el empleo de $C_2H_4O_3$ la capacidad anti-biofilm disminuyó a reducciones del 17,7%. Los ensayos de caracterización química y morfológica mostraron disminuciones en el espesor de la película y en los grupos polares de oxígeno después de los procesos de limpieza, lo que sugirió un deterioro parcial del recubrimiento. La durabilidad del comportamiento anti-biofilm del recubrimiento se vio influenciada por el pH del desinfectante. El elevado pH de la solución de NaOCl en comparación con $C_2H_4O_3$, provocó un mayor grado de desprotonación de los grupos de ácido carboxílico. Ello favoreció la retención de una fuerte hidrofiliidad tras los cinco ciclos de limpieza. El grado de humectabilidad se mantuvo inferior a 20° con NaOCl mientras que, a partir del segundo ciclo de uso de ácido peracético los valores aumentaron hasta alcanzar 40°. De modo que, a pesar del deterioro previamente comentado, la carga electronegativa del recubrimiento causante de la repulsión electrostática de las bacterias se mantuvo.

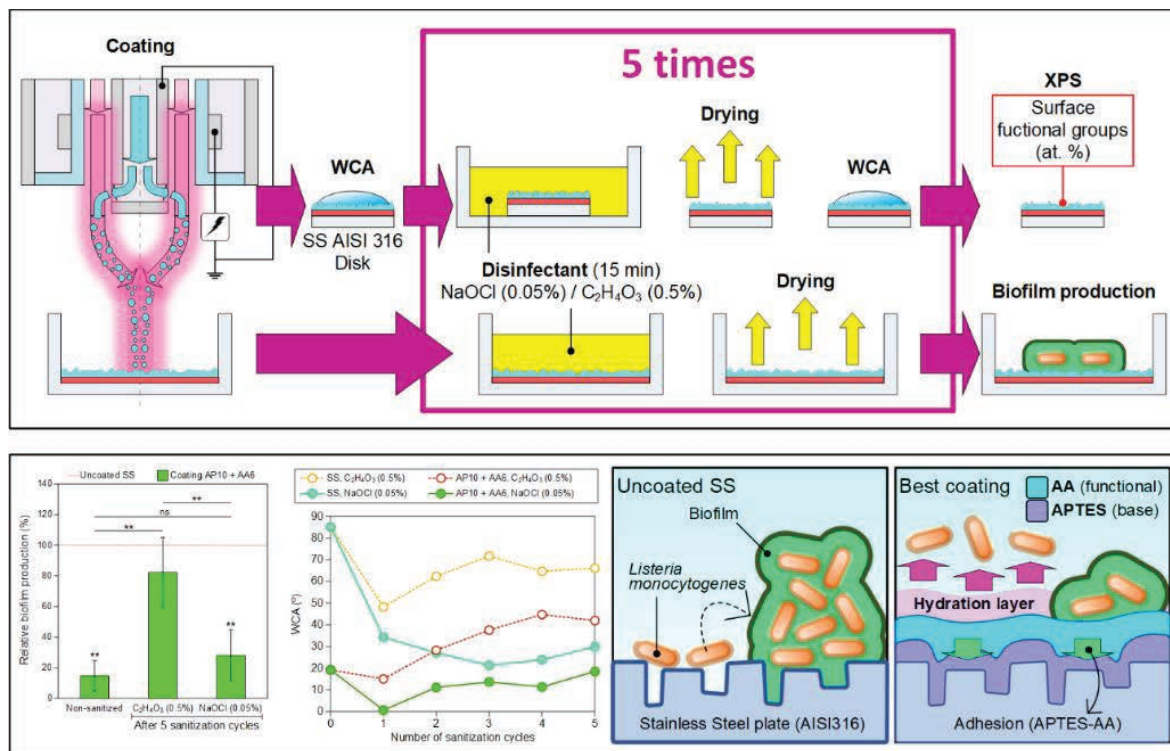


Fig. 1.3. Graphical abstract of I. Muro-Fraguas et al. [49]

1.3.2. Topic of the thesis

Las publicaciones presentadas en esta tesis se enmarcan en el empleo de la tecnología de plasma atmosférico frío para producir recubrimientos capaces de disminuir la adhesión bacteriana y posterior generación de biofilm, y con ello solucionar los problemas asociados a la impresión 3D y a la contaminación cruzada que tiene lugar en el sector médico y en la industria de procesamiento de alimentos.

- Los dos primeros trabajos comentados en la sección 1.3.1 se centran en la consecución del Objetivo 1. Se modificaron los parámetros del plasma para el desarrollo de películas anti-biofilm cuando las superficies fueron expuestas a bacterias presentes en plantas de manipulación de alimentos (*L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* y *E. coli*) y en el sector médico (cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* y *S. aureus*), respectivamente. Concretamente, se analizó el número de pasadas del tratamiento y el precursor líquido atomizado. Los resultados obtenidos permitieron identificar las modificaciones físico-químicas producidas

por los recubrimientos plasma-polimerizados, así como los mecanismos que rigen la etapa inicial de formación de biofilm (adhesión bacteriana).

- La tercera publicación está directamente relacionada con el Objetivo 2 de la presente tesis doctoral, centrado en la estabilidad y durabilidad de los recubrimientos plasma-polimerizados con capacidad anti-biofilm. El carácter anti-biofilm del recubrimiento estudiado, ya fue analizado en un trabajo anterior [19], de autoría compartida. A diferencia del trabajo anterior, en esta nueva publicación las muestras se exponen durante 12 días a un biofilm multibacteria de *L. monocytogenes*, para posteriormente, someterlas a cinco ciclos de limpieza con desinfectantes comunes de la industria de procesamiento de alimentos (hipoclorito de sodio y ácido peracético). Los resultados mostraron que el recubrimiento es compatible cuando se expone a desinfectantes con pH alcalino como el hipoclorito de sodio.

Estos hallazgos suponen un prometedor avance para la implementación industrial de los recubrimientos plasma-polimerizados a presión atmosférica con capacidad anti-biofilm.

1.4. Structure of the document

La presente tesis doctoral queda dividida en cuatro capítulos: Introducción, Experimentación, Resultados y Conclusiones.

En este primer capítulo (Introducción), se han definido los antecedentes, motivación y objetivos, así como las contribuciones aportadas en esta tesis.

En el segundo capítulo (Experimentación), se presentan los sustratos sobre los que se van a aplicar los recubrimientos, la justificación de la selección de los precursores líquidos empleados, así como el método de plasma-polimerización aplicado para la deposición de los recubrimientos. Finalmente se describen las técnicas de caracterización química, morfológica y funcional llevadas a cabo para conocer las propiedades de los sustratos antes y después de la exposición al plasma.

En el tercer capítulo (Resultados) se discuten los resultados obtenidos para la consecución de los objetivos previamente definidos.

Finalmente, el capítulo cuatro (Conclusiones y Futuras Investigaciones) recoge las principales modificaciones producidas, relaciones establecidas e ideas extraídas de los diferentes estudios realizados; así como posibles alternativas sobre futuras líneas de investigación.

Chapter 2. EXPERIMENTAL

2.1. Materials

2.1.1. Substrates

Los recubrimientos plasma-polimerizados fueron depositados sobre nuevos materiales avanzados cuyas aplicaciones en las industrias de procesamiento de alimentos y en el sector médico se encuentran en continuo crecimiento. Concretamente, el ácido poli-láctico (PLA) impreso en 3D y el acero inoxidable AISI 316 fueron los sustratos escogidos.

Como ha sido comentado en la sección 1.1.3, el PLA es el material más empleado en el mundo de la impresión 3D. Sus principales ventajas son la facilidad de impresión y la alta calidad de las piezas obtenidas. Se imprimieron placas de Petri de PLA con las siguientes dimensiones: diámetro interior de 31mm, diámetro exterior de 35mm y altura de 15mm; las cuales se cubrieron después de los tratamientos de plasma con tapas de poliestireno (*Polystyrene*, PS) esterilizadas de 35mm de diámetro suministradas por Thermo-Scientific (Estados Unidos) para evitar cualquier foco de contaminación ambiental durante el proceso experimental (Fig. 2.1[a]). El filamento seleccionado para la impresión de las placas fue PLA RS PRO Blanco de 1,75mm de diámetro suministrado por RS PRO (Reino Unido). La fabricación de las placas Petri se llevó a cabo con la impresora 3D “Original Prusa i3 MK3” (República Checa). Los parámetros de impresión fueron seleccionados atendiendo a las recomendaciones del fabricante [50]; temperatura del extrusor de 215°C, temperatura de la cama de impresión de 60°C, boquilla de 0,4mm de diámetro y un espesor de capa de 0,2mm con relleno al 80%.

Para el estudio centrado en la durabilidad de los recubrimientos destinados a entornos de manipulación de alimentos, los tratamientos de plasma fueron aplicados sobre placas de Petri de acero inoxidable AISI 316, con un diámetro interior de 35mm, espesor de 2mm y altura de 10mm (Fig. 2.1[b]). El material base es suministrado por Laser Ebro S.L (España), en forma de discos de Ø70mm x 1mm de espesor, mediante corte por láser. Posteriormente, la forma y dimensiones finales de las placas Petri son obtenidas mediante troquelado con un útil fabricado a tal efecto. Se emplea un torno paralelo de dos ejes semiautomático para la eliminación de la rebaba. Como previamente se ha descrito en la sección 1.1.3, la alta durabilidad, resistencia a la corrosión, facilidad de limpieza y su estado químicamente inerte; hacen que el acero inoxidable sea el material predominante en la industria alimentaria. Al igual que en los trabajos de PLA, las placas se cubren con tapas esterilizadas de PS hasta el momento de realización de los ensayos microbiológicos.

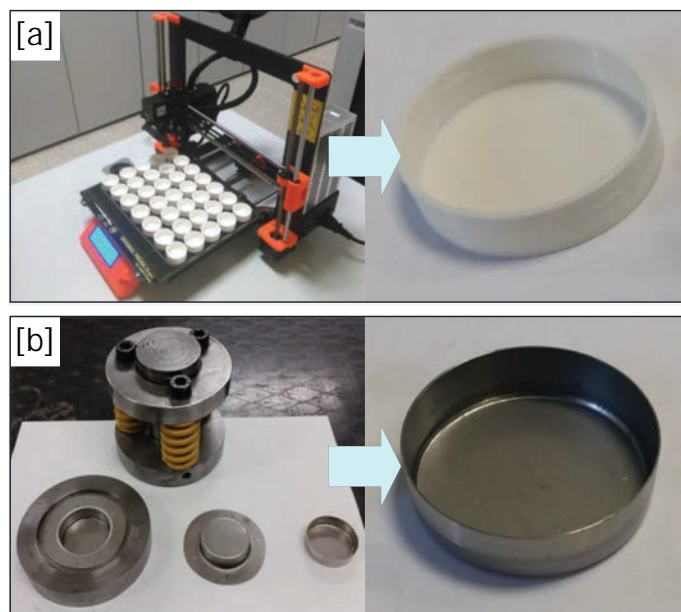


Fig. 2.1. Manufacturing process of: [a] 3D-printed PLA and [b] Stainless steel (SS) Petri dishes used as substrates on which to apply the plasma-polymerized coatings.

2.1.2. Selection of liquid precursors

Los objetivos funcionales fijados en la presente tesis han determinado la selección de los líquidos precursores a atomizar en los procesos de plasma-polimerización. A lo largo de la tesis, se han empleado los siguientes líquidos precursores:

- Ácido acrílico 90% (AcAc; $C_3H_4O_2$) suministrado por Alfa-Aesar (Estados Unidos).
- Tetraetilo ortosilicato 98% (TEOS; $Si(OC_2H_5)_4$) suministrado por Acros-Organics (Estados Unidos).
- (3-aminopropil)trióxido de silicio 99% (APTES; $H_2N(CH_2)_3Si(OC_2H_5)_3$) suministrado por Sigma-Aldrich (Alemania)

Según estudios realizados previamente por otros autores [51–53], son múltiples los factores relacionados con la química del precursor que influyen en la adhesión bacteriana, entre los que destacan las propiedades de hidrofiliidad/hidrofobicidad superficial, la carga superficial entre las bacterias y el sustrato y la rugosidad del material.

Un aspecto clave para la obtención de sustratos anti-biofilm es generar una capa de hidratación que actúe como barrera física para la adhesión bacteriana. La estructura de dicha capa de hidratación se forma sobre superficies hidrófilas a partir de la absorción de las moléculas de agua [54,55]. Las superficies hidrófilas, se caracterizan por un ángulo de contacto inferior a 90° y presentan grupos polares de alta energía superficial, capaces de atraer el agua y formar enlaces de hidrógeno entre los que destacan: OH, COOH y NH. El ácido acrílico es uno de los principales líquidos empleados para dotar de un comportamiento hidrófilo a los materiales gracias a la presencia de grupos carboxílicos (COOH) en su molécula [56,57].

Otro de los mecanismos identificados para limitar la adhesión bacteriana consiste en la generación de fuerzas de repulsión electrostática. En este caso, se debe prestar atención a la polaridad de la bacteria y del sustrato; determinado por el Punto Cero de Carga (*Point of Zero Charge*, PZC). El PZC se corresponde con el pH en el que se da un equilibrio entre el número de hidroxilos cargados positivamente y negativamente. Cuando el pH del material es inferior al del medio, el PZC adquiere carga negativa. De modo que, las fuerzas de repulsión electrostáticas aparecen cuando ambas cargas (bacteria y sustrato) adquieren el mismo signo de carga. Como generalmente la membrana celular bacteriana presenta cargas negativas, es necesario un potencial de superficie negativo para dar lugar a comportamientos antibacterianos. Las especies de sílice presentes en la molécula de TEOS, lo convierten en uno de los líquidos más empleados para reducir el PZC de las superficies, con la consiguiente limitación de la adhesión bacteriana debido a las fuerzas de repulsión electrostáticas generadas entre el sustrato y las bacterias [58].

Finalmente, en el último estudio de la presente tesis, el líquido base aplicado en el recubrimiento multicapa ha sido APTES, un compuesto ecológico y económico [59]. A diferencia de los trabajos anteriores, la elección del APTES no ha sido promovida por la generación de fuerzas de repulsión. Más bien todo lo contrario, los grupos aminos (NH_2) presentes en la molécula de APTES favorecen la adhesión a la superficie, mientras que los grupos siloxano ($SiOSi$) otorgan una mayor resistencia mecánica, mejorando delaminación y resistencia al agrietamiento de los recubrimientos [19,60]. Se espera que el APTES mejore la unión entre la superficie del sustrato y el recubrimiento anti-biofilm depositado posteriormente; y con ello la durabilidad del recubrimiento.

En cuanto a la morfología, a diferencia de los recubrimientos lisos de ácido acrílico, el empleo de precursores basados en siloxanos, como el TEOS y APTES, generan películas rugosas y granulares que reducen la adhesión celular al limitar el área de contacto entre las bacterias y el sustrato [61].

La Fig. 2.2 muestra la composición química de los líquidos precursores empleados en la tesis.

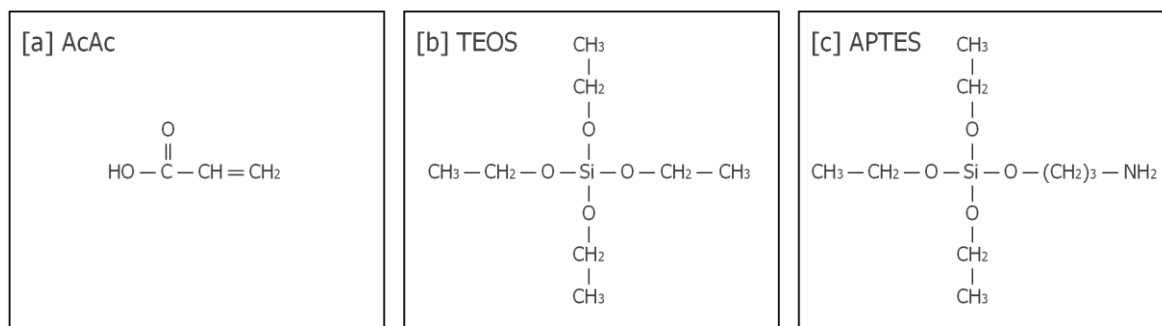


Fig. 2.2. Precursor molecules of: [a] AcAc, [b] TEOS and [c] APTES.

2.2. Plasma-polymerization process

Los tratamientos plasma-polimerizados fueron aplicados mediante el equipo APPJ PlasmaSpot500® (MPG, Luxemburgo) (Fig. 2.3). La Table 1 recoge los valores específicos de los parámetros más relevantes del proceso de plasma-polimerización aplicados en cada uno de los trabajos de la presente tesis.

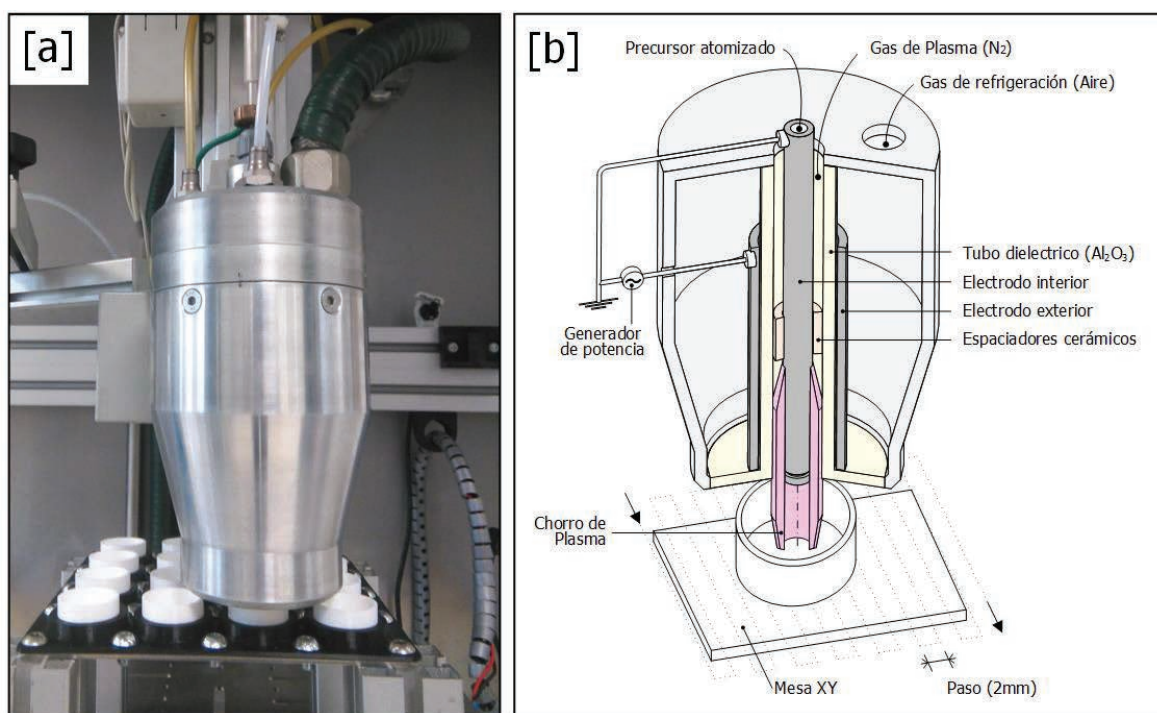


Fig. 2.3. APPJ system: [a] Plasma gun and [b] Schematic diagram of the PlasmaSpot500 equipment

El sistema APPJ está compuesto por dos electrodos cilíndricos coaxiales, el interior conectado a tierra y el exterior excitado mediante una fuente de alto voltaje, separados por un tubo dieléctrico de Al_2O_3 encargado de eliminar las perturbaciones del chorro de plasma y por tanto generar recubrimientos más homogéneos. En todos los tratamientos la potencia del generador se fijó en 360W con una frecuencia de 68kHz. La generación del plasma tiene lugar haciendo circular el gas de ionización entre ambos electrodos. En todos los trabajos realizados se ha empleado un flujo de 80slm de nitrógeno (N_2 , 99,999%) para la generación del plasma. El chorro de plasma avanza sobre el sustrato formando un patrón de escaneado en los ejes XY, con un paso de 2mm. La distancia entre el electrodo y la superficie expuesta al plasma fue de 10mm. Sin embargo, la velocidad de barrido del chorro de plasma varió entre 50 y 100mm/s. Las placas Petri de PLA impresas en 3D no fueron expuestas a una activación previa. Por el contrario, los sustratos de acero inoxidable fueron expuestos a una fase de activación de una única pasada sin agregar ningún precursor, a una velocidad de 50mm/s. En la fase de polimerización se analizó la influencia del número de pasadas en la capacidad anti-biofilm del recubrimiento. Se seleccionaron AcAc, TEOS y APTES como los precursores a atomizar durante la fase de plasma-polimerización. El precursor es transportado

con un flujo de nitrógeno de 1.5slm, gota a gota por efecto Venturi hasta el interior del plasma. Finalmente, tras circular a través del electrodo interior, entra en contacto con el chorro de plasma a la salida del mismo. Sobre las placas de PLA se aplicaron películas monocapa a base de AcAc y TEOS. Sin embargo, las placas de acero inoxidable fueron sometidas a recubrimientos multicapa a partir de APTES (recubrimiento base para promover la adhesión entre el sustrato y el recubrimiento funcional) y AcAc (recubrimiento funcional aplicado sobre el anterior). El objetivo de este último trabajo fue estudiar la durabilidad de un recubrimiento con exitosa capacidad anti-biofilm, previamente evaluado en P. Fernández-Gómez et al. [19]. Por dicha razón, ninguno de los parámetros del proceso se vio modificados (Table 1).

Parámetros proceso plasma-polimerización	Publicaciones científicas		
	I. Muro-Fraguas et al. [41]	I. Muro-Fraguas et al. [45]	I. Muro-Fraguas et al. [49]
Potencia (W)	360	360	360
Frecuencia (kHz)	68	68	68
Patrón Tratamiento pp	Escaneado XY	Escaneado XY	Escaneado XY
Gas Ionización Plasma	N ₂ (99,999%)	N ₂ (99,999%)	N ₂ (99,999%)
Flujo Gas Plasma (slm)	80	80	80
Nº Pasadas Activación	-	-	1
Precursor	AcAc, TEOS	AcAc	APTES+AcAc
Gas Portador Precursor	N ₂ (99.999%)	N ₂ (99.999%)	N ₂ (99.999%)
Flujo Gas Precursor (slm)	1.5	1.5	1.5
Nº Pasadas Recubrimiento	1, 2, 6, 12	1, 2, 6, 12	10 + 6
Velocidad Pistola (mm/s)	100	100	50 + 100
Distancia Pistola-Sustrato (mm)	10	10	10
Paso (mm)	2	2	2

Table 1. Plasma-polymerization process parameters

2.3. Sample Characterization Techniques

La modificación de los parámetros del plasma anteriormente mencionados, concretamente en esta tesis número de pasadas y precursor empleado, va a influir en las características químicas y morfológicas de la superficie expuesta al plasma; y por consiguiente afectará a la propiedad funcional deseada de los recubrimientos depositados (capacidad anti-biofilm y durabilidad de la misma).

En esta sección, se describen cada uno de los ensayos realizados para la correcta caracterización física, química y funcional de las muestras a estudio. La Tabla 2 identifica específicamente los análisis ejecutados en cada uno de los tres trabajos de la presente tesis. Para la realización de los ensayos, las muestras descritas en la sección 2.1.1 se cortan en porciones rectangulares de 10mm x 10mm x 1mm aproximadamente. Cada uno de los análisis se realiza por triplicado.

- Caracterización física:
 - Determinación de la morfología mediante Microscopía Electrónica de Barrido (*Scanning Electron Microscopy*, SEM).
 - Determinación de la rugosidad (Ra), relación del área interfacial desarrollada (Sdr), perfil superficial y distancia promedio entre picos mediante Microscopía de Fuerza Atómica (*Atomic Force Microscopy*, AFM).

- Caracterización química:
 - Determinación de la composición atómica y de los grupos químicos superficiales mediante Espectroscopía electrónica de rayos-X (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*, XPS).
 - Determinación de la composición química mediante Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (*Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflection*, FTIR-ATR).
 - Análisis cualitativo de los componentes químicos mediante Espectroscopía de Dispersión de Energía de rayos-X (*Energy Dispersive X-ray*, EDX).
- Caracterización funcional:
 - Determinación de la humectabilidad mediante la medición del ángulo de contacto con el agua (*Water Contact Angle*, WCA).
 - Cuantificación del biofilm generado mediante el método de tinción con cristal violeta.
 - Determinación de la durabilidad de los recubrimientos a partir de imágenes SEM, WCA y espectros FTIR-ATR y XPS, tras someterlos a procesos de desinfección.

A continuación, se describen de manera más detallada las técnicas de caracterización previamente mencionadas.

Ensayo	Publicaciones científicas		
	I. Muro-Fraguas et al. [41]	I. Muro-Fraguas et al. [45]	I. Muro-Fraguas et al. [49]
SEM	✓	✓	✓
AFM	✓	✓	✓
XPS	✓	✓	✓
EDX	-	-	✓
WCA	✓	-	✓
Cuantificación Biofilm	✓	✓	✓
Análisis Durabilidad (SEM, WCA FTIR-ATR, XPS)	-	-	✓

Table 2. Characterization assays carried out in each of the scientific publications

2.3.1. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Se empleó un microscopio electrónico de barrido (SEM) HITACHI S-2.400 con una potencia de 18kV (InterQuímica, La Rioja) para examinar la morfología de la superficie, determinar los mecanismos de crecimiento de los recubrimientos depositados; así como su influencia en la adhesión bacteriana (Fig. 2.4[a]). Las muestras de PLA y acero inoxidable analizadas en los estudios de I. Muro-Fraguas et al [41], I. Muro-Fraguas et al [45] e I. Muro-Fraguas et al [49], fueron previamente recubiertas mediante pulverización catódica de oro y paladio para hacerlas conductoras. En los tres estudios se aplicaron aumentos de x2.000. En los trabajos de I. Muro-Fraguas et al [41] e I. Muro-Fraguas et al [45] se analizaron cualitativamente las diferencias morfológicas sobre las muestras de PLA antes y después de la exposición al plasma. Mientras que en el estudio de I. Muro-Fraguas et al [49] se empleó la caracterización morfológica para determinar la durabilidad del recubrimiento antes y después de 5 ciclos de desinfección con ácido peracético e hipoclorito de sodio.

El microscopio electrónico de barrido aplica un haz de electrones de alta energía que se disipan al interactuar con la superficie de la muestra en forma de electrones secundarios, retrodispersados y rayos X. Dichas señales, concretamente los electrones secundarios, son recolectados en el detector, generando una imagen bidimensional que revela información sobre la morfología, estructura cristalina y orientación de los materiales que componen la muestra. Los electrones son acelerados y atraídos por el ánodo cargado positivamente para formar un haz. El cual, se hace pasar a través de una combinación de lentes electromagnéticas (lente del condensador y lente objetivo) que permiten enfocar el haz en un punto en concreto de la muestra y controlar la resolución de la imagen mediante el

tamaño y número de electrones que impactan sobre la misma (Fig. 2.4[b]). El ensayo se realiza en condiciones de vacío para proteger las muestras de contaminación, vibraciones o ruido; y para evitar posibles interacciones entre los electrones y las moléculas del gas, lo que conlleva una pérdida de calidad de la imagen final [62].

A modo de ejemplo, en la Fig. 2.4[c,d], se muestran las imágenes SEM realizadas sobre acero inoxidable sin tratar y con recubrimiento de plasma después de aplicar 5 ciclos de desinfección con hipoclorito de sodio al 0,05%.

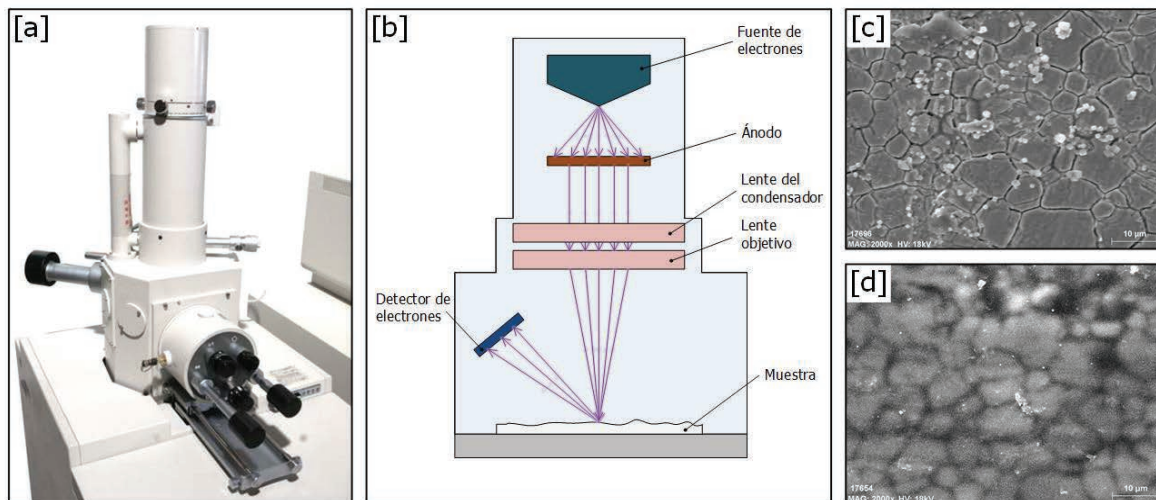


Fig. 2.4. SEM characterization: [a] Hitachi S-2400 equipment, [b] Working principle of SEM assays and [c,d] SEM images of non-coated and plasma polymerized SS sample after 5 disinfection cycles with NaOCl (0,05%) [49]

2.3.2. Atomic Force Microscopy (AFM)

En esta tesis, las imágenes AFM han sido empleadas para determinar el perfil superficial de las muestras y con ello, calcular cuantitativamente su rugosidad (R_a), distancia entre picos y la relación del área interfacial desarrollada (S_{dr} , superficie adicional aportada por la textura en comparación con el área escaneada) mediante el software *NanoScope Analysis 1.4*. Los ensayos AFM se llevaron a cabo mediante un microscopio de fuerza atómica Multimode (Bruker Corporation), equipado con un controlador Nanoscope V que opera en modo toque (Fig. 2.5[a]). Se analizaron áreas de $40\mu\text{m} \times 40\mu\text{m}$ con una frecuencia de 50Hz. A modo de ejemplo, en la Fig. 2.5[c,d], se muestra la imagen AFM y el perfil topográfico de una muestra de PLA plasma-polimerizada a base de AcAc. En los estudios de I. Muro-Fraguas et al [41] e I. Muro-Fraguas et al [45] las caracterizaciones AFM son realizadas en muestras de PLA sin tratar y sobre muestras previamente recubiertas con plasma. Por el contrario, en el estudio de I. Muro-Fraguas et al [49], los ensayos morfológicos se realizaron sobre muestras de acero inoxidable. Además, para medir la durabilidad de los recubrimientos depositados, los sustratos fueron previamente expuestos a ciclos de limpieza con desinfectantes de uso común.

Los ensayos AFM permiten realizar mediciones en 3 dimensiones de las características topográficas, eléctricas, magnéticas y mecánicas de la superficie de una muestra a escala nanométrica. A diferencia de los ensayos SEM, la técnica AFM se puede aplicar sobre muestras no conductoras (polímeros, cerámicas o muestras biológicas) y sin necesidad de vacío; es decir, no requiere la previa preparación de las muestras. Los principales componentes del sistema son: el láser, fotodiodo de posición, escáner, sonda y la propia muestra (Fig. 2.5[b]). AFM se basa en las mediciones de las fuerzas atómicas generadas en la interacción entre la punta de la sonda y la muestra. La sonda, compuesta por un listón en voladizo y una punta generalmente de silicio o nitruro de silicio, se flexiona en función de las diferencias de altura de la superficie de la muestra por la acción de las fuerzas de Van der Waals, fuerzas electrostáticas y las repulsiones electrónicas que aparecen cuando se encuentra muy próxima a la superficie. La flexión del listón en voladizo provoca que el láser, que impacta en la parte posterior del mismo dirigido hacia un fotodiodo de posición, se desvíe. La topografía de la muestra se obtiene a partir del registro de dichas desviaciones del láser en el fotodetector de posición. La medición de la superficie completa se realiza línea a línea mediante el preciso desplazamiento de un escáner piezoeléctrico. En función de la posición de la sonda respecto a la superficie, se distinguen tres modos de funcionamiento: en contacto, sin contacto y modo toque o *tapping*. Para evitar el contacto permanente entre la sonda y la muestra, la sonda oscila cerca de su frecuencia de resonancia en los modos

sin contacto y de toque. La principal diferencia entre ambos es que en el de toque realmente la sonda sí toca la muestra volviéndose a separar de nuevo en cada ciclo de oscilación [63].

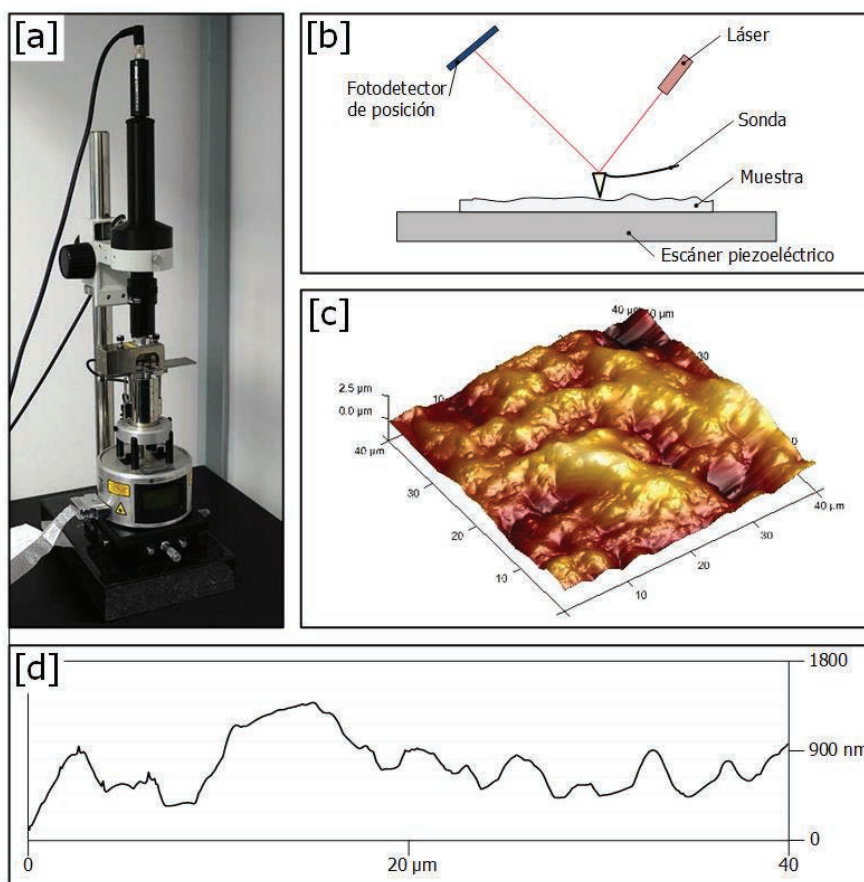


Fig. 2.5. AFM characterization: [a] AFM Multimode Bruker Nanoscope V equipment, [b] Working principle of AFM assays, [c] AFM image of AcAc pp sample [41] and [d] Cross section of AcAc pp sample [41]

2.3.3. X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)

La composición química y los grupos funcionales presentes en la superficie de las muestras, se determinó empleando un espectrómetro de fotoelectrones de rayos X (XPS) modelo Kratos AXIS Supra (Kratos Analytical) con un analizador de electrones hemisféricos y una fuente de rayos X monocromática $AlK\alpha$ (120W, 15kV) que opera a una presión residual de 1.33×10^{-7} Pa (Fig. 2.6[a]). Los espectros se recogieron a 160 eV (espectros generales) y 20 eV (espectros de alta resolución). Las energías de enlace se relacionaron con la señal de C1s para el carbono adventicio a 285 eV. El área de análisis fue aproximadamente de $700\mu\text{m} \times 300\mu\text{m}$. La cuantificación de los porcentajes atómicos de los principales elementos químicos presentes en las muestras analizadas se realizó mediante el software *CasaXPS 2.3.19* (Casa Software, Ltd.). Además, se empleó el software *PeakFit 4.12* (SPSS Inc.) mediante un ajuste de picos por funciones de suma Gaussiana-Lorentziana para obtener las deconvoluciones de las regiones C1s de alta resolución. En el estudio de I. Muro-Fraguas et al [41] e I. Muro-Fraguas et al [45], se determinaron los porcentajes atómicos C1s, O1s, N1s y Si2p presentes en las muestras recubiertas con AcAc y TEOS y las muestras de PLA sin recubrir. En el estudio de I. Muro-Fraguas et al [49], a parte de los elementos previamente citados, se calcularon los porcentajes atómicos Fe2p y Cr2p (presentes en las muestras de acero inoxidable sin recubrir) y Na1s y Cl2p (presentes en las muestras desinfectadas mediante hipoclorito de sodio). Posteriormente, en los tres estudios se llevó a cabo la deconvolución del pico principal del carbono para obtener los grupos polares basados en oxígeno (C-O, C=O y O-C=O), cuya presencia está relacionada con la hidrofiliidad de la superficie [64].

Los ensayos XPS proporcionan información cuantitativa del estado químico de los primeros 10nm de la superficie de las muestras, tanto conductoras como no conductoras a partir de la energía cinética de los electrones emitidos por la superficie cuando esta se irradia con un haz de rayos X. Se requiere aplicar vacío para evitar la contaminación de las muestras. La fuente de rayos X emplea un filamento de tungsteno para generar el haz de electrones que

impactan sobre la muestra. Como consecuencia de la radiación, los electrones con una energía de enlace inferior a la de la fuente de rayos X son expulsados por la muestra. Posteriormente, las lentes de extracción, colocadas entre la muestra y el analizador, tienen como misión recoger los electrones emitidos por la muestra y reducir su energía cinética con el fin de incrementar la resolución. A continuación, los electrones ingresan en un analizador compuesto por dos hemisferios concéntricos. De manera que, los electrones con altas energías impactarán en el hemisferio exterior y los de baja energía en el interior. Es decir, únicamente los electrones con una determinada energía serán capaces de atravesar el analizador y alcanzar el detector (Fig. 2.6[b]), el cual genera una gráfica en función del número de electrones recolectados (eje X) por cada una de las energías de enlace (eje Y) [65].

A modo de ejemplo, se muestra el espectro de barrido general (Fig. 2.6[c]) y el espectro de la región C1s de las muestras de PLA sin tratar con plasma (Fig. 2.6[d]) y las muestras plasma-polimerizadas con AcAc (Fig. 2.6[e]) obtenidas en I. Muro-Fraguas et al [41]. La posición de los picos permite identificar los elementos y la altura, la concentración de cada uno de ellos.

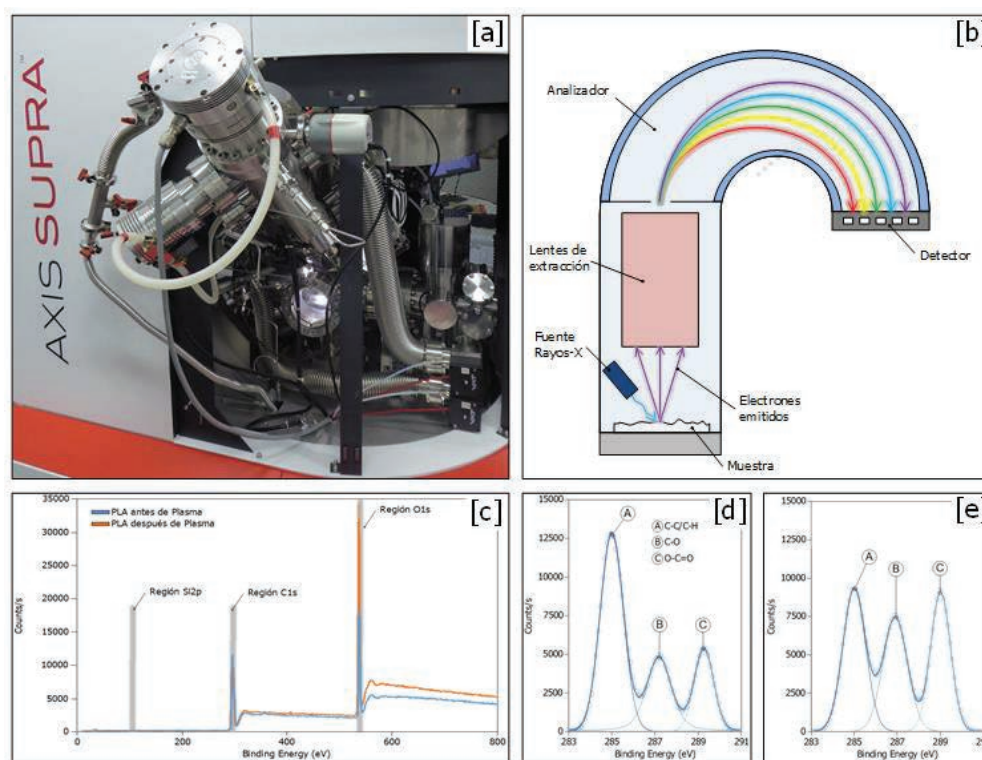


Fig. 2.6. XPS characterization: [a] XPS Kratos AXIS Supra equipment, [b] Working principle of XPS essays, [c] Wide spectra of non-coated and AcAc pp samples [41] and [d,e] C1s signal deconvolutions of non-coated and AcAc pp samples, respectively [41]

2.3.4. Fourier Transform Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflectance (FTIR-ATR)

En el estudio de I. Muro-Fraguas et al [49] se empleó la tecnología de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared*, FTIR) para determinar la durabilidad de los recubrimientos a partir de la composición química de las muestras de acero inoxidable recubiertas con plasma a base de APTES+AcAc. Concretamente, se deseaba conocer si los grupos carboxilo (COOH) se desprotonan en condiciones de pH alcalino transformándose en aniones carboxilato (COO⁻) cuando se exponen a ciclos de limpieza con ácido peracético e hipoclorito de sodio. Para ello, se aplicaron 32 escaneos en el rango de 600–4.000cm⁻¹ con una resolución de 4cm⁻¹ mediante un espectrómetro Spectrum Two FT-IR (PerkinElmer Inc.) (Fig. 2.7[a]). Con especial interés, en la región caracterizada por la presencia de grupos carboxilo (1.500–1.800 cm⁻¹). La corrección de línea base de los espectros se realizó con el software *Spectrum 10.4.3.339* (PerkinElmer Inc.) En la Fig. 2.7[b] extraída de I. Muro-Fraguas et al [49], se muestran los espectros FTIR (rango de estudio 600–4.000 cm⁻¹) de las muestras plasma-polimerizadas en función del desinfectante aplicado.

La espectrometría infrarroja con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) permite identificar los grupos funcionales presentes en la superficie de las muestras a partir de la intensidad de luz absorbida, emitida y reflejada por sus moléculas cuando se exponen a una fuente de luz infrarroja con una energía suficiente para provocar cambios vibracionales en las moléculas. Para ello, la luz infrarroja emitida desde la fuente de infrarrojos impacta y atraviesa el material óptico de diamante ATR formando una onda evanescente que se refleja entre la superficie del cristal y la muestra. Este efecto ocurre gracias a que el material del cristal ATR presenta un índice de refracción mayor que el de la muestra a estudio. En la parte opuesta del cristal se coloca un detector encargado de registrar la energía atenuada de las ondas evanescentes, en función de la diferencia de intensidad de luz entre la entrada y la salida (Fig. 2.7[c]). Finalmente, la señal obtenida es decodificada mediante la función Transformada de Fourier; generando los espectros infrarrojos [66].

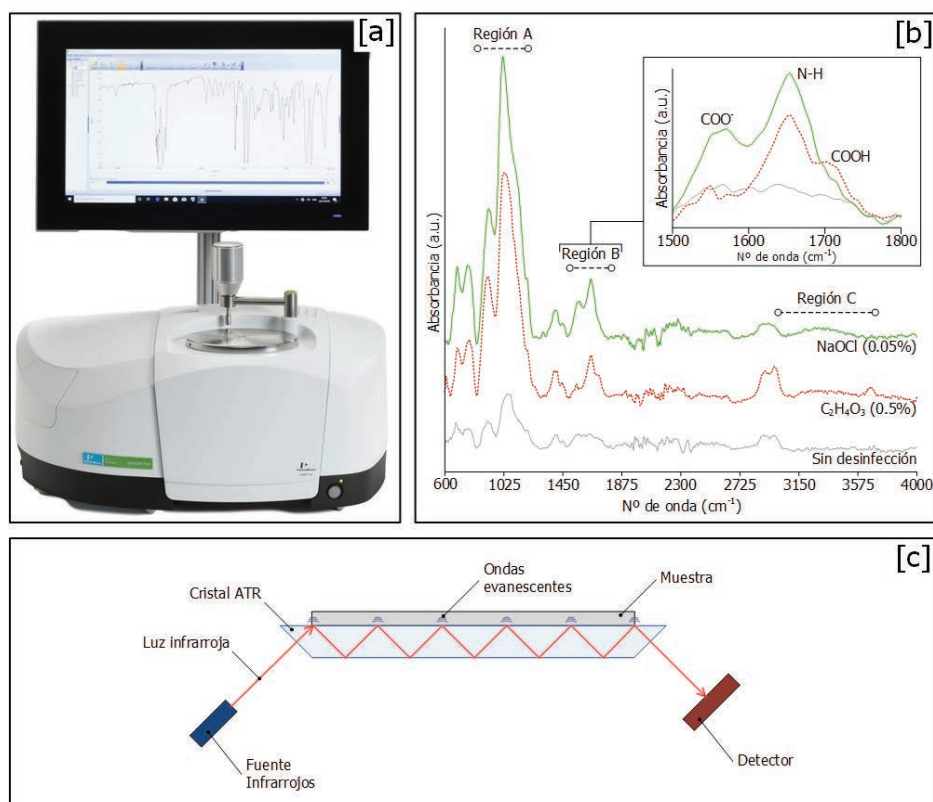


Fig. 2.7. FTIR-ATM characterization: [a] Spectrum Two FT-IR spectrometer, [b] FTIR spectra of the coating non-sanitized and after sanitization cycles [49] and [c] Working principle of FTIR-ATR analysis.

2.3.5. Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDX)

La técnica de dispersión de energía de rayos X (EDX) ha sido empleada en I. Muro-Fraguas et al [49] para determinar cualitativamente la presencia de Cl y Na en las muestras de acero inoxidable sin recubrir sometidas a cinco ciclos de desinfección con hipoclorito de sodio (Fig. 2.8). Para ello, se ha empleado un espectroscopio Quantax 200 (Bruker) con un detector XFlash 5.010/30 y el software de microanálisis *ESPRIT 1.9*, instalado en el microscopio electrónico de barrido (SEM) HITACHI S-2.400 SEM descrito en la sección 2.3.1. Que los ensayos EDX y SEM se hayan realizado sobre la misma región, ha permitido conocer las características morfológicas del acero inoxidable que favorecen la deposición de los desinfectantes y su influencia en la durabilidad de la capacidad anti-biofilm.

Los ensayos EDX permiten conocer la composición química superficial de una muestra, los elementos presentes, su distribución y concentración; a partir de la energía liberada por los átomos de la muestra en forma de rayos X. Los detectores EDX son accesorios complementarios con los microscopios SEM. De manera que, la elevada energía del haz de electrones del SEM excita los átomos de la superficie de la muestra, provocando la emisión de electrones. Los huecos generados tras la expulsión de dichos electrones son ocupados por los electrones presentes en capas exteriores de mayor energía. Los movimientos de electrones desde zonas de mayor a menor energía dan lugar a la emisión de rayos X. Finalmente, la cantidad y energía de los rayos X se registra en el detector EDX,

obteniendo los espectros de emisión electromagnética. De manera similar a las técnicas XPS y FTIR, los espectros EDX muestran la frecuencia de conteo de los distintos niveles de energía, exclusivos para cada elemento [67].

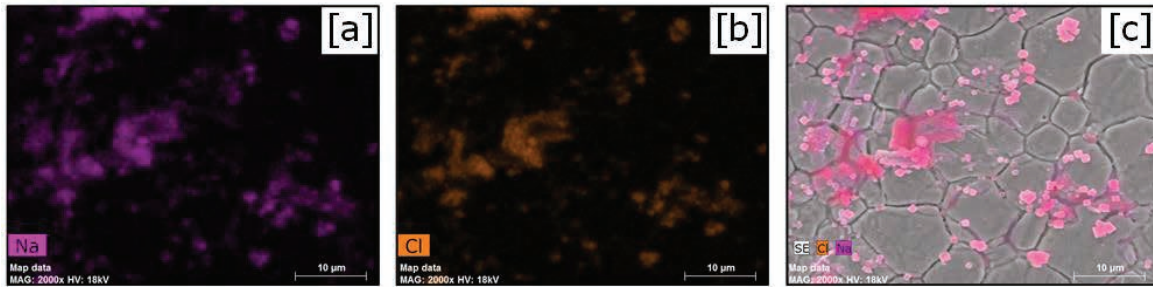


Fig. 2.8. EDX maps (x2.000) of [a] Sodium, [b] Chlorine and [c] Overlapped with the SEM image of the non-coated SS samples [49]

2.3.6. Water Contact Angle (WCA) Measurement

La determinación del ángulo de contacto del agua (WCA) se ha realizado en I. Muro-Fraguas et al [41] e I. Muro-Fraguas et al [49]. A pesar de que en el primero de ellos los sustratos estudiados están fabricados a partir de PLA, en ambos casos, las mediciones fueron efectuadas sobre muestras de acero inoxidable puesto que el patrón tan irregular de la superficie de las muestras impresas en 3D imposibilita su medición. Se escogió el acero inoxidable como material base para la medición del WCA porque es el más común en las industrias de manipulación de alimentos. El WCA se midió en modo estático mediante el método de la gota sésil. Para ello, una gota de 10 µL de agua destilada se aplicó sobre la superficie de estudio. Las imágenes de la gota de agua sobre el sustrato se tomaron y analizaron mediante un sistema OCA15 plus (Dataphysics) y el software *ImageJ* (Fig. 2.9[a]). En I. Muro-Fraguas et al [41], el objetivo era conocer la influencia de los recubrimientos aplicados en la humectabilidad de las muestras. De modo que, la cuantificación del WCA fue realizada tras la aplicación de los recubrimientos plasma-polimerizados. Por otro lado, en I. Muro-Fraguas et al [49], la medición del WCA se llevó a cabo, además, tras exponer las muestras a los procesos de desinfección ya que en dicho trabajo se perseguía conocer si la aplicación de dichos ciclos de limpieza influía negativamente en el grado de humectabilidad superficial (Fig. 2.9[b]).

El método de la gota sésil mide cuantitativamente el ángulo que forma la tangente del borde de una gota de agua con una superficie sólida. Está influenciado por la composición, estructura y las propiedades de los medios de contacto. El WCA permite conocer de manera indirecta la energía superficial de la superficie a partir del grado de humectación de la gota de agua; diferenciando así entre superficies hidrófilas ($WCA < 90^\circ$) e hidrófobas ($WCA > 90^\circ$). En superficies hidrófilas, las fuerzas de adherencia atraen la gota de agua, lo que conlleva que la gota se esparza y el WCA formado disminuya. Por el contrario, en las superficies de baja energía superficial, las fuerzas de atracción son muy pequeñas, provocando una repulsión entre la fase sólida y líquida, con el consiguiente aumento del WCA [68].

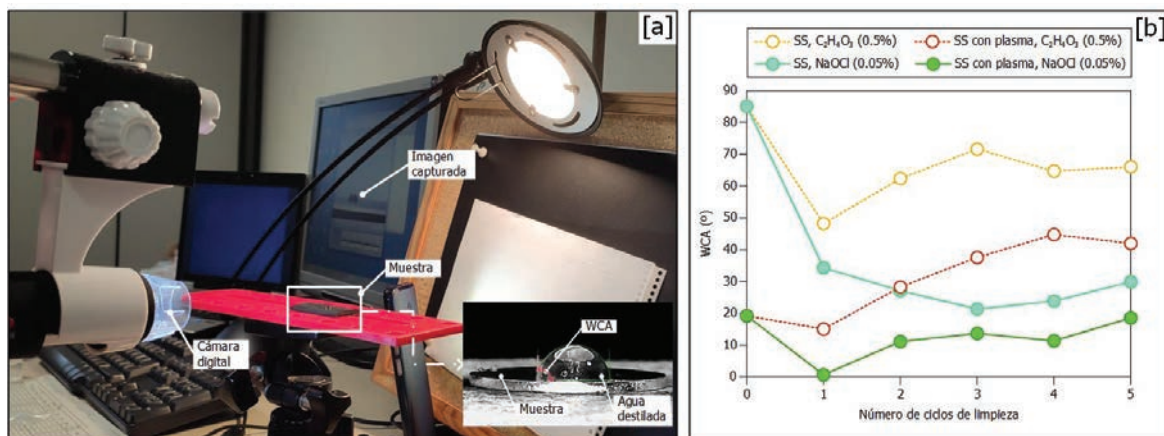


Fig. 2.9. WCA measurement: [a] WCA equipment with a close view of the image obtained and [b] Evolution of the WCA of coated and non-coated SS samples along successive sanitization cycles [49]

2.3.7. Biofilm formation quantification by Crystal Violet (CV) staining

La evaluación del biofilm generado se ha determinado mediante el protocolo de tinción con cristal violeta, que permite cuantificar la densidad de los microorganismos existentes en una superficie a partir de la absorbancia que emiten en un espectrofotómetro tras exponerlas al tinte con cristal violeta [69]. La producción relativa de biofilm para cada recubrimiento se calculó relacionando la absorbancia a 590nm de las placas recubiertas respecto a la de las muestras sin recubrir. Para todos los análisis se utilizaron, para cada microorganismo, cuatro muestras por tratamiento de plasma-polimerización aplicado y otras cuatro muestras sin recubrimiento de plasma como control. En la Table 3 se listan los microorganismos empleados para la formación de biofilm en cada uno de los estudios de la presente tesis.

Microorganismos	Publicaciones científicas		
	I. Muro-Fraguas et al. [41]	I. Muro-Fraguas et al. [45]	I. Muro-Fraguas et al. [49]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	✓	✓	-
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT911	✓	-	-
<i>Escherichia coli</i> CECT515	✓	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	-	✓	-
Cepas de <i>P. aeruginosa</i> resistentes a múltiples fármacos	-	✓	-
Cepas de <i>S. aureus</i> resistentes a la meticilina	-	✓	-
Biofilm multibacteria de 3 cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	✓

Table 3. Bacterial strains used to perform the biofilm analysis for each study

Las bacterias seleccionadas se corresponden con las que forman biofilms con mayor frecuencia en las plantas industriales de procesamiento de alimentos y el ámbito clínico [70]. A continuación, se describen brevemente cada una de las cepas utilizadas.

P. aeruginosa es un patógeno Gram-negativo con forma de bacilo (0,5-1µm de ancho y 2-4µm de largo) que ocasiona graves infecciones nosocomiales con elevada mortalidad (en torno al 30%) en pacientes con enfermedades respiratorias crónicas, como fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y bronquiectasias. En los últimos años, la resistencia de *P. aeruginosa* a los antibióticos ha aumentado considerablemente [71].

L. monocytogenes es un microorganismo Gram-positivo con forma de bacilo no ramificado (0,5-2µm de ancho y 0,5-4µm de largo) con una elevada capacidad para reproducirse en entornos con bajas temperaturas (4°C-10°C) y pH extremos. Se trata de una bacteria responsable de brotes alimentarios que ocasionan graves consecuencias socio sanitarias, especialmente en mujeres embarazadas, población inmunodeprimida y neonatos. Concretamente, la tasa de incidencia de listeriosis ha aumentado en las dos primeras décadas del siglo XXI desde 0,19 a 1,01 por cada 100 mil habitantes [21]. La mayor parte de los casos de listeriosis se producen por la ingesta de comida contaminada derivada de la contaminación cruzada en los entornos industriales [72].

E. coli es el bacilo (0,25-1µm de ancho y 2-3µm de largo) Gram-negativo más abundante en el tracto gastrointestinal en humanos que produce enfermedades con síntomas leves, que afectan al funcionamiento del proceso digestivo. La infección por *E. coli* suele provenir de agua y alimentos contaminados, principalmente carne y vegetales crudos. Particularmente en Europa, la resistencia de *E. coli* a los antibióticos está aumentando debido a la propagación de genes ubicados en elementos genéticos móviles, incluidos plásmidos, integrones y transposones [73].

S. aureus es una bacteria anaerobia Gram-positiva, con forma esférica, cuya transmisión se produce principalmente en entornos hospitalarios. La contaminación por *S. aureus* puede derivar en infecciones cutáneas, mucosas y enfermedades internas de mayor riesgo, como la endocarditis, neumonía o artritis séptica [74]. Cassini et al. [75], estimaron un total de 150.000 infecciones en Europa por *S. aureus* en el año 2.015; lo que supone un aumento en 1,28 veces en la incidencia de tales infecciones entre los años 2.007 y 2.015.

A su vez, también se han analizado bacterias que los antibióticos no pueden controlar ni eliminar como consecuencia del abuso en el uso de medicamentos a lo largo de las últimas décadas. La resistencia a los antibióticos provoca efectos negativos en la salud humana tanto por la aparición de nuevas infecciones de mayor gravedad, como por los fracasos de los medicamentos; aumentando la mortalidad de los pacientes. Además, las estancias hospitalarias se prolongan, lo que conduce a mayores costos médicos. Se ha estimado que en Europa cada año 33.000 muertes son atribuibles a infecciones con bacterias resistentes a los antibióticos [75]. A su vez, la Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*, WHO), en su informe de 2.021, declaró los riesgos y amenazas para la salud pública que supone este peligroso aumento de resistencia microbiana [76].

De manera específica, en I. Muro-Fraguas et al [41] e I. Muro-Fraguas et al [45], las placas Petri de PLA fueron inoculadas con un cultivo bacteriano inicial de 10⁶CFU/mL preparado en 3mL de caldo Mueller Hinton (MH) (Pronadisa) a partir de cultivos obtenidos previamente después de crecer en placas de agar BHI (*Brain Heart Infusion*) durante 18 horas. Posteriormente, las muestras se incubaron a 37°C durante 24 horas para obtener un cultivo de biofilm maduro (Fig. 2.10[a]). La temperatura de 37°C fue seleccionada porque se trata de la temperatura óptima de los microorganismos empleados [77–79]. Al final de dicho período de incubación, se retiró el medio y el biofilm se lavó con una solución salina tamponada con fosfato (*Phosphate Buffer Saline*, PBS), y posteriormente se fijó con metanol durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de eliminar el metanol, las placas de PLA se secaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después, se agregaron 3mL de solución de CV (Sigma, concentración final 10% en PBS) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (Fig. 2.10[b]). El exceso de CV se eliminó con agua (Fig. 2.10[c]). Tras el secado de las muestras, el cristal violeta unido a la célula se disolvió en 3mL de ácido acético al 66% v/v, durante 1 hora. Finalmente, se empleó un lector de placas POLARstar Omega (BMG Labtech) para medir la absorbancia de los pocillos a 590nm (Fig. 2.10[d]). En la Fig. 2.10[e], se muestran los resultados de producción relativa de biofilm (%) obtenidos en I. Muro-Fraguas et al [45], para las placas recubiertas respecto a las placas de PLA sin tratar con plasma.

En el estudio I. Muro-Fraguas et al [49] el procedimiento fue modificado ligeramente. En este caso, el material de las placas fue acero inoxidable, el cual se inoculó con 4mL de la suspensión bacteriana durante 6 días a 12°C. Se escogió dicha temperatura de 12°C porque según el Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea, se trata de la temperatura máxima recomendada que debe prevalecer en las instalaciones de procesamiento de alimentos de origen animal [80]. Tras la fase de contaminación bacteriana, las placas se lavaron tres veces con solución de Ringer (Merck). A continuación, se tiñó el biofilm, añadiendo 4mL de una solución CV al 0,1% (Panreac) e incubando a temperatura ambiente durante 15 minutos. Para eliminar el exceso de colorante, las placas se lavaron tres veces con solución de Ringer y el CV unido a la célula se disolvió añadiendo 5mL de etanol (Dávila Villalobos) al 95% a cada placa. Después de otros 15 minutos, se cuantificó la densidad óptica a 595nm con un espectrofotómetro UV-3.100PC (VWR, Radnor, PA).

Como se puede observar en la Table 3, otro aspecto que diferencia a los protocolos de cuantificación del biofilm de los 3 estudios llevados a cabo en esta tesis, son las bacterias con las que las muestras son contaminadas. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Listeria monocytogenes* CECT911 y *Escherichia coli* CECT515 se utilizaron como cepas de referencia para realizar el análisis microbiológico y de biofilm en I. Muro-Fraguas et al [41]. En el estudio de I. Muro-Fraguas et al [45], se emplearon las cepas de control de *P. aeruginosa* PAO1 y *S. aureus* ATCC29213, así como las cepas clínicas de *P. aeruginosa* resistentes a múltiples fármacos (Ps204, Ps713 y Ps1.056), y las cepas clínicas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (W1569, W1570 y W1571) de la colección del área de Microbiología Molecular del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja. Mientras que en el último trabajo, I. Muro-Fraguas et al [49], el biofilm formado estaba compuesto por tres cepas de *L. monocytogenes*: la cepa de referencia CECT911 y dos cepas previamente aisladas del entorno de procesamiento de una industria cárnica (ULE1264 y ULE1265).

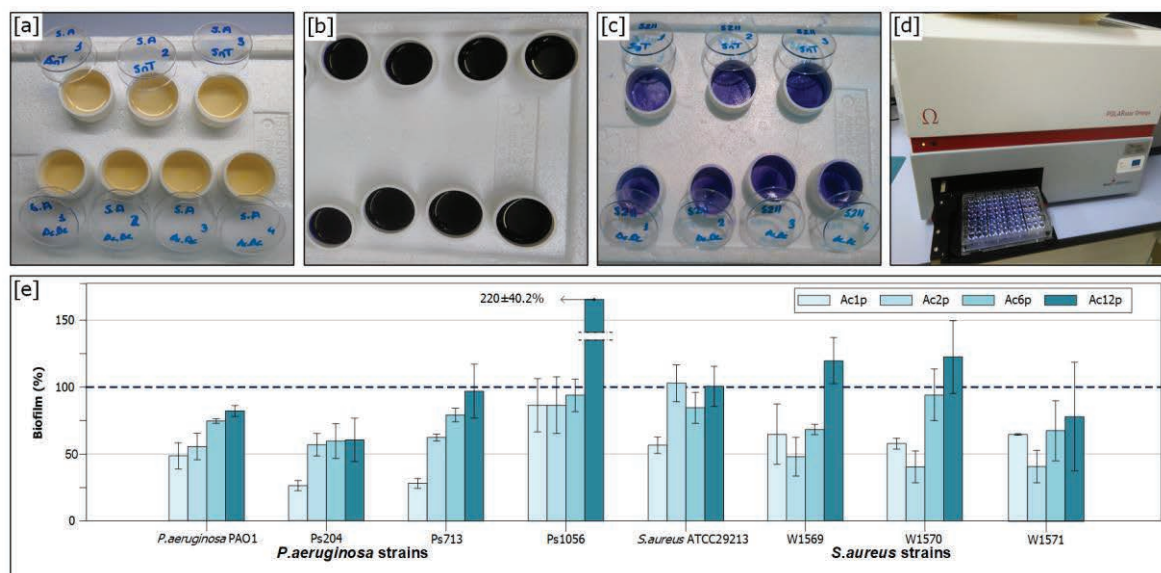


Fig. 2.10. Biofilm quantification method: [a] Biofilm formation [b] Samples stained by crystal violet, [c] Samples after CV excess removed, [d] Absorbance measures by POLARstar Omega plate reader generated on coated 3D printed PLA samples [45]

2.3.8. Evaluation of the anti-biofilm coatings durability

Como se ha mencionado en la sección 1.1.2, el procedimiento más empleado en la limpieza de superficies en la industria alimentaria se basa en la desinfección periódica mediante agentes químicos con actividad antimicrobiana, entre los que destacan el hipoclorito de sodio (NaOCl) y el ácido peracético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_3$). La actividad bactericida del hipoclorito de sodio radica en la oxidación de las enzimas bacterianas gracias a la producción de ácido hipocloroso (HOCl) e iones de hipoclorito (OCl^-) [46]. Sin embargo, es muy difícil lograr una eliminación completa de los biofilms en entornos industriales debido a la capacidad de las bacterias para desarrollar tolerancia a los desinfectantes. Además, se está tratando de reducir el uso de tales productos debido a la generación de componentes potencialmente peligrosos para la salud humana [21].

De modo que, tras la obtención de recubrimientos capaces de reducir la adhesión bacteriana y el biofilm generado, en los trabajos anteriores I. Muro-Fraguas et al [41] e I. Muro-Fraguas et al [45], lo que se persigue es evaluar la durabilidad de dicha capacidad anti-biofilm. Para ello, en I. Muro-Fraguas et al [49], muestras de acero inoxidable recubiertas y sin recubrir se expusieron a soluciones de ácido peracético al 0,5% (Merck) e hipoclorito de sodio al 0,05% (VWR, Radnor). En primer lugar, las placas se cubrieron con 6mL de la solución desinfectante durante 15 minutos. Posteriormente, se eliminó el exceso de solución y se secaron las muestras a temperatura ambiente. En dicho momento, se cuantificó el biofilm generado y se evaluaron las propiedades físico-químicas de la superficie de la muestras tras aplicar las técnicas de caracterización previamente descritas en la sección 2.3. Este proceso de limpieza se repitió en 5 ocasiones, cuantificando el biofilm generado tras cada una de ellas. Junto con la concentración de desinfectante y tiempo de aplicación; el pH es uno de los factores más influyentes en la eficacia de los procesos de desinfección [81]. Para determinar dicha posible relación, se han medido los valores de pH de las soluciones desinfectantes empleadas mediante un multímetro Sension+ MM150 con electrodo 5.048 (HACH).

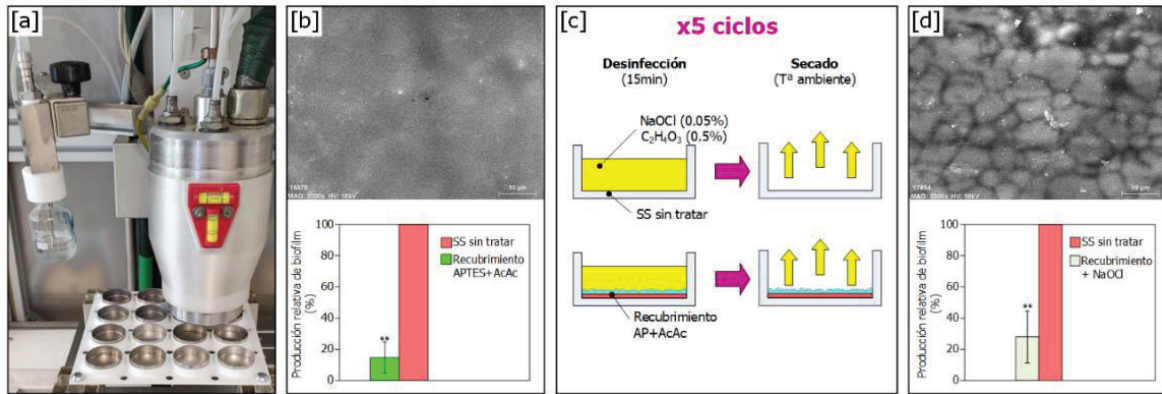


Fig. 2.11. Durability characterization: [a] Plasma-polymerization coatings, [b] SEM Images and Biofilm quantification before the sanitization process, [c] Sanitization process and [d] SEM Images and Biofilm quantification after the sanitization process [49]

Chapter 3. RESULTS AND DISCUSSION

A lo largo de este capítulo se van a presentar y analizar los resultados más relevantes de la tesis, así como las principales relaciones entre las variables del plasma y las propiedades físicas, químicas y funcionales obtenidas en los tres trabajos definidos en la sección 1.3.1. El capítulo se divide en 2 apartados que se corresponden con los objetivos definidos en la sección 1.2. El primero de ellos se centra en la obtención de recubrimientos anti-biofilm sobre muestras de PLA impresas en 3D y acero inoxidable (I. Muro-Fraguas et al [41], I. Muro-Fraguas et al [45]). Mientras que el segundo objetivo consiste en evaluar la durabilidad de la capacidad anti-biofilm de los recubrimientos cuando las muestras de acero inoxidable se exponen a procedimientos de desinfección comunes en las plantas de procesamiento de alimentos (I. Muro-Fraguas et al [49]). Para la consecución de este segundo objetivo se parte de un estudio anterior (P. Fernández-Gómez et al. [19]), en el que se ha verificado que el recubrimiento en cuestión da lugar a reducciones significativas en la cantidad de biofilm generado.

3.1. Application of anti-biofilm plasma-polymerized coatings

En I. Muro-Fraguas et al [41] se aplicaron recubrimientos plasma-polimerizados a base de AcAc y TEOS sobre placas de PLA previamente impresas en 3D. Además del líquido precursor, se modificó el número de pasadas de los recubrimientos para determinar la influencia de la duración del mismo. La siguiente tabla recoge la configuración de los recubrimientos generados en este primer estudio. Los valores del resto de parámetros del proceso de plasma quedan definidos en la sección 2.2.

Muestra	Precursor	Número de pasadas
Sin tratar (control)	-	-
Ac1p	AcAc	1
Ac2p	AcAc	2
Ac6p	AcAc	6
Ac12p	AcAc	12
Te1p	TEOS	1
Te2p	TEOS	2
Te6p	TEOS	6
Te12p	TEOS	12

Table 4. Sample identification, number of passes and precursor used [41]

La Fig. 3.1, recoge la producción relativa de biofilm para cada tratamiento aplicado y bacteria analizada. Las placas sin tratar se establecieron como referencia, asignándoles un valor de producción relativa del 100% (línea discontinua roja). De modo que, una producción de biofilm inferior a 100% indica que el recubrimiento presenta capacidad anti-biofilm, mientras que producciones de biofilm superiores al 100% hacen referencia a recubrimientos con comportamiento pro-biofilm. Para ambos precursores se lograron reducciones en el biofilm generado cuando se aplicaron recubrimientos con 1 y 2 pasadas. Se puede apreciar una relación directa entre el biofilm producido y el número de pasadas aplicadas. La producción de biofilm fue menor en los recubrimientos basados en AcAc respecto a los que emplearon TEOS. Concretamente, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el biofilm generado, para los 3 microorganismos analizados, sobre los recubrimientos de AcAc en los que se aplicó menor número de pasadas (1 y 2). El recubrimiento Ac1p puede considerarse el mejor recubrimiento, con una producción relativa de biofilm del $47,7 \pm 9,5\%$ para *P. aeruginosa*, $50,4 \pm 7,2\%$ para *L. monocytogenes* y $64,1 \pm 9,0\%$ para *E. coli*.

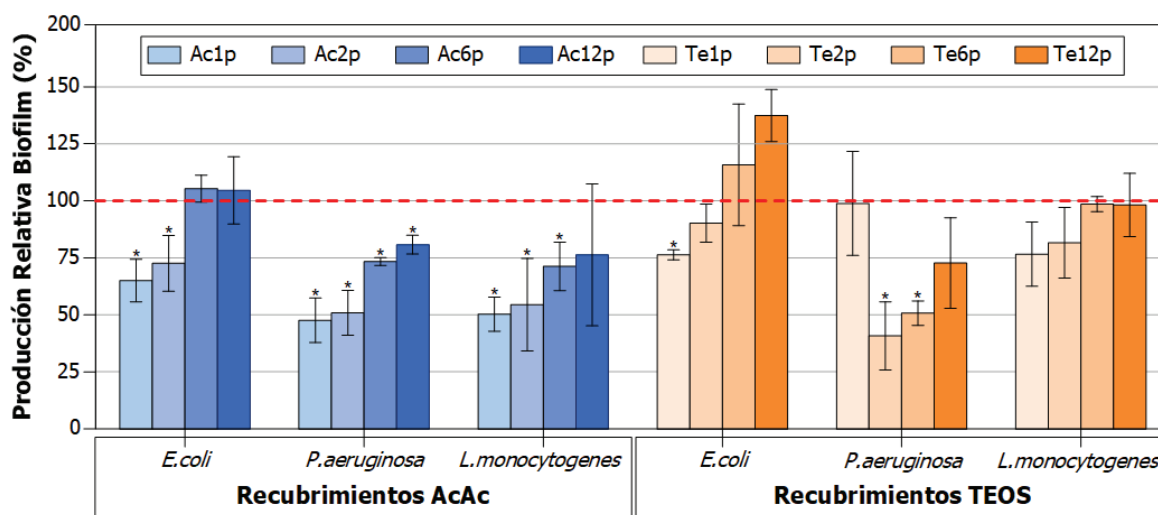


Fig. 3.1. Relative biofilm production generated on coated 3D printed PLA samples by *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria monocytogenes* [41]

Los recubrimientos plasma-polimerizados a base de AcAc provocaron modificaciones en las propiedades físico-químicas del PLA, que posteriormente se relacionaron con la mejora en la capacidad anti-biofilm.

En lo relativo a la química, se utilizó el análisis XPS para determinar la composición química elemental (C1s, O1s, N1s, Si2p) de la superficie de las Petri de PLA. En todas las muestras el contenido de nitrógeno y silicio es inferior al 1%. Por lo tanto, en la Fig. 3.2[a], se muestra el porcentaje de carbono y oxígeno del control y de las muestras recubiertas con AcAc. La Fig. 3.2[b], recoge el porcentaje relativo de cada uno de los grupos funcionales obtenidos tras la deconvolución de los espectros de alta resolución C1s. Las muestras plasma-polimerizadas presentaron mayores cantidades de oxígeno superficial en detrimento del carbono, respecto a las muestras no tratadas. Sin embargo, la composición química permanece estable independientemente del número de pasadas aplicadas. El aumento en el grado de oxidación también se observa en los grupos funcionales obtenidos en la señal C1s (Fig. 3.2[b]), donde se produjo un incremento en los grupos funcionales de oxígeno (C-O y O-C=O) y una disminución de los grupos funcionales de carbono (C-C/C-H). Al igual que para la composición elemental, las modificaciones son significativas y permanecen constantes desde la primera pasada de plasma. Este comportamiento puede deberse a la estabilidad y resistencia de los grupos O-C=O frente a las sucesivas pasadas del plasma. El aumento en el grado de oxidación superficial (ratio O/C) y específicamente en el grupo funcional O-C=O dan lugar a este incremento en la hidrofiliicidad de la superficie [32]. Las muestras de SS recubiertas con AcAc formaban ángulos de contacto inferiores a 10°, frente a un WCA de 89.5° en las placas de control sin tratar.

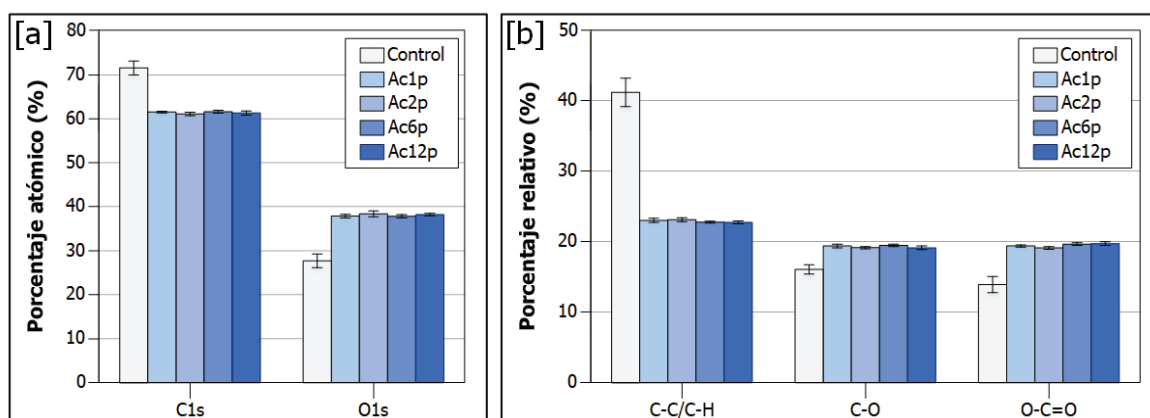


Fig. 3.2. XPS characterization: [a] Atomic percentage of C1s and O1s and [b] Relative percentages of groups found in the C1s signal of non-coated and coated samples [41]

Los resultados de caracterización química parecen indicar que la capacidad anti-biofilm de los recubrimientos de AcAc es el resultado de la disminución en la adhesión bacteriana debido a las fuerzas de repulsión producidas por la capa de hidratación que se genera sobre superficies hidrófilas [38]. Sin embargo, el distinto comportamiento anti-biofilm de los recubrimientos de AcAc en función del número de pasadas (Fig. 3.1) no se puede explicar atendiendo únicamente a la química de la superficie puesto que esta permanece constante independientemente del número de pasadas aplicadas. Por lo tanto, se estudió el efecto de la morfología de la superficie en la capacidad anti-biofilm de los recubrimientos.

Las imágenes SEM y AFM (Fig. 3.3) permitieron conocer los mecanismos de deposición del recubrimiento conforme se producían las sucesivas pasadas de la pistola de plasma sobre el sustrato. Las muestras de PLA impresas en 3D se caracterizan por una superficie rugosa, con grumos y surcos (Fig. 3.3[a]). Durante las primeras pasadas del plasma, el recubrimiento se deposita sobre los grumos mientras rellena parcialmente los surcos, lo que conllevó a un incremento de la rugosidad superficial (Fig. 3.3[b]). A su vez, la distancia entre picos disminuyó de $3,72\pm 1,89\mu\text{m}$ en las placas sin tratar, a $1,22\pm 0,84\mu\text{m}$ en las placas recubiertas con 1 pasada. Por el contrario, la superficie de los recubrimientos con mayor número de pasadas es menos rugosa, debido principalmente a que los espacios han sido completamente cubiertos por la película de AcAc (Fig. 3.3[c,d]). En estos casos, se obtuvo un perfil más suave con mayor distancia entre picos, alcanzando los $8,83\pm 3,67\mu\text{m}$ en los recubrimientos con mayor número de pasadas. Previamente, otros autores declararon que cuando la distancia entre picos es 2-3 veces menor que las dimensiones de la bacteria, éstas sufren deformaciones que pueden provocar la ruptura de la membrana y la muerte celular, limitando la adhesión y proliferación de las mismas [39,40]. En este estudio en particular, la menor cantidad de biofilm se produjo en las muestras Ac1p y Ac2p, cuya distancia media entre picos fue de $1,22\pm 0,84\mu\text{m}$ y $1,70\pm 1,22\mu\text{m}$, respectivamente. Es decir, la generación de una morfología que limite el área de contacto entre la bacteria y sustrato podría ser la clave de que los recubrimientos Ac1p y Ac2p, a pesar de tener una naturaleza química idéntica al resto, generen la menor cantidad de biofilm para las bacterias analizadas.

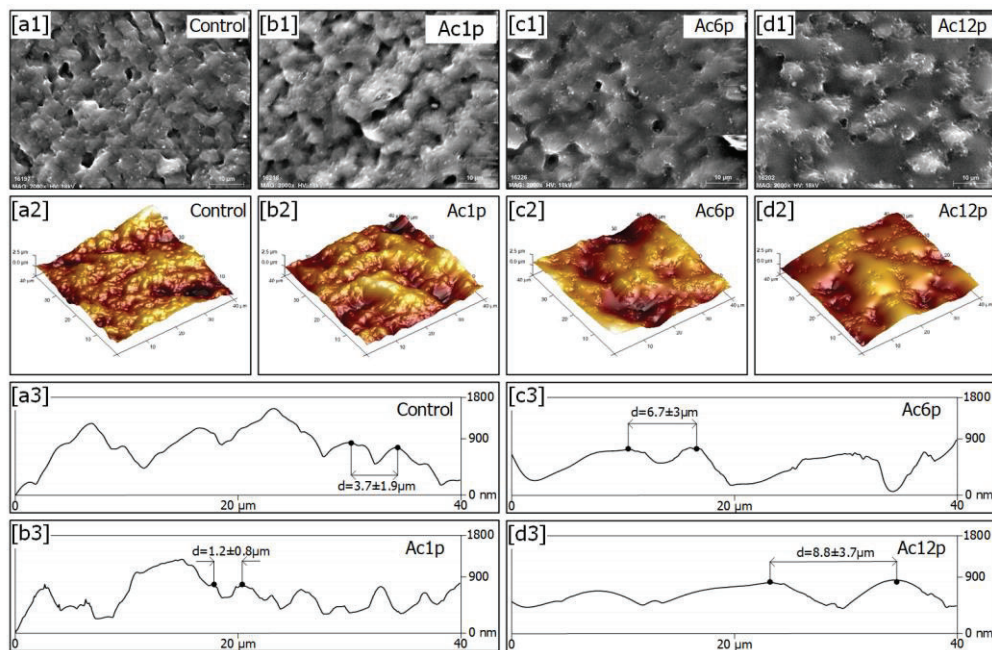


Fig. 3.3. Morphology characterization: [a] Scanning electron microscopy (SEM) images ($\times 2.000$), [b] Atomic force microscopy (AFM) images ($40\times 40\mu\text{m}$) and [c] Profiles (d =distance between peaks, μm) of non-coated and AcAc coated PLA samples [41]

En el siguiente trabajo (I. Muro-Fraguas et al [45]), se evaluaron los recubrimientos más eficaces del estudio anterior (recubrimientos a base de ácido acrílico) sobre otra serie de cepas bacterianas cuya presencia está más focalizada en los entornos hospitalarios. Una de las principales diferencias de los nuevos microorganismos analizados, es que las cepas de *S. aureus* presentan una forma esférica con tamaños que oscilan entre los $0,5\text{-}1\mu\text{m}$ de diámetro, menor longitud que la distancia entre los picos generados en la superficie de cualquiera de los recubrimientos de AcAc aplicados con anterioridad. Es decir, para estas las nuevas cepas de *S. aureus*, la distancia entre los picos no tuvo efecto en la producción de biofilms. Por lo tanto, ahora se pretende investigar si los recubrimientos de plasma

mantienen la capacidad anti-biofilm a pesar de las modificaciones en el tamaño y forma de las nuevas bacterias a evaluar. Al igual que en el estudio anterior, los recubrimientos de AcAc fueron aplicados con distinto número de pasadas sobre placas Petri de PLA impresas en 3D.

De manera concreta, la siguiente tabla recoge los recubrimientos aplicados en este segundo estudio. Los valores del resto de parámetros del proceso de plasma quedan definidos en la sección 2.2.

Muestra	Número de pasadas
Sin tratar (control)	-
Ac1p	1
Ac2p	2
Ac6p	6
Ac12p	12

Table 5. Sample identification and number of passes applied [45]

Para cada uno de los nuevos microorganismos estudiados, la producción relativa de biofilm en función del tratamiento aplicado se muestra en la Fig. 3.4. Los resultados de biofilm sobre las cepas de *P. aeruginosa* son muy similares a los obtenidos en el estudio anterior, puesto que la cantidad de biofilm generado fue mayor conforme aumentaba el número de pasadas del plasma. Para todas las cepas de *P. aeruginosa* con excepción de la cepa PS1.056, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el biofilm producido fueron observadas entre los recubrimientos aplicados con una, dos y seis pasadas respecto a las placas de control. Concretamente, la mayor capacidad anti-biofilm se obtuvo con el recubrimiento Ac1p, el cual mostró una producción relativa de biofilm de $25,8 \pm 3,7\%$ por la cepa Ps204, $27,7 \pm 3,5\%$ por Ps713, $47,7 \pm 9,5\%$ por PAO1 y $85,3 \pm 19,4\%$ por Ps1.056. Las cepas de *S. aureus* también sufrieron considerables limitaciones en el biofilm producido cuando se depositaron sobre placas plasma polimerizadas con AcAc, en mayor medida sobre los recubrimientos con menor número de pasadas. Los recubrimientos que aplicaron 1 y 2 pasadas redujeron significativamente ($p < 0,05$) el biofilm generado para todas las cepas de *S. aureus* con la excepción de la cepa de referencia ATCC2.9213. Los resultados parecen indicar que en las cepas de *S. aureus* son necesarias 2 pasadas de plasma para maximizar las propiedades anti-biofilm del sustrato. En este caso, la producción relativa de biofilm fue del $40,1 \pm 11,6\%$ por la cepa W1.570, $40,9 \pm 11,9\%$ por W1.571, $48,0 \pm 14,0\%$ por W1.569 y $102,6 \pm 13,4\%$ por *S. aureus* ATCC2.9213.

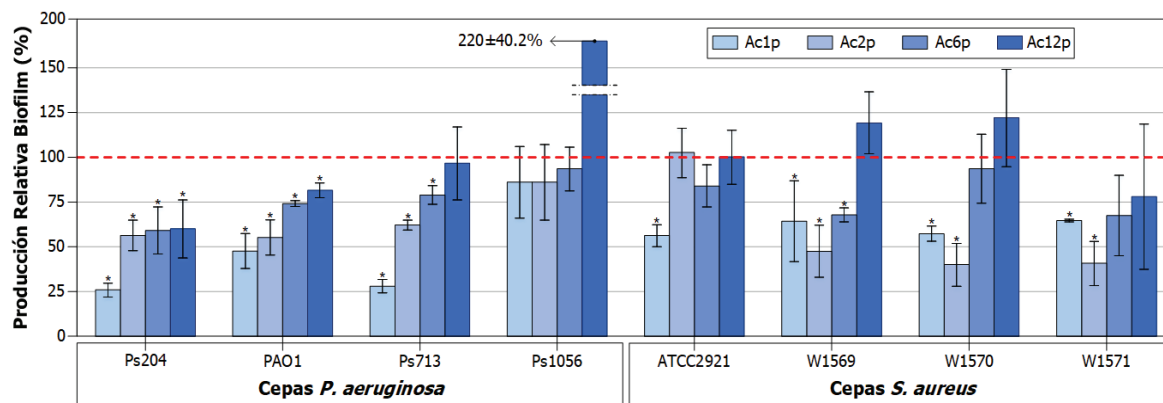


Fig. 3.4. Relative biofilm production generated on coated 3D printed PLA samples by *P. aeruginosa* and *S. aureus* strains [45]

Para tratar de conocer de un modo más preciso los aspectos que rigen los mecanismos de deposición de los distintos tipos de microorganismos en el sustrato, se realizó una caracterización morfológica con mayor grado de detalle.

La Fig. 3.5 muestra la rugosidad promedio (R_a) y la relación de área interfacial desarrollada (S_{dr}) en función del número de pasadas de plasma aplicadas. La duración del tratamiento de plasma tuvo un efecto directo sobre la morfología de las muestras. A medida que se aplican las primeras pasadas de plasma la superficie se vuelve más rugosa y texturizada, alcanzando un valor máximo de $8,6 \pm 1,6\%$ tras una única pasada de plasma. La rugosidad continúa aumentando cuando la superficie de PLA fue expuesta a dos pasadas de plasma, alcanzando un valor de

531,5±31,6nm. El incremento de la rugosidad y la textura superficial es provocado por el llamado “efecto sombreado” que tiene lugar durante la deposición de los recubrimientos [82]. En la primera etapa del tratamiento, las partículas plasma-polimerizadas inciden prioritariamente en las zonas más elevadas de la superficie. Dichas partículas pueden adherirse a la muestra o rebotar. Estas últimas, podían llegar a depositarse en las áreas más bajas de la muestra. Un incremento en la rugosidad de las muestras potencia la generación de la capa de hidratación descrita en el estudio anterior, lo que conlleva a una mayor capacidad anti-biofilm de los recubrimientos. De acuerdo con el modelo de Wenzel [44], un determinado material sólido con una tendencia positiva a la humectación se humedecerá con mayor facilidad conforme más rugosa sea su superficie. Por otro lado, si la superficie lisa es repelente al agua, la superficie rugosa lo será con mayor fuerza. Posteriormente, conforme se incrementa la duración de los tratamientos, los recubrimientos de AcAc van rellenando los surcos, lo que condujo a una superficie más lisa con menor rugosidad; y por lo tanto, a una pérdida del comportamiento anti-biofilm. Tras 12 pasadas de plasma, ambos parámetros (Ra y Sdr) son inferiores a los presentados por las muestras de PLA sin tratar

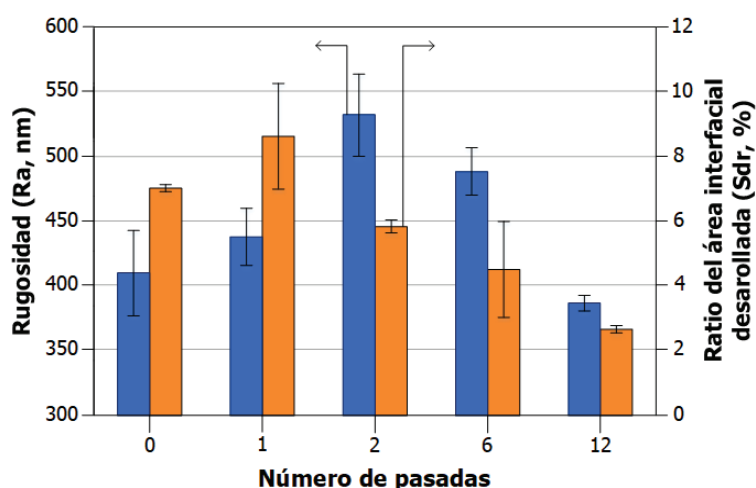


Fig. 3.5. Average roughness (Ra, nm) and developed interfacial area ratio (Sdr, %) of non-coated and AcAc plasma-polymerized samples [45]

Atendiendo a los resultados obtenidos en estos dos primeros trabajos, fue posible establecer una relación en la producción de biofilm, en función del grado de oxidación superficial y la morfología de las placas. Con el fin de aclarar estos aspectos, la Fig. 3.6 recoge los mecanismos que rigen la adhesión de las bacterias en función de su forma y dimensiones, rugosidad superficial y el espesor de la capa de hidratación. La mayor cantidad de grupos carboxilo en los recubrimientos plasma-polimerizados aumentan la hidrofiliidad de las muestras, dando lugar a la generación de una capa de hidratación con fuerzas repulsivas que limita la adhesión bacteriana y por tanto la producción de biofilm (Fig. 3.6[b-d]). Los mecanismos de deposición del recubrimiento, como el efecto sombra, producen un aumento en la rugosidad de la superficie durante las primeras pasadas del plasma. Tal efecto repercute en el grosor de la capa de hidratación, potenciando el comportamiento anti-biofilm del recubrimiento (Fig. 3.6[b1]). A su vez, el perfil de la superficie influye notablemente en la adhesión bacteriana cuando los microorganismos presentan una forma de bacilo con mayor tamaño como fue el caso de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *L. monocytogenes*. En estos casos, los recubrimientos de plasma con menor número de pasadas han desarrollado un perfil con forma de “dientes de sierra” que reduce el área de contacto entre los microorganismos y la superficie, limitando la adhesión y proliferación bacteriana (Fig. 3.6[b2]).

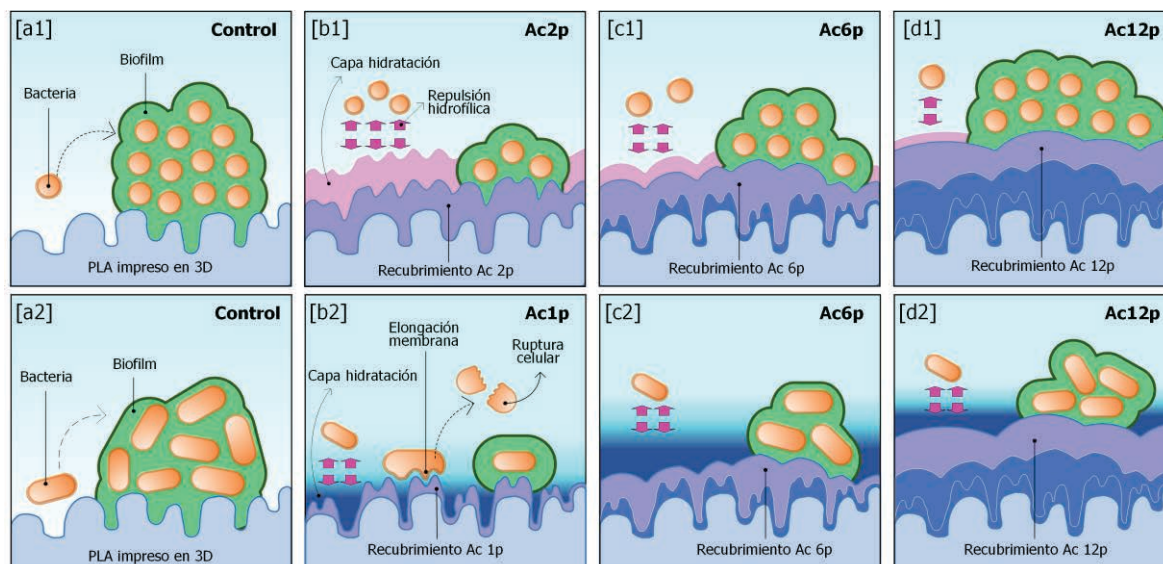


Fig. 3.6. Scheme of [1] round and [2] bacillus-shape bacteria adhesion according to the physicochemical properties of [a] Non-coated and [b-d] AcAc coated samples [41,45]

3.2. Durability evaluation of the anti-biofilm capacity of the plasma-polymerized coatings

En I. Muro-Fraguas et al [49], placas Petri de acero inoxidable AISI 316 fueron recubiertas mediante plasma-polimerización a base de dos precursores aplicados de forma consecutiva: un primer recubrimiento de APTES para promover la adhesión con la superficie de la muestra y un segundo recubrimiento a base de AcAc para dotar de la capacidad anti-biofilm deseada. La siguiente tabla recoge la designación de la muestra y el número de pasadas aplicado con cada precursor. La configuración completa del tratamiento está definida en la sección 2.2.

Muestra	Precursor base	Pasadas	Precursor funcional	Pasadas
Sin tratar (control)	-	-	-	-
AP10 + AA6	APTES	10	AcAc	6

Table 6. Sample identification and number of passes applied for each precursor [49]

La capacidad anti-biofilm de dicho tratamiento ya fue evaluada frente a diferentes cepas de *E. coli* y *L. monocytogenes*, en un trabajo anterior, P. Fernández-Gómez et al [19], de autoría compartida. La capa de hidratación generada en la superficie de la muestra como consecuencia de la elevada hidrofiliidad del recubrimiento aplicado, fue la responsable del comportamiento anti-biofilm de la película. Se alcanzaron reducciones del 74% tras la incubación a 37°C. Cuando la temperatura de incubación se redujo a los 12°C (temperatura representativa de los entornos de procesado de alimentos), el efecto anti-biofilm de la capa de hidratación se potenció debido a la mayor humectabilidad de las cepas, logrando reducciones del 90%.

En este nuevo estudio, se determinó la producción relativa de las placas recubiertas tras someterlas a cinco ciclos de limpieza con dos de los desinfectantes más comunes en la industria alimentaria: hipoclorito de sodio al 0,05% (NaOCl) y ácido peracético al 0,5% (C₂H₄O₃) (Fig. 3.7). El recubrimiento AP10+AA6 limitó significativamente el biofilm generado, con una producción relativa del 14,6% respecto a las muestras sin tratar. Tales resultados confirmaron la capacidad anti-biofilm del recubrimiento cuando este se expone durante 6 días a un biofilm compuesto por múltiples cepas, escenario más realista que el estudio anterior. Tras los ciclos de limpieza, el recubrimiento sigue exhibiendo una capacidad anti-biofilm, aunque su efectividad difiere en función del desinfectante aplicado. La producción relativa de biofilm tras el empleo de NaOCl fue del 27,9%, lo que indica que la efectividad de la película no se perdió tras los procesos de desinfección. Sin embargo, tras la exposición a

$C_2H_4O_3$ el biofilm generado aumento hasta el 82,3% respecto a las muestras sin tratar; valores estadísticamente superiores que los del recubrimiento que no se sometió a los procesos de limpieza.

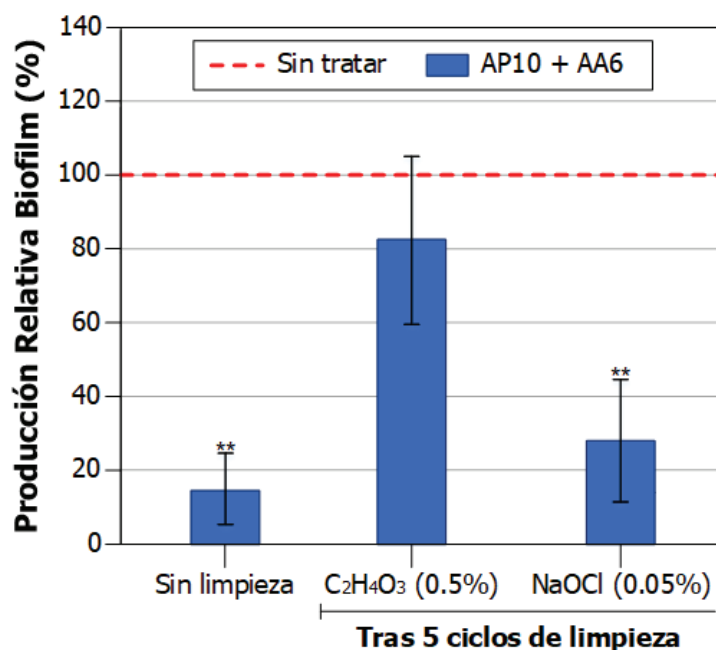


Fig. 3.7. Relative biofilm production of the three-strain *L. monocytogenes* cocktail on non-coated and coated samples under the two different sanitization scenarios [49]

La Fig. 3.8 recoge los resultados de caracterización morfológica (imágenes SEM y AFM) realizados sobre las muestras de acero inoxidable sin recubrir y recubiertas; antes y después de ser expuestas a los cinco ciclos del proceso de desinfección. Los surcos presentes en la superficie de la placa control de SS (Fig. 3.8[a]) fueron tapados por el recubrimiento plasma-polimerizado (Fig. 3.8[d]), dando lugar a una superficie más lisa. La generación de una superficie con menor rugosidad y la eliminación de los surcos contribuyeron a la limitar la adhesión y proliferación bacteriana. Tras los procesos de desinfección (Fig. 3.8[e,f]), se vuelven a apreciar los ranuras de la base del acero inoxidable, pero de una manera menos evidente que en las muestras sin tratar con plasma (Fig. 3.8[b,c]). Dichas imágenes parecen indicar que los procesos de desinfección causaron un deterioro del recubrimiento de plasma, haciendo que parte del mismo se desprendiese, provocando una disminución del espesor de la película. A pesar de ello, la rugosidad de la superficie sometida a la desinfección fue menor que la de las muestras sin tratar. Es decir, la morfología del recubrimiento continuó desempeñando un papel clave en la reducción de la adhesión bacteriana tras los procesos de desinfección.

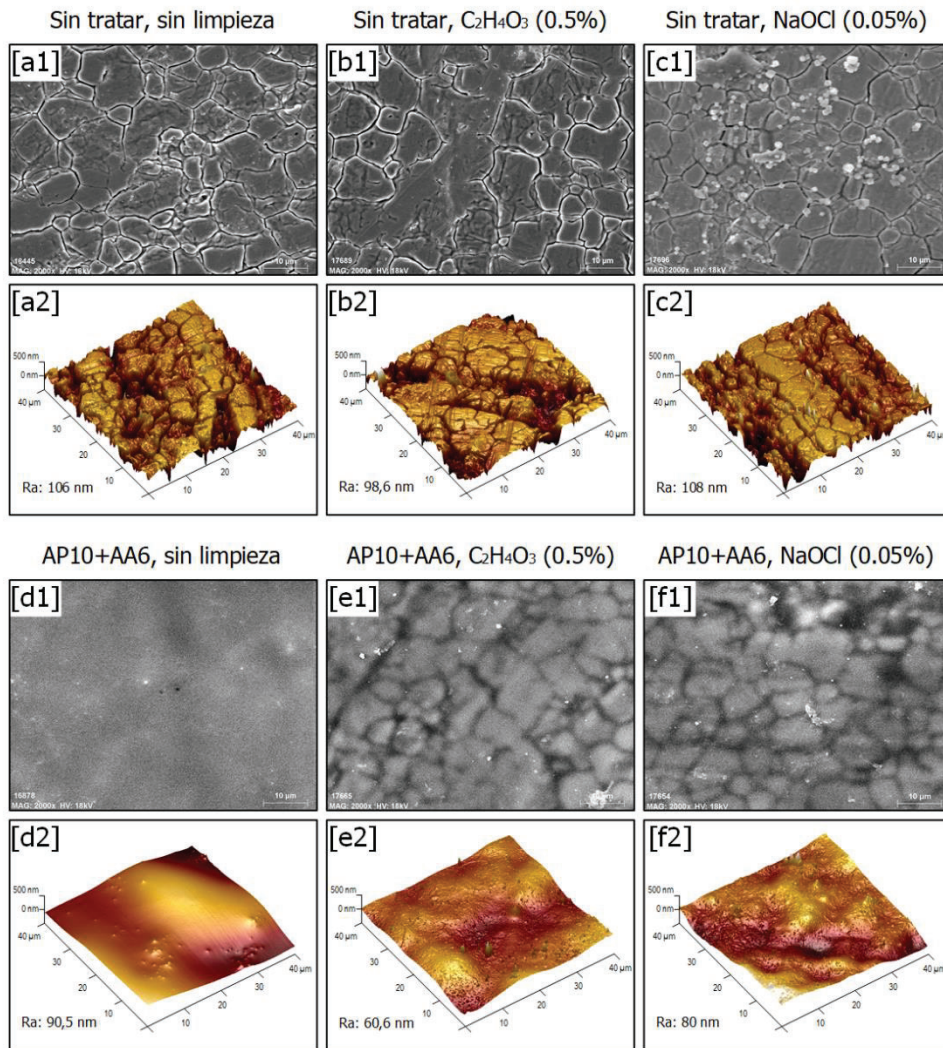


Fig. 3.8. [1] SEM images (x2.000) and [2] AFM images (40x40 μ m) of the [a-c] non-coated and [d-f] coated samples before and after the sanitization cycles [49]

Los resultados de caracterización morfológica no mostraron grandes diferencias en las superficies expuestas a hipoclorito de sodio y ácido peracético. De modo que, para justificar las diferencias en su capacidad anti-biofilm se analizó la composición química de los sustratos. La Table 7 recoge la composición química elemental (%) de las placas de acero recubiertas y sin recubrir antes y después de los procesos de limpieza. Además, con el objetivo de conocer hasta qué profundidad los ciclos de limpieza afectan negativamente al recubrimiento depuesto, se ha realizado un análisis XPS sobre una muestra recubierta únicamente con la capa base de APTES (AP10). La presencia de hierro y cromo, características del acero AISI 316, observada en las muestras sin recubrir no fue detectada sobre la superficie recubierta con AP10 + AA6 ni antes ni después de la limpieza independientemente del desinfectante empleado. Lo que demuestra que el recubrimiento no fue eliminado por completo tras los ciclos de limpieza. A pesar de que el silicio es un componente característico de la película base de APTES (11,1%), no se apreciaron porcentajes significativos de silicio en las muestras recubiertas antes de los procesos de limpieza. Es decir, la capa de AcAc cubre completamente la de APTES eliminando cualquier resto de silicio. Sin embargo, la composición de silicio en las muestras recubiertas aumentó hasta el 4,5% y 5,9% tras la desinfección mediante ácido peracético e hipoclorito de sodio, respectivamente. Este hecho sugiere que, los desinfectantes producen un deterioro parcial en el recubrimiento de AcAc.

Muestra	Sin tratar (control)			AP10+AA6			AP10	
Desinfectante	-	C ₂ H ₄ O ₃	NaOCl	-	C ₂ H ₄ O ₃	NaOCl	-	
Composición elemental (%)	C1s	54,0	47,4	59,1	66,7	66,8	58,3	48,6
	N1s	1,3	2,1	0,7	2,5	3,0	3,5	5,1
	O1s	33,6	30,3	26,7	30,6	25,8	28,9	35,2
	Si2p	-	-	0,7	0,2	4,5	5,9	11,1
	Fe2p	9,3	15,7	6,8	-	-	-	-
	Cr2p	1,8	3,6	1,0	-	-	-	-
	Na1s	-	-	4,2	-	-	2,1	-
	Cl2p	-	-	0,8	-	-	1,3	-

Table 7. Elemental composition of the analyzed surfaces [49]

Como se observó en los estudios anteriores de la presente tesis, la oxidación de la superficie influye en la capacidad anti-biofilm al incrementar la humectabilidad de la misma debido a la generación de grupos que contienen oxígeno, como C-O, C=O y O-C=O. En la Fig. 3.9 se observa la deconvolución de las regiones C1s de los espectros XPS, realizada para cuantificar el porcentaje de grupos polares basados en oxígeno. Los grupos polares basados en oxígeno se muestran apilados en una misma columna. Tal porcentaje aumentó de un $29,8 \pm 0,9\%$ a un $54,6 \pm 3,8\%$ tras la aplicación del tratamiento con plasma. En las muestras sin tratar no se observaron diferencias significativas en la región C1s antes y después de los procesos de desinfección. Sin embargo, el porcentaje relativo a los grupos polares que contienen oxígeno disminuyó tras la desinfección de las muestras recubiertas ($43,2\%$ - $47,2\%$). Atendiendo a la relación entre la composición de oxígeno y carbono, se puede determinar que, cuanto mayor es el grado de oxidación de la superficie (sin limpieza > NaOCl > C₂H₄O₃), mayor es su capacidad anti-biofilm. Al igual que lo observado anteriormente, la deconvolución de la señal C1s sugirió que los procesos de limpieza causaron un deterioro parcial del recubrimiento de AcAc; más notable en las muestras sometidas a ácido peracético.

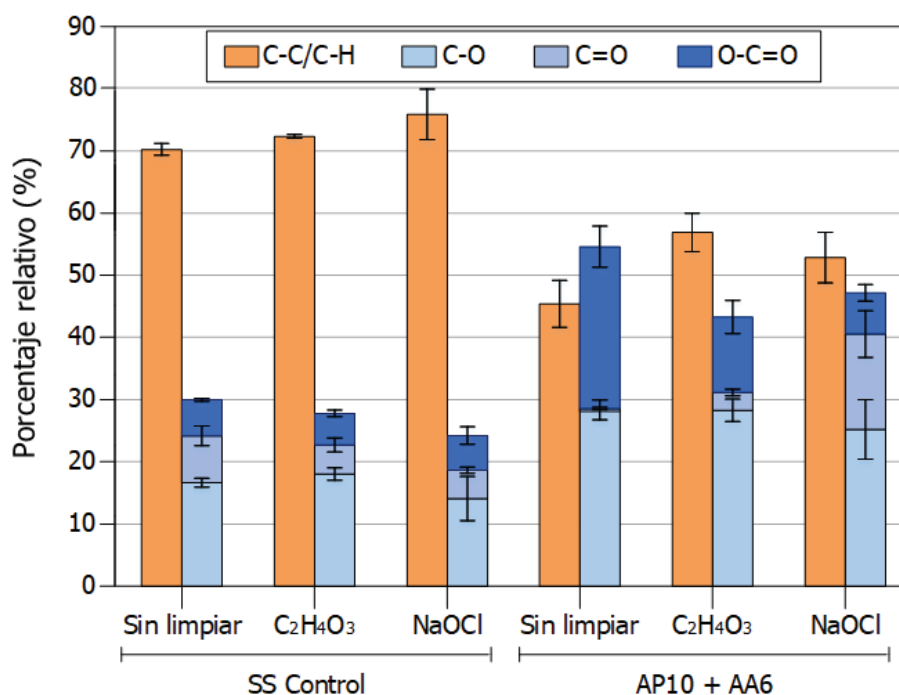


Fig. 3.9. Relative percentages of surface chemical groups in the C1s XPS region of the analyzed samples [49]

Los grupos de ácido carboxílico (COOH) tienen diferentes comportamientos ante la exposición a ambientes ácidos ($\text{pH} < 7$) o alcalinos ($\text{pH} > 7$). En condiciones de pH alto, se desprotonan formando aniones carboxilato (COO⁻),

generando recubrimiento más polares e hidrófilos, lo que resulta en una menor adherencia bacteriana [83,84]. De modo que, para cuantificar la cantidad de grupos COOH y aniones COO⁻ antes y después de los procesos de limpieza y determinar la influencia del pH del desinfectante en la durabilidad del recubrimiento, se estudiaron los espectros completos de FTIR-ATR sobre las muestras recubiertas, con una vista cercana de la región de identificación de los grupos COOH y COO⁻ (1.500–1.800cm⁻¹) (Fig. 3.10). Los picos situados a 1.560cm⁻¹ y 1.710cm⁻¹ se deben a la presencia de aniones COO⁻ y grupos COOH, respectivamente. Los resultados indicaron un mayor grado de desprotonación del grupo carboxilo en aniones COO⁻ cuando el recubrimiento fue expuesto a soluciones alcalinas (hipoclorito de sodio, pH=10,4) respecto a soluciones ácidas (ácido peracético, pH=3,1). Este hecho promovió la durabilidad del recubrimiento, al dotar a la superficie de una carga electronegativa que favorece la repulsión electrostática de las bacterias; compensando así el deterioro parcial de la película de AcAc.

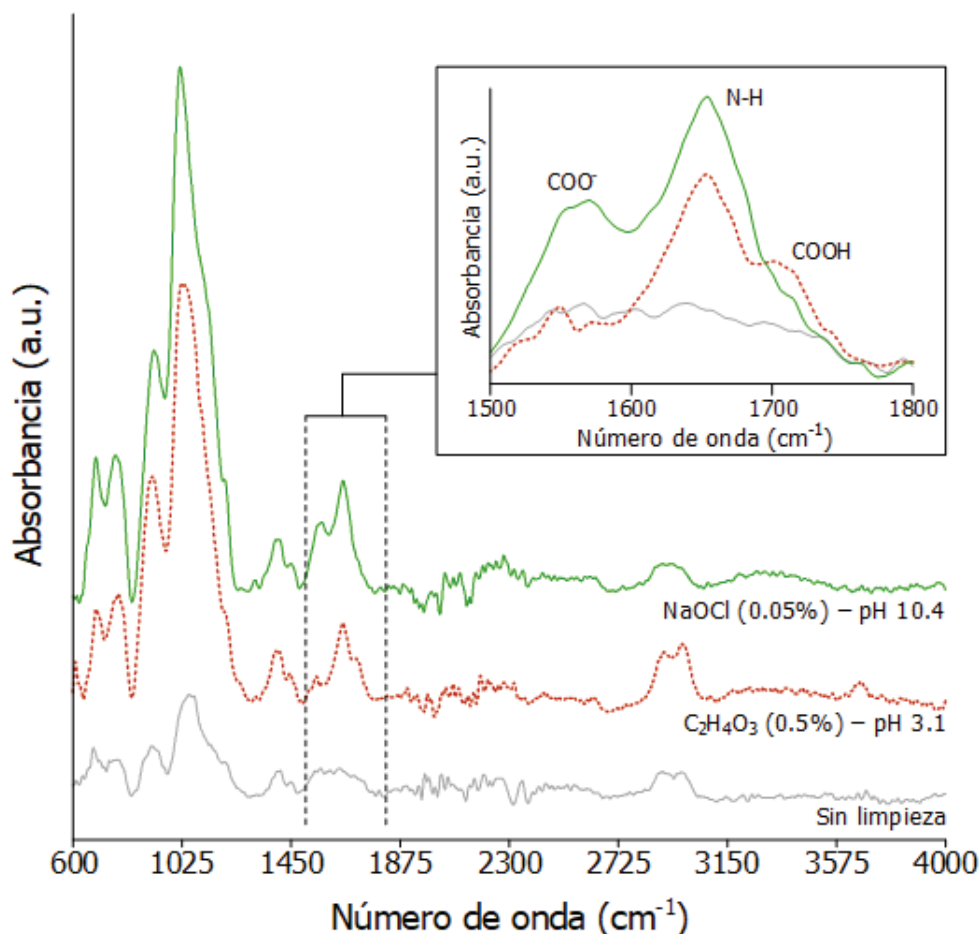


Fig. 3.10. FTIR-ATR spectra and close view of the region related with the presence of COOH groups and COO⁻ anions, of the coated sample (AP10+AA) before and after the sanitization processes [49]

La hipótesis anterior, fue corroborada con la medición del ángulo de contacto del agua sobre las placas de control y recubiertas a lo largo de los sucesivos ciclos de limpieza (Fig. 3.11). La hidrofiliidad de las muestras recubiertas sin limpiar (WCA=20°) se deterioró gradualmente desde el primer ciclo de limpieza con ácido peracético hasta alcanzar un WCA=40° tras los cinco ciclos. Sin embargo, la hidrofiliidad continuó aumentando tras la primera limpieza con hipoclorito de sodio debido a la desprotonación de los grupos COOH, y no fue hasta el segundo ciclo cuando el recubrimiento comenzó a degradarse parcialmente. A pesar de ello, la humectabilidad de las muestras sometidas a NaOCl fue similar antes y después de los 5 ciclos de desinfección.

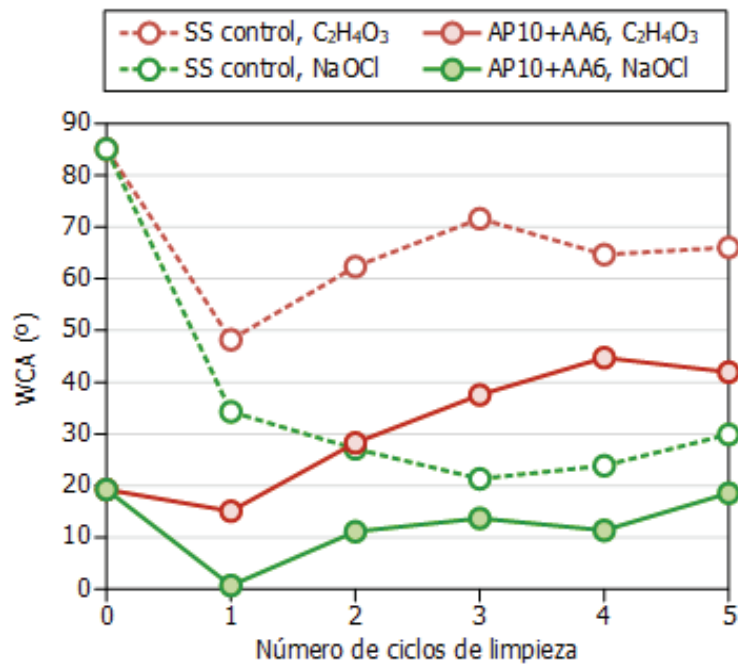


Fig. 3.11. Evolution of the WCA of the non-coated and coated samples subjected to five sanitization cycles with peracetic acid and sodium hypochlorite [49]

Chapter 4. CONCLUSIONS AND FUTURE RESEARCH

4.1. Conclusions

In this thesis, atmospheric-pressure plasma jet (APPJ) technology was employed to deposit coatings that limit the bacterial adhesion and the subsequent biofilm formation, on stainless steel substrates (the main material used in food processing facilities) and polymers made by 3D printing (a constantly growing technology in the health sector). The carried out essays have made it possible to identify the coating deposition mechanisms on the surface of the substrate, its physio-chemical properties, the superficial changes that occur on the substrate due to the modification of the plasma-polymerization process parameters; as well as the relationship between the established parameters and the anti-biofilm character of the coatings. In view of the results, it can be concluded that the proposed objectives have been successfully fulfilled. This chapter describes the key findings of the three scientific articles that make up this doctoral thesis.

In I. Muro-Fraguas et al [41], plasma-polymerized coatings based on TEOS and AcAc were applied on 3D printed PLA samples, which reduce biofilm formation against three of the main microorganism observed in food processing environments: *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* and *E. coli*. In general, the effectiveness of the coatings was higher in those that applied a lower number of passes. In turn, AcAc-based coatings achieved greater reductions than TEOS-based coatings. The best anti-biofilm nature was obtained by applying only one pass of AcAc, achieving biofilm reductions of 53,3%, 49,6% and 35,9% against *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* and *E. coli*, respectively; compared to non-coated samples.

In order to generate an anti-biofilm surface, attention must be paid to the wettability of the coating, the roughness of the surface and the size and shape of the microorganism that form the biofilm. The coatings increased the hydrophilic nature of the surface of the PLA samples due to the addition of polar groups based on oxygen such as C-O and O-C=O. This fact gave rise to the tendency of the water molecules to be oriented towards the surface as a result of the attractive interaction between the water molecules and the oxygen groups presents on the surface of the substrate, causing the generation of the hydration layer. Consequently, repulsive forces that limit bacterial adhesion (the first step in biofilm formation) are generated. In the case of AcAc coatings, the chemistry and surfaced wettability remained unchanged. However, TEOS-based coatings showed higher abundance of O-C=O and a higher hydrophilic nature when a reduced number of passes were applied. This fact contributed to restrict the bacterial adhesion as the number of applied passes decreased.

As regard the morphology of the surface, the cracks and grooves characteristic of the 3D printing technology were partially filled in as the successive plasma gun passes were applied. These modifications depend mainly on the applied coating and not only on the effect caused by the plasma flow itself. In the long term, this process resulted in smoother surfaces with less roughness. However, it was observed that AcAc film significantly increased the roughness of the surface along the first passes, a “saw tooth” pattern coating. This shape is ideal for limiting bacterial adhesion, since when the surface distance between peaks (tooth) is 2-3 times lower that the bacteria cellular length, the contact area between the bacteria and the substrate is reduced, causing the deformation and a potential rupture of the cellular membrane.

In the second work of the thesis, I. Muro-Fraguas et al [45], the biofilm production was measured on AcAc-based coatings (liquid precursor with the best anti-biofilm character of the previous study) deposited on 3D printed PLA samples. In this case, the biofilm generation was evaluated using antimicrobial-resistant clinical strains of *P. aeruginosa* and *S. aureus*, which are of big concern in the health field. The results were in agreement with those previously obtained, the anti-biofilm property is greater in those coatings that applied a lower number of passes. In general, the reductions obtained are around 50% for the *P. aeruginosa* and *S. aureus* strains, reaching a maximum of 75% after contamination with Ps204 and Ps713 *P. aeruginosa* strains.

A study in more detail about the effect that the morphology of the AcAc coatings had on the hydrophilic repulsion mechanism was developed. It was verified that the layer by layer deposition of the coatings caused a “shadow effect” on the substrate. During the first passes, the plasma-polymerized particles mainly have an impact on the highest areas of the surface, which adhere to it or bounce until finally being deposited in the deepest areas of the sample. This process results in an increment of the roughness and surface texture along the first passes of the

plasma. According to the Wenzel model, an increase in the roughness of the sample will enhance the wettability of the coating. That is, the increase in roughness causes the hydrophilic surfaces become even more hydrophilic, increasing the thickness of the hydration layer and therefore promoting greater anti-biofilm behavior of the coating. On the contrary, the anti-biofilm effect decreases as the duration of the treatments increases due to the fact that the AcAc film fills in the grooves, generating a smoother surface with less roughness. *P. aeruginosa* strains showed higher restrictions in biofilm production than *S. aureus*, due to the bacillus shape and the larger size of the *P. aeruginosa* strains (mechanism identified in the previous work).

In this first group of publications, it has been verified that, despite not obtaining a total inhibition of the biofilm formation mechanisms, the atmospheric-pressure plasma-polymerized coatings are an innovative and effective solution to help to mitigate the limitations of 3D printing technology in food contact applications and the health sector.

In the third and last work, I. Muro-Fraguas et al [49], the anti-biofilm effectiveness of the coating applied on a stainless steel surface was evaluated against a multi-bacteria biofilm generated by three strains of *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* is a bacteria that commonly develops in food due to cross-contamination on production lines and causes serious health problems. AP10+AA6 coating, made up of two layers, a first one of APTES to ensure the adhesion between the coating and the surface of the substrate, and a top layer of AcAc to promote the anti-biofilm character. Reductions of 85,4% in the biofilm generated were obtained regarding uncoated samples.

Afterwards, the durability of the anti-biofilm activity was evaluated. For that, coated and non-coated samples were subjected to five sanitization cycles with two of the most widely used disinfectants in the food processing facilities: sodium hypochlorite and peracetic acid. The durability of the coating was very different according to the disinfectant applied. Reductions in biofilm generated reached 72,1% when sodium hypochlorite was used but decreased to 17,7% after exposure to peracetic acid. The physio-chemical characterization results showed a partial deterioration of the AcAc layer, which led to a loss of polar groups based on oxygen (C-O, C=O and O-C=O), reducing the hydrophilicity of the coating, the hydrophilic repulsion forces and consequently the anti-biofilm behavior. The partial deterioration of the coating was compensated by the deprotonation of the carboxylic acid groups (COOH) present in the AcAc layer, when the samples were subjected to sodium hypochlorite disinfection. The high pH of the solution (pH=10,4) promoted the deprotonation of the carboxyl groups in COO⁻ anions, an aspect that did not occur in the acid solution of peracetic acid (pH=3,1). The generation of COO⁻ anions avoided the loss of the hydrophilicity of the coating (WCA<20° after five sanitization cycles with NaOCl) and provided the surface with an electronegative charge that increased the electrostatic repulsion of the bacteria.

Based on the results obtained, it can be concluded that AP10+AA6 coating is compatible with alkaline disinfectants, such as sodium hypochlorite. Since atmospheric plasma technology can be easily implemented in the current production lines, the findings in this thesis are a promising step towards achieving durable antibacterial surfaces without the need to use toxic chemical compounds with negative effects on the skin and human health and the environment.

4.2. Future research

This chapter defines the proposals to continue and improve the current research related to the achievement of anti-bacterial surfaces through the previous application of atmospheric-pressure plasma-polymerized coatings.

4.2.1. Toxicity evaluation of the anti-biofilm coatings developed

Taking into account that the coatings developed in this thesis are intended to be employed on food and/or human tissue contact surfaces, the evaluation of the toxicity is a key factor that must be analyzed.

Acrylic acid, the atomized liquid in the developed coatings of this thesis, is not classified as a toxic chemical compound, does not cause adverse effects on the reproductive organs and does not contain any hazardous material according to the exposure limits established by the regulatory organizations. Despite this, inhalation or ingestion of

AcAc can be harmful, causing skin burns and respiratory tract irritation in the most severe cases [85]. Therefore, to verify the safety of the applied coatings, any possible toxic effect must first be identified and evaluated.

4.2.2. Improvement of the anti-biofilm character of the coatings

Biofilm production may continue to be limited, to a greater extent on 3D printed PLA parts. For that, two really interesting options could be the modification of the liquid precursor and the use of new gases for the plasma generation.

Regarding the chemical compounds, it should be tested those able to generate hydrophilic surfaces that promotes the formation of the hydration layer (through the production of hydroxyl and carboxyl groups) and the generation of repulsive forces, such as oleic acid ($C_{18}H_{34}O_2$), succinic acid ($C_4H_6O_4$) or polyethylene glycol methyl ether methacrylate (PEGMA, $(C_2H_4O)_nC_5H_8O_2$). These chemicals are non-toxic and are not classified as carcinogenic, corrosive or skin irritants [86,87]. Oleic acid is a fatty acid that occurs naturally in animal and vegetable fats and oils. Its anti-microbial activity has been reported mainly against Gram-positive bacteria. In Huang et al. [88], the anti-bacterial effectiveness against oleic acid-loaded liposomes of *S. aureus*. In turn, toxicity tests in mice determined the biocompatibility of oleic acid with mouse skin. This results suggested that oleic acid will not cause any toxicity in the human epidermis due to its greater thickness. Succinic acid shows good anti-microbial properties, whose compatibility and use on food contact surfaces has been widely reported. The results obtained in Radkowski et al [89], showed that a 2% succinic acid solution was able to reduce *Salmonella* levels in chicken samples. Regarding PEGMA, it is a chemical commonly used to incorporate hydrophilic groups in polymeric surfaces, thus favoring the formation of the hydration layer and the consequent appearance of the hydrophilic repulsion mechanisms developed in this thesis.

On the other hand, an alternative to the described process in this thesis would be to determine the anti-bacterial effectiveness of the coatings using air (instead of nitrogen) as gas for plasma generation. The use of air could improve the surface wettability and increase the anti-bacterial capacity due to the generation of reactive oxygen species, whose formation would not be limited to the presence of oxygen in the surrounding atmosphere. Another advantage of air over nitrogen is its lower economic cost [6].

4.2.3. Evaluation of the anti-biofilm character of the coatings against other bacteria

As mentioned above, biofilms generated in industrial environments are complex structures made up of various microorganisms, whose eradication capacity will depend on their size, shape and electrical potential. Therefore, it is essential to analyze the antimicrobial properties of the generated coatings against the greatest number of bacterial species.

In this thesis, the samples were contaminated with the main bacteria identified in food processing facilities and in the clinical sector. However, the literature describes another microorganisms commonly found in such environments, despite the fact that the genus of the identified strains differs depending on the type of industry analyzed, the conditions in the processing plants and the methodology employed. Apart from the microorganism mentioned throughout this thesis, *Enterobacteriaceae serratia*, *Acinetobacter*, *Aeromonas spp.*, *Microbacterium spp.*, *Rhodococcus spp.* and *Salmonella* are other bacteria commonly observed in food processing facilities [90]. This study can be completed with the analysis of *Micrococcus luteus* and *Bacillus spp.*, bacteria widely detected in the surrounding air of hospital operating rooms [91].

4.2.4. Evaluation of the anti-biofilm character of the coatings over other substrates

The low temperatures reached during atmospheric-pressure cold plasma-polymerized treatments allow its application on a wide variety of materials, including heat-sensitive polymeric materials. Taking advantage of this technology, the effectiveness of the developed coatings will be verified on other substrates, such as plates for heat exchangers and cheese making molds, widely used in the dairy industry.

According to data from the Spanish Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, the dairy industry covers the 2% of the Spain industrial production, generating more than 60.000 direct jobs and turn over around 13 million euros per year. Total milk production increased by 7% between 2.016 and 2.020, reaching an annual production of 7.450 tons in the last period. In the European Union, Spain ranks seventh in terms of dairy production, covering 5% of

the total [92]. So, it is a sector in constant growing, whose improvement of the productive processes would be very interesting.

- Plates for heat exchangers made by AISI 316 stainless steel (Fig. 4.1[a])

The survival of foodborne microorganisms and biofilm formation is a major concern in the food industries. Specifically, raw milk is an ideal culture medium for microorganisms. These bacteria accumulate in milk processing equipment, mainly in pipes, storage tanks and heat exchangers [93]. Heat exchangers are made up of multiple stainless steel plates, and are used in the dairy industry for pasteurizing milk. During this process, the milk is quickly heated and cooled to eliminate any type of pathogen that may reside in the product.

In the third and last work of this thesis (I. Muro-Fraguas et al [49]), the anti-biofilm effectiveness of a plasma-polymerized coating applied on stainless steel was verified. Since it is the same material as the heat exchangers, evaluating the biofilm generated on plasma-coated heat exchanger plates simulating real operating conditions would be of great interest in the dairy industry.

- Cheese making molds (Fig. 4.1[b])

In order to remove any remaining liquid and give a desired shape, the curd is packed in molds during the molding and pressing phases. Commonly, the molds used are made from materials resistant to high pressure and daily cleaning, such as stainless steel or polymers, among which polyethylene (PE) and polypropylene (PP) stand out. The main concern identified at this stage is the cross-contamination that occurs in dairy products as a result of ineffective disinfection of the molds. The European Guide to Good Hygiene Practices for the production of handmade cheese and dairy products, developed in 2016, establishes the need to clean the molds after each use to minimize the risk of contamination of dairy products when the molds presents unhealthy hygienic conditions [94]. In this sense, the generation of antibacterial surfaces would help to limit the current issues. Until now, no studies have been carried out to verify the antibacterial efficacy of plasma coatings on polymeric materials such as PE and PP.

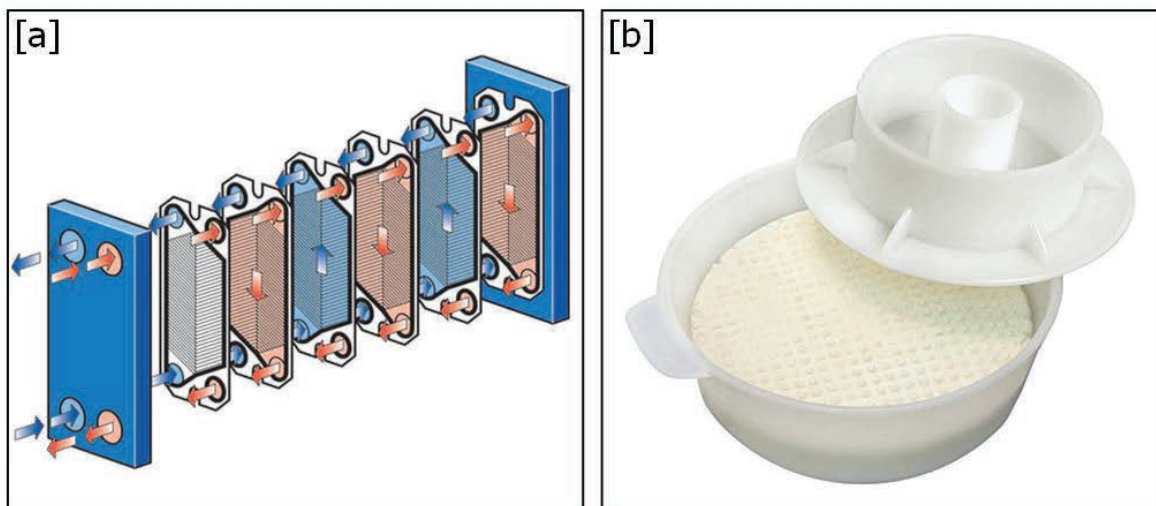


Fig. 4.1. Future substrates: [a] AISI316 Exchanger plate and [b] Polymeric cheese making mold

REFERENCES

- [1] R. Mandal, A. Singh, A. Pratap Singh, Recent developments in cold plasma decontamination technology in the food industry, *Trends Food Sci. Technol.* 80 (2018) 93–103. doi:10.1016/J.TIFS.2018.07.014.
- [2] A.I. Muhammad, X. Liao, P.J. Cullen, D. Liu, Q. Xiang, J. Wang, S. Chen, X. Ye, T. Ding, Effects of Nonthermal Plasma Technology on Functional Food Components, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 17 (2018) 1379–1394. doi:10.1111/1541-4337.12379.
- [3] M. Domonkos, P. Tichá, J. Trejbal, P. Demo, Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma Technology in Medicine, Agriculture and Food Industry, *Appl. Sci.* 2021, Vol. 11, Page 4809. 11 (2021) 4809. doi:10.3390/APP11114809.
- [4] M. Keidar, I.I. Beilis, Plasma Medicine, in: *Plasma Eng.*, 2018: pp. 455–539. doi:10.1016/b978-0-12-813702-4.00007-7.
- [5] M.N.F. Zainal, N. Redzuan, M.F.I. Misnal, Brief review: Cold plasma, *J. Teknol.* 74 (2015) 57–61. doi:10.11113/JT.V74.4834.
- [6] P. Pedrow, Z. Hua, S. Xie, M.J. Zhu, Engineering principles of cold plasma, *Adv. Cold Plasma Appl. Food Saf. Preserv.* (2019) 3–48. doi:10.1016/B978-0-12-814921-8.00001-3.
- [7] S. Toyokuni, F. Kikkawa, Y. Ikehara, M. Hori, Physical and chemical basis of nonthermal plasma, *Plasma Med. Sci.* (2018) 5–107. doi:10.1016/B978-0-12-815004-7.00002-0.
- [8] G. Nageswaran, L. Jothi, S. Jagannathan, Plasma Assisted Polymer Modifications, *Non-Thermal Plasma Technol. Polym. Mater. Appl. Compos. Nanostructured Mater. Biomed. Fields.* (2018) 95–127. doi:10.1016/B978-0-12-813152-7.00004-4.
- [9] T. Ding, P.J. Cullen, W. Yan, *Applications of Cold Plasma in Food Safety*, Springer and Zhejiang University Press, 2022. <https://www.springer.com/in/book/9789811618260>.
- [10] J. Šimončicová, S. Kryštofová, V. Medvecká, K. Ďurišová, B. Kaliňáková, Technical applications of plasma treatments: current state and perspectives, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103 (2019) 5117–5129. doi:10.1007/S00253-019-09877-X.
- [11] A. Alvarez-Ordóñez, L.M. Coughlan, R. Briandet, P.D. Cotter, Biofilms in Food Processing Environments: Challenges and Opportunities, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 10 (2019) 173–195. doi:10.1146/ANNUREV-FOOD-032818-121805.
- [12] M.H. Muhammad, A.L. Idris, X. Fan, Y. Guo, Y. Yu, X. Jin, J. Qiu, X. Guan, T. Huang, Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches, *Front. Microbiol.* 11 (2020). doi:10.3389/FMICB.2020.00928.
- [13] S. Srey, I.K. Jahid, S. Do Ha, Biofilm formation in food industries: A food safety concern, *Food Control.* 31 (2013) 572–585. doi:10.1016/J.FOODCONT.2012.12.001.
- [14] R. Múgica-Vidal, E. Sainz-García, I. Muro-Fraguas, A. Sainz-García, A. González-Marcos, M. López, B. Rojo-Bezares, P. Toledano, Y. Sáenz, F. Alba-Elías, Inhibition of biofilm formation on polystyrene substrates by atmospheric pressure plasma polymerization of siloxane-based coatings, *Plasma Process. Polym.* 18 (2021) 2100097. doi:10.1002/PPAP.202100097.
- [15] O.Y.A. Costa, J.M. Raaijmakers, E.E. Kuramae, Microbial extracellular polymeric substances: Ecological function and impact on soil aggregation, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 1636. doi:10.3389/FMICB.2018.01636/BIBTEX.
- [16] V. Oxaran, K.K. Dittmann, S.H.I. Lee, L.T. Chaul, C.A.F. de Oliveira, C.H. Corassin, V.F. Alves, E.C.P. De Martinis, L. Gram, Behavior of foodborne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in mixed-species biofilms exposed to biocides, *Appl. Environ. Microbiol.* 84 (2018) 2038–2056. doi:10.1128/AEM.02038-18.
- [17] Q. Han, X. Song, Z. Zhang, J. Fu, X. Wang, P.K. Malakar, H. Liu, Y. Pan, Y. Zhao, Removal of Foodborne

- Pathogen Biofilms by Acidic Electrolyzed Water, *Front. Microbiol.* 8 (2017). doi:10.3389/FMICB.2017.00988.
- [18] T.A. Pogiatis, V.S. Vassiliadis, F.J. Mergulhão, D.I. Wilson, Choosing When to Clean and How to Clean Biofilms in Heat Exchangers, *Heat Transf. Eng.* 36 (2015) 676–684. doi:10.1080/01457632.2015.954940.
- [19] P. Fernández-Gómez, I. Muro-Fraguas, R. Múgica-Vidal, A. Sainz-García, E. Sainz-García, M. González-Raurich, A. Álvarez-Ordóñez, M. Prieto, M. López, M. López, P. Toledano, Y. Sáenz, A. González-Marcos, F. Alba-Elías, Development and characterization of anti-biofilm coatings applied by Non-Equilibrium Atmospheric Plasma on stainless steel, *Food Res. Int.* 152 (2022) 109891. doi:10.1016/J.FOODRES.2020.109891.
- [20] S. Galié, C. García-Gutiérrez, E.M. Miguélez, C.J. Villar, F. Lombó, Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods, *Front. Microbiol.* 9 (2018). doi:10.3389/FMICB.2018.00898.
- [21] L. Guo, Y. Sun, Y. Zhu, B. Wang, L. Xu, M. Huang, Y. Li, J. Sun, The antibacterial mechanism of ultrasound in combination with sodium hypochlorite in the control of *Escherichia coli*, *Food Res. Int.* 129 (2020). doi:10.1016/J.FOODRES.2019.108887.
- [22] I. Alav, J.M. Sutton, K.M. Rahman, Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation, *J. Antimicrob. Chemother.* 73 (2018) 2003–2020. doi:10.1093/JAC/DKY042.
- [23] S.L. Percival, L. Suleman, C. Vuotto, G. Donelli, Healthcare-Associated infections, medical devices and biofilms: Risk, tolerance and control, *J. Med. Microbiol.* 64 (2015) 323–334. doi:10.1099/JMM.0.000032/CITE/REFWORKS.
- [24] 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, 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, G. Muthukrishnan, Evolving concepts in bone infection: redefining “biofilm”, “acute vs. chronic osteomyelitis”, “the immune proteome” and “local antibiotic therapy,” *Bone Res.* 2019 71. 7 (2019) 1–18. doi:10.1038/s41413-019-0061-z.
- [25] H. Shintani, Ethylene Oxide Gas Sterilization of Medical Devices, *Biocontrol Sci.* 22 (2017) 1–16. doi:10.4265/BIO.22.1.
- [26] S. Lerouge, Introduction to sterilization: Definitions and challenges, *Sterilisation Biomater. Med. Devices.* (2012) 1–19. doi:10.1016/B978-1-84569-932-1.50001-5.
- [27] T.M. Rankin, N.A. Giovinco, D.J. Cucher, G. Watts, B. Hurwitz, D.G. Armstrong, Three-dimensional printing surgical instruments: are we there yet?, *J. Surg. Res.* 189 (2014) 193–197. doi:10.1016/J.JSS.2014.02.020.
- [28] K.S. Aiyer, B.S. Vijayakumar, A.S. Vishwanathan, The enigma of biofilms, *Curr. Sci.* 115 (2018) 204–205. doi:10.18520/CS/V115/12/204-205.
- [29] R.P. Magalhães, T.F. Vieira, H.S. Fernandes, A. Melo, M. Simões, S.F. Sousa, The Biofilms Structural Database, *Trends Biotechnol.* 38 (2020) 937–940. doi:10.1016/J.TIBTECH.2020.04.002.
- [30] J. Gardan, Additive manufacturing technologies: State of the art and trends, *Int. J. Prod. Res.* 54 (2016) 3118–3132. doi:10.1080/00207543.2015.1115909.
- [31] I. Chiulan, A.N. Frone, C. Brandabur, D.M. Panaitescu, Recent Advances in 3D Printing of Aliphatic Polyesters, *Bioengineering*, 5 (2018). doi:10.3390/BIOENGINEERING5010002.
- [32] E.H. Baran, H. Yildirim Erbil, Surface Modification of 3D Printed PLA Objects by Fused Deposition Modeling: A Review, *Colloids Interfaces* 2019, Vol. 3, Page 43. 3 (2019) 43. doi:10.3390/COLLOIDS3020043.
- [33] J. Lipton, J. Witzleben, V. Green, C. Ryan, H. Lipson, Demonstrations of Additive Manufacturing for the Hospitality Industry, *3D Print. Addit. Manuf.* 2 (2015) 204–208. doi:10.1089/3DP.2015.0031.
- [34] Q. Yan, H. Dong, J. Su, J. Han, B. Song, Q. Wei, Y. Shi, A Review of 3D Printing Technology for Medical Applications, *Engineering*, 4 (2018) 729–742. doi:10.1016/J.ENG.2018.07.021.

- [35] D. Shilo, O. Emodi, O. Blanc, D. Noy, A. Rachmiel, Printing the Future-Updates in 3D Printing for Surgical Applications, *Rambam Maimonides Med. J.* 9 (2018) e0020. doi:10.5041/RMMJ.10343.
- [36] Formlabs, The Essential Guide to Food Safe 3D Printing, (n.d.) 2019. <https://formlabs.com/blog/guide-to-food-safe-3d-printing/> (accessed March 14, 2022).
- [37] C. Techer, S. Jan, F. Gonnet, N. Grosset, M. Gautier, F. Baron, S. Jan, F. Gonnet, N. Grosset, M. Gautier, F. Baron, Bacterial diversity on stainless steel surfaces of egg processing companies and potential of selected isolates to spoil liquid whole egg products, *J. Appl. Microbiol.* 127 (2019). doi:10.1111/jam.14403i.
- [38] M. Temmen, O. Ochedowski, M. Schleberger, M. Reichling, T.R.J. Bollmann, Hydration layers trapped between graphene and a hydrophilic substrate, *New J. Phys.* 16 (2014). doi:10.1088/1367-2630/16/5/053039.
- [39] S. Wu, S. Altenried, A. Zogg, F. Zuber, K. Maniura-Weber, Q. Ren, Role of the Surface Nanoscale Roughness of Stainless Steel on Bacterial Adhesion and Microcolony Formation, *ACS Omega.* 3 (2018) 6456–6464. doi:10.1021/ACSOMEGA.8B00769.
- [40] A. Elbourne, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, Nano-structured antimicrobial surfaces: From nature to synthetic analogues, *J. Colloid Interface Sci.* 508 (2017) 603–616. doi:10.1016/J.JCIS.2017.07.021.
- [41] I. Muro-Fraguas, A. Sainz-García, P. Fernández Gómez, M. López, R. Múgica-Vidal, E. Sainz-García, P. Toledano, Y. Sáenz, M. López, M. González-Raurich, M. Prieto, A. Alvarez-Ordóñez, A. González-Marcos, F. Alba-Elías, Atmospheric pressure cold plasma anti-biofilm coatings for 3D printed food tools, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 64 (2020) 102404. doi:10.1016/J.IFSET.2020.102404.
- [42] K. Poole, *Pseudomonas Aeruginosa: Resistance to the Max*, *Front. Microbiol.* 2 (2011). doi:10.3389/FMICB.2011.00065.
- [43] S. Hogan, J.P. O’Gara, E. O’Neill, Novel Treatment of Staphylococcus aureus Device-Related Infections Using Fibrinolytic Agents, *Antimicrob. Agents Chemother.* 62 (2018). doi:10.1128/AAC.02008-17.
- [44] R.N. Wenzel, Resistance of solid surfaces to wetting by water, *Ind. Eng. Chem.* 28 (1936) 988–994. doi:10.1021/IE50320A024.
- [45] I. Muro-Fraguas, A. Sainz-García, M. López, B. Rojo-Bezares, R. Múgica-Vidal, E. Sainz-García, P. Toledano, Y. Sáenz, A. González-Marcos, F. Alba-Elías, Antibiofilm coatings through atmospheric pressure plasma for 3D printed surgical instruments, *Surf. Coatings Technol.* 399 (2020) 126163. doi:10.1016/J.SURFCOAT.2020.126163.
- [46] C. Carrascosa, D. Raheem, F. Ramos, A. Saraiva, A. Raposo, Microbial Biofilms in the Food Industry—A Comprehensive Review, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 18 (2021) 1–31. doi:10.3390/IJERPH18042014.
- [47] A. Belias, G. Sullivan, M. Wiedmann, R. Ivanek, Factors that contribute to persistent Listeria in food processing facilities and relevant interventions: A rapid review, *Food Control.* 133 (2022) 108579. doi:10.1016/J.FOODCONT.2021.108579.
- [48] I. Doghri, T. Cherifi, C. Goetz, F. Malouin, M. Jacques, P. Fravalo, Counteracting Bacterial Motility: A Promising Strategy to Narrow Listeria monocytogenes Biofilm in Food Processing Industry, *Front. Microbiol.* 12 (2021). doi:10.3389/FMICB.2021.673484.
- [49] I. Muro-Fraguas, P. Fernández-Gómez, R. Múgica-Vidal, A. Sainz-García, E. Sainz-García, M. Oliveira, M. González-Raurich, M. López, B. Rojo-Bezares, M. López, F. Alba-Elías, Durability Assessment of a Plasma-Polymerized Coating with Anti-Biofilm Activity against *L. monocytogenes* Subjected to Repeated Sanitization, *Foods* 2021, Vol. 10, Page 2849. 10 (2021) 2849. doi:10.3390/FOODS10112849.
- [50] RS PRO, Product datasheet PLA, (n.d.) 25.
- [51] N. Cerca, G.B. Pier, M. Vilanova, R. Oliveira, J. Azeredo, Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of Staphylococcus epidermidis, *Res. Microbiol.* 156 (2005) 506–514. doi:10.1016/J.RESMIC.2005.01.007.
- [52] A. Terada, K. Okuyama, M. Nishikawa, S. Tsuneda, M. Hosomi, The effect of surface charge property on

- Escherichia coli* initial adhesion and subsequent biofilm formation, *Biotechnol. Bioeng.* 109 (2012) 1745–1754. doi:10.1002/BIT.24429.
- [53] J. Sen Peng, W.C. Tsai, C.C. Chou, Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel, *Int. J. Food Microbiol.* 65 (2001) 105–111. doi:10.1016/S0168-1605(00)00517-1.
- [54] J. Hu, J. Lin, Y. Zhang, Z. Lin, Z. Qiao, Z. Liu, W. Yang, X. Liu, M. Dong, Z. Guo, A new anti-biofilm strategy of enabling arbitrary surfaces of materials and devices with robust bacterial anti-adhesion via a spraying modified microsphere method, *J. Mater. Chem. A.* 7 (2019) 26039–26052. doi:10.1039/C9TA07236E.
- [55] P.J. Molino, D. Yang, M. Penna, K. Miyazawa, B.R. Knowles, S. MacLaughlin, T. Fukuma, I. Yarovsky, M.J. Higgins, Hydration Layer Structure of Biofouling-Resistant Nanoparticles, *ACS Nano.* 12 (2018) 11610–11624. doi:10.1021/ACS.NANO.8B06856.
- [56] X. Ping, M. Wang, G. Xuwu, Surface modification of poly(ethylene terephthalate) (PET) film by gamma-ray induced grafting of poly(acrylic acid) and its application in antibacterial hybrid film, *Radiat. Phys. Chem.* 80 (2011) 567–572. doi:10.1016/J.RADPHYSICHEM.2010.12.011.
- [57] R. Bitar, P. Cools, N. De Geyter, R. Morent, Acrylic acid plasma polymerization for biomedical use, *Appl. Surf. Sci.* 448 (2018) 168–185. doi:10.1016/J.APSUSC.2018.04.129.
- [58] M.E. Villanueva, A. Salinas, G.J. Copello, L.E. Díaz, Point of zero charge as a factor to control biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* in sol-gel derivatized aluminum alloy plates, *Surf. Coatings Technol.* 254 (2017) 145–150. doi:10.1016/J.SURFCOAT.2014.05.074.
- [59] C. Wang, H. Fang, C. Hang, Y. Sun, Z. Peng, W. Wei, Y. Wang, Fabrication and characterization of silk fibroin coating on APTES pretreated Mg-Zn-Ca alloy, *Mater. Sci. Eng. C.* 110 (2020). doi:10.1016/J.MSEC.2020.110742.
- [60] E. Joseph, S.S. Rajput, S. Patil, A. Nisal, Mechanism of Adhesion of Natural Polymer Coatings to Chemically Modified Siloxane Polymer, *Langmuir.* 37 (2021) 2974–2984. doi:10.1021/ACS.LANGMUIR.1C00047.
- [61] A. Siddique, T. Meckel, R.W. Stark, S. Narayan, Improved cell adhesion under shear stress in PDMS microfluidic devices, *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 150 (2017) 456–464. doi:10.1016/J.COLSURFB.2016.11.011.
- [62] K. Akhtar, S.A. Khan, S.B. Khan, A.M. Asiri, Scanning electron microscopy: Principle and applications in nanomaterials characterization, *Handb. Mater. Charact.* (2018) 113–145. doi:10.1007/978-3-319-92955-2_4.
- [63] A. García, K.K. Cruz, Microscopía de fuerza atómica como herramienta en la investigación de asfaltos, *Infraestruct. Vial.* 22 (2020) 20–27. doi:10.15517/IV.V22I40.42057.
- [64] Y. Zhang, X. Jing, K. Jing, L. Chang, W. Bao, Study on the pore structure and oxygen-containing functional groups devoting to the hydrophilic force of dewatered lignite, *Appl. Surf. Sci.* 324 (2015) 90–98. doi:10.1016/J.APSUSC.2014.10.126.
- [65] F.A. Stevie, C.L. Donley, Introduction to x-ray photoelectron spectroscopy ARTICLES YOU MAY BE INTERESTED IN, *J. Vac. Sci. Technol. A.* 38 (2020) 63204. doi:10.1116/6.0000412.
- [66] A. Bieberle-Hütter, A.C. Bronneberg, K. George, M.C.M. Van De Sanden, Operando attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy for water splitting, *J. Phys. D. Appl. Phys.* 54 (2021) 133001. doi:10.1088/1361-6463/ABD435.
- [67] M. Abd Mutalib, M.A. Rahman, M.H.D. Othman, A.F. Ismail, J. Jaafar, Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy-Dispersive X-Ray (EDX) Spectroscopy, *Membr. Charact.* (2017) 161–179. doi:10.1016/B978-0-444-63776-5.00009-7.
- [68] J.W. Drelich, L. Boinovich, E. Chibowski, C. Della Volpe, L. Holysz, A. Marmur, S. Siboni, Contact angles: History of over 200 years of open questions, *Surf. Innov.* 8 (2020) 3–27. doi:10.1680/JSUIN.19.00007.

- [69] E. Peeters, H.J. Nelis, T. Coenye, Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates, *J. Microbiol. Methods*. 72 (2008) 157–165. doi:10.1016/J.MIMET.2007.11.010.
- [70] Z. Khatoun, C.D. McTiernan, E.J. Suuronen, T.F. Mah, E.I. Alarcon, Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention, *Heliyon*. 4 (2018). doi:10.1016/J.HELIYON.2018.E01067.
- [71] A. Callejas-Díaz, C. Fernández-Pérez, A. Ramos-Martínez, E. Múñez-Rubio, I. Sánchez-Romero, J.A. Vargas Núñez, Impact of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia in a tertiary hospital: Mortality and prognostic factors, *Med. Clin. (Barc)*. 152 (2019) 83–89. doi:10.1016/J.MEDCLI.2018.04.020.
- [72] F. Boelaert, G. Amore, Y. Van der Stede, K. Nagy, V. Rizzi, I. Mirena, A. Stoicescu, F. Riolo, A. Gervelmeyer, the ECDC staff members Taina Niskanen, I. Reulet, J. Gomes Dias, H. Zeller, L. Marrama, V. Hollo, A. Ricci, L. Barco, S. Belluco, M. Mancin, I. Patuzzi, C. Losasso, the Istituto Superiore di Sanit, I. and staff members, S. Morabito, G. Scavia, I. Luzzi, A. Knijn, C. Lucarelli, E. Pozio, A. Casulli and, The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015, *EFSA J*. 14 (2016) e04634. doi:10.2903/J.EFSA.2016.4634.
- [73] N. Allocati, M. Masulli, M.F. Alexeyev, C. Di Ilio, *Escherichia coli* in Europe: an overview, *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 10 (2013) 6235–6254. doi:10.3390/IJERPH10126235.
- [74] M.A. Borg, L. Camilleri, What Is Driving the Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Europe?, <https://Home.Liebertpub.Com/Mdr>. 27 (2021) 889–894. doi:10.1089/MDR.2020.0259.
- [75] A. Cassini, L.D. Högberg, D. Plachouras, A. Quattrocchi, A. Hoxha, G.S. Simonsen, M. Colomb-Cotinat, M.E. Kretzschmar, B. Devleeschauwer, M. Cecchini, D.A. Ouakrim, T.C. Oliveira, M.J. Struelens, C. Suetens, D.L. Monnet, R. Strauss, K. Mertens, T. Struyf, B. Catry, K. Latour, I.N. Ivanov, E.G. Dobreva, A. Tambic Andrašević, S. Soprek, A. Budimir, N. Paphitou, H. Zemlicková, S. Schytte Olsen, U. Wolff Sönksen, P. Martin, M. Ivanova, O. Lyytikäinen, J. Jalava, B. Coignard, T. Eckmanns, M. Abu Sin, S. Haller, G.L. Daikos, A. Gikas, S. Tsiodras, F. Kontopidou, Á. Tóth, Á. Hajdu, Ó. Guólaugsson, K.G. Kristinsson, S. Murchan, K. Burns, P. Pezzotti, C. Gagliotti, U. Dumpis, A. Liuimiene, M. Perrin, M.A. Borg, S.C. de Greeff, J.C. Monen, M.B. Koek, P. Elstrøm, D. Zabicka, A. Deptula, W. Hryniewicz, M. Caniça, P.J. Nogueira, P.A. Fernandes, V. Manageiro, G.A. Popescu, R.I. Serban, E. Schréterová, S. Litvová, M. Štefkovicová, J. Kolman, I. Klavs, A. Korošec, B. Aracil, A. Asensio, M. Pérez-Vázquez, H. Billström, S. Larsson, J.S. Reilly, A. Johnson, S. Hopkins, Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis, *Lancet. Infect. Dis*. 19 (2019) 56–66. doi:10.1016/S1473-3099(18)30605-4.
- [76] World Health Organization, Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report: 2021, 2021. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240027336> (accessed March 30, 2022).
- [77] E. Bédard, M. Prévost, E. Déziel, *Pseudomonas aeruginosa* in premise plumbing of large buildings, *Microbiologyopen*. 5 (2016) 937–956. doi:10.1002/MBO3.391.
- [78] A.P. Das, L.B. Sukla, N. Pradhan, Microbial Recovery of Manganese using *Staphylococcus Epidermidis*, *Int. J. Nonferrous Metall*. 2012 (2012) 9–12. doi:10.4236/IJNM.2012.12002.
- [79] M. Govaert, C. Smet, M. Baka, T. Janssens, J. Van Impe, Influence of incubation conditions on the formation of model biofilms by *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* on abiotic surfaces, *J. Appl. Microbiol*. 125 (2018) 1890–1900. doi:10.1111/JAM.14071.
- [80] The European Parliament and the Council of the European Union, Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 Laying Down Specific Hygiene Rules for Food of Animal Origin, (2004) 22–82. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex%3A32004R0853> (accessed March 29, 2022).
- [81] J. Thomas, S. Linton, L. Corum, W. Slone, T. Okel, S.L. Percival, The affect of pH and bacterial phenotypic state on antibiotic efficacy, *Int. Wound J*. 9 (2012) 428–435. doi:10.1111/J.1742-481X.2011.00902.X.

- [82] A. Ganvir, Microstructure and Thermal Conductivity of Liquid Feedstock Plasma Sprayed Thermal Barrier Coatings, University West, 2016. <https://www.diva-portal.org/smash/record.jsf?pid=diva2%3A902091&dswid=-4401> (accessed April 4, 2022).
- [83] I. Muzammil, Y. Li, M. Lei, Tunable wettability and pH-responsiveness of plasma copolymers of acrylic acid and octafluorocyclobutane, *Plasma Process. Polym.* 14 (2017). doi:10.1002/PPAP.201700053.
- [84] T. He, D. Jańczewski, S. Guo, S.M. Man, S. Jiang, W.S. Tan, Stable pH responsive layer-by-layer assemblies of partially hydrolysed poly(2-ethyl-2-oxazoline) and poly(acrylic acid) for effective prevention of protein, cell and bacteria surface attachment, *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 161 (2018) 269–278. doi:10.1016/J.COLSURFB.2017.10.031.
- [85] ThermoFisher Scientific, Ficha de datos de seguridad: Ácido acrílico, 2009. www.alfa.com (accessed April 7, 2022).
- [86] Carl Roth, Ficha de datos de seguridad:Ácido Oleico, 2019. www.carlroth.de (accessed April 11, 2022).
- [87] Carl Roth, Ficha de datos de seguridad: Ácido Succínico, 2017. https://www.carlroth.com/downloads/sdb/es/0/SDB_0183_ES_ES.pdf.
- [88] C.M. Huang, C.H. Chen, D. Pornpattananankul, L. Zhang, M. Chan, M.F. Hsieh, L. Zhang, Eradication of drug resistant Staphylococcus aureus by liposomal oleic acids, *Biomaterials.* 32 (2011) 214–221. doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.08.076.
- [89] M. Radkowski, B. Zdrodowska, M. Gomółka-Pawlicka, Effect of Succinic Acid on Elimination of Salmonella in Chicken Meat, *J. Food Prot.* 81 (2018) 1491–1495. doi:10.4315/0362-028X.JFP-17-446.
- [90] T. Møretro, S. Langsrud, Residential Bacteria on Surfaces in the Food Industry and Their Implications for Food Safety and Quality, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 16 (2017) 1022–1041. doi:10.1111/1541-4337.12283.
- [91] A. Monteiro, J. Cardoso, N. Guerra, E. Ribeiro, C. Viegas, S.C. Verde, A. Sousa-Uva, Exposure and Health Effects of Bacteria in Healthcare Units: An Overview, *Appl. Sci.* 12 (2022). doi:10.3390/APP12041958.
- [92] Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Estructura del sector vacuno lechero en España y en la Unión Europea 2016-2020, 2020.
- [93] A. Mogha, K.; Shah, N.; Prajapati, J.; Chaudhar, Biofilm - A threat to dairy industry, *Indian J. Dairy Sci.* 67 (2014) 459–466. <https://www.semanticscholar.org/paper/Biofilm-A-threat-to-dairy-industry-Mogha-Shah/8935c14501081d42484be67a80c29d6932128b97> (accessed April 11, 2022).
- [94] FACEnetwork, Guía Europea de Prácticas Correctas de Higiene para la elaboración de quesos y productos lácteos artesanos, 2016.

PUBLICACIÓN 1

Ignacio Muro-Fraguas, Ana Sainz-García, Paula Fernández Gómez, María López, Rodolfo Múgica-Vidal, Elisa Sainz-García, Paula Toledano, Yolanda Sáenz, Mercedes López, Montserrat González-Raurich, Miguel Prieto, Avelino Alvarez-Ordóñez, Ana González-Marcos, Fernando Alba-Elías. (2020). **Atmospheric pressure cold plasma anti-biofilm coatings for 3D printed food tools.**

Innovative Food Science and Emerging Technologies, 64, 102404.

DOI Link: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102404>



Contents lists available at ScienceDirect

Innovative Food Science and Emerging Technologies

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ifset

Atmospheric pressure cold plasma anti-biofilm coatings for 3D printed food tools

Ignacio Muro-Fraguas^{a,*}, Ana Sainz-García^a, Paula Fernández Gómez^b, María López^c, Rodolfo Múgica-Vidal^a, Elisa Sainz-García^a, Paula Toledano^c, Yolanda Sáenz^c, Mercedes López^b, Montserrat González-Raurich^b, Miguel Prieto^b, Avelino Alvarez-Ordóñez^b, Ana González-Marcos^a, Fernando Alba-Elías^a

^a Department of Mechanical Engineering, University of La Rioja, C/ San José de Calasanz 31, 26004 Logroño, La Rioja, Spain

^b Department of Food Hygiene and Technology and Institute of Food Science and Technology, University of León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Castilla y León, Spain

^c Molecular Microbiology Area, Center for Biomedical Research of La Rioja (CIBIR), C/ Piqueras 98, 26006 Logroño, La Rioja, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

3D printing
Food industry
Atmospheric pressure plasma jet
Plasma-polymerization
Antibiofilm coatings
Hydration layer

ABSTRACT

Increasing adoption of 3D printing in the daily life and, specifically, the food field (kitchen tools and food contact containers) is associated with potential health risks when printed tools are made by specialized centers and designed for disabled patients, who cannot re-print them with the necessary periodicity. The characteristic pattern of 3D printing promotes bacterial adhesion and biofilm formation. In this work acrylic acid (AcAc) and tetraethyl orthosilicate (TEOS) coatings applied by plasma-polymerization have been developed to reduce biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on 3D printed PLA materials. Chemical (generation of a hydration layer) and morphological (a decrease in distance between peaks) modifications provoked by plasma-polymerized treatments could explain the reduction in bacterial attachment and biofilm formation. AcAc coatings were more effective than TEOS coatings, and showed up to a 47.7% (*L. monocytogenes*), 50.4% (*P. aeruginosa*) and 64.1% (*E. coli*) relative biofilm production, when compared with untreated samples.

Industrial relevance text: Nowadays, products manufactured by 3D printing technologies are constantly growing; resulting in a greater flexibility and customization in the designs and a reduction of production costs. One of the main applications of 3D printed tools is the food industry, specifically, kitchen tools and containers for disabled people. There are great difficulties when it comes to disinfecting these types of parts. So, the health risks associated with the use of 3D printed tools for food contact applications should be attended. Our study demonstrated that acrylic acid plasma coatings are suitable for decreasing the amount of biofilm generated by different bacteria over 3D printed poly-lactic acid (PLA) substrates. Plasma coatings make it possible to address food-related health issues through the generation of safe tools manufactured by 3D printing. The mitigation of those issues will allow the food industry to safely employ a technology as versatile as 3D printing.

1. Introduction

Additive manufacturing is capable of producing complex geometries that cannot be manufactured by other means, reducing times and production costs. Some entrepreneurs which have utilized 3D printing to create objects include aeronautic, architecture, automotive, dentistry, fashion, food, medicine, pharmaceutical and robotic industries (Gardan, 2016).

3D printing has increased over the last decade, with increases

starting to be significant in 2004, when the industry grew from 10% in 2003 to 25% in 2004 (Wohlers Associates, 2017). This sharp improvement was driven by the RepRap Project, which allowed adopting an open source equipment and the development of cheap 3D printers (S. H. Chang, 2016; Domínguez-Robles et al., 2019). In 2014, another huge increase in the 3D printing field occurred due to the expiry of Stratasys patents, which caused a rise from 20% in 2013 to 33% in 2014 (Gardan, 2016; Wohlers Associates, 2017).

The decrease in prices along the years and the recent emergence of

* Corresponding author.

E-mail address: ignacio.muro@unirioja.es (I. Muro-Fraguas).

<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102404>

Received 13 March 2020; Received in revised form 14 May 2020; Accepted 23 May 2020

Available online 30 May 2020

1466-8564/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

PUBLICACIÓN 2

Ignacio Muro-Fraguas, Ana Sainz-García, María López, Beatriz Rojo-Bezares, Rodolfo Múgica-Vidal, Elisa SainzGarcía, Paula Toledano, Yolanda Sáenz, Ana González-Marcos, Fernando Alba-Elías. (2020). **Antibiofilm coatings through atmospheric pressure plasma for 3D printed surgical instruments.**

Surface & Coatings Technology, 399, 126163.

DOI Link: <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2020.126163>



Antibiofilm coatings through atmospheric pressure plasma for 3D printed surgical instruments

Ignacio Muro-Fraguas^{a,*}, Ana Sainz-García^a, María López^b, Beatriz Rojo-Bezales^b, Rodolfo Múgica-Vidal^a, Elisa Sainz-García^a, Paula Toledano^b, Yolanda Sáenz^b, Ana González-Marcos^a, Fernando Alba-Elías^a

^a Department of Mechanical Engineering, University of La Rioja, C/ San José de Calasanz 31, 26004 Logroño, La Rioja, Spain

^b Molecular Microbiology Area, Center for Biomedical Research of La Rioja (CIBIR), C/Piqueras 98, 26006 Logroño, La Rioja, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Atmospheric-pressure cold plasma
Plasma-polymerization
3D printing surgical tools
Antibiofilm coatings
Antimicrobial resistant strains
Hydration layer

ABSTRACT

Recently, medical applications for 3D printing are expanding rapidly and are expected to revolutionize health care, specifically, manufacturing surgical guides and protective face mask against coronavirus (COVID-19). These instruments come in contact with the human tissues, being necessary 3D printed materials free of pathogenic microbes or other contaminants. Therefore, they must be sterilized to avoid that bacteria can attach to the surface and produce biofilm. With the aim of avoiding bacterial biofilm formation and minimize the health risks, acrylic acid (AcAc) coatings applied by plasma-polymerization have been deposited on 3D printed polylactic acid (PLA) Petri dishes. Six antimicrobial-resistant clinical and two susceptible control strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* species were analyzed. AcAc coatings provide the surface with greater hydrophilicity and, consequently, the formation of a hydration layer, whose thickness is related to the surface roughness. This hydration layer could explain the reduction of bacterial attachment and, consequently, the biofilm formation. Antibiofilm coatings are more successful against *P. aeruginosa* strains than against *S. aureus* ones; due to some coatings presents a smaller topography scale than the *P. aeruginosa* length, reducing the contact area between the bacteria and the coating, and causing a potential rupture of the cellular membrane. AcAc coatings with less number of plasma passes were more effective, and showed up to a 50% relative biofilm reduction (in six of the eight strains studied) compared with the untreated plates.

1. Introduction

The 3D printing technology based on biocompatible printable materials, is capable of manufacturing devices with a complex, specific and accurate geometry for each patient and their anatomy [1]. For these reasons, medical applications for 3D printing technology are expanding quickly [2,3]. In 2006, the 3D printing industry generated \$700 million, with only \$11 million (1.6%) invested in medical applications. However, in the next decades, 3D printing is expected to achieve \$9 billion, spending a quarter of the total on medical applications [4]. The most common medical applications of 3D printing devices are: preoperative planification, education, clinical training and surgical use (implants, prosthesis and protection devices) [5]. In the past few months, the global coronavirus pandemic (COVID-19) have caused a shortage of personal protective equipment (PPE) worldwide. In order to avoid the

lack of protective medical equipment and prevent the spread of COVID-19, 3D printing makers community have started manufacturing specific facial mask and respirators for intensive care unit (ICU) patients. Due to the risks associated with 3D printing medical devices (detailed below) and with the aim of combating COVID-19 disease effectively, the European Commission (DG GROW) has written a list of the 3D printing resources available in Europe [6].

Different materials are used for medical applications according to the employed 3D printing technology: polymers (acrylonitrile butadiene styrene-ABS-, polylactic acid-PLA- and nylon), metals (titanium) or ceramic materials (hydroxyapatite-HA-) [5]. PLA is the most widely used polymer in Fused Filament Fabrication (FFF) technology. PLA is a recyclable, biodegradable and biocompatible thermoplastic; and it is obtained from corn and sugar cane. The low thermal expansion coefficient of PLA facilitates its printing. Therefore, PLA printed parts show

* Corresponding author.

E-mail addresses: ignacio.muro@unirioja.es (I. Muro-Fraguas), ana.sainz@unirioja.es (A. Sainz-García), mlopezm@riojasalud.es (M. López), brojo@riojasalud.es (B. Rojo-Bezales), rodolfo.mugica@unirioja.es (R. Múgica-Vidal), elisa.sainzg@unirioja.es (E. Sainz-García), ptoledano@riojasalud.es (P. Toledano), ysaenz@riojasalud.es (Y. Sáenz), ana.gonzalez@unirioja.es (A. González-Marcos), fernando.alba@unirioja.es (F. Alba-Elías).

<https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2020.126163>

Received 26 May 2020; Received in revised form 1 July 2020; Accepted 3 July 2020

Available online 05 July 2020

0257-8972/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

PUBLICACIÓN 3

Ignacio Muro-Fraguas, Paula Fernández-Gómez, Rodolfo Múgica-Vidal, Ana Sainz-García, Elisa Sainz-García, Márcia Oliveira, Montserrat González-Raurich, María López, Beatriz Rojo-Bezares, Mercedes López, Fernando Alba-Elías (2021). **Durability assessment of a plasma-polymerized coating with anti-biofilm activity against *L.monocytogenes* subjected to repeated sanitization.** *Foods*, 10 (11), 2849.

DOI Link: <https://doi.org/10.3390/foods10112849>

Article

Durability Assessment of a Plasma-Polymerized Coating with Anti-Biofilm Activity against *L. monocytogenes* Subjected to Repeated Sanitization

Ignacio Muro-Fraguas ^{1,†}, Paula Fernández-Gómez ^{2,†}, Rodolfo Múgica-Vidal ^{1,*}, Ana Sainz-García ¹, Elisa Sainz-García ¹, Márcia Oliveira ², Montserrat González-Raurich ², María López ³, Beatriz Rojo-Bezares ³, Mercedes López ^{2,‡} and Fernando Alba-Elías ^{1,‡}

¹ Department of Mechanical Engineering, University of La Rioja, C/San José de Calasanz 31, 26004 Logroño, Spain; ignacio.muro@unirioja.es (I.M.-F.); ana.sainz@unirioja.es (A.S.-G.); elisa.sainzg@unirioja.es (E.S.-G.); fernando.alba@unirioja.es (F.A.-E.)

² Department of Food Hygiene and Technology, Institute of Food Science and Technology, Campus de Vegazana s/n, Universidad de León, 24071 León, Spain; pafeg@unileon.es (P.F.-G.); msouo@unileon.es (M.O.); mmgonr@unileon.es (M.G.-R.); mmlopf@unileon.es (M.L.)

³ Molecular Microbiology Area, Center for Biomedical Research of La Rioja (CIBIR), C/Piqueras 98, 26006 Logroño, Spain; mlopezm@riojasalud.es (M.L.); brojo@riojasalud.es (B.R.-B.)

* Correspondence: rodolfo.mugica@unirioja.es

† These authors contributed equally to this work.

‡ These authors contributed equally to this work.



Citation: Muro-Fraguas, I.; Fernández-Gómez, P.; Múgica-Vidal, R.; Sainz-García, A.; Sainz-García, E.; Oliveira, M.; González-Raurich, M.; López, M.; Rojo-Bezares, B.; López, M.; et al. Durability Assessment of a Plasma-Polymerized Coating with Anti-Biofilm Activity against *L. monocytogenes* Subjected to Repeated Sanitization. *Foods* **2021**, *10*, 2849. <https://doi.org/10.3390/foods10112849>

Academic Editor: Barbara Speranza

Received: 28 October 2021

Accepted: 16 November 2021

Published: 18 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 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/>).

Abstract: Biofilm formation on food-contact surfaces is a matter of major concern causing food safety and spoilage issues to this sector. The aim of this study was to assess the durability of the anti-biofilm capacity of a plasma-polymerized coating composed of a base coating of (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES) and a functional coating of acrylic acid (AcAc). Coated and uncoated AISI 316 stainless steel (SS) plates were subjected to five sanitization cycles with sodium hypochlorite (0.05%) and peracetic acid (0.5%). The effectiveness of the coating for the inhibition of multi-strain *Listeria monocytogenes* biofilm formation was confirmed using a three-strain cocktail, which was grown on the SS plates at 12 °C for 6 days. Compared to the uncoated SS, relative biofilm productions of 14.6% on the non-sanitized coating, 27.9% on the coating after sanitization with sodium hypochlorite, and 82.3% on the coating after sanitization with peracetic acid were obtained. Morphological and physicochemical characterization of the coatings suggested that the greater anti-biofilm effectiveness after sanitization with sodium hypochlorite was due to the high pH of this solution, which caused a deprotonation of the carboxylic acid groups of the functional coating. This fact conferred it a strong hydrophilicity and negatively charged its surface, which was favorable for preventing bacterial attachment and biofilm formation.

Keywords: durability; anti-biofilm; plasma polymerization; sanitization; disinfectants; food contact

1. Introduction

In order to guarantee food safety, inactivating pathogenic microorganisms and controlling their occurrence in food processing environments is of utmost importance in the food industry. Among the most concerning foodborne pathogens, *Listeria monocytogenes* stands out as one of the most difficult to control and eliminate due to its ubiquity and the capacity to grow in anaerobic conditions and at refrigeration temperatures. Furthermore, *L. monocytogenes*, which has been implicated in numerous foodborne disease outbreaks, is capable of forming biofilms, which are communities of bacteria attached to a surface and embedded in a matrix of self-produced extracellular polymeric substances (EPS) [1]. Biofilms are an important problem in food industries because they enable bacteria to adhere to a wide variety of materials that are frequently used in food-contact applications such