

Vniver§itat id València

Facultat de Medicina i Odontologia Programa de Doctorado: 3139 MEDICINA Línea de Investigación: MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

Estudio de la actividad del plasma frío a presión atmosférica sobre el biofilm y células planctónicas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*.

TESIS DOCTORAL Presentada por: José Baeza Oliete. DIRECTOR: Dr. Javier Pemán García CODIRECTORES: Dra. María Ángeles Tormo Mas Dr. Guillermo Baeza Oliete Valencia, junio 2020

D. JAVIER PEMÁN GARCÍA, jefe de sección del Servicio de Microbiología del Hospital Universitari i Politècnic La Fe y líder del Grupo de Investigación Infección Grave del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe.

Dña. MARÍA ÁNGELES TORMO MAS, investigadora del Hospital Universitari i Politècnic La Fe y miembro activo del Grupo de Investigación Infección Grave del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe.

D. GUILLERMO BAEZA OLIETE, experto en producción de plasma y en protección radiológica de laboratorios de investigación y centrales nucleares.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada "Estudio de la actividad del plasma frío a presión atmosférica sobre el biofilm y células planctónicas de *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans.*", corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por D. José Baeza Oliete para su presentación como tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Medicina de la Universitat de València.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, a 9 de junio de 2020.

Fdo

Fdo .:

Dr. Javier Pemán García

Dra. María Ángeles Tormo Mas

Fdo .: Dr. Guillermo Baeza Oliete

A Silvia, mi mujer, mis hijos Alejandro y María y mis padres Vicente y Amparo.

Agradecimientos

En primer, lugar quiero agradecer al Dr. Guillermo Baeza Oliete, mi hermano y Codirector de la Tesis. Experto en el campo de la generación de plasma frío a presión atmosférica, autor de la tesis doctoral "Contribución a la generación de plasma frío mediante electrodos SMD y JET", inspira e impulsa la continuidad en la investigación de las aplicaciones del plasma frío a presión atmosférica. Su conocimiento y entusiasmo por este campo, su constancia e ilusión han hecho que haya podido disfrutar en el desarrollo de esta tesis. Sin él no hubiera sido posible ya que es la persona que ha diseñado y fabricado la cámara de generación de plasma utilizada para el desarrollo de este trabajo. Gracias Guillermo.

Mi más profundo agradecimiento al Dr. Marcelo Ernesto Fernández Rivero, microbiólogo clínico y ex miembro del Grupo Multidisciplinar de Infección Grave del Instituto de Investigación Sanitaria Hospital La Fe que por razones laborales tuvo que trasladarse a Cádiz. Marcelo fue la persona que me introdujo en el Grupo Multidisciplinar de Infección Grave y nos ayudó a diseñar el estudio experimental. Con él hicimos las primeras pruebas.

A la Dra. María Ángeles Tormo Mas, investigadora del Instituto de Investigación Sanitaria. Hospital La Fe. Miembro activo del Grupo Multidisciplinar de Infección Grave de dicho instituto. Su aportación en el desarrollo de la tesis doctoral ha sido esencial por sus conocimientos en las técnicas de manipulación bacteriana en el laboratorio experimental. Gracias a su apoyo y paciencia hemos podido desarrollar la fase experimental.

Al Dr. Javier Pemán García, jefe de sección del Servicio de Microbiología del Hospital La Fe y líder del Grupo de Investigación Infección Grave del Instituto de Investigación Sanitaria Hospital La Fe, al haber aceptado la dirección del proyecto de investigación. Es para mí un reto y honor, como cirujano ortopédico poder estar en su grupo de trabajo.

A Patricia Bernabé Quispe, miembro del Grupo Multidisciplinar de Infección Grave. Para mí su ayuda y paciencia ha sido inestimable.

De manera más personal quisiera agradecer a mi mujer, mis hijos, padres, hermanos y a mis amigos por el soporte y los ánimos que me han dado durante todo este tiempo. Por último, agradecer a mi abuelo el Dr. Vicente Oliete Benimeli, a mi tío el Dr. Vicente Oliete Sanz y mi padre Vicente Baeza Giner. Sin su influencia no hubiera sido traumatólogo.

Resumen

El objeto de esta tesis es estudiar la actividad del plasma frío a presión atmosférica o ANTP (Atmospheric Non Thermal Plasma) sobre el biofilm y las células planctónicas de *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans.*

El plasma constituye el cuarto estado de agregación de la materia, tras los sólidos, líquidos y gases. Se produce al ionizar total o parcialmente un gas, pudiendo utilizar cualquier fuente de energía para su generación (eléctrica, térmica, óptica o radiación electromagnética ionizante). Al producirse cargas eléctricas libres (electrones e iones) el plasma es un buen conductor de la electricidad.

El estado de plasma se alcanza cuando buena parte de las partículas que componen el gas alcanzan tanta energía como para que sea posible su ionización liberando una alta densidad de electrones. Los electrones producidos y sus colisiones posteriores con los átomos y moléculas del gas generan las especies reactivas que interaccionarán con el entorno.

El plasma se puede clasificar según los niveles energéticos relativos de los electrones y partículas pesadas (iones y neutras) en plasma térmico y en plasma no térmico, también llamado plasma de no equilibrio o plasma frío.

En el plasma térmico la alta temperatura implica que todas las especies químicas se encuentran en estado de equilibrio termodinámico ($T_e \approx T_i \approx T_g$). En los plasmas no térmicos, el enfriamiento de los iones y las moléculas sin carga es más efectivo que la transferencia de energía de los electrones en las colisiones, no alcanzándose el equilibrio térmico y permaneciendo el gas a baja temperatura ($T_e >> T_i \approx T_g$) por lo que es conocido como plasma frío. Los plasmas fríos son capaces de destruir, a temperatura ambiente, microorganismos con un mínimo o nulo daño al entorno por calor.

Los plasmas fríos se pueden generar en cámaras de vacío, denominándose plasmas de baja presión, o a presión atmosférica denominándose plasmas a presión atmosférica. En los generados a bajas presiones de gas, la frecuencia de colisión de los electrones es baja por lo que las energías de los electrones seguirán siendo altas en comparación con las energías de las partículas pesadas (iones y neutras) representando un estado de no equilibrio térmico.

Resumen

A presiones atmosféricas la frecuencia de las colisiones de los electrones es más alta, por lo que disminuirá la diferencia entre la T_e y la temperatura de las partículas pesadas y, por lo tanto, el estado del plasma estará más cerca del estado de equilibrio térmico. Esta condición se puede evitar suministrando una baja densidad de potencia de alimentación o una potencia pulsada, lo que lleva a la formación de plasma frío o de no equilibrio.

La necesidad de descontaminar biológicamente material sensible o de esterilizar material en quirófanos, ha hecho que durante años se estudien diversas técnicas de descontaminación. Existen diversas técnicas empleadas en la actualidad como son el calor seco, calor húmedo, radiación ultravioleta, peróxido de hidrógeno o líquidos con diversas composiciones químicas, pero ninguna se puede aplicar sobre tejidos vivos o materiales especialmente sensibles.

El uso del plasma frío a presión atmosférica surge como una técnica relativamente nueva que permite descontaminar a temperatura ambiente y presión atmosférica, tejidos vivos o materiales especialmente sensibles. Parece ser un buen candidato para la inactivación microbiana en el biofilm o la destrucción de la estructura de una manera ecológica y rentable. El estrés oxidativo producido por los reactivos de la química del plasma es el responsable de los efectos que se producen.

Dado que mi actividad profesional está dedicada al tratamiento de la infección protésica articular y de la osteomielitis crónica del adulto, donde el biofilm es la causa de la cronicidad y dificultad de curación de estas enfermedades, la posible aplicación del plasma frío para descontaminar o esterilizar tejidos vivos y material protésico motivó mi interés por el tema y el desarrollo de esta tesis doctoral.

Para el desarrollo del trabajo experimental empleamos un prototipo denominado cámara de plasma a presión atmosférica - plasma no térmico que se caracteriza por usar aire como gas, trabajar a temperatura ambiente y a presión atmosférica para la producción de plasma, convirtiéndola en un posible candidato para poder ser utilizada de forma económica en multitud de situaciones, entre ellas en el campo de la cirugía séptica del aparato locomotor. La calibración del equipo ya fue realizada por el Dr. Guillermo Baeza Oliete en su tesis "Contribución a la generación de plasma frío mediante electrodos SMD y JET".

Para poder demostrar la capacidad antimicrobiana de la cámara de generación de plasma sobre el biofilm de *S. aureus, P. aeruginosa y C. albicans* formada en discos de titanio comercialmente puro (grado 3) y politetrafluoroetileno

(PTFE/Teflón) y sobre sus respectivas células planctónicas, desarrollamos cuatro diseños experimentales.

En los dos primeros diseños experimentales se valora la actividad del plasma frío sobre el biofilm de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans* formado sobre discos de titanio comercialmente puro y PTFE y sobre sus respectivas células planctónicas. En el tercer diseño experimental se analiza la capacidad del plasma frío para actuar sobre el medio de cultivo e impedir el crecimiento posterior de microorganismos. En el último diseño experimental se evalúa cualitativamente, mediante microscopía confocal laser, la viabilidad del biofilm de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans* tras su exposición al plasma frío.

La letalidad media producida sobre el biofilm de *S. aureus, P. aeruginosa y C. albicans*, formadas durante 48 horas sobre discos de titanio, después de 60 minutos de exposición al plasma frío fue del 99,7%, 99,9% y 99,6%, respectivamente. En el caso de los discos de PTFE fue del 99,1%, 95,9% y 94,4%, respectivamente.

La letalidad global media de las células planctónicas de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans* después de la exposición del plasma frío durante 90 minutos fue del 99,87%.

La exposición del medio de cultivo BHI al plasma frío durante 90 minutos generó un medio de cultivo activado por plasma (PAM) que impidió el posterior crecimiento de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans.*

Mediante microscopía confocal de exploración láser se constató, que la exposición al plasma frío durante 60 minutos de discos de cristal, sobre los que previamente se había formado un biofilm de 48 horas de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans* se produjo una destrucción completa del biofilm.

Abstract

The purpose of this thesis is to study the activity of cold plasma or Atmospheric No thermal plasma (ANTP) on biofilm and the planktonic forms of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*.

Plasma constitutes the fourth state of aggregation of matter, after solids, liquids and gases. It is produced by completely or partially ionizing a gas, being able to use any source of energy for its generation (electrical, thermal, optical or ionizing electromagnetic radiation). When free electrical charges (electrons and positive ions) occur, plasma is a good conductor of electricity.

The plasma state is reached when a large part of the particles that make up the gas reach enough energy to allow its ionization to release a high electron density. The produced electrons and their subsequent collisions with the atoms and molecules of the gas generate the reactive species that will interact with the environment.

Plasma can be classified according to the relative energy levels of electrons and heavy particles (ions and neutrals) in thermal plasma and non-thermal plasma also called non-equilibrium plasma or cold plasma.

In thermal plasma, high temperature implies that all chemical species $(T_e \approx T_i \approx T_g)$ are in a state of thermodynamic equilibrium. In non-thermal plasma, the cooling of ions and molecules without charge, is more effective than the transfer of energy of electrons in collisions, the thermal equilibrium is not achieved and the gas remains at low temperature $(T_e >> T_i \approx T_g)$ so is known as cold plasma. Cold plasmas are capable of destroying, at room temperature, microorganisms with minimal or no heat damage.

Cold plasmas can be generated in vacuum chambers, called low pressure plasmas, or at atmospheric pressure called atmospheric pressure plasmas. In those generated at low gas pressures, the frequency of collision of the electrons is low, so that the energies of the electrons will remain high compared to the energies of the heavy particles (ions and neutrals) representing a state of non-equilibrium plasma.

At atmospheric pressures the frequency of collisions of electrons is higher, so the difference between T_e and the temperature of the heavy particles will decrease

and therefore, the state of the plasma will be closer to the state of thermal equilibrium. This condition can be avoided by providing a low power supply density or a pulsed power, which leads to the formation of cold or non-equilibrium plasma.

The need to biologically decontaminate sensitive material or to sterilize material in operating rooms has made for years that various decontamination techniques are studied. There are various techniques used today such as dry heat, wet heat, ultraviolet radiation, hydrogen peroxide or liquids with various chemical compositions, but none can be applied to living tissues or especially sensitive materials.

The use of cold plasma at atmospheric pressure emerges as a relatively new technique that allows decontamination at room temperature and atmospheric pressure, living tissues or especially sensitive materials. It seems to be a good candidate for microbial inactivation in biofilms or the destruction of the structure in an ecological and cost-effective manner. The oxidative stress produced by plasma chemistry reagents is responsible for the effects that occur.

Since my professional activity is dedicated to the treatment of prosthetic joint infection and chronic osteomyelitis in adults, where biofilm is the cause of chronicity and difficulty in curing these diseases, the possible application of cold plasma to decontaminate or sterilize living tissues and prosthetic material motivated my interest in the subject and the development of this doctoral thesis.

For the development of the of the experimental work we used a device called the Atmospheric Pressure Plasma Chamber - Non-Thermal Plasma (APPC-NTP) characterized by using air as a gas, working at room temperature and atmospheric pressure for plasma production, making it a possible candidate to be used economically in a multitude of situations, including in the field of septic surgery of the musculoskeletal system. The calibration of the equipment was already carried out by PhD. Guillermo Baeza Oliete in his thesis "Contribution to the generation of cold plasma using SMD and JET electrodes".

In order to demonstrate the antimicrobial capacity of the plasma generation chamber on biofilms from *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* formed on commercially pure titanium (grade 3) and polytetrafluoroethylene (PTFE / Teflon) discs and on their respective cells planktonic, we developed four experimental designs.

In the first two experimental designs, we evaluated the activity of cold plasma on the biofilm of *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* formed on commercially pure titanium disks and PTFE and on their respective plankton cells. In the third experimental design, the ability of cold plasma to act on the culture medium and prevent the subsequent growth of microorganisms is analyzed. In the last experimental design, the viability of the biofilm of *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* was evaluated qualitatively using laser confocal microscopy after exposure to cold plasma.

The average lethality produced on the biofilm of *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*, formed during 48 hours on titanium discs, after 60 minutes of exposure to cold plasma was 99.7%, 99.9% and 99.6%, respectively. In the case of PTFE discs, it was 99.1%, 95.9% and 94.4%, respectively.

The mean lethality of the planktonic cells of *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* after exposure of cold plasma for 90 minutes was 99.87%.

Exposure of the BHI culture medium to cold plasma for 90 minutes generates a plasma activated culture medium (PAM) that prevents subsequent growth of *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*.

We verified, by confocal microscopy of laser exploration, that after exposure to cold plasma for 60 minutes of glass disks on which a 48-hour biofilm of *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* had previously formed, produced a complete destruction of the biofilm.

Resum

L'objecte d'aquesta tesi és estudiar l'activitat del plasma fred a pressió atmosfèrica o ANTP (Atmospheric Non Thermal Plasma) sobre el biofilm i les formes planctòniques de *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* i *Candida albicans.*

El plasma constitueix el quart estat d'agregació de la matèria, després dels sòlids, líquids i gasos. Es produeix al ionitzar total o parcialment un gas, podent utilitzar qualsevol font d'energia per a la seua generació (elèctrica, tèrmica, òptica o radiació electromagnètica ionitzant). En produir càrregues elèctriques lliures (electrons i ions) el plasma és un bon conductor de l'electricitat.

L'estat de plasma s'aconsegueix quan bona part de les partícules que componen el gas aconsegueixen tanta energia com perquè siga possible la seua ionització alliberant una alta densitat d'electrons. Els electrons produïts i les seues col·lisions posteriors amb els àtoms i molècules del gas generen les espècies reactives que interaccionaran amb l'entorn.

El plasma es pot classificar segons els nivells energètics relatius dels electrons i partícules pesades (ions i neutres) a plasma tèrmic i en plasma no tèrmic també anomenat plasma de no equilibri o plasma fred.

En el plasma tèrmic l'alta temperatura implica que totes les espècies químiques $(T_e \approx T_i \approx T_g)$ es troben en estat d'equilibri termodinàmic. En els plasmes no tèrmics, el refredament dels ions i les molècules sense càrrega, és més efectiu que la transferència d'energia dels electrons en les col·lisions, no aconseguint-se l'equilibri tèrmic i romanent el gas a baixa temperatura $(T_e >> T_i \approx T_g)$ pel que és conegut com a plasma fred. Els plasmes freds són capaços de destruir, a temperatura ambient, microorganismes amb un mínim o nul dany a l'entorn per calor.

Els plasmes freds es poden generar en cambres de buit, denominant-se plasmes de baixa pressió, o a pressió atmosfèrica denominant-se plasmes a pressió atmosfèrica. En els generats a baixes pressions de gas, la freqüència de col·lisió dels electrons és baixa pel que les energies dels electrons continuaran sent altes en comparació amb les energies de les partícules pesades (ions i neutres) representant un estat de no equilibri tèrmic.

Resum

A pressions atmosfèriques la freqüència de les col·lisions dels electrons és més alta, per la qual cosa disminuirà la diferència entre la T_e i les partícules pesades i per tant, l'estat del plasma estarà més prop de l'estat d'equilibri tèrmic. Esta condició es pot evitar subministrant una baixa densitat de potència d'alimentació o una potència polsada, la qual cosa porta a la formació de plasma fred o de no equilibri.

La necessitat de descontaminar biològicament material sensible o d'esterilitzar material en quiròfans, ha fet durant anys que s'estudiïn diverses tècniques de descontaminació. Hi ha diverses tècniques emprades en l'actualitat com la calor seca, calor humida, radiació ultraviolada, peròxid d'hidrogen o líquids amb diverses composicions químiques, però cap es pot aplicar sobre teixits vius o materials especialment sensibles.

L'ús de l'plasma fred a pressió atmosfèrica sorgeix com una tècnica relativament nova que permet descontaminar a temperatura ambient i pressió atmosfèrica, teixits vius o materials especialment sensibles. Sembla ser un bon candidat per a la inactivació microbiana en el biofilm o la destrucció de l'estructura d'una manera ecològica i rendible. L'estrès oxidatiu produït pels reactius de la química de l'plasma és el responsable dels efectes que es produeixen.

Atés que la meua activitat professional està dedicada al tractament de la infecció protètica articular i de l'osteomielitis crònica de l'adult, on el biofilm és la causa de la cronicitat i dificultat de curació d'aquestes malalties, la possible aplicació del plasma fred per a descontaminar o esterilitzar teixits vius i material protètic va motivar el meu interés pel tema i el desenvolupament d'aquesta tesi doctoral.

Per al desenvolupament del treball experimental emprem un equip denominat cambra de plasma a pressió atmosfèrica - plasma no tèrmic que es caracteritza per usar aire com a gas, treballar a temperatura ambient i a pressió atmosfèrica per a la producció de plasma, convertint-la en un possible candidat per poder ser utilitzada de forma econòmica en multitud de situacions, entre elles en el camp de la cirurgia sèptica de l'aparell locomotor. El calibratge de l'equip ja va ser realitzada pel Dr. Guillermo Baeza Oliete en la seva tesi "Contribució a la generació de plasma fred mitjançant elèctrodes SMD i JET".

Per poder demostrar la capacitat antimicrobiana de la cambra de generació de plasma sobre el biofim de *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *C. albicans* formades sobre discos de titani comercialment pur (grau 3) i politetrafluoroetilè (PTFE / Tefló) i

sobre les seves respectives cèl·lules planctòniques, desenvolupem quatre dissenys experimentals.

En els dos primers dissenys experimentals es valora l'activitat del plasma fred sobre el biofilm de *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *C. albicans* format sobre discos de titani comercialment pur i PTFE i sobre les seues respectives cèl·lules planctòniques. En el tercer disseny experimental s'analitza la capacitat del plasma fred per a actuar sobre el mitjà de cultiu i impedir el creixement posterior de microorganismes. En l'últim disseny experimental s'avalua qualitativament, mitjançant microscòpia confocal laser, la viabilitat del biofilm de *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *C. albicans* després de la seua exposició al plasma fred.

La letalidat mitjana produïda sobre el biofilm de *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *C. albicans*, formades durant 48 hores sobre discos de titani, després de 60 minuts d'exposició al plasma fred va ser del 99,7%, 99,9% i 99,6%, respectivament. En el cas dels discos de PTFE va ser del 99,1%, 95,9% i 94,4%, respectivament.

La letalidat mitjana de les cèl·lules planctòniques de *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *C. albicans* després de l'exposició del plasma fred durant 90 minuts va ser del 99,87%.

L'exposició del mitjà de cultiu BHI al plasma fred durant 90 minuts genera un mitjà de cultiu activat per plasma (PAM) que impedeix el posterior creixement de *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *C. albicans*.

Mitjançant microscòpia confocal d'exploració làser, es va constatar que la exposició al plasma fred durant 60 minuts de discos de cristall, sobre els quals prèviament s'havia format un biofilm de 48 hores de *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *C.albicans*, es va produir una destrucció completa del biofilm.

Índice

Índice	1
Índice de figuras	7
Índice de tablas	9
Abreviaturas	11
1 Introducción	13
1.1 Motivación	15
1.2 Infección protésica y biofilm	18
1.2.1 Patogénesis y microbiología	19
1.2.2 Factores de riesgo	20
1.2.3 Clasificación	20
1.2.4 Presentación clínica	20
1.2.5 Prevención	21
1.2.6 Tratamiento	22
1.3 El biofilm	23
1.3.1 Definición	23
1.3.2 Etapas de crecimiento del biofilm	23
1.3.3 Composición del biofilm	25
1.3.4 Funciones de la matriz de EPS	26
1.3.5 Características comunes del biofilm	29
1.3.6 Resistencia y Tolerancia	30
1.3.7 Estrategias de prevención y tratamiento antibiofilm	31
1.3.7.1 Estrategias dirigidas a evitar la adherencia primaria	32
1.3.7.2 Estrategias dirigidas a las EPS de la matriz	33
1.3.7.3 Estrategias dirigidas a la inducción de la dispersión	36
1.3.8 Nuevos abordajes tecnológicos	37

1.4 El plasma	_ 38
1.4.1 ¿Qué es el plasma?	_ 38
1.4.2 Clasificación del plasma	_ 39
1.4.2.1 Plasmas a alta temperatura o temperatura de fusión	_ 39
1.4.2.2 Plasmas a baja temperatura	_ 39
1.4.3 Clasificación del plasma no térmico o plasma frío	_ 41
1.4.3.1 Plasma a baja presión	_ 41
1.4.3.2 Plasma a presión atmosférica	_ 42
1.4.4 Bases de la generación del plasma frío a presión atmosférica	_ 42
1.4.4.1 Generación de plasma entre electrodos. Curvas de Paschen_	_ 43
1.4.4.2 Descarga pulsada de alto voltaje	_ 46
1.4.5 Fuentes de plasma frío	_ 46
1.4.5.1 Descarga de barrera dieléctrica (DBD)	_ 47
1.4.5.2 Chorro de plasma a presión atmosférica (APPJ)	_ 49
1 4 6 Química básica del plasma	51
1.4.0 Quinica basica del plasma	_ 51
1.4.7 Plasma directo y plasma indirecto	_ 51 _ 54
1.4.0 Quinica basica del plasma	_ 54 _ 54 _ 54
1.4.0 Quinica basica del plasma	_ 51 _ 54 _ 54 _ 55
1.4.0 Quinica basica del plasma	_ 51 _ 54 _ 54 _ 55 _ 55
1.4.0 Quinica basica del plasma	_ 51 _ 54 _ 54 _ 55 _ 55 _ 55 _ 56
1.4.0 Quinica basica del plasma	_ 51 _ 54 _ 54 _ 55 _ 55 _ 56 _ 58
1.4.0 Quinica basica del plasma	_ 51 _ 54 _ 55 _ 55 _ 56 _ 58 _ 58
1.4.0 Quinica basica del plasma	- 51 - 54 - 55 - 55 - 55 - 56 - 58 - 58 - 58 - 58
1.4.0 Quinica basica del plasma	- 51 - 54 - 55 - 55 - 56 - 58 - 58 - 58 - 58 - 58 - 58 - 58 - 58 - 58 - 55 - 58 - 59 - 59
1.4.0 Quinica basica del plasma	-51 -54 -54 -55 -55 -56 -58 -58 -58 -58 -58 -58 -58 -58 -59 -59
1.4.0 Quinica basica del plasma	-51 -54 -54 -55 -55 -58 -58 -58 -58 -58 -58 -58 -59 -59 -59 -60
1.4.0 Quinica basica del plasma 1.4.7 Plasma directo y plasma indirecto 1.4.7.1 Plasma directo 1.4.7.2 Plasma indirecto 1.4.7.2 Plasma indirecto 1.4.8 Soluciones activadas por plasma 1.4.9 Mecanismo de acción. Interacción con los microorganismos 1.4.10 Plasma frío y biofilm. Desafíos 1.4.10.1 Profundidad de penetración 1.4.10.2 Falta de estandarización 1.4.10.3 Biofilm en infecciones crónicas 1.4.10.4 Interacción de la matriz del biofilm con las ROS y RONS_ 1.4.10.5 Persistencia y tolerancia inducida por plasma 1.4.10.6 Dispersión del biofilm inducido por NO.	-51 -54 -55 -55 -56 -58 -58 -58 -58 -59 -59 -59 -60 -61
1.4.0 Quinica basica del plasma	= 51 = 54 = 55 = 55 = 56 = 58 = 58 = 58 = 59 = 60 = 61 = 62
1.4.0 Quinica basica del plasma indirecto 1.4.7 Plasma directo y plasma indirecto 1.4.7.1 Plasma directo 1.4.7.2 Plasma indirecto 1.4.8 Soluciones activadas por plasma 1.4.9 Mecanismo de acción. Interacción con los microorganismos 1.4.10 Plasma frío y biofilm. Desafíos 1.4.10.1 Profundidad de penetración 1.4.10.2 Falta de estandarización 1.4.10.3 Biofilm en infecciones crónicas 1.4.10.4 Interacción de la matriz del biofilm con las ROS y RONS_ 1.4.10.5 Persistencia y tolerancia inducida por plasma 1.4.10.6 Dispersión del biofilm inducido por NO. 1.4.10.7 Interferencia del plasma frío con el quorum sensing 2 Hipótesis y objetivo	-51 -54 -55 -55 -56 -58 -58 -58 -58 -59 -59 -60 -61 -62 -63

2.2 Objetivos	(
2.2.1 Objetivo general	
2.2.2 Objetivos específicos	
3 Material y métodos	
3.1 Equipamiento para la generación del plasma	. 6
3.1.1 Generador de funciones	. 6
3.1.2 Amplificador de alta tensión	7
3.1.3 Cámara de producción de plasma con electrodos tipo SMD	7
3.1.3.1 La cámara	7
3.1.3.2 Los electrodos	_ 7
3.2 Microorganismos y medios de cultivo	7
3.2.1 Microorganismos	_ 7
3.2.2 Medios de cultivo y soluciones y empleados.	_ 7
3.2.2.1 Tampón fosfato salino estéril	_ 7
3.2.2.2 Agar Infusión Cerebro Corazón (Agar ICC/BHI)	7
3.3 Actividad del ANTP sobre el biofilm de <i>S. aureus, P. aeruginosa y albicans</i> formado en discos de titanio y PTFE	y (
3.4 Actividad del ANTP sobre las células planctónicas de <i>S. aureus P. aerugir</i> y <i>C. albicans</i>	10. _ {
3.5 Actividad del ANTP sobre el medio de cultivo	. 8
3.6 Evaluación de la viabilidad del biofilm mediante microscopía confocal su exposición al plasma frío	tr: ع
3.7 Análisis de los datos	9
4 Resultados	9
4.1 Actividad del ANTP sobre el biofilm de <i>S. aureus, P. aeruginosa y albicans</i> formado en discos de titanio y PTFE	y (
4.1.1 Factor "disposición espacial"	ģ
4.1.2 Factor tipo de "material"	1(
4.1.3 Factor tipo de "microorganismo"	1(
4.1.4 Factor "tiempo"	1(

4.1.5 Interacción de factor "tiempo-material"	106
4.1.6 Interacción "tiempo-microorganismo"	107
4.2 Actividad del ANTP sobre las células planctónicas de <i>S. aureus P. aerugi</i> y <i>C. albicans</i>	<i>nosa</i> 110
4.3 Efecto microbicida del medio BHI tras exposición al ANTP	115
4.3.1 Efecto de la exposición de 30 minutos del medio de cultivo BHI	116
4.3.2 Efecto de la exposición de 90 minutos del medio de cultivo	118
4.4 Análisis, mediante microscopía confocal laser de la viabilidad del biofil S. aureus, P. aeruginosa y C. albicans tras su exposición al plasma frío a pro atmosférica	m de esión 121
4.4.1 Discos en seco	121
4.4.2 Discos en medio líquido	123
5 Discusión	127
5.1 Actividad del ANTP sobre el biofilm de <i>S. aureus, P. aeruginosa albicans</i> formadas en discos de titanio y PTFE	y <i>C</i> . 129
5.2 Actividad del ANTP sobre las células planctónicas de <i>S. aureus P. aerugi</i> y <i>C. albicans</i>	nosa 130
5.3 Análisis del efecto microbicida del medio BHI tras su exposición al A	NTP 131
5.4 Análisis, mediante microscopía confocal láser, de la viabilidad del biofil <i>S. aureus, P. aeruginosa</i> y <i>C. albicans</i> tras su exposición al plasma frío a pre atmosférica	m de esión 132
5.5 Comentarios finales	133
5.6 Limitaciones del estudio	134
5.7 Líneas futuras de investigación	136
6 Conclusiones	137
7 Bibliografía	141
8 Anexo	163
1 Formación de especies reactivas del radical hidroxilo OH ⁻ y monóxid nitrógeno NO ⁻	lo de 165

2 Actividad del ANTP sobre el biofilm de S. aureus, P. aeruginosa y C. albica	ans
formadas en discos de titanio y PTFE. Experimentos (1-13)1	166
3 Actividad del ANTP sobre el biofilm de S. aureus, P. aeruginosa y C. albica	ans
formadas en discos de titanio y PTFE. Datos de letalidad 1	176
4 Actividad del ANTP sobre las células planctónicas de S. aureus P. aerugino	osa
y <i>C. albicans</i> . Datos de letalidad 1	179

Índice de figuras

Figura 1. Polimerización del tetrafluoroetileno
Figura 2. Ciclo de las etapas de crecimiento del biofilm
Figura 3. Estructura de la matriz de EPS
Figura 4. Estrategias dirigidas a las EPS de la matriz y su dispersión
Figura 5. Especies reactivas del plasma
Figura 6. Clasificación del plasma
Figura 7. Diferencia entre <i>streamer</i> y arco eléctrico
Figura 8. Disposición planar de los electrodos
Figura 9. Disposición coaxial
Figura 10. Disposición de superficie y coplanar
Figura 11. Jet de plasma 50
Figura 12. Exposición de la muestra al plasma directo
Figura 13. Exposición a plasma indirecto
Figura 14. Generador de funciones
Figura 15. Amplificador de Voltaje
Figura 16 . APPC-NTP
Figura 17. Configuración de electrodos SMD
Figura 18. Dinámica del plasma en los electrodos73
Figura 19. Esquema de malla del electrodo de tierra
Figura 20. Electrodos y dieléctrico
Figura 21. Electrodos ubicados en sus columnas. Baeza G. (2017)75
Figura 22. Diluciones seriadas. Protocolo de trabajo para cuantificar las células
viables presentes en el biofilm
Figura 23. Esquema de trabajo. Evaluación de la actividad antimicrobiana del
ANTP sobre el biofilm de S. aureus, P. aeruginosa y C. albicans en discos de
titanio y PTFE
Figura 24. Diluciones seriadas. 83
Figura 25. Esquema de trabajo. Evaluación de la actividad antimicrobiana del
ANTP sobre células planctónicas de S. aureus P. aeruginosa y C. albicans 84
Figura 26. Esquema de trabajo. Evaluación de la actividad microbicida del BHI
tras su exposición al plasma frío
Figura 27. Esquema de trabajo. Evaluación de la de la viabilidad del biofilm tras
la exposición al plasma frío a presión atmosférica (discos en seco) mediante
microscopía confocal láser

Figura 28. Esquema de trabajo. Evaluación de la de la viabilidad del biofilm
microscopía confocal láser
Figura 29. Soportes de ubicación de los discos de titanio y PTFE
Figura 30. Letalidad para las diferentes disposiciones espaciales 100
Figura 31. Letalidad para el factor "material" (titanio y PTFE) 102
Figura 32. Letalidad para el factor "microorganismo" (S. aureus, P. aeruginosa
<i>y C. albicans</i>)
Figura 33. Letalidad para el factor "tiempo" 105
Figura 34. Interacción "tiempo-material"
Figura 35. Interacción "tiempo-microorganismo"
Figura 36. Letalidad sobre células planctónicas de S. aureus y P. aeruginosa tras
60 minutos de exposición (inóculos 10 ³ -10 ⁵ UFC/ml) 111
Figura 37. Letalidad sobre células planctónicas de C. albicans tras 60 minutos
de exposición en concentraciones bacterianas desde 10 ⁴ - 10 ² UFC/ml) 111
Figura 38. Letalidad sobre células planctónicas de S. aureus y P. aeruginosa tras
90 minutos de exposición (inóculos 10 ³ -10 ⁸ UFC/ml)112
Figura 39. Letalidad sobre células planctónicas de C. albicans tras 90 minutos
de exposición (inóculos 10 ² -10 ⁸ UFC/ml)113
Figura 40. Curva de crecimiento de S. aureus (30 minutos) 116
Figura 41. Curva de crecimiento P. aeruginosa (30 minutos) 117
Figura 42. Curva de crecimiento C. albicans (30 minutos) 117
Figura 43. Curva de crecimiento S. aureus (90 minutos) 118
Figura 44. Curva de crecimiento P. aeruginosa (90 minutos) 119
Figura 45. Curva de crecimiento C. albicans (90 minutos) 119
Figura 46. Turbidez medios BHI 120
Figura 47. Microscopía confocal discos en seco (S. aureus) 122
Figura 48. Microscopía confocal en seco (P. aeruginosa) 122
Figura 49. Microscopía confocal en seco (C. albicans) 123
Figura 50. Microscopía confocal de discos en medio líquido (S. aureus) 124
Figura 51. Microscopía confocal de discos de cristal expuestos al ANTP en
medio líquido (P. aeruginosa) 124
Figura 52. Microscopía confocal de discos en medio líquido (C. albicans) 125

Índice de tablas

Abreviaturas

AC: Corriente alterna (Alternating Current)

- **ADN:** Ácido Desoxirribonucleico
- AgNP: Nanopartículas de plata
- AIP: Péptidos Autoinductores (Autoinducing Peptides)
- ANTP: Plasma no térmico a presión atmosférica (Atmospheric Non Thermal Plasma)
- **APNTPJ:** Jet de plasma frío a presión atmosférica (Atmospheric Pressure Non Thermal Plasma Jet)
- APP: Plasma a presión atmosférica (Atmospheric Pressure Plasma)
- **APPC-NTP:** Cámara de plasma a presión atmosférica-Plasma no térmico (Atmospheric Pressure Plasma Chamber-No Thermal Plasma)
- APPJ: Jet de plasma a presión atmosférica(Atmospheric Pressure Plasma)

BHI: Agar cerebro-corazón (Brain Heart Infusion)

DBD: Descarga de barrera dieléctrica (Dielectric Barrier Discharge)

DC: Corriente continua (Direct current)

- eADN: Acido desoxirribonucleico extracelular (eADN)
- EPS: Sustancias poliméricas extracelulares (Extracellular Polymeric Substance)
- IP: Infección Protésica
- LPP: Plasma a baja presión (Low Pressure plasma)
- LTE: Equilibrio térmico local (Local Thermal Equilibrium)
- MHCD: Descarga de cátodo de microagujero (Microhollow Cathode Discharge)
- ne: Densidad de electrones
- ns: nanosegundos

NTP: Plasma no térmico (Non Thermal Plasma)

- **OAUGDP:** Plasma de descarga luminiscente a una atmósfera (One Atmosphere Uniform Glow Discharge)
- PAM: Medio activado por Plasma (Plasma Activated Media)
- PAW: Agua Activada por Plasma (Plama activated Water)
- PBS: Tampón fosfato salino (phosphate buffered saline)
- PTFE/Teflón: Politetrafluoroetileno/Teflon

Abreviaturas

QS: Quórum Sensing

QSI: Inhibidores del Quórum Sensing (Quorum Sensing Inhibitors)

RF: Radiofrecuencia (Radio Frecuency)

RNS: Especies reactivas del Nitrógeno (Reactive Nitrogen Species)

RONS: Especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (Reactive Oxygen and Nitrogen Species)

ROS: Especies reactivas del oxígeno (Reactive Oxygen Species)

RPMI: Medio de cultivo Roswwell Park Memorial Institute medium

SMD: Micro-descarga superficial (Surface Micro-Discharge)

T_e: Temperatura de los electrones

T_{g:} Temperatura del gas

T_i: Temperatura de los iones

- **TP:** Plasma térmico. (Thermal plasma)
- UFC: Unidades formadoras de colonias
- **VBNC:** Viable pero no cultivable (Viable But NonCulturable)

1 Introducción

1.1 Motivación

Este trabajo de investigación surge de la confluencia de dos circunstancias, por un lado, el desarrollo por parte del Dr. Guillermo Baeza Oliete de su tesis doctoral "Contribución a la generación de plasma frío mediante electrodos SMD y JET" (1) y por otro mi dedicación como cirujano ortopédico al tratamiento de las enfermedades infecciosas del aparato locomotor, incluyendo la infección articular protésica y la osteomielitis crónica del adulto. En este tipo de enfermedades, el biofilm es la causa de la cronicidad, recidivas y dificultad de curación.

El objetivo de la tesis "Contribución a la generación de plasma frío mediante electrodos SMD y JET" era la obtención de correlaciones entre las variables de entrada de los equipos de producción de plasma con las variables de salida de éste, con el fin de obtener un mejor conocimiento del plasma y de poder predecir su comportamiento y su posible aplicación o no, sobre tejidos vivos y material especialmente sensible.

En la actualidad para la descontaminación de materiales se emplean técnicas como el calor seco, calor húmedo, radiación ultravioleta, peróxido de hidrógeno o líquidos con diversas composiciones químicas, pero ninguna se puede aplicar sobre tejidos vivos o materiales especialmente sensibles.

El uso del plasma frío a presión atmosférica o ANTP (*atmospheric non thermal plasma*) surge como una técnica relativamente nueva que permite descontaminar a temperatura ambiente y presión atmosférica, tejidos vivos o materiales especialmente sensibles.

Los biofilms bacterianos o fúngicos originan, hoy en día, una proporción importante de infecciones asociadas a dispositivos médicos y de infecciones crónicas en humanos. Nuestra capacidad para controlarlas se ve comprometida debido a una resistencia elevada a las defensas del huésped y una mayor tolerancia a los antibióticos dentro del biofilm. El plasma frío surge como una opción terapéutica prometedora, alternativa al tratamiento con antimicrobianos, para la destrucción de la estructura del biofilm o inactivación microbiana de una manera ecológica y rentable, pudiendo controlar o erradicar las infecciones en la que el biofilm está implicado. El estrés oxidativo producido por los reactivos de la química del plasma es el responsable de los efectos que se producen. El poder tratar con plasma frío incluso, de manera intraoperatoria, la infección protésica o la osteomielitis crónica podría aumentar la tasa de curaciones de este problema sanitario actual que crea grandes costos económicos y sociales.

Por lo tanto, mi inquietud fundamental para la ejecución de este proyecto ha sido la utilidad potencial del plasma frío para mejorar el tratamiento y el pronóstico de las infecciones osteoarticulares protésicas y de las osteomielitis crónicas.

Para poder considerar las aplicaciones clínicas previamente hay que realizar estudios *in vitro*. En esta tesis concretamente se estudió la actividad *in vitro* del plasma frío a presión atmosférica sobre el biofilm y células planctónicas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. Para ello utilizamos un prototipo de generación de plasma no térmico a presión atmosférica - plasma no térmico o APPC-NTP (*atmospheric pressure plasma chamber – no thermal plasma*). El equipo trabaja a presión atmosférica, usa aire como gas para la producción de plasma generándolo a temperatura ambiente, lo que lo convierte, en un candidato perfecto para poder ser utilizado de forma económica y ecológica en la descontaminación biológica de tejidos vivos y en la descontaminación y esterilización de implantes médicos.

Para valorar la actividad producida por el plasma frío se seleccionaron tres agentes causales representativos de infecciones osteoarticulares: *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*.

Como representante de las bacterias Gram-positivas se eligió *S. aureus* por su resistencia a los antibióticos como en el caso de los SAMR (*S. aureus* meticilín resistentes) y también por su elevada frecuencia, ya que representa el 23% de las infecciones protésicas (2).

Entre las bacterias Gram-negativas responsables del 10% de estas infecciones se escogió *P. aeruginosa* por la gran dificultad para su erradicación en la infección periprotésica debido a su multiresistencia.

En el caso de los hongos se seleccionó *C. albicans* por ser la especie fúngica más común en este tipo de infecciones y por su capacidad de producir un biofilm complejo. Los hongos están implicados en el 1% de los casos de infección protésica pero su importancia radica en las altas tasas de fracaso de tratamiento y en afecta a pacientes con factores de riesgo asociados (uso de corticoides, fármacos inmunosupresores, enfermedades malignas, tratamiento antibiótico
previo, presencia de catéteres permanentes, diabetes mellitus e infección bacteriana periprotésica previa, entre otros). Las tasas de fracaso de tratamiento son de alrededor del 50% cuando se realiza un desbridamiento agudo y retención del implante o un recambio en un tiempo. A pesar de que el estándar actual de tratamiento es el recambio en dos tiempos sus resultados son inferiores comparados con los obtenidos en las infecciones bacterianas.

Los biomateriales utilizados en el presente trabajo han sido discos de titanio, de 1,27 cm de diámetro y 0,3 cm de alto, comercialmente puro grado 3 (modelo RD128-Ti) y discos de politetrafluoroetileno (PTFE/Teflón, modelo RD128-PTFE) del mismo tamaño, ambos suministrados por Biosurface Technologies Corp.

El titanio (Ti) es un metal de transición de número atómico 22. Se encuentra en la naturaleza como dióxido de titanio (TiO₂) formando un mineral llamado rutilo. El titanio no aleado conocido como titanio comercialmente puro contiene entre un 98,64% y un 95,5% de titanio. Se clasifica en diversos grados (1, 2, 3 y 4) en función de los elementos intersticiales presentes en la estructura como oxígeno, nitrógeno, carbono o hierro (3).

La aleación Ti-6Al-4V acapara más del 45% de la producción de titanio y es ampliamente utilizada como biomaterial para la fabricación de dispositivos biomédicos. Las ventajas de su uso como material protésico y de osteosíntesis en cirugía ortopédica son claras ya que al ser bioinerte consigue una mejor osteointegración. El titanio es resistente a la corrosión y muy flexible, con un módulo de elasticidad cinco veces superior al hueso cortical evitando la osteoporosis por protección de cargas y la rotura por fatiga. Como inconvenientes presenta una escasa resistencia a la fricción y desgaste acelerado. El titanio puro es más usado en osteosíntesis y las aleaciones de titanio se usan más en la fabricación de material protésico.

El politetrafluoroetileno, más conocido como teflón, es un polímero similar al polietileno en el que los átomos de hidrógeno han sido sustituidos por átomos de flúor (4). La fórmula química del monómero de tetrafluoroetileno es $CF_2=CF_2$. El monómero se polimeriza en largas cadenas de hasta 50.000 monómeros cada una.



Figura 1. Polimerización del tetrafluoroetileno.

Los enlaces C-C y C-F son enlaces covalentes dándole una gran fuerza de unión. Los átomos carbono y flúor coinciden en tamaño, de manera tal que estos últimos forman una lámina continua sobre la cadena carbonada protegiéndola del ataque químico.

La molécula se empaqueta formando un material sólido, duro, rígido, insoluble, inerte y no inflamable, con un punto de fusión elevado que le aporta estabilidad térmica y química. Es extremadamente resistente a la corrosión y a la acción de los disolventes Tiene un bajo coeficiente de fricción y elevada hidrofobicidad. Aunque en cirugía ortopédica se usa el polietileno de ultra alto peso molecular con alto grado de entrecruzamiento como superficie de fricción en las prótesis articulares, el tetrafluoroetileno posee características semejantes de hidrofobicidad, resistencia y coeficiente de fricción.

1.2 Infección protésica y biofilm

La cirugía protésica es el tratamiento de elección en las artropatías degenerativas e inflamatorias cuando comprometen la calidad de vida del paciente, existe deformidad importante y los analgésicos no controlan el dolor. Aunque el aflojamiento aséptico es más frecuente, la infección periprotésica (IP) es una complicación devastadora (5). Su incidencia es de alrededor de 1-3% a pesar de una técnica quirúrgica correcta, medidas asépticas y profilaxis adecuada (6). La IP se asocia con un mayor tiempo operatorio, mayor pérdida de sangre, mayor número de complicaciones, y el aumento de los costes sanitarios (7). Aunque la mortalidad asociada a intervención quirúrgica por una infección es baja, el grado de morbilidad es muy importante. El tratamiento de la IP es complejo, precisa de múltiples intervenciones quirúrgicas, hospitalizaciones y uso prolongado de antibióticos.

1.2.1 Patogénesis y microbiología

La IP es el resultado de la llegada de los microorganismos a la superficie protésica de manera directa o por vía hematógena. Una vez alcanzada la superficie protésica, se multiplica formando el biofilm. La existencia del biofilm conlleva dos importantes consecuencias:

- 1. Las manifestaciones clínicas dependerán del número de células libres (planctónicas) desprendidas del biofilm y de la respuesta inmune contra sus antígenos. Las formas agudas con signos inflamatorios asociados son la consecuencia de la respuesta inmune a las células planctónicas.
- 2. Los microorganismos dentro del biofilm muestran una resistencia más elevada a las defensas del huésped y una mayor tolerancia a los antibióticos que en forma planctónica, provocando una reacción inflamatoria menor.

Habitualmente, la IP se produce por contaminación directa en el momento de la cirugía por microorganismos de la piel del paciente, del quirófano o de la piel del personal sanitario. El tiempo desde la contaminación hasta el inicio de los síntomas es variable.

Cualquier microorganismo puede estar asociado a la IP, pero el género *Staphylococcus* causa el 60% de estas infecciones siendo más frecuentes las causadas por *Staphylococcus* coagulasa negativos (30-40%) que por *S. aureus* (12-23%). Las infecciones por *Streptococcus, Enterococcus y* bacilos Gramnegativos (*Enterobacteriaceae y P. aeruginosa*) representan el 10% de las IP. Otros microorganismos causales son las bacterias anaerobias (2-4%), entre ellas *Cutibacterium acnes*, los hongos (1%) y las micobacterias (0,3%). Además, se han descrito infecciones polimicrobianas (10-20%) e IP con cultivos negativos en el 7-35% de los episodios (2).

En las IP agudas predominan los bacilos Gram-negativos, *Streptococcus* spp y *S. aureus*, mientras que *Staphylococcus* coagulasa negativos y *C. acnes* son más frecuentes en las IP crónicas.

1.2.2 Factores de riesgo

Los factores de riesgo más habituales que predisponen a la infección de la herida quirúrgica o a la IP y contraindican la cirugía protésica son la artritis séptica (8), la sepsis grave y las infecciones activas en piel, tejido subcutáneo o tejidos profundos.

Además, se han descrito otros potenciales factores de riesgo que predisponen a la infección de la herida quirúrgica o a la IP: antecedentes de cirugías previas, procedimientos quirúrgicos previos en la articulación afectada, diabetes mellitus mal controlada, malnutrición, obesidad mórbida (IMC >40 kg/m²), enfermedad hepática activa, insuficiencia renal crónica, tabaquismo (>1 paquete/día), consumo excesivo de alcohol (>40 unidades/ semana), abuso de drogas por vía intravenosa, hospitalización reciente, estancia prolongada en instituciones sociosanitarias, sexo masculino, artritis postraumática, artropatía inflamatoria e inmunodeficiencia grave (9)

1.2.3 Clasificación

Aunque actualmente no existe una clasificación de las IP universalmente aceptada, se han propuesto diversos sistemas de clasificación. Tsukayama (10) sugirió un sistema que divide a las IP en cuatro grupos: 1) cultivos positivos intraoperatorios, 2) infección postquirúrgica precoz (< 2-4 semanas), 3) infección crónica tardía (> 2-4 semanas) y 4) infección hematógena aguda tras bacteriemia. La clasificación de McPherson (11) tiene en cuenta el tipo de infección (postoperatoria aguda y hematógena menor de 4 semanas y crónica mayor de 4 semanas); el tipo de huésped (A no comprometido, B comprometido y C seriamente comprometido) y las condiciones locales de la extremidad (1 no comprometido, 2 comprometido y 3 seriamente comprometido).

1.2.4 Presentación clínica

Las manifestaciones clínicas de las IP están determinadas por varios factores, como las características del huésped, la vía de infección y los microorganismos asociados. La presentación clínica puede variar, desde un curso indolente crónico, que se caracteriza solo por el dolor articular progresivo, hasta una artritis séptica fulminante. Los pacientes con infecciones agudas son más propensos a tener signos clásicos de inflamación incluyendo fiebre, aumento local de la temperatura, eritema que recubre la zona del implante, derrame articular, y/o

drenaje de la herida. Los pacientes con infecciones crónicas suelen presentar dolor articular crónico y rigidez articular sin los signos típicos de infección. Las infecciones hematógenas clínicamente se comportan como infecciones agudas (12). Típicamente, las IP por microorganismos más virulentos tienden a asociarse con infecciones agudas y las causadas por gérmenes menos virulentos pueden simplemente presentarse con dolor articular progresivo y rigidez asociados o no a aflojamiento de la prótesis teniendo que realizar el difícil diagnóstico diferencial con el aflojamiento aséptico. La fiebre suele ser un indicador poco fiable de IP (12).

1.2.5 Prevención

La importancia de la prevención de la IP reside en la posibilidad de disminuir sus graves complicaciones asociadas. Las estrategias de prevención van dirigidas a: actuar sobre los factores modificables relacionados con el paciente, asociar una profilaxis antibiótica primaria correcta (13), utilizar una técnica quirúrgica cuidadosa junto con unas medidas adecuadas en el quirófano (14) y optimizar el uso de las nuevas tecnologías en los implantes para evitar la adherencia primaria de los microorganismos (15) (Ver punto 1.3.8.1).

Entre los factores modificable relacionados con el paciente sobre los que se puede actuar previamente a la cirugía para disminuir el riesgo de IP se encuentran la enfermedad cardiovascular, el alcoholismo, la enfermedad hepática y renal, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la diabetes, la desnutrición, la artritis reumatoide, etc. Son factores de riesgo no modificables la edad, el género, el riesgo anestésico, hemiplejia previa, la anticoagulación crónica, la infección previa de la articulación, la cirugía articular previa, etc. Un análisis exhaustivo de cada uno de estos factores se encuentra en la publicación del II Consenso Internacional de Filadelfia en infecciones musculoesqueléticas (9).

Las estrategias dirigidas a evitar la adherencia primaria sobre los implantes se desarrollan en el apartado 1.3.8.1.

1.2.6 Tratamiento

Los objetivos primarios del tratamiento de la IP son la erradicación de los microorganismos causales y conseguir un implante indoloro y funcionante. Para ello hay que realizar un diagnóstico precoz e instaurar el tratamiento más apropiado según cada caso. Existen seis opciones de tratamiento: 1) Lavado, desbridamiento, tratamiento antibiótico y retención del implante (16); 2) Recambio en un tiempo (17); 3) Recambio en dos tiempos (18,19); 4) Artroplastia resección (cadera y hombro) o artrodesis (rodilla, tobillo, codo, hombro) (20); 5) Amputación y 6) Tratamiento antibiótico supresor (21). Hay que tener presente que el manejo terapéutico de estas infecciones es complejo debido, entre otras causas, a la presencia del biofilm y a la elevada edad de la población afectada con gran morbilidad asociada.

Las indicaciones de cada uno de los tratamientos quedan fuera del objetivo de esta tesis, pero los factores a considerar en la elección del mismo son: el posible aflojamiento de la prótesis, la comorbilidad del paciente, la virulencia y sensibilidad antibiótica del patógeno, el estado de las partes blandas, el stock óseo residual y el tiempo desde el inicio de los síntomas; sin olvidar que la formación del biofilm y su maduración responsable de muchos fracasos terapéuticos.

El plasma frío es una nueva tecnología destinada a la eliminación física de los biofilms. Su capacidad de destrucción del biofilm determinará su utilidad en el campo de la infección articular periprotésica. La posibilidad de retención del implante mediante el desbridamiento protésico y tratamiento antibiótico o el poder realizar el recambio en un tiempo utilizando la tecnología del plasma frío, en el caso de ser eficiente, disminuiría los riesgos asociados a múltiples intervenciones en pacientes frágiles y los costes sociales y sanitarios generados por este tipo de enfermedades.

1.3 El biofilm

1.3.1 Definición

El biofilm se define como una comunidad de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares, o EPS (*extracellular polymeric substance*), y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo (22-24).

Una amplia variedad de microorganismos es capaz de formar biofilm, entre ellos las bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y los hongos. Todos pueden depositarse en dispositivos médicos formando biofilms que les confieren hasta 1000 veces más resistencia y tolerancia a los antibióticos en comparación con sus formas planctónicas (25-27).

Actualmente, los biofilms están implicadas en casi el 80% de las infecciones hospitalarias recalcitrantes, jugando un papel relevante en infecciones crónicas con importantes implicaciones clínicas como la infección pulmonar por *P. aeruginosa* en la fibrosis quística, la formación de la placa dental bacteriana, las infecciones recidivantes del tracto urinario causadas por *Escherichia coli* y la infección de dispositivos médicos como catéteres centrales o periféricos, sondas urinarias, lentes de contacto, válvulas cardiacas, marcapasos, implantes mamarios, prótesis dentales y prótesis articulares en cirugía ortopédica (28-30).

1.3.2 Etapas de crecimiento del biofilm

Cronológicamente el ciclo biológico del biofilm se puede subdividir en las siguientes cuatro fases (31).

- 1. Adherencia primaria
- 2. Formación temprana y proliferación del biofilm
- 3. Maduración del biofilm
- 4. Dispersión

Cada una de las etapas del ciclo están representadas y descritas en la Figura 2.



Figura 2. Ciclo de las etapas de crecimiento del biofilm. Adaptado de Koo et al. (31).

1.3.3 Composición del biofilm

El biofilm está compuesto por microorganismos (de una o múltiples especies microbianas) y por una matriz de material extracelular que rodea a éstos. Los microorganismos representan menos del 10% de la masa seca del biofilm, mientras que la matriz constituye el 90% de ésta (32).

La matriz es el material extracelular producido por los propios microorganismos. Está formada por un conglomerado de diferentes tipos de biopolímeros, conocidos como EPS, que forman la arquitectura tridimensional del biofilm y son responsables de la adhesión a las superficies y de su cohesión. La matriz representa una compleja interfaz biológica compuesta principalmente por agua, iones inorgánicos y moléculas orgánicas (polisacáridos, ADN extracelular eADN, proteínas, lípidos, surfactantes y estructuras bacterianas extracelulares (33,34).

La matriz de EPS ha sido estudiada en diferentes especies bacterianas y su composición varía en función del tiempo, tipo de microorganismo, fuerzas locales de cizallamiento mecánico, disponibilidad de nutrientes del sustrato y el entorno del huésped (35). La matriz de *P. aeruginosa* consta de exopolisacáridos (alginato, Pel, Psl), proteínas de superficie (pili tipo IV, Fimbrias CupA), proteínas de unión a lectina y eADN (36). A diferencia de la matriz extracelular de *S. aureus* formada por un polisacárido de adhesión intercelular (PIA), poli-N-acetil glucosamina (PNAG), proteínas adhesivas (Baps: proteínas asocias al biofilm) y eADN.

La matriz extracelular del biofilm de *C. albicans* está compuesta principalmente de carbohidratos (39,6%), especialmente glucosa (32,2%), aunque también es posible encontrar pequeñas cantidades de proteínas (5%), hexosaminas (3,3%), fósforo (0,5%), ácido urónico (0,1%) y e-ADN (37). Las moléculas de glucosa se encuentran formando principalmente β -1,3-glucano, el cual no solo es el componente fundamental de la pared celular sino también el carbohidrato más abundante de la matriz extracelular. El biofilm de *C. albicans* es bifásica, con una capa de blastosporas metabólicamente activas adheridas al biomaterial, recubiertas por una fina capa de matriz extracelular compuesta por β -1,3-glucano similar a la pared celular. Por encima se sitúa una capa de abundantes hifas, inmersas en matriz extracelular, y metabólicamente activas (38).

Estudios con modelos *in vitro* han observado que la duración de la fase de adherencia de *C. albicans* comprende aproximadamente 12 horas, tras las cuales

se pueden observar agregados celulares sobre la superficie colonizada (38). Alrededor de 20 a 24 horas después de la adhesión de las primeras células se obtiene un biofilm maduro, que continuará sintetizando nueva matriz extracelular (fase de maduración) y dispersando (fase de dispersión) células planctónicas que intentarán colonizar nuevas superficies (39).

En la Figura 3 se representa un esquema de los componentes de los componentes de la matriz.

1.3.4 Funciones de la matriz de EPS

La mayor parte de la biomasa del biofilm está formada por una matriz de EPS hidratada. La organización de las moléculas de las EPS se basa en interacciones intermoleculares que también determinan sus propiedades mecánicas y la actividad fisiológica de los organismos en el biofilm (32).

Se han determinado varias funciones asociadas a los componentes de las EPS (32):

- 1. Adhesión: Interviene en los pasos iniciales de la colonización de las superficies abióticas y bióticas por las células planctónicas y en la fijación a largo plazo del biofilm. EPS implicadas: Polisacáridos, proteínas, ADN y moléculas anfipáticas.
- 2. Agregación: Permite la unión entre las células, la inmovilización temporal de las poblaciones bacterianas, el desarrollo de altas densidades celulares y el reconocimiento célula-célula. EPS implicadas: Polisacáridos, proteínas y eADN.
- 3. Cohesión del biofilm: Forma una red polimérica hidratada dando estabilidad mecánica y determinando la arquitectura del biofilm, así como permitiendo la comunicación célula-célula. EPS implicadas: Polisacáridos neutros y cargados, proteínas y eADN.
- Retención de agua: Mantiene un microambiente altamente hidratado impidiendo la desecación en ambientes con deficiencia de agua. EPS implicadas: Polisacáridos hidrofílicos.
- 5. Barrera protectora: Confiere resistencia a las defensas inespecíficas y específicas del huésped, protección contra la radiación ultravioleta, así como tolerancia a agentes antimicrobianos como desinfectantes y antibióticos. EPS implicadas: Polisacáridos y proteínas.

- Absorción de componentes orgánicos: Permite la acumulación de nutrientes del medio ambiente. EPS implicadas: Polisacáridos y proteínas cargadas o hidrófobas.
- Absorción de iones: Promueve la formación del polisacárido y el intercambio de iones. EPS implicadas: Polisacáridos y proteínas cargadas, fosfato y sulfato.
- 8. Actividad enzimática: Permite la digestión de macromoléculas exógenas para la obtención de nutrientes, así como la degradación de las EPS estructurales, liberando células del biofilm. EPS implicadas: Proteínas.
- 9. Fuente de nutrientes: Proporciona una fuente de compuestos que contienen carbono, nitrógeno y fósforo. EPS implicadas: Potencialmente todos los componentes de la EPS.
- 10. Intercambio de información genética: Facilita la transferencia horizontal de genes entre las células del biofilm. EPS implicadas: eADN.
- 11. Dador o aceptor de electrones: Permite la actividad redox en la matriz del biofilm protegiendo a los microorganismos contra los agentes oxidantes. EPS implicadas: Proteínas.
- 12. Exportación de componentes celulares: Libera material celular como resultado del recambio metabólico. EPS implicadas: Vesículas de membrana que contienen ácidos nucleicos, enzimas, lipopolisacáridos y fosfolípidos.
- 13. Descenso del nivel de energía: Almacena el exceso de carbono en ratios desequilibrados de carbono/nitrógeno. EPS implicadas: Polisacáridos
- 14. Unión de enzimas: Resultados de la acumulación, retención y estabilización de enzimas a través de su interacción con polisacáridos. EPS implicadas: Polisacáridos y enzimas.



Figura 3. Estructura de la matriz de EPS. Adaptado de Koo et al. (31). La matriz de EPS funciona como un andamiaje tridimensional que proporciona cohesión, adhesión a las superficies, estabilidad mecánica y protección. Está compuesta principalmente por agua, iones inorgánicos y moléculas orgánicas representadas en la figura como polisacáridos, ADN extracelular, proteínas y adhesinas. En la figura se representa su organización e interacciones moleculares responsables de la agregación y cohesión intercelular. Se observan las proteínas transmembrana encargadas de la secreción de los polisacáridos y el ADN extracelular.

1.3.5 Características comunes del biofilm

Bacterias y hongos son capaces de formar biofilms con unas características muy similares:

- 1. Adherencia: Los microorganismos pueden adherirse a casi todo tipo de materiales artificiales (plásticos, metales, cerámicas e híbridos) y superficies bióticas (esmalte dental, hueso, piel, mucosas, tejido conectivo y endotelio vascular), utilizando mecanismos de adhesión específicos (interacciones adhesina bacteriana-receptor del huésped) y no específicos (fuerzas hidrófobas o electrostáticas) (40).
- 2. Matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS): Aunque la composición química y física precisa de las EPS (polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos) varía entre especies y condiciones de crecimiento (tipo y abundancia de nutrientes, hidrodinámica, temperatura y concentración de oxígeno), las EPS proporcionan un andamiaje para la estabilidad mecánica y crea microambientes químicos y físicos compartimentados que brindan protección a las células dentro de una estructura en tres dimensiones heterogénea.
- 3. Arquitectura: Hay un número limitado de formas comunes de los biofilms cultivados *in vitro* (parches planos, montículos, hongos, torres, ondulaciones y serpentinas) que no son específicas de la especie y dependen en gran medida de la madurez del biofilm, de la producción de ciertos componentes de las EPS y de las condiciones de crecimiento (41).
- 4. Viscoelasticidad: Es la propiedad que permite al biofilm absorber y disipar energía, en lugar de desprenderse, cuando se exponen a fuerzas mecánicas como el cizallamiento hidrodinámico. El componente elástico permite que recupere su forma durante las perturbaciones intermitentes, mientras que el componente viscoso permite que fluyan de manera similar a los líquidos cuando se le aplican fuerzas (42).
- 5. Heterogeneidad: Los biofilms son heterogéneos en distribución, estructura 3D y fisiología. Dentro del biofilm, se desarrollan microambientes $(10-100 \ \mu m)$ que modulan la actividad microbiana, la señalización intercelular y el intercambio metabólico.
- 6. Ciclo vital: Las etapas de crecimiento son comunes entre patógenos. Muchas especies tienen estructuras superficiales (cápsula, pili o flagelos) que son importantes para la adhesión.
- 7. Señales celulares: Coordinan el comportamiento de la población, la actividad metabólica, así como la formación y dispersión de los biofilms (43). La familia

de acil-homoserina-lactonas es producida por muchas especies bacterianas Gram-negativas, mientras que los organismos Gram-positivos usan más comúnmente péptidos autoinductores (AIP).

- 8. Desarrollo de gradientes: En nutrientes, pH y oxígeno como consecuencia de la actividad metabólica y el transporte de moléculas de difusión limitada dentro y fuera de la matriz.
- 9. Subpoblaciones latentes o de lento crecimiento: Estas incluyen las células *persisters*, microorganismos en estado viable pero no cultivable (estado VBNC) y variantes de colonias pequeñas (SCV) que muestran tolerancia a los antibióticos. El agotamiento de nutrientes en el interior del biofilm hace que los microorganismos entren en la fase estacionaria del ciclo de crecimiento.

1.3.6 Resistencia y Tolerancia

Los microorganismos en el interior del biofilm presentan una resistencia y/o tolerancia aumentada a los antibióticos y a otros agentes antimicrobianos como desinfectantes y metales tóxicos, así como una mayor capacidad de supervivencia a la deshidratación respecto a su fase planctónica.

La resistencia a los antibióticos tiene una base genética heredable subyacente que puede adquirirse mediante mutación puntual o transferencia horizontal de genes y permanece incluso en las células planctónicas.

En el biofilm la alta densidad celular, el aumento de la competencia genética y la acumulación de elementos genéticos móviles que se producen proporcionan una situación favorable para la transferencia horizontal de genes de resistencia (44).

La tolerancia a los antimicrobianos se observa cuando las cepas requieren concentraciones mucho más altas para obtener reducciones logarítmicas similares cuando crecen en el biofilm. La tolerancia se puede perder cuando del biofilm se dispersan en células individuales, por lo que las estrategias de dispersión normalmente se consideran adyuvantes para la terapia antimicrobiana (45,46).

La tolerancia puede surgir por:

 El estado metabólico menos activo de los microorganismos dentro del biofilm. Al estar en fase estacionaria de crecimiento se impide la actuación de los agentes antimicrobianos que dependen del metabolismo celular para ejercer su mecanismo de acción (47). Conforme madura el biofilm, un mayor número de células ingresan en la fase estacionaria. El bloqueo de la actividad de los antimicrobianos por parte de las moléculas de las EPS mediante quelación o degradación enzimática. Al disminuir la concentración efectiva de antimicrobianos a concentraciones subletales se promueve la selección de células en el biofilm (48,49).

Los estados de latencia han sido reconocidos como medios de supervivencia para las bacterias en el biofilm expuestas a los antimicrobianos (50,51).

Las tasas de crecimiento lento pueden conducir al estado viable pero no cultivable o estado VBNC (*viable but non-culturable*) o a otros estados de latencia manteniéndose la actividad metabólica y la integridad de la membrana celular (52,53).

El estado de VBNC puede ser inducido por condiciones adversas, como estrés ambiental o exposición a antimicrobianos.

Otro estado de latencia son las células conocidas como *persisters*, que son variantes transitorias fenotípicas dentro de una población microbiana que muestran inactividad metabólica. No crecen ni mueren en presencia de concentraciones letales de agentes antimicrobianos o en respuesta al estrés letal que hace que la mayoría de la población sea inviable (54,55).

Según Ayrapetan *et al.* (56) las células VBNC y las *persisters* utilizan mecanismos similares de latencia pero ocupan diferentes posiciones fisiológicas en el rango de latencia (hipótesis de latencia continua). Sin embargo, el trabajo reciente de Kim *et al.* ha sugerido que las células VBNC y las *persisters* son, de hecho, el mismo fenotipo latente (57).

1.3.7 Estrategias de prevención y tratamiento antibiofilm

Las estrategias para la prevención y la erradicación del biofilm pueden ir dirigidas contra cada una de las etapas de su formación: adherencia primaria, formación temprana del biofilm, maduración del biofilm y fase de dispersión.

1.3.7.1 Estrategias dirigidas a evitar la adherencia primaria

Actualmente, existen tres líneas de trabajo para evitar o minimizar la adherencia del biofilm en materiales protésicos (58):

- 1. Acabado o modificación pasiva de superficie mediante recubrimientos pasivos destinados a prevenir o reducir la adhesión bacteriana. Los avances en la ingeniería de materiales y superficies han llevado al desarrollo de topografías bien definidas que pueden controlar los patrones de superficie de formación del biofilm sin incluir agentes antimicrobianos (59). Las modificaciones químicas de la superficie se centran en la repulsión inespecífica de proteínas para la inhibición de la colonización bacteriana. Existen recubrimientos antiadherentes mediante la modificación superficial con polímeros, copolímeros o proteínas; concretamente se han utilizado polímeros hidrofílicos de polietilenglicol (PEG) en la prevención de formación del biofilm en dispositivos médicos (60). También se ha observado que las superficies hidrófilas y las cargas negativas son menos propensas a la adhesión bacteriana en biofilms de *S. aureus* (61).
- 2. Modificación activa de superficie mediante recubrimientos con agentes bactericidas activos farmacológicamente. Existe una amplia gama de recubrimientos antibacterianos utilizados en aplicaciones médicas que incluye, entre otros, plata, cobre, dióxido de titanio y quitosano. La fase cristalina del óxido de titanio en la superficie de los biomateriales reduce la unión bacteriana sin efectos adversos sobre la biocompatibilidad (62). La plata (Ag) ha sido conocida a lo largo de la historia por sus efectos antimicrobianos (63). Su probable mecanismo de acción reside en la formación de especies reactivas de oxígeno e iones biológicamente activos que dañan las paredes bacterianas y se unen a los ácidos nucleicos impidiendo su replicación (64). Una ventaja adicional del uso de Ag es su efecto bactericida sin la generación de resistencias (65). Desde hace años, las nanopartículas de plata (AgNP) se han aplicado sobre superficies de implantes debido a su potencial actividad antibiofilm, actividad antimicrobiana de amplio espectro y baja citotoxicidad para las células humanas (63,66-68). Una ventaja de las superficies recubiertas con AgNP es su capacidad de liberar Ag de manera controlada y continua en los tejidos periprotésicos además de actuar en superficie. Asimismo, se ha observado en estudios recientes que las AgNP aumentan la actividad bactericida de los osteoclastos (69) y que a una concentración de 100 nM inhibe casi por completo (> 95%) la formación de biofilm de S. epidermidis y P. aeruginosa (70). Estudios recientes in vivo han demostrado la viabilidad y

la eficacia de nanorecubrimientos multicapa que liberaron diferentes combinaciones de antibióticos (71) o la administración secuencial de gentamicina y un factor de crecimiento osteoinductivo (72) de manera escalonada. Ambos estudios demostraron la capacidad de prevenir la formación del biofilm en la superficie del dispositivo, en relación con los controles no recubiertos, promoviendo la formación de hueso y osteointegración.

3. Recubrimientos antibacterianos locales, biodegradables o no, aplicados en el momento del procedimiento quirúrgico. Ciertos polisacáridos bacterianos pueden inhibir la formación del biofilm (73). El más estudiado de ellos, el ácido hialurónico, aplicado durante la cirugía, reduce la adhesión de *S. aureus* a las superficies de titanio y a las lentes intraoculares de polimetilmetacrilato (74).

1.3.7.2 Estrategias dirigidas a las EPS de la matriz

Estas estrategias se pueden dirigir a la inhibición de la producción y secreción de EPS, al bloqueo de las adhesinas para la interrupción de la unión bacteriana al huésped, a la degradación de la estructura y la composición química de las EPS ya establecidas, al desarrollo de anticuerpos dirigidos a las EPS y a las proteínas unidas al eADN. También se pueden usar peptidoglucano hidrolasas, codificadas por fagos, para destruir el peptidoglicano de la pared bacteriana (Figura 4) (75).

Interrupción de la producción y secreción de las EPS

El 3',5'-diguanilato cíclico monofosfato (c-di-GMP) y la di-adenosina cíclica monofosfato (c-di-AMP) controlan varias exoenzimas productoras de EPS, polisacáridos y adhesinas; siendo, por tanto, candidatos potenciales para inhibir o interrumpir la formación de biofilm de las bacterias Gram-positivas y Gramnegativas (76). Aunque se han encontrado potenciales inhibidores, su eficacia contra los biofilm precisa de una mayor validación *in vivo* (77).

Bloqueo de las adhesinas

Se han desarrollado inhibidores de la producción de adhesinas y anticuerpos o péptidos de unión a adhesinas para interrumpir la unión bacteriana a las superficies del huésped. Los manósidos que actúan como inhibidores de la adhesina bacteriana FimH de *E.coli* han demostrado eficacia en la prevención y el tratamiento de infecciones bacterianas y fúngicas productoras de biofilm *in vivo* (78).



Figura 4. Estrategias dirigidas a las EPS de la matriz y su dispersión. Adaptado de Koo *et al.* (**31).** Los inhibidores de la producción (\bigcirc) actúan disminuyendo los niveles de c-di-GMP y c-di-AMP que controlan las exoenzimas productoras de polisacáridos y adhesinas. Los inhibidores de la secreción (\diamondsuit) actúan controlando las proteínas secretoras. El bloqueo de las adhesinas mediante anticuerpos o la inhibición de su producción es otra estrategia en desarrollo. La degradación de la estructura y composición del biofilm dirigida al eADN mediante las ADNAasas (\bigstar) y a los exopolisacáridos mediante dispersina B y glucosidasa (\bigstar) han demostrado eficacia para alterar el biofilm. Los anticuerpos (\bigstar) específicos contra epítopos de las proteínas ADNIII y de polisacáridos de la matriz han demostrado eficacia para alterar el biofilm *in vitro*. El óxido nítrico media en la dispersión del biofilm disminuyendo los niveles de c-di-GMP. La terapia mediante las peptidoglicano hidrolasas (\blacklozenge) codificadas por fagos es otra estrategia para destruir el peptidoglicano bacteriano.

Degradación de la estructura y su composición

Son estrategias dirigidas directamente contra el eADN (ADNasas) y los exopolisacáridos (dispersina B, glucosidasas).

Las glucosidasas se han utilizado para destruir el biofilm preexistente de *P*. *aeruginosa* potenciando la muerte bacteriana mediada por neutrófilos (79).

Las ADNasas también han demostrado eficacia para alterar el biofilm (80). El uso terapéutico de la ADNasa I humana recombinante (dornasa alfa) degrada el ADN derivado de neutrófilos y microorganismos en el esputo de pacientes con fibrosis quística, reduciendo así su la viscosidad (81). Por tanto, la combinación de enzimas que degradan la matriz junto con agentes antimicrobianos podría ayudar a eliminar las bacterias en el interior del biofilm de una manera más efectiva.

Anticuerpos dirigidos a las EPS y proteínas unidas a eADN

La utilidad de esta estrategia ha sido confirmada en varios estudios. En uno de ellos, los anticuerpos monoclonales específicos contra epítopos del polisacárido Psl de *P. aeruginosa* fueron capaces de aumentar la opsonización bacteriana e inhibir su adherencia a las células epiteliales pulmonares *in vitro*, mostrando protección profiláctica en varios modelos animales de infección por *P. aeruginosa* (82). En otro estudio, un modelo animal de infección urinaria, los anticuerpos inducidos por la vacuna contra *Enterococcus faecalis* pilus tip (EbpA) impidieron la unión bacteriana al fibrinógeno y la formación el biofilm (83).

Una vacuna multivalente dirigida frente a antígenos con expresión en biofilms de *S. aureus* mostró una mayor eficacia en combinación con antibióticos en comparación con el tratamiento antibiótico solo en un modelo de infección de osteomielitis en conejos (84).

Combinado con antibióticos, el uso de anticuerpos contra epítopos específicos de las proteínas ADNBII, un componente integral del eADN, ha demostrado ser altamente eficaz, tanto *in vitro* como en modelos animales, contra el biofilm producido por diversas bacterias, incluidas bacterias orales y uropatógenas (*E. coli*) y *P. aeruginosa* (85). De la misma manera, ha sido efectivo contra biofilms de *S. aureus* meticilín-resistentes en ratones comparado con antibióticos exclusivamente (86).

1.3.7.3 Estrategias dirigidas a la inducción de la dispersión

La dispersión del biofilm es un proceso regulado que involucra la degradación de la matriz EPS. La dispersión hace que las bacterias vuelvan a su estado activo similar a su fenotipo planctónico, haciéndolas más sensibles a los antibióticos.

Estrategias dirigidas a las vías del c-di-GMP

Se ha demostrado que el óxido nítrico (NO[·]), a bajas concentraciones, regula los niveles de c-di-GMP e induce dispersión del biofilm de *P. aeruginosa* y otras especies bacterianas (87,88). En un estudio clínico con un pequeño número de pacientes con fibrosis quística se observa que a dosis bajas de NO[·] gaseoso en el rango picomolar a nanomolar se reduce el tamaño del agregado de biofilm de *P. aeruginosa* en el esputo (89).

Sin embargo, el uso de NO[•] gaseoso o de donantes moleculares de NO[•] Presenta desafíos clínicos, debido a la citotoxicidad potencial de la exposición sistémica, la falta de especificidad en el tratamiento y a su elevado costo. Además, como el NO[•] es lábil, la concentración óptima para dispersar el biofilm es difícil de medir. Con el objetivo de reducir el costo y la toxicidad sistémica del NO[•] se han desarrollado profármacos de NO[•] donante asociado a cefalosporinas para administrarlo al biofilm bacteriano. Estos profármacos, diseñados para liberar NO[•] después de la escisión del anillo de β-lactámico de la cefalosporina por las β-lactamasas bacterianas, han demostrado efectividad en la dispersión del biofilm *in vitro* de *P. aeruginosa* (90).

Estrategias dirigidas al quorum sensing

El *quorum sensing* (QS) es un mecanismo de regulación transcripcional que permite a las poblaciones bacterianas responder colectivamente a estímulos externos o al estrés, coordinando comportamientos grupales, como la diferenciación celular, la producción de metabolitos específicos y la formación del biofilm (91-93). En tales sistemas, a medida que aumenta el número de células bacterianas, la acumulación de las moléculas de señalización bacteriana aumenta hasta que se alcanza una concentración umbral, donde ocurre la transcripción o represión génica. Las células producen pequeñas moléculas que denominadas autoinductores, que se acumulan en el medio extracelular. La mejor caracterizada de estas redes de señalización involucra a las moléculas de señalización de N-acyl homoserina lactonas en muchas bacterias Gram-

negativas; mientras que las Gram-positivas usan más comúnmente péptidos autoinductores (AIP).

Los inhibidores del *quorum sensing* se han evaluado ampliamente para valorar su eficacia en el biofilm bacteriano utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* (94-97). Se ha demostrado que la inhibición de QS por inhibidores exógenos controla la formación del biofilm y se ha propuesto su modulación para controlar la virulencia e infección bacteriana (98).

1.3.8 Nuevos abordajes tecnológicos

Los nuevos avances tecnológicos evaluados contra el biofilm (31) van dirigidos principalmente a:

- 1. La modificación del material y de la superficie de los dispositivos médicos, como la carga superficial, la hidrofobicidad, la rugosidad, la topografía y la química para evitar la unión bacteriana y así atenuar o bloquear la formación del biofilm.
- La construcción de superficies de respuesta 'inteligentes' o activadas por estímulos que provocan su efecto en respuesta al contacto con adhesinas de la pared celular, la membrana, señales químicas bacterianas (EPS y metabolitos) o desencadenantes externos (como fotoactivación o pH).
- 3. El desarrollo de nanopartículas metálicas inorgánicas (plata, cobre, óxido de hierro y oro) y orgánicas (liposomas, aptámeros y polímeros) para mejorar su biocompatibilidad, eficacia antibiofilm y efectos tóxicos sobre el huésped. Las nanopartículas pueden usarse para formar nano recubrimientos combinados con antimicrobianos convencionales.
- 4. Nuevas tecnologías para la eliminación física del biofilm, incluyendo el cizallamiento por estrés mecánico (jets) (99), la terapia fotodinámica y fototérmica (100), ondas de presión y campos eléctricos (101) y el plasma no térmico a presión atmosférica o plasma frío que es el objeto de estudio de esta tesis.

Dada la dificultad de la erradicación del biofilm podría ser necesaria una combinación de estrategias antibiofilm para combatir con éxito la enfermedad mediada por el biofilm, pudiendo el plasma frío a presión atmosférica ser un buen candidato para la erradicación del biofilm en multitud de situaciones clínicas.

1.4 El plasma

1.4.1 ¿Qué es el plasma?

El plasma se considera como el cuarto estado de agregación de la materia, tras los sólidos, líquidos y gases representando más del 99% de la materia del universo. Se produce al ionizar total o parcialmente un gas; aunque se puede utilizar cualquier fuente de energía para su generación (mecánica, térmica, química, eléctrica, óptica, radiación electromagnética ionizante o una combinación de éstas), las más utilizadas son los campos eléctricos o electromagnéticos (102).

El estado de plasma se alcanza cuando buena parte de las partículas que componen el gas alcanzan tanta energía como para que sea posible su ionización liberando una alta densidad de electrones. Los electrones producidos y sus colisiones posteriores con los átomos y moléculas del gas generan las especies reactivas que interaccionarán con el entorno (103).

Cuando un electrón colisiona con un átomo o molécula puede ocurrir una amplia gama de procesos físicos tales como ionización, disociación, ionización disociativa, captura electrónica disociativa, ionización por captura electrónica y excitaciones atómicas o moleculares. Las especies formadas en dichos procesos se convierten en los reactivos de la química del plasma.

Por lo tanto, el plasma está compuesto por electrones, iones positivos y negativos, radicales libres altamente reactivos, moléculas y átomos del gas en estado fundamental y excitado (metaestables), así como fotones de luz ultravioleta y visible generados por el retorno de los estados excitados electrónicamente, atómicos y moleculares, a su estado fundamental (Figura 5).

El plasma puede existir en un rango extremadamente amplio de temperatura y presión.



Figura 5. Especies reactivas del plasma.

1.4.2 Clasificación del plasma

Una de las clasificaciones más habituales es la clasificación de Nehra (104). Se pueden distinguir dos grupos principales: los plasmas a alta temperatura o temperatura de fusión y los plasmas a baja temperatura (Figura 6).

1.4.2.1 Plasmas a alta temperatura o temperatura de fusión

La alta temperatura implica que todas las especies (electrones, iones y especies neutras) se encuentran en un estado de equilibrio térmico. El plasma de fusión láser es un ejemplo. La temperatura de los electrones T_e es igual a la temperatura de los iones T_i y la temperatura de las partículas neutras del gas T_q .

La
$$T_e \approx T_i \approx T_g = 10^6 - 10^8 K$$
 y la densidad electrónica (n_e) es $\geq \frac{10^{20}}{m^3}$.

1.4.2.2 Plasmas a baja temperatura

Los plasmas de baja temperatura se pueden clasificar, según los niveles energéticos relativos de los electrones y partículas pesadas (iones y neutras), en

plasma térmico o TP (*thermal plasma*) también llamado plasma de cuasiequilibrio, que se encuentra en un estado de equilibrio térmico local o LTE (*local thermal equilibrium*), y plasma no térmico o NTP (*non thermal plasma*), también llamado plasma de no equilibrio o plasma frío.

Plasma térmico (TP) o de cuasi-equilibrio

En el TP, la alta temperatura implica que todas las especies químicas $(T_e \approx T_i \approx T_g)$ se encuentran en estado de equilibrio termodinámico o de cuasiequilibrio.

La $T_e \approx T_i \approx T_g \leq 2x 10^4 K$ y la densidad electrónica es $n_e \geq \frac{10^{20}}{m^3}$.

Ejemplos de estos plasmas son los de arco de plasma, las antorchas de plasma y las descargas acopladas inductivamente a radiofrecuencia (RF).

Estas fuentes producen un alto flujo de calor y se utilizan principalmente en áreas como el procesamiento de materiales y el tratamiento de materiales de desecho, reduciendo la contaminación ambiental.

Plasma no térmico (NTP), plasma de no equilibrio o plasma frío

En el plasma frío, el enfriamiento de los iones y de las moléculas sin carga es más efectivo que la transferencia de energía de los electrones en las colisiones, por lo que no se alcanza el equilibrio térmico y el gas permanece a temperatura ambiente $(T_e >> T_i \approx T_g)$ (105). Casi toda la energía permanece en los electrones y por lo tanto casi toda la temperatura.

La
$$T_e \gg T_i \approx T_g \leq 300 \dots \dots 10^3 K$$
 y la densidad electrónica ($n_e \approx \frac{10^{10}}{m^3}$).

Debido a que en el NTP la T_g permanece a baja temperatura ofrece la posibilidad de utilizarlo en tejidos biológicos y en el tratamiento de materiales sensibles al calor. El NTP es capaz de destruir, a temperatura ambiente, microorganismos con un daño al entorno mínimo o nulo por calor.

1.4.3 Clasificación del plasma no térmico o plasma frío

Los NTPs se pueden generar en cámaras de vacío denominándose plasmas de baja presión o LPP (*low pressure plasma*) o a presión atmosférica denominados plasmas a presión atmosférica o APP (*atmospheric pressure plasma*).

En los plasmas a baja presión (10⁻² a 10⁻⁴ kPa), la frecuencia de las colisiones de los electrones es baja por lo que no se produce el calentamiento de las partículas pesadas. El plasma no está en equilibrio térmico local (LTE) lo que significa que la temperatura de las partículas pesadas (iones y neutras) es más baja que la de los electrones. Las colisiones inelásticas¹ entre los electrones y las partículas pesadas producen excitaciones o ionizaciones.

Cuando la presión aumenta, las colisiones elásticas² e inelásticas de los electrones se intensifican. El aumento de las colisiones de los electrones producirá el calentamiento de las partículas pesadas reduciéndose la diferencia de temperatura entre éstas y los electrones. En esta situación el estado del plasma se acerca al estado de LTE (106). Por lo tanto, la potencia de la fuente de alimentación influye mucho en el estado del plasma (LTE o no). En general, una potencia alta induce plasma en LTE (por ejemplo, plasmas de arco) mientras que una potencia baja o una potencia pulsada de la fuente de alimentación produce un plasma que no está en LTE. En este último caso, la corta duración del pulso evita que se establezca el estado de equilibrio.

1.4.3.1 Plasma a baja presión

Los plasmas de descarga luminiscente de baja presión son de gran interés en la investigación básica, así como en la industria microelectrónica y la tecnología de materiales. Estos plasmas se producen en reactores de vacío que los hacen muy costosos. Además, la densidad de partículas activadas es relativamente baja.

¹ Colisiones inelásticas: Cuando la energía de los electrones es lo suficientemente alta, las colisiones modifican la estructura electrónica de las especies neutras generándose especies excitadas o iones.

² Colisiones elásticas: Al chocar el electrón incidente se produce una desviación de su trayectoria sin producir ninguna alteración de la estructura electrónica de las partículas pesadas.

Estos plasmas se producen en el interior de cámaras especiales de vacío a una presión de 10^{-2} a 10^{-4} kPa (10^{-1} a 10^{-3} mbar) que los hacen muy costosos. Además, la densidad de partículas activadas es relativamente baja (106).

1.4.3.2 Plasma a presión atmosférica

Los equipos que producen este plasma trabajan a presión atmosférica lo que simplifica enormemente el equipo y abarata tanto los costes de producción como de mantenimiento, además de permitir trabajar con material especialmente sensible y con tejidos vivos "*in situ*".



Figura 6. Clasificación del plasma.

1.4.4 Bases de la generación del plasma frío a presión atmosférica

A diferencia de los materiales conductores, los aislantes tienen electrones fuertemente ligados a sus átomos impidiendo el flujo de electrones libres. La fuerza que mantiene estos electrones en su lugar no es infinita y con suficiente voltaje éstos pueden ganar suficiente energía para ser arrancados convirtiéndose así el aislante en conductor. El voltaje umbral al que ocurre esto se conoce como voltaje de ruptura³ o resistencia dieléctrica.

Aunque el aire es normalmente un excelente aislante eléctrico, si se somete a un voltaje de 30 kV entre dos electrodos separados por 1 cm (campo eléctrico de 30

³ Voltaje de ruptura: voltaje necesario para empezar una descarga eléctrica o generar un arco eléctrico en un gas entre dos electrodos.

kV/cm), los átomos y moléculas del aire comienzan a ionizarse, produciendo su ruptura dieléctrica haciéndolo parcialmente conductivo. Si el voltaje es suficientemente alto, la ruptura producirá una chispa o un arco eléctrico conectando ambos electrodos. Por tanto, es posible crear, bajo ciertas condiciones, una descarga uniforme de tipo luminiscente sin producción de arco eléctrico que genere el plasma frío a presión atmosférica.

Cuando se aplica energía (eléctrica o electromagnética) a un gas, los electrones adquieren más energía que los iones debido a la diferencia de masas entre ellos. Si esa energía se aplica a un gas a baja presión, donde la frecuencia de colisión de los electrones es baja, sus energías permanecerán altas en comparación con las energías de los iones (y las energías de las partículas de gas), esto representa el no equilibrio en el plasma.

Por el contrario, en los generados a altas presiones, con frecuencias de colisiones más altas se generan plasmas en equilibrio térmico o plasmas calientes.

A presiones atmosféricas y más altas, la forma más factible de crear plasmas de no equilibrio térmico es "bombeando" la energía selectivamente a los electrones.

1.4.4.1 Generación de plasma entre electrodos. Curvas de Paschen

Las condiciones del voltaje de ruptura a diferentes presiones en los gases fueron estudiadas por primera vez por Paschen (107). Las curvas de Paschen describen del voltaje de ruptura (V_b) en función del producto de la distancia (d) de los electrodos y de la presión (p) del gas. $V_b = f(pd)$.

Para un gas dado, el voltaje de ruptura es función del producto p·d.

Su ecuación (Ley de Paschen) es:

$$V_b = \frac{Bpd}{\left[\ln(Apd) - \ln\left[\ln\left(\frac{1+1}{\gamma_{se}}\right)\right]\right]}$$

V_b: Voltaje de ruptura en Voltios

p: Presión del gas en pascales

d: Distancia de separación en metros

 γ_{se} : Coeficiente de emisión de electrones secundario⁴.

A y B son constantes que dependen del tipo de gas. Para el aire a temperatura ambiente A= $\frac{15}{cm torr}$. B= 365 $\frac{V}{cm torr}$ y $\gamma_{se} = 10^{-2}$ con electrodos de cobre.

Paschen estudió el voltaje de ruptura de varios gases entre placas metálicas paralelas a medida que variaba la presión del gas y la distancia de separación de las placas (gap).

Si tenemos en cuenta que a mayor presión del gas mayor frecuencia de colisiones, pero menor recorrido medio libre⁵se puede afirmar que:

- 1. Si la distancia entre los electrodos es constante a mayor presión ejercida sobre el gas, mayor frecuencia de colisiones, menor recorrido medio libre y mayor el voltaje de ruptura.
- 2. Si la distancia entre los electrodos es constante a menor presión ejercida sobre el gas, menor frecuencia de colisiones, mayor recorrido medio libre y menor el voltaje de ruptura. A presiones muy bajas el recorrido medio libre de los electrones será mayor que el gap entre los electrodos, disminuyendo las colisiones por lo que el voltaje de ruptura aumentará.
- 3. Si la presión es constante, a distancias muy pequeñas entre los electrodos el recorrido medio libre de los electrones para producir ionizaciones será mayor que la distancia entre dichos electrodos disminuyendo las colisiones y aumentando el voltaje de ruptura.
- 4. Si la presión es constante, a distancias grandes de los electrodos se precisará de un gran voltaje de ruptura para puentear la distancia entre electrodos.

Teniendo en cuenta la ley de Paschen es más fácil generar plasma frío a bajas presiones que a presión atmosférica con temperaturas de gas cercanas a la temperatura ambiente para un mismo gap.

A presión atmosférica, una descarga eléctrica en gas requiere un campo eléctrico más alto para iniciar su ruptura. En el caso de un gap amplio entre electrodos, el voltaje de ruptura es aún mayor. Debido a los altos voltajes de ruptura, la descarga eléctrica en el gas se convierte fácilmente en una chispa o arco eléctrico por lo

⁴ Coeficiente de emisión de electrones secundario: Número de ionizaciones por colisión causadas por los iones positivos generados en colisiones inelásticas.

⁵ Recorrido medio libre: Distancia promedio recorrida por una partícula en movimiento (como un átomo, una molécula, un fotón) entre colisiones sucesivas. Cuanto mayor es su valor mayor energía tiene la partícula antes de colisionar con otra.

que es necesario utilizar una configuración especial de los electrodos y seleccionar una fuente de energía y gas de operación adecuados.

Conseguir una descarga luminiscente homogénea a presión atmosférica es un desafío ya que la norma es la formación de *streamers* o descargas filamentosas transitorias. Los *streamers* son regiones ionizadas, conductoras de la electricidad cerca del electrodo en forma de dedo que crece rápidamente en la dirección del campo eléctrico (Figura 7) (108).



Figura 7. Diferencia entre streamer y arco eléctrico.

A presión atmosférica, los *streamers* tienden a evolucionar a chispa o arco eléctrico, en particular cuando la densidad de corriente es alta, lo que conduce al calentamiento del gas. Por lo tanto, es necesario evitar la transición de *streamer* a chispa eléctrica, ya sea limitando la densidad de corriente o controlando el tiempo de desarrollo del mismo.

Las principales formas de producir plasma frío a presión atmosférica son (108,109):

- 1. Aumentar la intensidad del campo eléctrico local mediante el uso de electrodos afilados para disminuir el voltaje de ruptura y estabilizar una descarga uniforme sobre la superficie del electrodo, como en las descargas de corona.
- 2. Limitar la corriente de descarga al introducir barreras dieléctricas o resistivas.
- 3. Prevenir el alcance del equilibrio térmico mediante el uso de una fuente de alimentación pulsada.

- 4. Mejorar la transferencia de calor por convección forzada a través de un alto flujo de gas, utilizando un gas con gran conductividad térmica como el helio.
- 5. Utilizar de campos eléctricos de corriente alterna (AC) de alta frecuencia como los iniciados por ondas de radio frecuencia (1 MHz a 1 GHz) o los plasmas de descargas de microondas cuyas frecuencias son mayores de 1 GHz.

Las propiedades de los plasmas, como la densidad de las partículas cargadas y sus energías, dependen de la potencia, el tipo de potencia (Corriente alterna AC, Corriente continua (DC), modo pulsada, frecuencia, etc.) y tipo de gas.

1.4.4.2 Descarga pulsada de alto voltaje

Como ya se ha mencionado, una forma de evitar la transición de *streamer* a chispa eléctrica es la utilización de fuentes de alimentación o voltaje pulsados (109).

Estos generadores de energía pueden proporcionar parámetros de pulso flexibles, como son la amplitud del voltaje, el tiempo de subida, la duración, la tasa de repetición (frecuencia) y la polaridad del pulso (110,111).

Los parámetros típicos del voltaje pulsado son 100–500 ns de duración de pulso (anchura a media altura), 10–100 ns de tiempo de aumento del pulso y frecuencias de hasta decenas de kHz. De esta manera se permite la aplicación de amplitudes de voltaje más altas para aportar energía a los electrones, logrando un estado de no equilibrio térmico local muy alto. Debido a que la energía aportada por pulso es muy pequeña, este modo de trabajo es más seguro que las descargas convencionales de alto voltaje de DC o las descargas de alto voltaje de baja frecuencia de AC. La mayoría de las configuraciones de descarga pueden ser impulsadas por voltajes pulsados de nanosegundos. El pulso de alto voltaje de nanosegundos y de alta frecuencia permite la creación de un plasma más uniforme en una gama más amplia de condiciones (112,113).

Los plasmas generados por descargas de barrera dieléctrica (DBD) con pulsos de duración del orden del nanosegundo han mostrado ventajas sobre los AC-DBD mejorando el aporte de energía, la densidad y la temperatura electrónicas (109).

1.4.5 Fuentes de plasma frío

Los principales tipos de descarga para generar plasma frío a presión atmosférica son: descarga de corona, descarga de barrera dieléctrica o DBD (*dielectric barrier discharge*), plasma de descarga luminiscente uniforme a una atmósfera o

OAUGDP (*one atmosphere uniform glow discharge plasma*), jets de plasma a presión atmosférica o APPJ (*atmospheric pressure plasma jet*) y los de descarga de cátodo de microagujero o MHCD (microhollow cathode discharge).

Aunque en esta tesis se utiliza un generador de plasma tipo de DBD de microsuperficie o SMD (superficie de micro descarga), por sus aplicaciones ambientales, biológicas y frecuencia de uso en el campo biomédico para la inactivación de bacterias, se describen los dispositivos de DBD y el jet de plasma.

1.4.5.1 Descarga de barrera dieléctrica (DBD)

En este dispositivo la descarga está bloqueada por una capa de barrera dieléctrica que cubre uno, dos electrodos o está suspendida entre ambos.



En la Figura 8 se observa la relación entre los electrodos y el dieléctrico.

Figura 8. Disposición planar de los electrodos. Adaptado de Nehra *et al.* (104). Dieléctrico cubriendo uno, dos electrodos o suspendido entre ambos.

En la Figura 9 se muestra la distribución coaxial de los electrodos y su relación con el dieléctrico.



Figura 9. Disposición coaxial. Adaptado de Nehra *et al.* (104). En esta distribución el dieléctrico se encuentra entre dos electrodos circulares.

En la distribución planar y coplanar la descarga se produce en un volumen de gas.

En la Figura 10 se muestran diseños que utilizan descargas de superficie y coplanares.



Figura 10. Disposición de superficie y coplanar. Adaptado de Nehra et al. (104)

Los dispositivos de descarga de superficie tienen un electrodo delgado y largo cubierto por una superficie dieléctrica en toda su longitud extendiéndose hasta el otro electrodo. En esta configuración, el espacio de descarga no está perfectamente definido por lo que la descarga se propaga a lo largo de la superficie del dieléctrico (104).

La disposición coplanar es una combinación de la configuración de descarga y de volumen, como los utilizados en pantallas de plasma de televisión. El dispositivo de descarga coplanar se caracteriza por pares de electrodos paralelos con polaridad opuesta, que están incrustados dentro de una masa dieléctrica cerca de una superficie.

Las DBDs son un enfoque sencillo y seguro para producir una descarga de equilibrio no térmica a presión atmosférica. El diseño impide la formación de la chispa o el arco eléctrico limitando, por el uso del dieléctrico, la corriente de descarga. Las DBDs a presión atmosférica son generalmente filamentosas que surgen de diferentes lugares de la superficie del dieléctrico (*streamers*). Cada *streamer* representa una microdescarga en el gap moviéndose erráticamente (114).

La manera de generar un plasma de descarga luminiscente uniforme a una atmósfera (OAUGDP), basado en la DBD fue propuesta por Roth *et al.* (115). El

OAUGDP es impulsado por una fuente de energía de radiofrecuencia (RF) y puede funcionar en el aire.

Los materiales comúnmente utilizados como dieléctrico son el vidrio, cuarzo, cerámica y capas de polímero. Estos materiales determinan la estabilidad de la descarga y la mayoría de sus parámetros. Los DBDs pueden operar bajo una amplia gama de presiones de gas (normalmente $10^4 - 10^6$ pascales). Se puede utilizar AC con una banda de frecuencia amplia (50 Hz – 1 MHz) y también un voltaje pulsado. La DC se puede emplear en algunas configuraciones con diseño especial del material dieléctrico. La distancia de separación típica en DBD varía de 0,1 mm a varios centímetros.

La producción ANTP mediante los dispositivos de descarga de barrera dieléctrica tienen muchas ventajas al ser estables, fiables y económicos. Estas ventajas han dado lugar a una serie de aplicaciones que incluyen la generación de ozono industrial, la modificación de la superficie de polímeros, la deposición de vapor químico por plasma, el control de la contaminación, la excitación de los láseres de CO_2 y los paneles planos de plasma de gran superficie. En la medicina de plasma y los alimentos, se utiliza plasma DBD muy homogéneo para tratar la materia biológica.

El generador de plasma utilizado en esta tesis es un tipo de DBD de microsuperficie o SMD (superficie de micro descarga). La cámara generadora de plasma a presión atmosférica (APPC-NTP) dispone de dos DBDs tipo SMD situados en el interior de la cámara, uno en la parte superior y otro en la parte inferior.

1.4.5.2 Chorro de plasma a presión atmosférica (APPJ)

Inicialmente los APPJ desarrollados por Jeong y Park (116,117), consistían en dos electrodos concéntricos a través de los cuales hicieron fluir una mezcla de helio, oxígeno u otros gases. En esta configuración, el electrodo interno lo acoplaron a una fuente de alimentación de radio frecuencia de 13,56 MHz y a un voltaje entre 100 y 250 V, el electrodo externo lo acoplaron a tierra. Al aplicar la alimentación de RF, comienza la descarga y actúa sobre el gas inyectado, el cual fluye entre el electrodo cilíndrico externo conectado a tierra y el electrodo central produciendo una corriente de gran velocidad de efluente de especies químicas altamente reactivas (104). En la revisión de Winter *et al.* se ofrece una visión general de los dispositivos APPJ desde 2012 (118). En la Figura 11 se representa un esquema de un jet de plasma con una configuración de electrodos concéntricos

entre los cuales fluye el gas exponiendo los microorganismos a las especies reactivas del plasma.



Figura 11. Jet de plasma. Configuración con dieléctrico y electrodos concéntricos.

En los últimos años, el interés en los jets de plasma se ha desplazado hacia los jets de plasma no térmicos a presión atmosférica o APNTPJ (*atmospheric pressure non thermal plasma jet*) (116). Los APNTPJ permiten tratar blancos alejados de la fuente de generación del plasma lanzando las especies reactivas a un entorno distante donde el campo eléctrico puede ser muy bajo (119). Se han aplicado ampliamente en el campo biomédico, para la inactivación de bacterias, la curación de heridas y el tratamiento del cáncer (120-122).

El campo eléctrico puede ser paralelo al flujo de gas o perpendicular a éste y la mayoría trabajan con gases nobles mezclados con un pequeño porcentaje de gases reactivos, como el O_2 o el aire.

El tamaño del jet puede ser muy flexible. El tamaño radial del chorro de plasma se puede reducir a rangos de micrómetro lo que permite estudiar la interacción del chorro de plasma con unas pocas células biológicas, o incluso una sola célula. Para aplicaciones que requieren un área grande o tratamiento a gran escala, el jet se puede mover a lo largo de la superficie del objeto o funcionar en modo de matriz.

1.4.6 Química básica del plasma

Aunque la atmósfera que nos rodea se compone casi por completo de átomos y moléculas neutras, siempre hay una pequeña densidad de iones y electrones libres presentes. Esta ionización se debe principalmente a los rayos cósmicos, que producen una densidad de partículas cargadas de, aproximadamente 10⁹/m³ al nivel del mar (123).

Con carácter general, cuando se aplica un campo eléctrico en un gas, los electrones libres experimentan una fuerza y se aceleran. El movimiento a lo largo de la dirección del campo es interrumpido ocasionalmente por colisiones con las moléculas del gas neutro generando electrones por ionización que a su vez colisionarán produciendo una alta densidad electrónica ($n_{e=}10^{11} - 10^{16} cm^{-3}$). El recorrido medio libre del electrón o distancia entre dos colisiones en un plasma a presión atmosférica es de 500 nm, lo que significa que sufre numerosas colisiones cuando viaja entre la separación típica de 1 mm entre los electrodos de un DBD. Estas colisiones pueden cambiar la dirección y la energía de los electrones, pero debido a la disparidad de masa entre éstos y las partículas pesadas, prácticamente no hay transferencia de energía en las colisiones, por lo que las partículas pesadas permanecerán cerca de la temperatura ambiente si la fuente de generación de plasma es la adecuada.

En las colisiones de los electrones con un átomo o molécula se generan las especies reactivas del plasma en una amplia gama de procesos físicos que incluyen:

- 1. Disociación: $e^- + AB \rightarrow A + B$
- 2. Ionización: $e^- + M \rightarrow M^+ + 2e^-$
- 3. Ionización disociativa: $e^- + AB \rightarrow A^+ + B + 2e^-$
- 4. Captura electrónica: $e^- + M \rightarrow M^-$
- 5. Captura electrónica disociativa: $e^- + AB \rightarrow A^- + B$
- 6. Excitación: $e^- + M \rightarrow M^* + e^-$ (excitación electrónica en el caso de átomos y excitación rotacional y vibración en el caso de moléculas).

Las especies reactivas generadas son moléculas y átomos del gas en estado excitado (metaestables⁶) (124), iones positivos y negativos y radicales libres altamente reactivos formadas tras la colisión de los electrones (125,126). A su vez estas especies reactivas colisionarán secundariamente dando lugar a nuevas especies y a tasas de reacción elevadas impulsando la química del plasma.

En fase gaseosa las principales especies reactivas primarias formadas son los radicales hidroxilos (OH[·]), radicales de monóxido de nitrógeno (NO[·]), radical dióxido de nitrógeno (NO[·]), radical anión superóxido (O⁻₂), el oxígeno atómico singlete (O(¹D), O(¹S)), el oxígeno molecular singlete (${}^{1}\Delta_{g}$, ${}^{1}\Sigma_{g}^{-}$), el nitrógeno atómico excitado y el nitrógeno molecular excitado N_{2} ($A^{3}\Sigma_{\mu}^{+}$). Estas especies tienen una vida relativamente corta siendo su concentración dentro de la región de descarga muy alta.

Las colisiones secundarias de estas especies reactivas generan especies reactivas secundarias de larga vida como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) , nitritos (NO_2^-) , nitratos (NO_3^-) y ozono (O_3) .

En el caso de la activación mediante plasma de una solución líquida como el medio activado por plasma o PAM (*plasma activated media*) o el agua activada por plasma o PAW (*plasma activated water*), las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que se generan principalmente cerca de la interfaz gas-líquido se disuelven en el medio líquido. La disolución desencadena reacciones químicas dinámicas y forma una serie de especies reactivas acuosas, algunas de las cuales son especies reactivas transitorias de corta duración. Si bien el efecto biológico total asociado con el PAM puede ser el resultado de una diversidad de especies de vida corta y larga, se ha establecido bien en el campo de la medicina del plasma que el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), nitritos (NO₂⁻), nitratos (NO₃⁻) y peroxinitritos (ONOO⁻) se detectan como especies estables de larga vida jugando un importante papel biológico.

⁶ Especies metaestables: La mayoría de las especies excitadas tienen una vida muy corta y cuando el electrón retorna de nuevo a su estado estable o de menor energía emite un fotón. Las "especies metaestables" también son estados excitados, pero con una larga vida útil porque su retorno a su estado estable o de menor energía por emisión de radiación se ve obstaculizada ya que no hay transiciones permitidas que partan del estado respectivo: El retorno al estado estable o de menor energía solo puede tener lugar mediante transferencias de energía a través de colisiones. Son especies metaestables el $O_2({}^{1}\Delta_g)$, O (¹D) (singlete D) y especies excitadas del nitrógeno atómico (N) y molecular $N_2(A^3 \Sigma^+_{\mu})$.
En la Tabla 1 se detallan las especies reactivas del oxígeno o ROS (reactive oxygen species) y las especies reactivas de nitrógeno o RNS (reactive nitrogen species).

Tabla 1

Especies reactivas del oxígeno y nitrógeno

Especies reactivas del oxígeno (ROS)	Especies reactivas del Nitrógeno (RNS)
Oxígeno atómico singlete (O(1D), O(1S))	Nitrógeno atómico excitado
Oxígeno molecular singlete (${}^{1}\Delta_{g}, {}^{1}\Sigma_{g}^{-}$)	Nitrógeno molecular excitado N_2 ($A^3 \Sigma^+_{\mu}$)
Anión superóxido (0^{-}_2)	Monóxido de nitrógeno (NO·)
Radical hidroxilo (OH·)	Dióxido de nitrógeno (NO2)
Ozono (0 ₃)	Nitritos (NO_2^-)
Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	Nitratos (NO_3^-)
	Peroxinitritos (0N00 ⁻)

Nota. En la colisión electrónica se producen estados excitados atómicos y moleculares. El oxígeno atómico en su estado fundamental tiene dos electrones desapareados (biradical) y se denomina como ³*p* (*triplete p*) al tener una multiplicidad de 3 según la primera regla de Hund. Los estados excitados con multiplicidad de Hund de 1 (singletes) se denominan O(¹D) (singlete D) y O (¹S) (singlete S). El primer estado de excitación se corresponde con O(¹D) y el segundo con O (¹S). El oxígeno molecular singlete es el nombre común de un estado de oxígeno molecular excitado electrónicamente que es menos estable que el oxígeno molecular en estado fundamental (oxígeno triplete). Los dos estados metaestables derivados de la configuración del estado fundamental se representan como (¹Δ_g) y (¹Σ_g). El estado excitado de nitrógeno molecular N₂(A³Σ_µ⁺) es una especie que contiene energía capaz de disociar moléculas en el gas, en muchos casos, comparable o más importante que la disociación inducida por electrones.

Un ejemplo de interacción de las especies reactivas con los microorganismos es la oxidación que produce el radical hidroxilo (OH·) extrayendo un átomo de hidrógeno de una gama de compuestos orgánicos (RH) para generar radicales adicionales, R⁻.

$$OH^{\cdot} + RH \rightarrow R^{\cdot} + H_2O$$

Son numerosas las reacciones químicas producidas en la creación y destrucción de las especies reactivas del nitrógeno y oxígeno o RONS (*reactive nitrogen and oxygen species*) en el plasma no térmico. En la Anexo 1 se exponen las principales reacciones químicas de formación de las principales especies reactivas.

1.4.7 Plasma directo y plasma indirecto

1.4.7.1 Plasma directo

En el plasma directo la exposición de la muestra tiene lugar entre los dos electrodos o cuando el sustrato actúa como un electrodo participando en la creación de la descarga de plasma (127). La muestra estará expuesta a las especies reactivas del plasma, partículas cargadas, campo eléctrico y rayos UV (128-130).

La contribución de la radiación electromagnética UV en la inactivación bacteriana es escasa, a diferencia de la producida por un campo eléctrico elevado. En los dispositivos médicos, el efecto bioeléctrico (aumento de la eficacia de los antimicrobianos por el campo eléctrico) está bien establecido (131). Se ha demostrado que los campos eléctricos intensos pulsados en nanosegundos alteran la fisiología de las células de mamíferos y bacterias (132). Stoodley *et al.* han demostrado que la contracción y expansión del biofilm que se produce bajo la influencia de campos eléctricos (voltaje aplicado con polaridad oscilante) aumenta la susceptibilidad del biofilm a los antibióticos (133). También se ha descrito el papel de las partículas cargadas en la inactivación de la exposición directa de las bacterias, por lo que la acumulación de carga en la membrana bacteriana y la fuerza electrostática resultante supera la resistencia a la tracción de la membrana, lo que lleva a la ruptura (134,135).



Figura 12. Exposición de la muestra al plasma directo.

El efecto combinado de los rayos UV, los campos eléctricos y las partículas cargadas puede ser sinérgico en la inactivación de los microorganismos durante las exposiciones directas al plasma (136).

1.4.7.2 Plasma indirecto

En la exposición indirecta (Figura 13), la muestra está fuera del área de descarga



Figura 13. Exposición a plasma indirecto.

del plasma (127). Las RONS generadas se transfieren a la matriz hidratada del biofilm (137). La composición precisa de las RONS que se difunden en el interior del biofilm dependerá de la interacción con los componentes de las EPS, los solutos disueltos en la matriz hidratada, las alteraciones en el pH y la concentración de O_2 dentro del biofilm. Son factores importantes para la generación del plasma la configuración de la fuente, el tipo de gas y la naturaleza del líquido o interfase con el que interacciona. Son ejemplos de exposición indirecta los jets de plasma y las fuentes de DBD. En esta tesis se

utilizó plasma indirecto mediante DBD de microsuperficie o SMD.

1.4.8 Soluciones activadas por plasma

Los medios activados por plasma o PAM y el agua activada por plasma o PAW son soluciones biológicas expuestas al plasma de forma directa o indirecta. La solución tratada se enriquece con una variedad de RONS de larga vida (de horas a días), dándole una gran versatilidad ya que posteriormente se pueden utilizar para tratamiento de objetivos biológicos donde no es posible la generación de plasma, como en pequeños órganos y cavidades que son difíciles de alcanzar (138,139).

Actualmente, la generación de PAM está emergiendo como una nueva herramienta en la medicina del plasma. Los PAM han mostrado resultados prometedores en la esterilización de tejidos vivos, la coagulación de la sangre, la destrucción de células cancerosas y muchas otras aplicaciones médicas, como la curación de heridas, como desinfectante médico para equipos e incluso como un tipo de enjuague bucal para odontología El PAM es estable a temperatura ambiente, no daña el tejido sano a dosis efectivas y genera especies reactivas dentro de los tejidos. La formación de las especies reactivas puede alterarse cambiando ciertos parámetros de procesamiento, como el gas de trabajo, la velocidad de flujo de gas, el tiempo de tratamiento, la distancia de separación plasma-líquido, el tipo de solución líquida objetivo y su cantidad, los diferentes tampones y antioxidantes dentro de la solución, todo en relación con un cambio en la energía suministrada (140).

1.4.9 Mecanismo de acción. Interacción con los microorganismos

La composición química del ANTP es compleja. En general, su composición y eficacia dependerán del diseño del dispositivo y de los parámetros operativos del sistema (composición y caudal del gas, humedad, temperatura, voltaje y frecuencia) (141). Los componentes del plasma actuarán de forma sinérgica o independiente en la inactivación de los microorganismos.

Si bien los estudios muestran que las especies reactivas de plasma son responsables de la muerte celular bacteriana, los mecanismos exactos de este proceso siguen sin estar claros. Se ha propuesto (142) que la muerte bacteriana se produce a través de tres mecanismos diferentes:

- 1. Permeabilización directa de la membrana o pared celular, lo que conduce a la fuga de componentes celulares (potasio, ácido nucleico y proteínas).
- 2. Daño crítico de proteínas intracelulares por las RONS.
- 3. Daño directo del ADN.

A menudo se observa la muerte bifásica microbiana, con un rápido descenso en el número de células seguido de una meseta, antes de un nuevo aumento brusco de letalidad (143). Las células pasan por un conjunto secuencial de cambios fisiológicos y morfológicos antes de ser inactivadas. Varios estudios han demostrado que después de una corta exposición al plasma, las células entran en un estado viable pero no cultivable (VBNC) (143-145).

Los mecanismos exactos de la inactivación bacteriana mediada por ANTP todavía están bajo investigación, pero se ha demostrado que las RONS, las partículas cargadas, el campo eléctrico y la radiación UV generadas desempeñan un papel fundamental. Entre las ROS, se considera que el ozono, el oxígeno atómico, el oxígeno singlete, el superóxido, el peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilo están implicados en la inactivación microbiana (146,147).

La mayoría de las bacterias, particularmente las anaerobias, son muy sensibles a las ROS. La difusión de ROS a través de la pared celular de una bacteria causa daño local posiblemente por oxidación de la membrana citoplasmática, proteínas y ADN (148). En el estudio de Joshi *et al.* (146) el oxígeno singlete y el peróxido de hidrógeno fueron responsables de la peroxidación de los lípidos de la membrana, ya que los neutralizadores de las ROS redujeron significativamente el daño oxidativo del ADN de *E. coli*. Se puede aumentar la eficacia de inactivación de las RNS con la presencia de RONS, lo que indica la importancia de la mezcla de oxígeno en los gases de trabajo (149). Al agregar 2% de oxígeno al gas nitrógeno dio como resultado la formación de óxidos nítricos, lo que mejoró significativamente el efecto de inactivación (150).

El bombardeo de la pared celular por partículas cargadas, iones y electrones puede romper enlaces químicos, causar erosión y formación de poros en las membranas, favoreciendo la penetración de compuestos tóxicos del plasma dentro la bacteria (148,151). Se cree que la inactivación por erosión es más fácil de lograr en bacterias Gram-negativas, debido a la vulnerabilidad de la pared celular, en comparación con las especies Gram-positivas con una estructura de membrana más gruesa (152). Sin embargo, el daño intracelular es más obvio en las Gram-positivas como resultado de un mayor nivel de ROS intracelular (130).

Como ya se ha comentado en la sección 1.4.7.1, en el plasma directo la acumulación de carga en la membrana bacteriana y la fuerza electrostática resultante supera la resistencia a la tracción de la membrana, lo que lleva a la ruptura de ésta. La perforación de la membrana celular causada por la erosión aumenta la difusión de especies reactivas secundarias que podrían formarse en la descarga de plasma dentro de la célula (153).

La erosión, como resultado de la reacción entre los átomos y moléculas excitados, los radicales y los materiales orgánicos provoca la ruptura de los enlaces, particularmente para los compuestos de hidrocarburos. Esto a su vez conduce a la formación de fragmentos moleculares y compuestos volátiles que emanan de las células, causando cambios morfológicos, que van desde la reducción del tamaño de la célula hasta la aparición de canales profundos en la célula, o la destrucción celular completa. El oxígeno atómico y el ozono reaccionan fácilmente con estos enlaces abiertos, lo que facilita una ruptura molecular más rápida. Estos mecanismos de ruptura de enlaces químicos también afectan a la estructura del biofilm (153).

1.4.10 Plasma frío y biofilm. Desafíos

1.4.10.1 Profundidad de penetración

Diversos estudios han investigado la profundidad de penetración de las RONS en matrices de biofilm. Xiong *et al.* han demostrado que un chorro de plasma He/O₂ inactiva por completo del biofilm de *Porphyromonas gingivalis* alcanzando una profundidad de 15 μ m (154). Pei *et al.* comprobaron la inactivación del biofilm de *E. faecalis* de 25,5 μ m de espesor (155). Así mismo, Alkawareek *et al.* confirmaron penetraciones de 40 y 80 μ m de profundidad con plasma He/O₂ en biofilms de *P. aeruginosa* PAO1 (147). En un estudio reciente, alrededor del 5% de las ROS y 80% de las NOS producidas por un jet de He/O₂ penetraron 500 μ m a través de un tejido biológico alcanzando algunas ROS hasta 1,25 mm (156).

Los límites de penetración del plasma no sólo dependen de la extensión de la matriz (biomasa) sino también de su composición molecular, decisiva en la naturaleza de la interacción entre la matriz y las especies reactivas, y que puede variar entre especies de diferentes microorganismos, incluso entre cepas de la misma especie.

1.4.10.2 Falta de estandarización

Actualmente existen dificultades para la aplicación clínica de los datos obtenidos tras la exposición del biofilm al plasma frío, ya sea en estudios realizados *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* en animales. No hay técnicas estandarizadas para evaluar las nuevas tecnologías antibiofilm, y no hay acuerdo en cuanto al beneficio clínico de las pruebas de susceptibilidad al biofilm (157).

Recientemente, se han desarrollado directrices, a través de la iniciativa "Mínima información sobre un experimento en biofilm" (158). Estas pautas tienen como objetivo simplificar el intercambio, la interpretación y la comparación de los datos experimentales con biofilms.

Asimismo, dada la complejidad y variabilidad de los protocolos experimentales y los datos generados dentro del campo de la medicina de plasma, altamente interdisciplinario, la comunidad científica debería considerar generar pautas para estandarizar la experimentación en esta disciplina (159).

1.4.10.3 Biofilm en infecciones crónicas

En enfermedades crónicas los leucocitos polimorfonucleares (PMN), en respuesta a un patógeno, provocan hipoxia por el consumo significativo de O_2 para la producción de ROS y NO[•] (160-162). En el caso de los pacientes con fibrosis quística y afectación pulmonar, este consumo puede conducir a condiciones hipóxicas donde la reducción de O_2 conlleva una reducción de las tasas de crecimiento bacteriano y, por lo tanto, a un aumento de la tolerancia a los antibióticos.

De la misma manera, la exposición crónica a las ROS y NO⁻ derivadas de los PMN podría predisponer a ciertos patógenos a mostrar tolerancia inherente al tratamiento de ANTP. Esto puede explicar observaciones de tolerancia significativamente elevada al tratamiento de ANTP en aislamientos clínicos de infección crónica, en comparación con cepas tipo en el laboratorio (163).

El ANTP podría tener una ventaja significativa sobre los antibióticos o biocidas convencionales, ya que la diversidad química y la flexibilidad creadas por los ANTPS pueden ajustarse y adaptarse para tales aplicaciones, creando un enfoque terapéutico dinámico.

1.4.10.4 Interacción de la matriz del biofilm con las ROS y RONS

Los componentes de la matriz, como el eDNA y los polisacáridos, pueden disminuir la actividad antimicrobiana del ANTP por la interacción y secuestro de las RONS derivadas del plasma.

Se ha demostrado que los polisacáridos, como el alginato, interactúan con las especies reactivas pudiendo contribuir a la atenuación de la actividad biocida del ANTP.

En pacientes con enfermedades crónicas, el alginato, polisacárido aniónico y componente principal del biofilm de *P. aeruginosa*, puede eliminar los radicales libres, principalmente ROS, liberados por neutrófilos y macrófagos por lo que también podría atenuar las ROS del ANTP. El alginato también disminuye la difusión e inhibe la muerte por agentes antimicrobianos catiónicos, incluidos péptidos antimicrobianos (164) y antibióticos como la tobramicina y otros aminoglucósidos (165).

El eADN es otro componente estructural de la matriz que contribuye a la tolerancia a los antibióticos y péptidos catiónicos. La exposición del biofilm de *S. epidermidis* a dosis bajas (subinhibitorias) de vancomicina aumenta la concentración de eADN, impidiendo la penetración de la vancomicina y aumentando su tolerancia (166). Numerosos estudios han examinado el efecto del ANTP sobre el ADN celular de diversas fuentes biológicas. Se ha demostrado que la producción de ROS es un factor causal importante en la degradación del eADN sufriendo roturas de cadena simple y doble, siendo considerado este último como un evento letal (146,167); sin embargo su rápida acumulación podría disminuir la actividad del ANTP debido a la interacción y secuestro de las ROS por el e-ADN.

La solución salina tamponada con fosfato activada por ANTP también da lugar a daños oxidativos en el ADN y efectos biocidas en *E. coli* (168).

La utilización del ANTP junto con antibióticos y biocidas convencionales podría tener efectos sinérgicos. El efecto de la degradación del eADN mediado por plasma sobre la viscoelasticidad del biofilm, la arquitectura y la penetración antimicrobiana justifica una mayor investigación.

Un estudio reciente examinó la susceptibilidad del biofilm de *Burkholderia cepacia* asociadas a fibrosis quística. Las muestras que produjeron la mayor biomasa (EPS) exhibieron mayor actividad de catalasa y fueron menos sensibles a los efectos bactericidas del ANTP; además la degradación enzimática de las ROS pudo haber contribuido a la supervivencia bacteriana (163). En otro estudio, la producción de catalasa por *P. aeruginosa* evitó la penetración de H₂O₂ protegiendo las bacterias en el interior del biofilm (169).

1.4.10.5 Persistencia y tolerancia inducida por plasma

La exposición al ANTP puede favorecer el desarrollo de poblaciones celulares con el fenotipo VBNC (143,170,171). Se ha descrito la formación de *persisters* tras la exposición al plasma en *P. aeruginosa*. Los resultados de este estudio muestran el papel central del estrés oxidativo del ANTP en la muerte bacteriana, así como la alteración fenotípica celular hacia la persistencia (171).

Por lo tanto, debe tenerse en cuenta la exposición subletal al ANTP ya que se puede producir erradicación incompleta del microorganismo, desarrollar mutaciones, resistencia y estados de latencia. Los regímenes de tratamiento basados en la aplicación repetida podrían obviar tales problemas. Hacen falta más estudios para dilucidar los estímulos específicos que desencadenan estas respuestas fenotípicas, así como la posibilidad de que las especies reactivas puedan resucitar a las células persisters o VBNC y devolverlas a un fenotipo metabólicamente activo, sensible a los antimicrobianos.

Zimmerman *et al.* demostraron que cultivos de células planctónicas de *S. aureus* resistentes a meticilina, *Enterococcus mudtii*, y *E. coli* no mostraron resistencia primaria ni secundaria tras exposiciones repetidas al ANTP (172).

Por lo tanto, es importante conocer el amplio rango potencial de blancos celulares de las especies reactivas derivadas de plasma (173) y la capacidad de diferentes especies reactivas para abordar diferentes vías de muerte celular (174).

1.4.10.6 Dispersión del biofilm inducido por NO⁻

El óxido nítrico (NO⁻), tal y como se ha mencionado previamente ha sido identificado como una señal de dispersión en diversas bacterias, incluidas *P. aeruginosa, S. epidermidis, Serratia marcescens, Vibrio cholera y Fusobacterium nucleatum* (175), modulando la dispersión y la tolerancia a los antibióticos.

Un estudio demostró que el estrés inducido por nitritos en *S. aureus* impidió la síntesis de polisacáridos de adhesión intercelular y la formación del biofilm, pero al mismo tiempo condujo a la regulación positiva de los genes asociados con el estrés oxidativo y nitrosativo (incluidos los genes para la reparación del ADN, la homeostasis del hierro y la desintoxicación de ROS). La adición de nitrito también erradicó el biofilm preformado de *S. aureus* y reprimió la formación del biofilm en *S. epidermidis*. Curiosamente, los efectos en el biofilm inducido por nitritos se reprimen mediante la adición de eliminadores de NO[•] (carboxi-PTIO y hemoglobina bovina), lo que sugiere un papel importante para del NO[•] en estos procesos. Además, se ha observado que el NO[•] potencia la muerte de *B. cepacia* por ROS(176).

Se ha descrito que la generación de NO[•] en jets de plasma se correlaciona con las tasas de inactivación microbiana y que la concentración de NO[•] y N₂O[•] depende de la mezcla de gases, la configuración del chorro y las condiciones experimentales (177,178). Por lo tanto, es probable que el NO[•] y las RNS derivadas del plasma participen tanto en la destrucción directa del biofilm como en la dispersión o activación de las respuestas al estrés celular cuando se exponen

a concentraciones no letales de NO[·]. También se ha demostrado que las RNS activan la respuesta de reparación de ADN en *E. coli* (179).

1.4.10.7 Interferencia del plasma frío con el quorum sensing

Los inhibidores de *quorum sensing* (QS) (acylasas o lactonasas) pueden reducir la virulencia microbiana, aumentar la susceptibilidad a los antimicrobianos y reducir la formación del biofilm, ejerciendo una presión selectiva sobre el patógeno que, en última instancia, podría conducir a la aparición de resistencia.

En *P. aeruginosa*, el QS regula la expresión de catalasa y superóxido dismutasa necesarias modificando la susceptibilidad del biofilm a H_2O_2 , una de las ROS del ANTP (180). Además se ha demostrado la capacidad del ANTP para modificar e inactivar las moléculas de señalización de N-acyl-homoserina lactona QS para inactivar factores de virulencia (elastasa y piocianina) regulados por el QS (181).

Además de la activación de otras enzimas proteolíticas dependientes del tiempo, el efecto combinado de la reducción de la viabilidad del biofilm, la destrucción de la actividad enzimática de los factores de virulencia v la modificación/inactivación de las moléculas de OS, podrían facilitar la curación y la resolución de infecciones relacionadas con el biofilm en heridas crónicas. (173, 174).

2 Hipótesis y objetivo

2.1 Hipótesis de trabajo

El plasma frío a presión atmosférica producido con la cámara de generación de plasma a presión atmosférica tiene actividad antimicrobiana sobre biofilms de *S. aureus, P. aeruginosa y C. albicans* formados en discos de titanio comercialmente puro y de politetrafluoroetileno (teflón), así como frente a sus respectivas células planctónicas.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad antimicrobiana del plasma frío generado a presión atmosférica frente al biofilm de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans* y frente a sus respectivas células planctónicas.

2.2.2 Objetivos específicos

- 1. Evaluar la actividad antimicrobiana del plasma frío a presión atmosférica sobre el biofilm de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans* formadas sobre discos de titanio.
- 2. Evaluar la actividad antimicrobiana del plasma frío a presión atmosférica sobre el biofilm de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans* formadas sobre discos de teflón.
- 3. Valorar la actividad antimicrobiana del plasma frío a presión atmosférica frente a células planctónicas de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans*.
- 4. Estudiar la actividad antimicrobiana del medio de cultivo (BHI), tras su exposición al plasma frío a presión atmosférica, frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*.
- 5. Evaluación de la viabilidad del biofilm de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans,* mediante microscopía confocal de exploración láser, tras su exposición a plasma frío a presión atmosférica.

3 Material y métodos

3.1 Equipamiento para la generación del plasma

Para la generación de plasma frio a presión se utilizó un prototipo denominado cámara de generación de plasma a presión atmosférica - plasma no térmico o APPC-NTP, dotada de 2 pares de electrodos tipo SMD, uno en la parte superior y otro en la parte inferior.

El plasma generado dentro de la cámara es de tipo indirecto, es decir, la muestra está fuera del área de descarga. Las RONS generadas se transfieren a la matriz del biofilm de forma indirecta, así como a las soluciones líquidas biológicas ubicadas en su interior.

Las características técnicas de la corriente utilizada fueron las recomendadas por G. Baeza en su tesis doctoral (1):

- 1. Forma de onda: Sinusoidal.
- 2. Voltaje: 19 kV.
- 3. Intensidad máxima: 40 mA.
- 4. Frecuencia: 1 kHz.

Con el fin de obtener la corriente eléctrica con las características descritas se precisa un generador de funciones y un amplificador adecuados.

3.1.1 Generador de funciones

Es el equipo encargado de generar y conformar la señal eléctrica tanto en su forma de onda como en su frecuencia, así como de un voltaje que posteriormente será amplificado por el amplificador de alta tensión. El generador de funciones utilizado fue de la marca Rigol, modelo DG5072 (RIGOL Technologies, INC, Pekín) (Figura 14) y se generó una señal eléctrica sinusoidal de 19 Vpp, con una frecuencia de 1 kHz.



Figura 14. Generador de funciones. Baeza G. (2017).

3.1.2 Amplificador de alta tensión

Este equipo es el responsable de amplificar la señal eléctrica proveniente del generador de funciones hasta el voltaje de alta tensión deseado, en nuestro caso los 19 kV.

Se utilizó el amplificador de alta tensión de la marca Trek modelo 10/10B-HS (TREK INC, Nueva York) (Figura 15), modelo ya probado con éxito en otros trabajos de investigación (182). Este modelo permite una intensidad de corriente máxima de 40 mA.



Figura 15. Amplificador de Voltaje. Baeza G. (2017).

3.1.3 Cámara de producción de plasma con electrodos tipo SMD

Este prototipo utiliza aire como gas para la producción de plasma, trabaja a presión atmosférica y produce plasma a temperatura ambiente. La temperatura tanto en el interior de la cámara como en las muestras se mantiene en todo momento por debajo de 32,12 °C (1).

Dispone de una salida de aire controlada de forma que se puede dirigir las especies reactivas fuera de la cámara para el tratamiento de objetivos biológicos donde no es posible la generación de plasma, como en pequeños órganos y cavidades que son difíciles de alcanzar.

El prototipo de cámara utilizado se basó en el diseñado por Morfill *et al.* (183), usado posteriormente por otros autores (182) y utilizado en la tesis doctoral de Klämpfl (184), Baeza (1), Zimmerman (172) y Shimizu *et al.* (185).

3.1.3.1 La cámara

Las funciones principales de la cámara de producción son: evitar la dispersión de las especies reactivas producidas en el plasma de forma que aumente su concentración en el interior de la cámara, alojar las muestras a tratar y permitir la extracción del aire existente en su interior de forma controlada.

La cámara utilizada es de teflón, un material químicamente muy inerte y recomendado por Klämpfl (184).

Las dimensiones interiores de esta son $320 \ge 209 \ge 240$ mm. Sus dimensiones interiores son $320 \ge 209 \ge 240$ mm y dispone de una bandeja para depositar las muestras (Figura 16).



Figura 16. APPC-NTP. Baeza G. (2017).

3.1.3.2 Los electrodos

Los electrodos de este equipo son DBD, concretamente un tipo de particular de DBD basado en la tecnología SMD (*surface microdischarge*). En este tipo de tecnología la configuración de electrodos es en sándwich y sigue la siguiente disposición; electrodo de potencia, dieléctrico y electrodo de tierra tipo malla (Figura 17).



Figura 17. Configuración de electrodos SMD. Baeza G. (2017).

La estructura tipo malla del electrodo de tierra permite que se produzcan filamentos o *streamers* de plasma entre el electrodo y la barrera dieléctrica. Estas micro descargas no superan el grosor de la malla por lo que el plasma no actúa directamente sobre la muestra sometida a tratamiento evitando de este modo el daño por calor o por iones locales producidos en el plasma (Figura 18).



Figura 18. Dinámica del plasma en los electrodos. Baeza G. (2017).

El diseño de los electrodos y el dieléctrico están formados por los siguientes materiales con las siguientes dimensiones:

- El electrodo de potencia es de latón con una dimensión de 132 x 86 x3 mm.
- Como dieléctrico se utilizó una lámina de teflón de 154 x 109 x 1.5 mm. El electrodo de tierra es una malla de acero inoxidable con las siguientes dimensiones. 140 x 95 x 1.5 mm., teniendo la malla las siguientes dimensiones C: 10 mm y U: 13 mm. Con C agujero cuadrado. U: distancia entre centros de agujeros.
- El electrodo de tierra es una malla de acero inoxidable con las siguientes dimensiones 140 x 95 x 1.5 mm., teniendo la malla las siguientes dimensiones C: 10 mm. y U: 13 mm. Con C agujero cuadrado. U: distancia entre centro de agujeros.



Figura 19. Esquema de malla del electrodo de tierra. Baeza G.

Los electrodos están sujetos por una carcasa realizada en teflón en la cual se embuten los electrodos y el dieléctrico.



Figura 20. Electrodos y dieléctrico. Baeza G. (2017).

La cámara dispone de un par de juegos de estos electrodos, uno situado en la parte inferior con electrodo de tierra encarado hacia arriba y otro en la parte superior con el electrodo de tierra encarado hacia abajo. Dichos elementos se pueden desplazar en sentido vertical a través de unas columnas con el fin de variar la distancia a la superficie de tratamiento (Figura 21).



Figura 21. Electrodos ubicados en sus columnas. Baeza G. (2017).

El plasma de tipo indirecto producido en los dos pares de electrodos tipo SMD difunden en el interior de la cámara interaccionando con las muestras. Las especies reactivas que se forman dentro de la cámara son las que corresponden a picos correspondientes a las longitudes de onda de 335,981 nm y 356,402 nm: N I, N III, O III, O IV, NO, C_2H_4O y C_2H_5CHO , detectadas mediante espectrometría de emisión óptica (OES) (1).

3.2 Microorganismos y medios de cultivo

3.2.1 Microorganismos

Los microorganismos que se emplearon para su exposición al plasma frío son tres cepas formadoras de biofilm de la colección del Grupo de Investigación Infección Grave del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe. En representación de los Gram-positivos se utilizó la cepa de *S. aureus* V329 (186). En representación de los Gram-negativos la cepa de *P. aeruginosa* PFQ2 y en representación de los hongos la cepa de *C. albicans* B2. Todas estas especies, como ya se ha comentado, están implicados en la etiología de la infección periprotésica y los biomateriales.

3.2.2 Medios de cultivo y soluciones y empleados.

3.2.2.1 Tampón fosfato salino estéril

El tampón fosfato salino o PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4.) se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Se utilizó en la preparación de los inóculos y para lavar los discos de titanio y PTFE retirando las células planctónicas no adheridas.

3.2.2.2 Agar Infusión Cerebro Corazón (Agar ICC/BHI)

Los diferentes microorganismos se crecieron de manera rutinaria a 37 °C en caldo infusión cerebro corazón (BHI) o agar BHI (Becton Dickinson GmbH). El BHI es un medio de cultivo general rico en nutrientes, adecuado para el cultivo de una gran variedad de bacterias y hongos. Se utilizó para los experimentos de formación de biofilm sobre los discos de titanio y PTFE, posteriores lavados y diluciones. También se utilizó como solución líquida biológica para ser activada por las especies reactivas del plasma frío convirtiéndose en un medio activado por plasma o PAM.

En la Tabla 2 se muestra su composición. La base nutricionalmente rica de infusiones de corazón de ternera y cerebro de ternera y mezcla de peptona proporcionan nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos que favorecen el crecimiento de una variedad de microorganismos. El fosfato disódico actúa como tampón para ajustar el ph a 7,4 \pm 0,2. La dextrosa es el carbohidrato fermentable que proporciona carbono y energía. El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico y el agar es el agente solidificante.

Tabla 2

Composición del medio Agar Infusión Cerebro Corazón	
Infusión de cerebro de ternera	7,7 g
Infusión de corazón de res	9,8 g
Peptona	10,0 g
Dextrosa	2,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Fosfato disódico	2,5 g
Agar	20 g

Medio Agar Infusión Cerebro

3.3 Actividad del ANTP sobre el biofilm de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans* formado en discos de titanio y PTFE

El objetivo de este diseño experimental fue la valoración de la letalidad producida en el biofilm de 48 horas de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans* formado en discos de titanio y PTFE tras la exposición al ANTP. Se ensayaron diferentes tiempos de exposición y se realizó el análisis de letalidad producida comparándola con los discos no expuestos.

Para ello se prepararon los discos de titanio y PTFE recubiertos con biofilm de 48 horas de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans.* La metodología seguida fue la siguiente:

1. Preparación del inóculo

Se prepararon cultivos de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans* en agar *BHI* y se incubaron durante 24h a 37°C. El inoculo se preparó suspendiendo 2-5 colonias en PBS estéril, ajustando la suspensión a 0,5 McFarland y posteriormente se inoculó en placa de poliestireno de 24 pocillos (Micro TestTM Becton Dickinson Labware, NJ, EEUU), obteniendo una concentración final del inoculo en la placa de microdilución de 0,5-2,5 x 10^5 UFC/ml. El inóculo fue comprobado plaqueando 100 µl y diluciones seriadas del mismo en placas de agar BHI y realizando el recuento de colonias tras 24h de incubación.

2. Formación del biofilm sobre los discos de titanio y PTFE

Los discos empleados (1,27 cm de diámetro y 0,3 cm de alto) de titanio comercialmente puro grado 3 (modelo RD128-Ti) y de politetrafluoroetileno (modelo RD128-PTFE) fueron suministrados por Biosurface Technologies Corp. (Bozeman, MT, EEUU).

Antes de su uso, se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 121 °C. Tras su esterilización se procedió a equipar la placa de 24 pocillos con discos PTFE y titanio. Se añadió a cada pocillo 1 ml de cultivo BHI. A continuación, se añadió 20 μ l del inóculo microbiano de cada uno de los tres microorganismos. Se realizó incubación durante 48 horas a 37°C.

3. Extracción de los discos para su exposición al plasma

Tras la incubación se procedió a la extracción aséptica de los discos controles y problema de la placa de 24 pocillos, se lavaron los discos con PBS para retirar las células en fase planctónica no adheridas a los discos y se dividieron en dos grupos, control y expuestos.

4. Exposición de los discos al plasma

Los discos controles que no se expusieron al plasma se conservaron en la campana de flujo laminar. Los discos problema se colocaron en una gradilla metálica esterilizada y se introdujeron en la cámara de plasma para su exposición. Se ensayaron distintas "configuraciones espaciales" de los discos en relación con electrodos SMD. Los tiempos de exposición al plasma fueron de 20, 30, 45, 60 y 90 minutos.

5. Introducción de los discos en tubos con 2 ml de BHI estéril

Tras la exposición se extrajeron los discos de la APPC-NTP y de la cámara de siembra y se introdujo cada disco en tubos con 2 ml de BHI estéril para su posterior sonicación.

6. Agitación, sonicación y nueva agitación de los discos

Para desprender el biofilm adherido a la superficie del biomaterial, cada tubo conteniendo el disco (control o expuestos) en su interior, se sometió a agitación con vortex durante 1 minuto a 2500 rpm, posteriormente se sonicaron a 50 kHz en un baño sonicador (P-selecta, Ultrasons H, Barcelona, España) durante 5 minutos y nueva agitación durante 1 minuto a 2500 rpm.

7. Diluciones seriadas y siembra de las placas

Para determinar el número de células viables por unidad de superficie de material el medio de cultivo BHI de cada uno de los tubos obtenido tras sonicación se diluyó en suero fisiológico (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) y 0,1 mL de cada dilución se cultivó en agar BHI (Becton Dickinson, EEUU). Las placas se incubaron 48 horas a 37°C.



Figura 22. Diluciones seriadas. Protocolo de trabajo para cuantificar las células viables presentes en el biofilm.

8. <u>Recuento de las unidades formadoras de colonias UFC</u>

Se contabilizaron el número de UFC por placa para el cálculo del número de UFC/ml.

9. <u>Fórmulas utilizadas para el cálculo</u> de $\frac{ufc}{ml}$, $\frac{ufc}{2ml}$, $\frac{ufc}{cm^2}$, $\log_{10} \frac{ufc}{cm^2}$, $\Delta de logaritmos de los discos control y discos problema y letalidad producida por la exposición al plasma en discos controles y problema tras la exposición al plasma$

1.
$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \left(\frac{\text{Colonias enumeradas}}{0,1 \text{ ml sembrados}}\right) * \text{ Factor de dilución}$$
2.
$$\frac{\text{UFC}}{2\text{ml}} = \left(\left(\frac{\text{Colonias enumeradas}}{0,1 \text{ ml sembrados}}\right) * \text{ Factor de dilución}\right) * 2\text{ml}$$
3.
$$\frac{\text{UFC}}{\text{cm}^2} = \left(\frac{\frac{\text{ufc}}{2\text{ml}}}{1,2667 \text{ cm}^2}\right)$$
4.
$$\log_{10} \frac{\text{UFC}}{\text{cm}^2} = x$$

5.
$$\Delta \left(\log_{10} \left(\frac{\text{UFC}}{\text{cm}^2} \right)_{\text{disco control}} \right) - \left(\log_{10} \left(\frac{\text{UFC}}{\text{cm}^2} \right)_{\text{disco problema}} \right)$$

6. Letalidad = $100 - \left(\frac{\frac{\text{UFC disco expuesto}}{\text{cm}^2}}{\frac{\text{UFC disco no expuesto}}{\text{cm}^2}} \right) * 100$

11. Análisis estadístico de los datos obtenidos:

Se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos.

En la Figura 23 se representa el esquema de trabajo de este diseño experimental.



Figura 23. Esquema de trabajo. Evaluación de la actividad antimicrobiana del ANTP sobre el biofilm de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans* en discos de titanio y PTFE.

3.4 Actividad del ANTP sobre las células planctónicas de S. *aureus P. aeruginosa* y C. *albicans*.

El objetivo de este diseño experimental fue la valoración de la letalidad producida en células planctónicas de *S. aureus P. aeruginosa* y *C. albicans* suspendidas en medio líquido tras la exposición al ANTP. La metodología seguida fue la siguiente:

1. Preparación de inóculos

Se prepararon cultivos de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans* en agar *BHI* y se incubaron durante 24h a 37°C. El inoculo se preparó suspendiendo 2-5 colonias en agua destilada estéril, ajustando la suspensión a 0,5 McFarland y posteriormente se inocularon los pocillos en la placa de poliestireno de 24 pocillos con concentraciones variables de inóculo 10^2 a 10^8 UFC/ml (500 µl en cada pocillo). El inóculo fue comprobado plaqueando 100 µl y diluciones seriadas del mismo en placas de agar BHI y realizando el recuento de colonias tras 24h de incubación. Se utilizaron tres réplicas de cada inóculo y cepa en la placa problema. Como control se inoculó una placa en las mismas condiciones que la placa problema.

2. Exposición en cámara de plasma de la placa problema

Se expuso la placa problema al plasma y se reservó en la cámara de flujo laminar la placa control. Los tiempos de exposición al plasma fueron 60 y 90 minutos.

3. Diluciones seriadas y siembra de placas

Se realizaron diluciones seriadas de cada uno de los pocillos. Las diluciones seriadas que se realizaron fueron son: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000.

Se sembraron 100 μ l de cada una de las diluciones de las placas control y problema en agar BHI y se incubaron 48 horas a 37 °C.



Figura 24. Diluciones seriadas. Protocolo de trabajo para cuantificar las células viables tras la exposición al plasma de las células planctónicas

4. <u>Recuento de las UFC</u>

Se contabilizaron el número de colonias por placa tras 48 horas para el cálculo del número de UFC/ml y la letalidad en las placas control y placas problema.

5. <u>Fórmulas para el cálculo</u> de $\frac{UFC}{ml}$ <u>y letalidad producida por la exposición al</u> <u>plasma sobre células planctónicas expuestas al plasma</u>

1.
$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \left(\frac{\text{Colonias enumeradas}}{0.1 \text{ ml sembrados}}\right) * \text{ Factor de dilución}$$

2. **Letalidad** = $100 - \left(\frac{\frac{\text{UFC problema}}{\text{ml}}}{\frac{\text{UFC control}}{\text{ml}}}\right) * 100$

8. Análisis estadístico de los datos obtenidos

Se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos.

En la Figura 25 se representa el esquema de trabajo de este diseño experimental.



Figura 25. Esquema de trabajo. Evaluación de la actividad antimicrobiana del ANTP sobre células planctónicas de *S. aureus P. aeruginosa* y *C. albicans*.

3.5 Actividad del ANTP sobre el medio de cultivo

El objetivo de este diseño experimental fue evaluar si la activación del medio BHI en la cámara del plasma era capaz de impedir el crecimiento de *S. aureus P. aeruginosa* y *C. albicans*.

Un medio de cultivo activado por plasma o PAM es una solución líquida biológica que tras su exposición al plasma de forma directa o indirecta se enriquece con una variedad de RONS de larga vida dándole una gran versatilidad ya que posteriormente se pueden utilizar para tratamiento de objetivos biológicos donde no es posible la generación de plasma. En este caso el medio activado por plasma es el BHI.

La metodología seguida fue la siguiente:

1. Colocación de 50 ml de medio de cultivo BHI en dos placas de Petri

Se prepararon dos placas de Petri cada una con 50 ml de medio de cultivo BHI.

2. Exposición del medio de cultivo en cámara de plasma.

Una placa se expuso al plasma frío y la otra se reservó en la cámara de flujo laminar como control. Se utilizaron dos tiempos de exposición (30 minutos y 60 minutos).

3. Inoculación del medio de cultivo expuesto y no expuesto

Tras la exposición, el medio de cultivo expuesto y el no expuesto se dividieron en alícuotas y se introdujeron en matraces Erlenmeyer sembrándolos con inóculos de los cultivos de *S. aureus P. aeruginosa* y *C. albicans* partiendo una absorbancia de 0,02 e incubando a 37 °C en agitación durante 24 horas.

Curvas de crecimiento: Se realizaron curvas de crecimiento de 24 horas de los medios de cultivo expuestos y no expuestos. Para ello cada hora se tomó una alícuota para el cálculo de la absorbancia mediante el espectrofotómetro Thermo Scientific[™] NanoDrop[™] One (2µl de cada muestra por medición). En la figura 26 se representa el esquema de trabajo de este diseño experimental.



Figura 26. Esquema de trabajo. Evaluación de la actividad microbicida del BHI tras su exposición al plasma frío.

3.6 Evaluación de la viabilidad del biofilm mediante microscopía confocal tras su exposición al plasma frío

La microscopía laser confocal posee ventajas sobre la microscopía de fluorescencia convencional, permitiendo la obtención de imágenes con una mayor resolución y eliminando toda la señal fuera de plano focal gracias a la presencia del pinole. La combinación de imágenes capturadas siempre en plano focal y a lo largo del eje Z es la base para la reconstrucción tridimensional de las muestras.

Para el estudio del biofilm se utilizó microscopía confocal, lo que permitió la obtención de imágenes a lo largo de todo su espesor, que finalmente se compilaron en una sola, creando una reconstrucción tridimensional del mismo. El equipo utilizado fue el microscopio confocal Leica TCS-SP5-AOBS.

El objetivo de este diseño experimental fue el determinar la viabilidad de las poblaciones de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* en las biopelículas formadas sobre discos de cristal mediante microscopía laser confocal.

Las fases desarrolladas en este diseño experimental fueron:

1. Preparación de inóculos de S. aureus, P. aeruginosa y C. albicans

Los inóculos se prepararon mediante la misma metodología que se ha descrito previamente para los discos de titanio y teflón.

2. Formación del biofilm sobre los discos de cristal

En primer lugar, se esterilizaron los discos de cristal en autoclave 20 minutos, a 121 °C. Tras su esterilización se procedió a equipar la placa de 24 pocillos con los discos. Se le añadió 1 ml de BHI. A continuación, se añadieron 20 μ l del inóculo microbiano 0.5 McFarland de cada uno de los tres microorganismos. Se incubaron durante 48 horas a 37°C para la formación de la biopelícula.

3. Exposición de los discos al plasma

Para la exposición al plasma de los discos de cristal, se optó por su exposición tanto en seco como en medio líquido.

En el caso de los discos de cristal que se iban a exponer al plasma en seco, después de la formación de la biopelícula sobre su superficie, se retiró por aspiración el medio de cultivo de los pocillos y se lavaron con 1ml de Ringer. A continuación, se colocaron en la gradilla dentro de la cámara de plasma y se expusieron al plasma. Los discos de control, de la misma manera se lavaron con 1ml de Ringer y se reservaron en la cámara de flujo laminar.

En el caso de los discos de cristal que se iban a exponer al plasma en medio líquido, después de la formación de la biopelícula sobre su superficie, se mantuvieron en la placa de 24 pocillos y se introdujeron en la cámara de plasma para su exposición. Se obtuvo una réplica de la placa expuesta que se mantuvo en la campana de flujo laminar como control. Tras la finalización de la exposición se retiró el medio de cultivo de los discos problema y control y se lavaron con 1ml de Ringer para su posterior visualización con la microscopía confocal. El tiempo de exposición utilizado fue de 60 minutos.

4. <u>Tinción con KIT LIVE/DEAD</u>

Posteriormente se procedió a teñir las biopelículas de *C. albicans* con el sistema LIVE/DEAD® Yeast Viability Kit (Invitrogen) y para el caso de *S. aureus* y *P. aeruginosa* con el sistema LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Estas tinciones permiten distinguir a los microorganismos metabólicamente activos, en función de la integridad de la membrana celular. Una vez finalizado el periodo de tinción, se procedió a realizar el lavado de los discos con 1ml de Ringer para eliminar el exceso de reactivos de tinción, se realizaron tres lavados prestando especial atención de no dañar las biopelículas formadas sobre los discos de cristal.

5. Estudio de la citoarquitectura de las biopelículas mediante microscopía laser <u>confocal</u>

Se eliminó el exceso de humedad de los discos con el biofilm y se montaron sobre portaobjetos usando como medio de montaje Mowiol. Finalmente se observaron en el microscopio confocal, utilizando el modo secuencial para la adquisición de imágenes. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes:

LIVE/DEAD® Yeast Viability Kit (Invitrogen)

- Calcofluor Excitación 365 nm (Diodo 405) Emisión 435 nm
- FUN 1 Excitación 488 nm (Laser Ar, Linea 488) Emisión 530 nm
LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen)

 SYTO 9 Excitación 480 nm (Laser Ar, Linea 488) Emisión 510 nm Ioduro de Propidio Excitación 493 nm (Laser Ar, Linea 496) Emisión 636 nm

En las Figuras 27 y 28 se representa el esquema de trabajo de este diseño experimental



Figura 27. Esquema de trabajo. Evaluación de la de la viabilidad del biofilm tras la exposición al plasma frío a presión atmosférica (discos en seco) mediante microscopía confocal láser.



Figura 28. Esquema de trabajo. Evaluación de la de la viabilidad del biofilm microscopía confocal láser.

3.7 Análisis de los datos

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.17.

Para el análisis de la letalidad del ANTP sobre el biofilm de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans* formadas en discos de titanio y PTFE se utilizó un diseño factorial con 4 factores y una única variable respuesta, la letalidad. Los 4 factores del análisis fueron; "disposición espacial de los discos", "tiempo de exposición", "material" (titanio, PTFE) y "microorganismo" (*S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans*). En el análisis de la Varianza (ANOVA) se incluyeron entre los posibles efectos a estimar, además de los efectos simples de los cuatro factores, las interacciones de "tiempo" con "material" y con "microorganismo". Debido al desequilibrio del diseño no fue posible analizar la interacción entre la "disposición espacial" de los discos y el tiempo. Se consideró estadísticamente significativo el valor p <0,05. La estadística descriptiva del conjunto de datos incluyó tanto medias, error estándar de la media e intervalos de confianza del 99,0%.

Para la valoración de la actividad del ANTP sobre las células planctónicas de *S. aureus P. aeruginosa* y *C. albicans* se utilizó el análisis estadístico ANOVA factorial de dos factores "microorganismo" y "concentración" realizando sólo el análisis para el tiempo de exposición de 60 minutos dado que en la totalidad de los ensayos de 90 minutos la letalidad fue del 100%.

En el análisis de la actividad sobre el medio de cultivo se realizaron curvas de crecimiento de 24 horas. Se describen los hallazgos para los tiempos de 30 y de 60 minutos.

La evaluación de la viabilidad del biofilm tras la exposición al plasma frío a presión atmosférica se realizó mediante microscopía confocal láser y se analizó de forma cualitativa exponiendo los hallazgos observados.

4 Resultados

4.1 Actividad del ANTP sobre el biofilm de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans* formado en discos de titanio y PTFE

La actividad microbicida del ANTP sobre el biofilm se evaluó mediante el cálculo de la letalidad producida. En total se realizaron 13 experimentos, en cada uno de los cuales se midió la letalidad en 6 discos correspondientes a las combinaciones de dos tipos de material (titanio y PTFE) con tres tipos de microorganismos (*S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans*).

Las 13 pruebas se clasificaron en cinco grupos en función de la disposición espacial relativa de los discos respecto al par de electrodos de la cámara de producción de plasma (distancia relativa a los electrodos y posición de los discos). Las disposiciones espaciales relativas se denominaron "disposición espacial" 1, 2, 3, 4 y 5. Se pretendía conocer si las especies reactivas se difundían de manera homogénea en la cámara y su influencia sobre la letalidad. En cada grupo se realizaron diferentes pruebas correspondientes a diferentes tiempos de exposición (20, 30, 45, 60 y 90 minutos). No se ensayaron todos los tiempos en todos los grupos lo que dificultó el análisis estadístico. El desequilibrio del diseño hizo imposible analizar la posible interacción entre "disposición espacial" y "tiempo". Dicha interacción, en caso de existir, estaría confundida con el error experimental empeorando la precisión del experimento.

Los tiempos ensayados en cada grupo fueron los siguientes:

Disposición espacial 1: 30 minutos. Disposición espacial 2: 20, 30, 45 (3 veces) y 60 minutos. Disposición espacial 3: 30 y 45 minutos. Disposición espacial 4: 45 minutos. Disposición espacial 5: 60 (2 veces) y 90 minutos.

Los datos de la letalidad del ANTP sobre el biofilm formado en discos de titanio para todas las disposiciones espaciales y tiempos se resumen en la Tabla 3.

Resultados

La letalidad media producida sobre el biofilm de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans*, sobre discos de titanio, después de 60 minutos de exposición al plasma frío, fue del 99,7 %, 99,9 % y 99,6 %, respectivamente.

D:	T: (!)	Letalidad (%)			
Disposición espacial	Tiempo (min)	S. aureus	P. aeruginosa	C. albicans	
1	30	99,81	99,67	88,35	
2	20	99,58	53,24	98,25	
2	30	99,93	98,66	98,87	
2	45	83,16	99.99	99.99	
2	45	100	100	99,89	
2	45	93,61	99,52	10,62	
2	60	96,11	100	99,89	
3	30	97,26	97,25	43,35	
3	45	99,88	76,09	0	
4	45	89,74	99,23	91,16	
5	60	99,39	99,95	99,94	
5	60	99,96	100	99,35	
5	90	92	99,99	99,34	

Tabla 3

Letalidad del del plasma frío sobre el biofilm formado sobre discos de titanio

La letalidad media producida sobre el biofilm de *S. aureus, P. aeruginosa y C. albicans*, formadas durante 48 horas sobre discos de PTFE, después de 60 minutos de exposición al plasma frío fue del 99,1 %, 95,9 % y 94,4 %, respectivamente. (Tabla 4).

Tabla 4

Dian o si si ón como si si	T ioner (Letalidad (%)			
	Tiempo (min)	S. aureus	P. aeruginosa	C. albicans	
1	30	51,22	99,26	99,44	
2	20	99,8	0	0	
2	30	0	98,9	0	
2	45	99,53	100	99,69	
2	45	99,67	100	98,21	
2	45	99,92	99,99	98,98	
2	60	99,68	100	98,97	
3	30	77,68	91,79	0	
3	45	58,66	61,34	85,81	
4	45	69,42	100	99,28	
5	60	99,77	92,15	99,97	
5	60	98,41	99,81	88,91	
5	90	99,65	98,67	96,21	

Letalidad del plasma frío sobre el biofilm formado sobre discos de PTFE

El análisis de estos datos se realizó mediante un análisis de la varianza factorial (ANOVA). Dicho análisis permitió evaluar el efecto individual y conjunto de los factores implicados ("disposición espacial de los discos", "tiempo", "material" (titanio, PTFE) y "microorganismo" (*S. aureus, P. aeruginosa y C. albicans*) sobre la variable dependiente cuantitativa, en nuestro caso la letalidad producida. Se incluyeron entre los posibles efectos a estimar, además de los efectos simples de los cuatro factores, las interacciones de "tiempo" con "material" y con "microorganismo". El desequilibrio del diseño no permitió analizar la interacción entre la "disposición espacial" de los discos y el tiempo. Analizar el efecto "material" (p 0,0166) y "tiempo" (p 0,0183), así como las interacciones "material-tiempo" (p 0,009) y "microorganismo-tiempo" (p 0.0467) se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

Resultados

En la tabla 7 se recogen los resultados del análisis de la varianza, que se obtendrían operando como si los 78 resultados fueran los resultados de 78 pruebas independientes.

	Suma de Cuadrados	Grados libertad	Media cuadrática	Razón-F	Valor-P
Efectos individuales					
Disposición espacial	4358,95	4	1089,74	2.05	0,0996
Material	3240,15	1	3240,15	6.11	0,0166
Microorganismo	2084,98	2	1042,49	1.97	0,1499
Tiempo	6908,77	4	1727,19	3.26	0,0183
Interacciones					
Material -tiempo	7986,07	4	1996,52	3.76	0,0090
Microorganismo- tiempo	9108,9	8	1138,61	2.15	0,0467
Residuos	28637,4	54	530,323		
Total, corregido	65378,4	77			

Tabla 5

Análisis de varianza para la letalidad

Nota. Tabla de resultados del ANOVA. En la columna de la derecha se muestran los valores p de los efectos individuales (disposición espacial, material, bacteria, tiempo) y de las interacciones material-tiempo, bacteria-tiempo. Se muestran los valores numéricos de la suma de cuadrados, grados de libertad y los residuos para el cálculo de los valores p. Los valores con significación estadística fueron el factor "material", el factor "tiempo" y la interacción "material-tiempo" y "microorganismo - tiempo" (p < 0,005).

4.1.1 Factor "disposición espacial"

El factor "disposición espacial" se corresponde con diferentes situaciones de los discos (titanio y PTFE), utilizadas dentro de la cámara para su exposición al plasma frío. En los experimentos se han utilizado tres tipos de soportes para ubicar los discos, dos posiciones de los discos (vertical y horizontal) y diferentes distancias en relación con el electrodo superior e inferior. En las Figura 20 se muestran los tres soportes utilizados: la rejilla de teflón, la gradilla "Z" 50 tubos y la gradilla de rejilla.



Figura 29. Soportes de ubicación de los discos de titanio y PTFE. A: rejilla de teflón. B: Gradilla "Z" 50 tubos, C: Gradilla de rejilla.

Las cinco variables "disposición espacial" fueron:

- 1. "disposición 1": Distancia 1 rejilla de teflón, disco horizontal.
- 2. "disposición 2": Distancia 2, gradilla "Z" 50 tubos, disco vertical.
- 3. "disposición 3": Distancia 3, gradilla "Z" 50 tubos, disco vertical.
- 4. "disposición 4": Distancia 4, gradilla de rejilla, disco vertical.
- 5. "disposición 5": Distancia 4, gradilla de rejilla, disco horizontal.

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre sus cinco variantes (p=0,0996) (Tabla 5), aunque si se pudo apreciar ciertas diferencias entre sus cinco variantes, destacando el valor medio corregido de la letalidad para el factor "disposición espacial" 3 de 66,6 siendo claramente inferior al resto de disposiciones espaciales (Tabla 6).

En la Figura 30 se recogen los valores medios obtenidos para la letalidad en los ensayos correspondientes a las diferentes variantes del factor "disposición espacial". Las medias graficadas no son medias aritméticas clásicas, sino medias "corregidas" estimadas por mínimos cuadrados, en las que se ha eliminado los efectos de los otros factores. Así, por ejemplo, la media aritmética de las letalidades en los casos en que "disposición espacial" 5 es 98,0, mientras que cuando "disposición espacial" 1 es 89,6. Sin embargo, las correspondientes medias mínimo cuadráticas son 84,3 (para "disposición espacial" 5) y 97,8 en el caso de "disposición espacial" 1, porque a la media de "disposición espacial" 5 se le ha corregido a la baja para tener en cuenta que siempre ha ido asociado a valores altos (60', 90') de "tiempo", mientras que la media de "disposición espacial" 1 se sociado a valores bajos (30') de "tiempo" (Tabla 6).



Figura 30. Letalidad para las diferentes disposiciones espaciales. Se representan las medias "corregidas" estimadas por mínimos cuadrados, en las que se ha eliminado los efectos de los otros factores.

En la Tabla 6 se resumen los datos de las medias corregidas de la letalidad en porcentajes, estimadas por mínimos cuadrados, para el factor "disposición espacial" con intervalos de confianza del 99%.

Tabla 6

Letalidad media corregida para el factor "disposición espacial"

	Discos	Letalidad	Error	Intervalo de med	confianza para la ia al 99%
	(n)	media (%)	estándar	Límite Inferior	Límite Superior
Media global	78	83,4013			
Disposición espacial					
1	6	97,8523	12,2146	97,6985	98,0062
2	36	83,7573	5,21759	83,6916	83,823
3	12	66,664	8,759	66,5537	66,7743
4	6	84,3923	11,313	84,2499	84,5348
5	18	84,3407	8,45085	84,2342	84,4471

Nota. En la tabla se puede observar la letalidad media global estimada por mínimos cuadrados, producida en los 78 discos analizados (titanio y PTFE) tras la exposición al plasma, así como la media en cada una de las "disposiciones espaciales". Se muestra el error estándar y los intervalos de confianza para la media al 99%.

4.1.2 Factor tipo de "material"

La media corregida de la letalidad para el titanio fue de 91,3% frente a la letalidad en PTFE que fue 75,5% (p=0,0166), lo que parece indicar que hay diferencias relativamente importantes entre las letalidades constatadas en ambos tipos de material (Tabla 7).

En la Figura 31 se reflejan los valores medios corregidos obtenidos para la letalidad en los ensayos correspondientes a los dos tipos de materiales utilizados.

Medias corregidas



Figura 31. Letalidad para el factor "material" (titanio y PTFE). La media corregida de la letalidad para el titanio es de 91,3% frente a la letalidad en PTFE que es de 75,5%.

En la Tabla 7 se resumen los datos de las medias corregidas estimadas por mínimos cuadrados de la letalidad en porcentajes para el factor "material" con intervalos de confianza del 99%.

Tabla 7

Letalidad media corregida para el factor "material"

	Discos	Letalidad	Error	Intervalo de medi	confianza para la ia al 99%
	(n)	media (%)	estándar	Límite Inferior	Límite Superior
Media global	78	83,4013			
Material					
Titanio	39	91,2704	5,53542	91,2007	91,3402
PTFE	39	75,5322	5,53542	75,4625	75,6019

Nota. Letalidad media global estimada por mínimos cuadrados, producida en los 78 discos analizados (titanio y PTFE) tras la exposición al plasma, así como la media con cada tipo de "material" utilizado (titanio y PTFE). Se muestra el error estándar y los intervalos de confianza para la media al 99%.

4.1.3 Factor tipo de "microorganismo"

La media corregida de la letalidad para *S. aureus* fue 91%, la de *P. aeruginosa* 83,5% y la de *C. albicans* 75.6% (Tabla 8 y Figura 32). No se observaron diferencias significativas entre las letalidades de los tres tipos de microorganismos estudiados (p=0,1499). La letalidad fue más elevada para *S. aureus* y más baja para *C. albicans*.

En la figura 32 se reflejan los valores medios corregidos obtenidos para la letalidad en los ensayos correspondientes a los tres tipos de microorganismos utilizados *S. aureus, P. aeruginosa* y C. *albicans*.



Medias corregidas

Figura 32. Letalidad para el factor "microorganismo" (*S. aureus, P. aeruginosa y C. albicans*). La media corregida de la letalidad para *S. aureus* fue del 91%, la de *P. aeruginosa* de 83,5% y la de *C. albicans* 75,6%.

En la Tabla 8 se resumen los datos de las medias corregidas estimadas por mínimos cuadrados del porcentaje de letalidad para el factor "microorganismo" con intervalos de confianza del 99%.

Tabla 8

Letalidad media corregida para el factor "microorganismo"

	Discos	Letalidad	Error	Intervalo d para la me	de confianza nedia al 99%	
	(n)	media (%)	estándar	Límite Inferior	Límite Superior	
Media global	78	83,4013				
Microorganismo						
S. aureus	26	91,0864	6,38561	91,006	91,1669	
P. aeruginosa	26	83,4924	6,38561	83,412	83,5729	
C. albicans	26	75,6251	6,38561	75,5447	75,7055	

Nota. Letalidad media global estimada por mínimos cuadrados, producida en los 78 discos analizados (titanio y PTFE) tras la exposición al plasma, así como la media con cada tipo de "microorganismo" utilizado. Se muestra el error estándar y los intervalos de confianza para la media al 99%.

Al analizar en el apartado 4.1.6 la interacción de "microorganismo" con "tiempo" se constatará que la diferencia de letalidades entre microorganismos depende del tiempo de exposición siendo prácticamente inexistente para valores altos de "tiempo".

4.1.4 Factor "tiempo"

La letalidad fue más alta al aumentar el tiempo de exposición (Tabla 9), siendo la más elevada con tiempos de exposición de 60 minutos (97,2%) y 90 minutos (96,8%), observándose diferencias estadísticamente significativas con los tiempos inferiores (p=0,0166).

En la Figura 33 se reflejan los valores medios corregidos obtenidos para la letalidad en los ensayos correspondientes a todos los tiempos de exposición.



Figura 33. Letalidad para el factor "tiempo". La media corregida de la letalidad para 20, 30, 45, 60 y 90 minutos fueron de 57,8%, 75,2%, 90%, 97,2% y 97% respectivamente.

La curva de crecimiento fue claramente no lineal, siendo el aumento de la letalidad muy rápido entre 20 y 45 minutos y más lento para valores más elevados.

En la Tabla 9 se resumen los datos de las medias corregidas estimadas por mínimos cuadrados de la letalidad en porcentajes para el factor "tiempo" con intervalos de confianza del 99%.

Tabla 9

Letalidad media corregida para el factor "tiempo"

	Discos	Letalidad	Error	Intervalo de med	confianza para la ia al 99%
	(n)	media (%)	estándar	Límite Inferior	Límite Superior
Media global	78	83.4013			
Tiempo (min)					
20	6	57,8273	10,5865	57,694	57,9607
30	18	75,1823	6,56757	75,0996	75,265
45	30	89,9757	5,38433	89,9079	90,0435
60	18	97,2107	8,759	97,1004	97,321
90	6	96,8107	13,8428	96,6363	96,985
20	6	57,8273	10,5865	57,694	57,9607

Nota. Letalidad media global estimada por mínimos cuadrados, producida en los 78 discos analizados (titanio y PTFE) tras la exposición al plasma, así como la media con para todos los "tiempos". Se muestra el error estándar y los intervalos de confianza para la media al 99%.

4.1.5 Interacción de factor "tiempo-material"

En los discos de titanio la letalidad fue ya elevada para valores bajos de "tiempo", creciendo más lentamente a lo largo del tiempo; sin embargo, la letalidad en los discos de PTFE fue muy baja al principio, creciendo rápidamente con el tiempo hasta ser similar a la constatada con titanio para valores altos de tiempo (Tabla 10). Las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas (p=0009), resaltando la importancia del material empleado en las tasas de letalidad observadas en función del tiempo.

En la Figura 34 se representa la gráfica con las medias corregidas de las letalidades para la interacción factor "tiempo" (20, 30, 45, 60 y 90 minutos) y factor "material" (titanio y PTFE).



Figura 34. Interacción "tiempo-material". Se representan las medias corregidas de la letalidad de la interacción "tiempo-material" tras 20, 30, 45, 60 y 90 minutos de exposición.

En la Tabla 10 se resumen los datos de las medias corregidas estimadas por mínimos cuadrados de la letalidad en porcentajes para la interacción "tiempo" / "material" con intervalos de confianza del 99%.

	Discos	Letalidad	Error	Intervalo d la m	ervalo de confianza para la media al 99%	
	(n)	media (%)	estándar	Límite Inferior	Límite Superior	
Media global	78	83,4013				
Interacción Material/tiempo						
Titanio / 20 min.	3	83,344	14,1585	83,1657	83,5223	
Titanio / 30 min.	9	92,1323	8,52029	92,025	92,2396	
Titanio / 45 min.	15	85,849	6,83143	85,763	85,935	
Titanio / 60 min.	9	98,6662	10,3045	98,5365	98,796	
Titanio / 90 min.	3	96,3607	16,7335	96,1499	96,5714	
PTFE / 20 min.	3	32,3107	14,1585	32,1324	32,489	
PTFE / 30 min.	9	58,2323	8,52029	58,125	58,3396	
PTFE / 45 min.	15	94,1023	6,83143	94,0163	94,1884	
PTFE / 60 min.	9	95,7551	10,3045	95,6253	95,8849	
PTFE / 90 min.	3	97,2607	16,7335	97,0499	97,4714	

Tabla 10

Medias de letalidad para la interacción "tiempo-material"

Nota. Letalidad media global estimada por mínimos cuadrados, producida en los 78 discos analizados (titanio y PTFE) tras la exposición al plasma, así como las medias de la interacción del tipo de material de los discos (titanio, PTFE) con todos los "tiempos". Se muestra el error estándar y los intervalos de confianza para la media al 99%.

4.1.6 Interacción "tiempo-microorganismo"

El valor-p de la interacción "tiempo-microorganismo" (p=0.0467) fue estadísticamente significativo. El efecto de "tiempo" fue muy diferente según el tipo de microorganismo.

Con *S. aureus* la letalidad fue elevada, incluso con valores bajos de tiempo (20 minutos), no variando significativamente a tiempos mayores. Con *P. aeruginosa*

Resultados

y *C. albicans* se observó una letalidad baja a los 20 minutos, pero que mientras que con *P. aeruginosa* la letalidad fue máxima a los 30 minutos, el aumento de letalidad fue mucho más lento con *C. albicans*, alcanzando valores máximos a los 60 minutos.

En la Figura 35 se representa las medias corregidas de las letalidades para la interacción factor "tiempo" (20, 30, 45, 60 y 90 minutos) y factor "microorganismo".



Figura 35. Interacción "tiempo-microorganismo". Medias corregidas de la letalidad de la interacción "tiempo-microorganismo" tras 20, 30, 45, 60 y 90 minutos de exposición.

En la Tabla 11 se resumen los datos de las medias corregidas estimadas por mínimos cuadrados de la letalidad en porcentajes para la interacción "bacteriatiempo" con intervalos de confianza del 99%.

Tabla 11

	Discos	Letalidad	Error	Interval para la 1	valo de confianza la media al 99%	
	(n)	media (%)	estándar	Límite Inferior	Límite Superior	
Media global	78	83.4013				
Interacción						
microorganismo/ tiempo						
S. aureus / 20 min.	2	98,444	16,9956	98,23	98,658	
S. aureus /30 min.	6	71,6268	10,1024	71,4996	71,754	
S. aureus / 45 min.	10	92,2957	8,02159	92,1947	92,3967	
S. aureus / 60 min.	6	98,1551	11,6467	98,0084	98,3018	
S. aureus / 90 min.	2	94,9107	19,1937	94,669	95,1524	
P. aeruginosa / 20 min.	2	26,244	16,9956	26,03	26,458	
P. aeruginosa / 30 min.	6	98,2601	10,1024	98,1329	98,3873	
P. aeruginosa / 45 min.	10	96,6257	8,02159	96,5247	96,7267	
P. aeruginosa / 60 min.	6	97,9218	11,6467	97,7751	98,0684	
P. aeruginosa / 90 min.	2	98,4107	19,1937	98,169	98,6524	
C. albicans / 20 min.	2	48,794	16,9956	48,58	49,008	
C. albicans / 30 min.	6	55,6601	10,1024	55,5329	55,7873	
C. albicans / 45 min.	10	81,0057	8,02159	80,9047	81,1067	
C. albicans / 60 min.	6	95,5551	11,6467	95,4084	95,7018	
C. albicans / 90 min.	2	97,1107	19,1937	96,869	97,3524	
C. albicans / 20 min.	2	98,444	16,9956	98,23	98,658	

Nota. Letalidad media global estimada por mínimos cuadrados, producida en los 78 discos analizados (titanio y PTFE) tras la exposición al plasma, así como las medias de la interacción del tipo de microorganismo con todos los "tiempos". Se muestra el error estándar y los intervalos de confianza para la media al 99%.

4.2 Actividad del ANTP sobre las células planctónicas de *S. aureus P. aeruginosa* y *C. albicans*

Para evaluar la letalidad sobre células planctónicas tras la exposición al plasma frío, se inocularon placas con distintas concentraciones $(10^8 - 10^2 \text{ UFC/ml})$ de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans* que fueron expuestas durante diferentes tiempos a plasma frío. Como control se utilizaron réplicas de las placas anteriores que se mantuvieron en la campana de flujo laminar. Tras la exposición de las placas se plaquearon diluciones seriadas de los diferentes pocillos (control y problema), obteniéndose tras la incubación a 37°C durante 48h, el número de UFC/ml y la letalidad producida.

En total se realizaron tres experimentos con una exposición de 90 minutos al ANTP de células planctónicas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*, un experimento de 90 minutos únicamente con *S. aureus* y 2 experimentos de 60 minutos con *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*.

Para evaluar la letalidad tras 60 minutos de exposición al plasma frío se analizaron 18 pocillos con distintos inóculos (10^5 , 10^4 , 10^3 y 10^2 UFC/ml) de *S. aureus, P. aeruginosa y C. albicans* (Tabla 12).

Tabla 12

Letalidad de los microorganismos, tras 60 minutos de exposición al plasma frío, en función del inóculo

Letalidad (%)						
Inóculo (UFC/ml)	S. aureus	P. aeruginosa	C. albicans			
10 ⁵	55,71	56,74	n/d			
10 ⁴	17,56	47,09	60,68			
10 ³	17,56	57,14	51,38			
10 ²	n/d	n/d	66,27			

Nota. Letalidad tras la exposición al plasma frío durante 60 minutos de células planctónicas suspendidas en medio líquido. Se muestran los datos de letalidad correspondientes a distintos inóculos de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans.* n/d, no disponible.

En la Figura 36 se muestra la representación gráfica de la letalidad correspondiente a *S. aureus*, y *P. aeruginosa* y en la Figura 37 la de *C. albicans*.



Figura 36. Letalidad sobre células planctónicas de *S. aureus* y *P. aeruginosa* tras 60 minutos de exposición (inóculos 10³-10⁵ UFC/ml).



Figura 37. Letalidad sobre células planctónicas de *C. albicans* tras 60 minutos de exposición en concentraciones bacterianas desde 10⁴ - 10² UFC/ml).

Para evaluar la letalidad tras 90 minutos de exposición al plasma frío se analizaron un total de 61 pocillos con distintos inóculos $(10^{8}, 10^{7}, 10^{6}, 10^{5}, 10^{4}, 10^{3} \text{ y } 10^{2} \text{ UFC/ml})$ de *S. aureus, P. aeruginosa y C. albicans*. En la Tabla 13 se muestran los datos correspondientes a la letalidad media.

Tabla 13

Letalidad de los microorganismos, tras 90 minutos de exposición al plasma frío, en función del inóculo

Letalidad (%)						
Inóculo (UFC/ml)	S. aureus	P. aeruginosa	C. albicans			
10 ⁸	100,00	100,00	98,48			
10 ⁷	99,98	100,00	99,97			
10 ⁶	99,98	100,00	100,00			
10 ⁵	99,79	100,00	100,00			
10 ⁴	99,42	100,00	100,00			
10³	100,00	100,00	100,00			
10²	n/d*	n/d	100,00			
Media	99,86	100	99,74			

Nota. Letalidad tras la exposición al plasma frío durante 90 minutos de células planctónicas suspendidas en medio líquido. Se muestran los datos de letalidad correspondientes a distintos inóculos de S. *aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans.* n/d, no disponible.

En la Figura 38 se muestra la representación gráfica de la letalidad de *S. aureus,* y *P. aeruginosa* y en la Figura 39 la correspondiente a *C. albicans.*



Figura 38. Letalidad sobre células planctónicas de *S. aureus* y *P. aeruginosa* tras 90 minutos de exposición (inóculos 10³-10⁸ UFC/ml).



Figura 39. Letalidad sobre células planctónicas de *C. albicans* tras 90 minutos de exposición (inóculos 10²-10⁸ UFC/ml).

En el apéndice III se muestran los datos con las letalidades correspondientes a los 61 pocillos expuestos durante 90 minutos y a los 18 pocillos expuestos durante 60 minutos.

Del análisis de estos datos, resulta evidente, que la diferencia de letalidad entre 60 minutos y 90 minutos es muy relevante.

Aunque ambos grupos de ensayos no son estrictamente comparables, por no estar perfectamente equilibrados los factores (microorganismo e inóculo). Si analizamos las medias para el factor "tiempo", se comprueba que los resultados que se resumen en la Tabla 14 son contundentes. En los ensayos de 90 minutos la letalidad media fue del 99,86%, con un valor mínimo de 96,94 y alcanzándose el valor máximo del 100% en el 84% de los ensayos. En los ensayos de 60 minutos la letalidad media fue del 52,57%, con un valor mínimo del 0 en dos ensayos y resultando inferior al 90% en el 83% de los ensayos.

Resultados

Tabla 14

Letalidad media de los microorganismos tras 60 y 90 minutos de exposición

	60 minutos	90 minutos
Pocillos expuestos (n)	18	61
Letalidad media (%)	52,5661	99,8672
Desviación Estándar	30,4366	0,515894
Coeficiente de Variación (%)	57,9015	0.51658
Valor mínimo (%)	0	96,94
Valor máximo (%)	98,74	100,0

El estudio del posible efecto sobre la letalidad de los factores microorganismo e inóculo se realizó considerando sólo los resultados de los ensayos de 60 minutos (18 casos), dado que en la totalidad de los ensayos de 90 minutos la letalidad fue del 100% o solo ligeramente inferior.

Para ello se realizó un análisis de varianza multifactorial, siendo la variable dependiente la letalidad y los factores de estudio "microorganismo" e "inóculo" (Tabla 15). Ninguno de los dos factores analizados, microorganismo e inóculo, tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la letalidad (p>0,05). ("microorganismo" p=0,7697); inóculo p=0,8524)

Tabla 15

Anova multifactorial-letalidad (tiempo= 60 minutos)

	Suma de Cuadrados	Grados libertad	Media cuadrática	Razón-F	Valor-p
Efectos individuales					
Microorganismo	627,261	2	313,631	0,27	0,7697
Inóculo	916,536	3	305,512	0,26	0,8524
Residuos	14070,4	12	1172,54		
Total, corregido	15748,6	17			

Nota. Tabla de resultados del ANOVA. En la columna de la derecha se muestran los valores p de los efectos individuales (microorganismo e inóculo). Se muestran los valores numéricos de la suma de cuadrados, grados de libertad y los residuos para el cálculo de los valores p.

En la Tabla 16 se recogen los valores medios (estimados por mínimos cuadrados) obtenidos para la letalidad para los tres microorganismos y para los cuatro inóculos ensayados. Como hemos señalado las diferencias entre estas medias no resultaron estadísticamente significativas.

	Pocillos (n)	Media
Media global	18	54,2842
Microorganismo		
S. aureus	6	45,5092
P. aeruginosa	6	56,0908
C. albicans	6	61,2525
Concentración (UFC/ml)		
10 ²	2	59,3017
10 ³	6	55,3483
10^{4}	6	42,775
10 ⁵	4	59,7117

Tabla 16

Medias por mínimos cuadrados para la letalidad

4.3 Efecto microbicida del medio BHI tras exposición al ANTP

Tal y como se describe en el punto 3.5, se expuso al plasma frío 50 ml de medio de cultivo BHI en placa de Petri (medio expuesto) en dos experimentos diferentes de 30 y 90 minutos. En cada uno de los experimentos se reservaron 50 ml de medio de cultivo en la cámara de flujo laminar (medio no expuesto).

Tras la exposición, el medio de cultivo expuesto y el no expuesto, se dividieron en alícuotas, se inocularon los cultivos con *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans* partiendo de una absorbancia de 0,02 e incubando a 37 °C en agitación durante 24 horas. Cada hora se tomó una alícuota para medir la absorbancia de las muestras experimento y control obteniendo las correspondientes curvas de crecimiento. Como blanco para cada medición se utilizó una alícuota del medio BHI sin inocular

4.3.1 Efecto de la exposición de 30 minutos del medio de cultivo BHI

En las Figuras 40, 41 y 42 se representan las curvas de crecimiento durante 24 horas en los medios de cultivo BHI expuestos durante 30 minutos y no expuestos al plasma frío que previamente habían sido inoculados con *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*.

Se objetivó crecimiento de *S. aureus* en el medio BHI no expuesto (aumento de la absorbancia), pero no hubo crecimiento en el medio de cultivo expuesto al plasma frío durante 30 minutos (Figura 40).



Figura 40. Curva de crecimiento de *S. aureus* (**30 minutos**). Efecto de la exposición previa del BHI al plasma frío durante 30 minutos sobre el crecimiento de *S. aureus*. Bajo la gráfica se muestran los datos de absorbancia.

Como se aprecia en la Figura 41, se objetivó crecimiento de *P. aeruginosa* en el medio BHI no expuesto (aumento de la absorbancia), pero no hubo crecimiento en el medio de cultivo expuesto al plasma frío durante 30 minutos.



Figura 41. Curva de crecimiento *P. aeruginosa* (**30 minutos**). Efecto de la exposición previa del BHI al plasma frío durante 30 minutos sobre el crecimiento de *P. aeruginosa*. Bajo la gráfica se muestran los datos de absorbancia.

En el caso de *C. albicans* se observó crecimiento en ambos medios de cultivo, por lo que el medio activado por plasma con tiempo de exposición de 30 minutos no fue efectivo para impedir el crecimiento de *C. albicans*, aunque si se observó una disminución en la velocidad de crecimiento (Figura 42).



Figura 42. Curva de crecimiento *C. albicans* (30 minutos). Efecto de la exposición previa del BHI al plasma frío durante 30 minutos sobre el crecimiento de *C. albicans*. Bajo la gráfica se muestran los datos de absorbancia.

Del análisis de las gráficas podemos concluir que la exposición al plasma frío del medio de cultivo BHI durante 30 minutos disminuye drásticamente el crecimiento de especies bacterianas Gram-positivas y Gram-negativas. Sin embargo, apenas se afecta el crecimiento de especies fúngicas como *C. albicans* en el medio expuesto.

4.3.2 Efecto de la exposición de 90 minutos del medio de cultivo

En las Figuras 43, 44 y 45 se presentan las curvas de crecimiento durante 24 horas de los medios de cultivo BHI expuestos durante 90 minutos y no expuestos al plasma frío que previamente habían sido inoculados con *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans*.

Como se aprecia en la Figura 43, se observó crecimiento de *S. aureus* en el medio BHI no expuesto, pero no hubo crecimiento en el medio de cultivo expuesto al plasma frío durante 90 minutos.



Figura 43. Curva de crecimiento *S. aureus* (90 minutos). Efecto de la exposición previa del BHI al plasma frío durante 90 minutos sobre el crecimiento de *S. aureus*. Bajo la gráfica se muestran los datos de absorbancia.

El mismo efecto microbicida sobre el medio se observó con *P. aeruginosa* (Figura 44).



Figura 44. Curva de crecimiento *P. aeruginosa* (90 minutos). Efecto de la exposición previa del BHI al plasma frío durante 90 minutos sobre el crecimiento de *P. aeruginosa*. Bajo la gráfica se muestran los datos de absorbancia.

Como se aprecia en la Figura 45 se produjo crecimiento de *C. albicans* en el medio de cultivo BHI no expuesto (aumento de la absorbancia), pero, a diferencia de lo observado con tiempos de exposición más cortos (30 minutos), no hubo crecimiento en el medio de cultivo expuesto al plasma frío durante 90 minutos



Figura 45. Curva de crecimiento *C. albicans* (90 minutos). La exposición durante 90 minutos del medio expuesto de cultivo BHI (línea roja) impide el crecimiento de *C. albicans*. En el medio no expuesto se observa un aumento de la absorbancia produciéndose el crecimiento. Bajo la gráfica se muestran los datos de absorbancia.

Resultados

Por lo tanto, la exposición al plasma frío del medio de cultivo BHI durante 90 minutos disminuye drásticamente el crecimiento tanto de especies fúngicas como bacterianas, ya que en todos los casos no se observó un aumento de densidad óptica en el medio expuesto al plasma. Esto efecto pudo comprobarse también visualmente, al constatar la ausencia de turbidez en los matraces que contenía BHI expuesto durante 90 minutos al plasma frío (Figura 46).



Figura 46. Turbidez medios BHI. Ausencia y presencia de turbidez en los medios BHI expuestos al plasma frío durante 90 min (matraces inferiores) y no expuestos al plasma (matraces superiores) y posteriormente inoculados con *C. albicans* (izquierda), *P. aeruginosa* (centro) y de *S. aureus* (derecha).

4.4 Análisis, mediante microscopía confocal laser de la viabilidad del biofilm de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* tras su exposición al plasma frío a presión atmosférica

Para analizar los efectos sobre el biofilm de *C. albicans* se utilizó el kit LIVE/DEAD® Yeast Viability (Invitrogen) y para el biofilm de *S. aureus y P. aeruginosa*, el kit LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability (Invitrogen). Ambos sistemas permiten la visualización de las células metabólicamente activas.

El Kit de viabilidad para bacterias dispone de dos colorantes de ácidos nucleicos, SYTO® 9 de color verde-fluorescente y yoduro de propidio de color rojo-fluorescente.

Ambos tienen características espectrales específicas y capacidad para penetrar en las células bacterianas en función de la integridad de las membranas celulares, aquellas con las membranas celulares intactas se tiñen en verde fluorescente, mientras que las bacterias con las membranas comprometidas, que se consideran muertas o moribundas, se visualizarán teñidas de rojo fluorescente.

El kit de viabilidad para levaduras combina dos colorantes fluorescentes el FUN[®] 1 con el Calcofluor® White M2. Calcofluor White tiñe la quitina de la pared celular con fluorescencia azul independientemente del estado metabólico. La integridad de la membrana plasmática y la actividad metabólica de los hongos se visualiza como fluorescencia rojo-naranja mediante el colorante FUN[®] 1. Si hay integridad de membrana y la función metabólica está conservada, la tinción intracelular verde fluorescente del FUN[®] 1 pasará a ser tinción intravacuolar rojonaranja.

4.4.1 Discos en seco

El desarrollo del experimento con los discos en seco está descrito en el apartado 3.6 de material y métodos y el esquema de trabajo se describe en la Figura 27. El tiempo de exposición al plasma de los discos expuestos fue de 60 minutos.

En la Figura 47 se observa la letalidad cualitativa producida en el biofilm formado sobre discos de cristal en seco de *S. aureus*. Es de destacar que ya existe letalidad en los discos no expuestos por la ausencia de medio de cultivo durante los 60

minutos de duración del experimento (Figura 47 A). En los discos de *S. aureus* expuestos al plasma se observa una ausencia de biofilm con algunos restos celulares dispersos debido a la acción del plasma frío (Figura 47 B).





A: S. aureus disco no expuesto Figura 47. Microscopía confocal discos en seco (S. aureus).

En la Figura 48 se observa la letalidad cualitativa producida en el biofilm formado sobre discos de cristal de *P. aeruginosa* formadas sobre discos de cristal en seco. Al igual que con *S. aureus* ya existe letalidad en los discos no expuestos por la ausencia de medio de cultivo durante los 60 minutos de duración del experimento (Figura 48 A). En los discos expuestos al plasma de *P. aeruginosa* se observa una ausencia de biofilm con algunos restos celulares dispersos debido a la acción del plasma frío (Figura 48 B).



A: P. aeruginosa disco no expuestoB: P. aeruginosa disco expuestoFigura 48. Microscopía confocal en seco (P. aeruginosa).

En la Figura 49 se observa la letalidad cualitativa producida en el biofilm formado sobre discos de cristal en seco de *C. albicans*.

En la Figura 49A se observa la coloración de la pared celular en azul, así como la existencia de puntos intravacuolares rojos-naranjas reflejo de la viabilidad de *C. albicans*.

En la Figura 49B se observa la ausencia de conversión del marcador fluorescentes FUN[®] 1, de fluorescente amarillo-verde a rojo-naranja dentro de las estructuras intravacuolares, reflejando la ausencia de actividad metabólica tras la exposición al plasma. Además, en las muestras expuestas al plasma frío se visualiza escasa tinción azul de la quitina, lo que indica la desestructuración de la pared celular de las lavaduras por efecto del tratamiento.



A: C. albicans disco no expuesto



B: C. albicans disco expuesto

Figura 49. Microscopía confocal en seco (C. albicans).

4.4.2 Discos en medio líquido

El desarrollo del experimento con los discos en medio líquido está descrito en el apartado 3.6 de material y métodos y el esquema de trabajo se describe en la Figura 28. El tiempo de exposición al plasma de los discos expuestos fue de 60 minutos.

En la figura 50 se observa la letalidad cualitativa producida en el biofilm formado sobre discos de cristal de *S. aureus* suspendidos en medio líquido tras la

exposición al plasma. A los 60 minutos de exposición se siguen observando células viables de *S. aureus*, aunque se aprecia letalidad (Figura 50 B).





Figura 50. Microscopía confocal de discos en medio líquido (S. aureus).

En la figura 51 se aprecia la letalidad cualitativa producida en el biofilm de P. *aeruginosa* formada sobre discos de cristal suspendidos en medio líquido tras la exposición al plasma. A los 60 minutos de exposición la letalidad es casi completa, aunque persisten algunas células viables (Figura 51 B).



A: P. aeruginosa disco no expuesto

B: P. aeruginosa disco expuesto

Figura 51. Microscopía confocal de discos de cristal expuestos al ANTP en medio líquido (*P. aeruginosa*).
En la figura 52 se observa la letalidad cualitativa producida en el biofilm formado de *C. albicans* sobre discos de cristal suspendidos en medio líquido tras la exposición al plasma frío. A los 60 minutos se observa únicamente estructuras de la pared celular marcadas en azul, pero hay ausencia de conversión de fluorescente amarillo-verde a rojo-naranja reflejando la ausencia de actividad metabólica y la letalidad de *C. albicans* tras la exposición al plasma (Figura 52 B).



E: C. albicans disco no expuesto



F: C. albicans disco expuesto

Figura 52. Microscopía confocal de discos en medio líquido (C. albicans).

5 Discusión

5.1 Actividad del ANTP sobre el biofilm de S. aureus, P. aeruginosa y C. albicans formadas en discos de titanio y PTFE

La "disposición espacial" utilizada de los discos de titanio y PTFE, dentro de la cámara, en relación con los pares de electrodos no influye sobre la letalidad producida en el biofilm. Pero, aunque no se observan diferencias estadísticamente significativas entre sus cinco variantes, se puede apreciar ciertas singularidades destacando el valor claramente inferior al resto de la "disposición espacial" 3. Estos hallazgos sugieren que las especies reactivas generadas dentro de la cámara se distribuyen espacialmente de manera uniforme.

En cuanto al tipo de "material" analizado se observan diferencias importantes entre las letalidades observadas, siendo la letalidad superior en titanio que en PTFE (p= 0,016). La media corregida de la letalidad para el titanio es de 91,3 % frente a la letalidad en PTFE que es de 75,5% independientemente del tipo de bacteria y tiempo. El efecto del material empleado como substrato del biofilm, así como la hidrofobicidad del aislado, también ha sido objetivado en diferentes especies de *Candida* en otros trabajos; habitualmente, *Candida* spp. forman más biofilm en PTFE (hidrófobo) que en titanio (hidrófilo) (187-189). Asimismo, en biofilms de *S. aureus* las superficies hidrófilas y las cargas negativas en el biomaterial generalmente muestran menos adhesión bacteriana que las hidrófobas (61).

En nuestro estudio, la menor letalidad producida en los discos de PTFE se podría explicar por la mayor formación de biofilm sobre el PTFE debido a su elevada hidrofobicidad lo que probablemente influya en la eficacia de las RONS. Uno de los desafíos actuales del plasma frío es la profundidad de penetración del plasma en el biofilm. Los límites de penetración del plasma no sólo dependen de la biomasa sino también de su composición molecular (que influye en la naturaleza de la interacción entre la matriz y las especies reactivas), pudiendo variar entre microorganismos. Sin embargo, la prolongación del tiempo de exposición, como se comentará más adelante, incrementa la letalidad producida por las RONS en materiales más hidrófobos en los que se forma mayor cantidad de biofilm sobre su superficie como el PTFE.

No se observan diferencias significativas en las tasas de letalidad de los tres microorganismos analizados después de la exposición al ANTP; aunque la letalidad es mayor en *S. aureus* (91 %) seguida de *P. aeruginosa* (83,5%), a diferencia de algunos estudios que comunican mayor susceptibilidad de los Gram-negativos (135). La letalidad en *C. albicans* es del 75,6 %.

En nuestro estudio se aprecian diferencias importantes entre las letalidades en función del tiempo de exposición (p=0,0166), siendo en promedio la letalidad superior con tiempos de exposición de 60 y 90 minutos (97,2% y 96,8%, respectivamente).

También se observan diferencias estadísticamente significativas cuando se analiza la interacción "tiempo-material" (p = 0,009), indicando que el efecto del tiempo de exposición sobre la letalidad difiere según el material analizado. En los discos de titanio la letalidad es ya elevada para valores bajos de tiempo, aumentando más lentamente con el mismo; mientras que la letalidad en discos de PTFE es muy baja con tiempos cortos y aumenta rápidamente con el tiempo hasta ser similar a la constatada con titanio a los 60 y 90 minutos. Esto puede ser debido a que la mayor hidrofobicidad del PTFE implica una mayor formación de biofilm y por lo tanto mayor tiempo de exposición necesario para que las RONS consigan la misma letalidad.

Al analizar la interacción entre el tiempo de exposición y el microorganismo estudiado también se observan significativas (p=0,0467). Con *S. aureus* la letalidad es alta, incluso con poco tiempo de exposición (20 min), a diferencia de lo observado con *P. aeruginosa* y *C. albicans*. Con *P. aeruginosa* la letalidad alcanza su tasa más alta a los 30 minutos; sin embargo, con *C. albicans*, el incremento de la letalidad es mucho más lento, alcanzando sus valores máximos a los 60 minutos. Estos datos revelan una mayor resistencia de *C. albicans* al efecto de las RONS en comparación con *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

5.2 Actividad del ANTP sobre las células planctónicas de *S. aureus P. aeruginosa* y *C. albicans*

Sobre las células planctónicas, la diferencia de letalidad entre los 60 y 90 minutos de exposición es muy relevante. A los 90 minutos la letalidad media es del 99,86%, contrastando con la letalidad media observada a los 60 minutos

(52,57%). Dado que en la totalidad de los ensayos la letalidad a los 90 minutos fue prácticamente del 100%, se realizó el análisis de varianza para la letalidad tras un tiempo de exposición de 60 minutos para el estudio del posible efecto de del microorganismo e inóculo, constatándose que ninguno de estos factores influye significativamente sobre la letalidad.

Durante la experimentación observamos que, con tiempos de 60 minutos, si realizábamos la siembra en medio BHI inmediatamente después de exponer al plasma las células planctónicas, crecían el mismo número de UFC/ml que en los controles, pero si la siembra se realizaba al día siguiente no se producía crecimiento de colonias. Con tiempos de 90 minutos la siembra en medio BHI inmediatamente después de la exposición no producía crecimiento de colonias.

La exposición al plasma frío del medio de cultivó genera una solución activada por plasma o PAM; por lo tanto, cuanto mayor es la demora en la siembra, mayor es el tiempo de contacto de las RONS con las diferentes especies microbianas y mayor es el efecto microbicida. Por otro lado, cuando aumenta el tiempo de exposición, se producen mayor cantidad de RONS y aumenta la transferencia de dichas RONS de la cámara al medio líquido y, consecuentemente, se produce mayor letalidad.

Estos hallazgos sugieren que las RONS transferidas desde la cámara a la fase líquida no ejercen un efecto inmediato sobre las células planctónicas diluidas en el medio, precisando de la interacción de las células con las RONS para producir letalidad.

5.3 Análisis del efecto microbicida del medio BHI tras su exposición al ANTP

Recientemente, los medios activados por plasma (PAM) y el agua activada por plasma (PAW) han sido ampliamente estudiados para muchas aplicaciones biomédicas como medicina anticancerígena, antimetastásica, esterilización de tejidos vivos, regenerativa, para favorecer la hemostasia e incluso como agente de tratamiento dental. El plasma en las proximidades del agua o de los medios de cultivo es capaz de crear soluciones activas que contienen RONS. Estas soluciones permanecen estables a temperatura ambiente durante varios días sin dañar el tejido sano (138).

Discusión

Para confirmar que la exposición de un medio líquido al plasma genera una solución antimicrobiana, se expuso el medio de cultivo BHI directamente al plasma frío y posteriormente se inoculó con células planctónicas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*. Mediante espectrofotometría no se observa incremento de la absorbancia en el medio expuesto durante 30 minutos e inoculado con *S. aureus* y *P. aeruginosa*, revelando la ausencia de crecimiento de estos microorganismos, que luego fue confirmada mediante resiembra en medio sólido. Sin embargo, con *C. albicans* se observa incremento de la absorbancia y, por tanto, del crecimiento a partir de las dos horas, no siendo efectivo el PAM con ese tiempo de exposición. Por el contrario, exponiendo el medio BHI al plasma frío durante 90 minutos no se observa incremento de la absorbancia ni crecimiento de los tres microorganismos analizados.

Por lo tanto, se ha podido demostrar la capacidad de la cámara APPC-NTP para activar medios de cultivo o soluciones biológicas para su posterior uso como antimicrobiano cuando el plasma frío no es posible aplicarlo directamente sobre el objetivo biológico por ser zonas inaccesibles o cavidades amplias. En estas situaciones, la aplicación de soluciones líquidas activadas por plasma como medios de cultivo (PAM) o agua (PAW) es una posibilidad atractiva en desarrollo, como ya ha sido sugerido en otros estudios que han empleado líquidos activados por plasma para la inactivación de microorganismos (190-192).

5.4 Análisis, mediante microscopía confocal láser, de la viabilidad del biofilm de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans* tras su exposición al plasma frío a presión atmosférica

Para objetivar cualitativamente el efecto del plasma frío en la viabilidad del biofilm de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans*, se formó un biofilm sobre discos de cristal durante 48 horas y luego se expusieron al plasma durante 60 minutos.

Mediante microscopía confocal láser se observa la desestructuración completa del biofilm, sobre cristal seco, de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* tras 60 minutos de exposición al plasma. Sin embargo, en los biofilms producidos sobre discos de cristal introducidos en medio líquido y expuesto al plasma durante 60

minutos se siguen observando células viables de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, aunque la letalidad es casi completa para *P. aeruginosa*. Con *C. albicans* se observa desestructuración del biofilm y ausencia de actividad metabólica tras la exposición al plasma.

Los resultados obtenidos sobre discos de cristal en medio líquido son compatibles con los encontrados al exponer al ANTP las células planctónicas de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans* suspendidas en medio líquido durante 60 minutos. Las RONS transferidas a la fase líquida precisan de la concentración o tiempo de contacto adecuados para producir letalidad sobre el biofilm formado sobre los cristales expuestos al plasma o sobre las células planctónicas.

5.5 Comentarios finales

Nuestros resultados son difíciles de comparar con los existentes en la literatura ya que la cámara de generación de plasma utiliza unas condiciones de trabajo que genera unas especies reactivas específicas, diferentes de las que se producen en otros dispositivos. Además, la variabilidad de la composición química del ANTP depende del diseño del dispositivo, de los parámetros operativos del sistema, del gas utilizado, de su caudal en el caso de los jets, de la humedad, la temperatura, el voltaje y la frecuencia (141).

De la misma manera, los principales factores que influyen en la eficacia de inactivación de las especies reactivas generadas son, entre otros, la composición química del plasma, el tipo de microorganismo, la forma y tipo de exposición, la fase de crecimiento del biofilm y su distribución espacial, los componentes de la matriz y el sustrato sobre el que reside (193). Las bacterias Gram-negativas generalmente son más susceptibles al ANTP que las Gram-positivas, lo que indica que el daño inducido por el ANTP a la membrana celular y la pared celular es un factor crítico (135). Como ocurre con otros antimicrobianos, la respuesta de las bacterias que crecen en el biofilm requiere un mayor tiempo de exposición antes de inactivarse (135).

Múltiples estudios con dispositivos diferentes y distintas configuraciones han demostrado la capacidad antimicrobiana del ANTP contra el biofilm, la mayoría de ellos en forma de jet (143,147,194-199). Todos ellos demuestran que los biofilms bacterianos o fúngicos, independientemente de la especie, son más resistentes a la inactivación inducida por ANTP en comparación con sus homólogos de células planctónicas.

Discusión

Existen estudios que han empleado la tecnología DBD alejada del punto de aplicación demostrando su capacidad bactericida. Cotter *et al.* (200) evaluaron la tasa de desinfección del ANTP remoto (DBD en el aire) en biofilms clínicamente relevantes de *S. aureus* y *S. epidermidis* resistentes a la meticilina. Las cepas se desarrollaron en forma de biofilm sobre superficies de vidrio y se analizaron en un recipiente de desinfección alejado de la fuente de plasma. Las RONS se inyectaron posteriormente en un recipiente de desinfección. Los recuentos de UFC se redujeron 4 log para *S. epidermidis* y 5,5 log para *S. aureus* después de 1 hora de exposición. Con tiempos de 90 minutos se consiguió una reducción de 5,5 log en *S. aureus* resistente a la meticilina.

Golkowski *et al.* (201) investigaron el efecto antibiofilm de las especies reactivas producidas por el DBD alimentadas con peróxido de hidrógeno en el biofilm de *E. coli.* La producción del plasma estaba alejada 3 metros de la zona de desinfección y las especies reactivas se administraron a través de una corriente de aire. Las UFC en el biofilm, que fueron expuestas directamente al efluente del plasma, mostraron una reducción de 6 log después de una exposición de 5 minutos. Los autores concluyeron que el efluente producido por el dispositivo fue eficaz contra los biofilms, siempre que el objetivo estuviera completamente inmerso en el efluente.

En nuestro trabajo se ha utilizado un sistema APPC-NTP dotado de 2 pares de electrodos DBD tipo SMD, un par en la parte superior y otro en la parte inferior de la cámara. El plasma generado se produce en los dos pares de electrodos y las especies reactivas se difunden en el interior de la cámara interaccionando con las muestras. Teniendo en cuenta los estudios anteriores se podría desarrollar un sistema de extracción de las RONS para su aplicación a distancia en zonas donde interese aplicar el plasma generado en la cámara. Este diseño ofrece ventajas sobre los dispositivos jet de aplicación del plasma ya que están limitados por la extensión de la superficie a tratar y su configuración geométrica.

5.6 Limitaciones del estudio

El objetivo de esta tesis ha sido demostrar la capacidad antimicrobiana de la cámara de generación de plasma a presión atmosférica APPC-*NTP* sobre biofilms de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans* y sobre sus respectivas células planctónicas. Debido a que es un estudio *in vitro*, los resultados no son extrapolables y no tienen aplicación clínica directa.

Es difícil comparar los resultados obtenidos con nuestro equipo con los obtenidos con otros dispositivos. En la actualidad, no hay pruebas estandarizadas para evaluar las nuevas tecnologías antibiofilm y no hay consenso sobre el beneficio clínico de las pruebas de susceptibilidad del biofilm, lo que dificulta la comparación de los resultados con otros estudios (157).

Tampoco se dispone de medidas para comparar dosis de ANTP (potencia de salida) por lo que es imposible ajustar dos dispositivos para fines de comparación. A pesar de todo, dispositivos generadores de plasma frío técnicamente muy diferentes muestran efectos antimicrobianos muy similares siendo el mecanismo de acción de las RONS independiente de la acción de antimicrobianos convencionales.

Otra limitación del estudio es la técnica de detección de la letalidad bacteriana tras la exposición al plasma. En nuestro trabajo, la letalidad se ha determinado mediante el método de dilución, siembra y recuento de las UFC. Con ese método se corre el riesgo de la existencia de células viables no cultivables (VBNC) en tiempos cortos de exposición. La comprobación de la ausencia de VBNC para los tiempos utilizados la hemos realizado con el análisis de microscopía confocal de exploración laser.

Para salvar el desequilibrio en el diseño experimental "Actividad del ANTP sobre biofilms de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans* formadas en discos de titanio y PTFE" se realizó un ANOVA multifactorial con medias "corregidas" estimadas por mínimos cuadrados. Dicho análisis permitió evaluar el efecto individual y conjunto de los factores implicados ("disposición espacial de los discos", "tiempo", "material" (titanio, PTFE) y "microorganismo" (*S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans*) sobre la variable dependiente cuantitativa, la letalidad producida.

Aunque en el diseño experimental "Actividad del ANTP sobre las células planctónicas de *S. aureus P. aeruginosa* y *C. albicans*" existe un desequilibrio de los factores "bacteria" y "concentración" las medias para el factor "tiempo" son contundentes. Para el estudio del posible efecto de dichos factores se realizó un análisis de varianza multifactorial con medias corregidas considerando sólo los resultados de los ensayos de 60 minutos. Se constató que ninguno de los dos factores "bacteria" y "concentración" tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la letalidad.

5.7 Líneas futuras de investigación

Los resultados obtenidos en este trabajo sientan las bases para el desarrollo de nuevas líneas de investigación.

Una vez demostrada la actividad antimicrobiana de la APPC-NTP, sobre biofilms y su capacidad de activación de medios líquidos (PAM) se podría plantear el estudio de su capacidad potencial para su utilización como cámara de activación de soluciones o medios líquidos. Una posible aplicación sería su uso en cavidades sépticas amplias donde no es posible la utilización de otros medios de producción de plasma como los jets por su limitación de superficie de exposición. Existen artículos de revisión donde se plantea el uso de los líquidos activados por plasma en el campo de la cirugía ortopédica (202).

Además, se pueden diseñar estudios para dilucidar la naturaleza y los perfiles de concentración dependientes del tiempo de las especies reactivas generadas en medios activados por plasma (PAM), así como evaluar otros tipos de soluciones además de los medios de cultivo o el agua. Conociendo la susceptibilidad de los microorganismos al ANTP, parece interesante comprobarlo tratando las bacterias con soluciones activadas por plasma (203). Estas soluciones son prometedoras ya que se ha probado con éxito en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

También sería interesante realizar estudios de toxicidad sobre células eucariotas de las especies reactivas producidas en la cámara (N I, N III, O III, O IV, NO, C_2H_4O y C_2H_5CHO) ya que las especies C_2H_4O y C_2H_5CHO no están descritas en otros estudios.

Otra línea de investigación a desarrollar sería el realizar estudios *in vivo* en animales, diseñando cavidades sépticas donde inyectar las RONS generadas en la cámara del plasma y valorar su capacidad antimicrobiana.

Conclusiones

- 1. La letalidad producida sobre el biofilm de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans,* formado durante 48 horas, tras la exposición al plasma frío es más elevada en los discos de titanio que en los discos de PTFE.
- 2. La disposición espacial de los discos de titanio y PTFE, con biofilm de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans* de 48 horas formadas en su superficie, expuestos al plasma frío no influye en la letalidad.
- 3. En promedio, la letalidad producida sobre el biofilm tras la exposición al plasma frío es más elevada para *S. aureus* y más baja para *C. albicans*.
- 4. La letalidad producida sobre el biofilm de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans,* formado durante 48 horas sobre discos de titanio y PTFE, tras la exposición al plasma se incrementa al aumentar el tiempo de exposición siendo más elevada a los 60 y 90 minutos.
- 5. El efecto del "tiempo" sobre la letalidad producida sobre el biofilm de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans,* tras la exposición al plasma frío difiere según el material donde se desarrolla el biofilm. La letalidad con PTFE es muy baja en tiempos cortos, pero aumenta rápidamente hasta ser similar a la observada con titanio a los 60 minutos.
- 6. El efecto del "tiempo" sobre la letalidad producida sobre el biofilm de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans,* tras la exposición al plasma frío varía según el microorganismo. *C. albicans* es más resistente al ANTP, alcanzando la tasa máxima de letalidad a los 60 minutos.
- 7. En células planctónicas de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans* suspendidas en medio líquido son necesarios 90 minutos de exposición al plasma frío para que las RONS interaccionen con los microorganismos y produzcan letalidad.
- 8. La exposición del medio de cultivo BHI al plasma frío durante 90 minutos genera un medio de cultivo activado que impide el crecimiento de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans.*
- 9. La microscopía confocal de exploración láser permite confirmar de manera cualitativa la letalidad producida sobre el biofilm de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans* formado durante 48 horas sobre discos de cristal tras la exposición al plasma frío dentro de la cámara.

7 Bibliografía

(1) Guillermo Baeza Oliete. Contribución a la Generación de Plasma Frío Mediante Electrodos Tipo SMD y JET. Universitat Politècnica de València; 2017.

(2) Ariza J, Euba G, Murillo Ó. Infecciones relacionadas con las prótesis articulares. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2008; 26(6):380-390.

(3) Leyens C, Peters M. Titanium and titanium alloys: fundamentals and applications.: John Wiley & Sons; 2003.

(4) Fluoroproducts D. Teflon PTFE Fluoropolymer Resin: Properties Handbook.: DuPont Fluoroproducts; 1996.

(5) Baeza Oliete J, Mut Oltra T, Angulo Sánchez , Amaya Valero J, Baixauli García F, Fernández Sabaté E. Aproximación Actual a la Infección Protésica. Revista Española de Cirugía Osteoarticular 2015; 50 (261).

(6) Schutzer SF, Harris WH. Deep-wound infection after total hip replacement under contemporary aseptic conditions. J Bone Joint Surg Am 1988 Jun; 70(5): 724-727.

(7) Bozic KJ, Ries MD. The impact of infection after total hip arthroplasty on hospital and surgeon resource utilization. J Bone Joint Surg Am 2005 Aug; 87 (8): 1746-1751.

(8) Cherney DL, Amstutz HC. Total hip replacement in the previously septic hip. J Bone Joint Surg Am 1983 Dec; 65(9): 1256-1265.

(9) Cizmic Z, Feng JE, Huang R, Iorio R, Komnos G, Kunutsor SK, et al. Hip and Knee Section, Prevention, Host Related: Proceedings of International Consensus on Orthopedic Infections. J Arthroplasty 2019; 34 (2): S255-S270.

(10) Tsukayama DT, Estrada R, Gustilo RB. Infection after total hip arthroplasty. A study of the treatment of one hundred and six infections. J Bone Joint Surg Am 1996 Apr; 78 (4): 512-523.

(11) McPherson EJ, Woodson C, Holtom P, Roidis N, Shufelt C, Patzakis M. Periprosthetic total hip infection: outcomes using a staging system. Clin Orthop Relat Res 2002 Oct; (403): 8-15.

(12) Shohat N, Bauer T, Buttaro M, Budhiparama N, Cashman J, Della Valle CJ, et al. Hip and Knee Section, What is the Definition of a Periprosthetic Joint

Infection (PJI) of the Knee and the Hip? Can the Same Criteria be Used for Both Joints?: Proceedings of International Consensus on Orthopedic Infections. J Arthroplasty 2019 Feb; 34 (2, Supplement): S325-S327.

(13) Aboltins CA, Berdal JE, Casas F, Corona PS, Cuellar D, Ferrari MC, et al. Hip and Knee Section, Prevention, Antimicrobials (Systemic): Proceedings of International Consensus on Orthopedic Infections. The Journal of Arthroplasty 2019; 34 (2, Supplement): S279-S288.

(14) Abouljoud MM, Alvand A, Boscainos P, Chen AF, Garcia GA, Gehrke T, et al. Hip and Knee Section, Prevention, Operating Room Environment: Proceedings of International Consensus on Orthopedic Infections. The Journal of Arthroplasty 2019; 34 (2, Supplement): S293-S300.

(15) Aboltins CA, Antoci V, Bhattacharyya S, Cross M, Ducheyne P, Freiberg AA, et al. Hip and Knee Section, Prevention, Prosthesis Factors: Proceedings of International Consensus on Orthopedic Infections. The Journal of Arthroplasty 2019; 34 (2, Supplement): S309-S320.

(16) Argenson JN, Arndt M, Babis G, Battenberg A, Budhiparama N, Catani F, et al. Hip and Knee Section, Treatment, Debridement and Retention of Implant: Proceedings of International Consensus on Orthopedic Infections. The Journal of Arthroplasty 2019; 34 (2, Supplement): S399-S419.

(17) Bialecki J, Bucsi L, Fernando N, Foguet P, Guo S, Haddad F, et al. Hip and Knee Section, Treatment, One Stage Exchange: Proceedings of International Consensus on Orthopedic Infections. The Journal of Arthroplasty 2019; 34 (2, Supplement): S421-S426.

(18) Abdel MP, Barreira P, Battenberg A, Berry DJ, Blevins K, Font-Vizcarra L, et al. Hip and Knee Section, Treatment, Two-Stage Exchange Spacer-Related: Proceedings of International Consensus on Orthopedic Infections. The Journal of Arthroplasty 2019; 34 (2, Supplement): S427-S438.

(19) Aalirezaie A, Abolghasemian M, Busato T, Dennis D, Ghazavi M, Holst DC, et al. Hip and Knee Section, Treatment, Two-Stage Exchange: Proceedings of International Consensus on Orthopedic Infections. The Journal of Arthroplasty 2019; 34 (2, Supplement): S439-S443.

(20) Ghazavi M, Mortazavi J, Patzakis M, Sheehan E, Tan TL, Yazdi H. Hip and Knee Section, Treatment, Salvage: Proceedings of International Consensus on Orthopedic Infections. The Journal of Arthroplasty 2019; 34 (2, Supplement): S459-S462.

(21) Calabrò F, Coen M, Franceschini M, Franco-Cendejas R, Hewlett A, Segreti J, et al. Hip and Knee Section, Treatment, Antimicrobial Suppression: Proceedings of International Consensus on Orthopedic Infections. The Journal of Arthroplasty 2019; 34 (2, Supplement) :S 483-S485.

(22) Danese PN, Pratt LA, Kolter R. Exopolysaccharide Production Is Required for Development of *Escherichia coli* K-12 Biofilm Architecture. J Bacteriol 2000;182 (12): 3593-3596.

(23) Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. Science 1999 May 21; 284 (5418): 1318-1322.

(24) Hall-Stoodley L, Stoodley P, Kathju S, Hoiby N, Moser C, Costerton JW, et al. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. FEMS Immunol Med Microbiol 2012 July; 65 (2): 127-145.

(25) Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15(2): 167-193.

(26) Mah TC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol 2001; 9 (1): 34-39.

(27) Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. The lancet 2001; 358 (9276): 135-138.

(28) Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. Nature Reviews Drug Discovery 2003 Feb; 2 (2): 114-122.

(29) Sherrard LJ, Tunney MM, Elborn JS. Antimicrobial resistance in the respiratory microbiota of people with cystic fibrosis. Lancet 2014 August 23; 384 (9944): 703-713.

(30) Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2004 February; 2 (2): 123-140.

(31) Koo H, Allan RN, Howlin RP, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. Nature Reviews Microbiology 2017; 15 (12): 740-755.

(32) Flemming H, Wingender J. The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology 2010 Sep; 8 (9): 623-633.

(33) Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nat Rev Microbiol 2016 August 11; 14 (9): 563-575.

(34) Zogaj X, Nimtz M, Rohde M, Bokranz W, Romling U. The multicellular morphotypes of Salmonella typhimurium and Escherichia coli produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. Mol Microbiol 2001 March; 39 (6): 1452-1463.

(35) López D, Vlamakis H, Kolter R. Biofilms. Cold Spring Harbor perspectives in biology 2010 Jul; 2 (7): a000398.

(36) Orgad O, Oren Y, Walker SL, Herzberg M. The role of alginate in *Pseudomonas aeruginosa* EPS adherence, viscoelastic properties and cell attachment. Biofouling 2011; 27 (7): 787-798.

(37) Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. J Med Microbiol 2006 August;5 5 (Pt 8): 999-1008.

(38) Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. J Dent Res 2001 March; 80(3): 903-908.

(39) Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. J Antimicrob Chemother 2002 June; 49 (6): 973-980.

(40) Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat Rev Microbiol 2004 February; 2 (2): 95-108.

(41) Bjarnsholt T, Alhede M, Alhede M, Eickhardt-Sorensen SR, Moser C, Kuhl M, et al. The in vivo biofilm. Trends Microbiol 2013 September; 21 (9): 466-474.

(42) Peterson BW, He Y, Ren Y, Zerdoum A, Libera MR, Sharma PK, et al. Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges. FEMS Microbiol Rev 2015 Mar; 39(2): 234-245.

(43) Papenfort K, Bassler BL. Quorum sensing signal-response systems in Gramnegative bacteria. Nat Rev Microbiol 2016 August 11; 14 (9): 576-588. (44) Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. Trends Microbiol 2005 January;13 (1): 34-40.

(45) Olsen I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015 May; 34 (5): 877-886.

(46) Brauner A, Fridman O, Gefen O, Balaban NQ. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. Nat Rev Microbiol 2016 April;14 (5): 320-330.

(47) Maisonneuve E, Gerdes K. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. Cell 2014 April 24; 157 (3): 539-548.

(48) Daddi Oubekka S, Briandet R, Fontaine-Aupart M, Steenkeste K. Correlative time-resolved fluorescence microscopy to assess antibiotic diffusion-reaction in biofilms. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56 (6): 3349-3358.

(49) Billings N, Birjiniuk A, Samad TS, Doyle PS, Ribbeck K. Material properties of biofilms-a review of methods for understanding permeability and mechanics. Rep Prog Phys 2015 February; 78 (3): 1-17.

(50) Brown MR, Allison DG, Gilbert P. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? J Antimicrob Chemother 1988 December; 22 (6): 777-780.

(51) Amato SM, Fazen CH, Henry TC, Mok WWK, Orman MA, Sandvik EL, et al. The role of metabolism in bacterial persistence. Frontiers in microbiology 2014; 5:70.

(52) Ayrapetyan M, Williams T, Oliver JD. Relationship between the Viable but Nonculturable State and Antibiotic Persister Cells. J Bacteriol 2018; 200 (20): 249.

(53) Conlon BP, Rowe SE, Lewis K. Persister cells in biofilm associated infections. Adv Exp Med Biol 2015; 831: 1-9.

(54) Ayrapetyan M, Williams TC, Oliver JD. Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria. Trends Microbiol 2015 January; 23 (1): 7-13.

(55) Helaine S, Kugelberg E. Bacterial persisters: formation, eradication, and experimental systems. Trends Microbiol 2014 July; 22 (7): 417-424.

(56) Ayrapetyan M, Williams TC, Oliver JD. Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria. Trends in Microbiology 2015; 23 (1): 7-13.

(57) Kim J, Chowdhury N, Wood TK. Viable But Non-Culturable Cells and persistence describe the same bacterial stress state. Environ Microbiology 2018; 20 (6):2038-2048

(58) Romano CL, Scarponi S, Gallazzi E, Romano D, Drago L. Antibacterial coating of implants in orthopaedics and trauma: a classification proposal in an evolving panorama. J Orthop Surg Res 2015 October 1; 10:157-5.

(59) Swartjes JJ, Sharma PK, van Kooten TG, van der Mei, H. C., Mahmoudi M, Busscher HJ, et al. Current Developments in Antimicrobial Surface Coatings for Biomedical Applications. Curr Med Chem 2015; 22 (18): 2116-2129.

(60) Damodaran VB, Murthy NS. Bio-inspired strategies for designing antifouling biomaterials. Biomater Res 2016 June 20; 20:18-4. eCollection 2016.

(61) Speziale P, Visai L, Rindi S, Pietrocola G, Provenza G, Provenzano M. Prevention and treatment of Staphylococcus biofilms. Curr Med Chem 2008;15 (30): 3185-3195.

(62) Del Curto B, Brunella MF, Giordano C, Pedeferri MP, Valtulina V, Visai L, et al. Decreased bacterial adhesion to surface-treated titanium. Int J Artif Organs 2005 July; 28 (7): 718-730.

(63) Clement JL, Jarrett PS. Antibacterial silver. Met Based Drugs 1994; 1 (5-6): 467-482.

(64) Brennan SA, Ni Fhoghlu C, Devitt BM, O'Mahony FJ, Brabazon D, Walsh A. Silver nanoparticles and their orthopaedic applications. Bone Joint J 2015 May; 97-B (5): 582-589.

(65) Qin H, Cao H, Zhao Y, Zhu C, Cheng T, Wang Q, et al. In vitro and in vivo anti-biofilm effects of silver nanoparticles immobilized on titanium. Biomaterials 2014; 35 (33): 9114-9125.

(66) Secinti KD, Ozalp H, Attar A, Sargon MF. Nanoparticle silver ion coatings inhibit biofilm formation on titanium implants. J Clin Neurosci 2011 March;18 (3): 391-395.

(67) Rabih O. Darouiche. Anti-Infective Efficacy of Silver-Coated Medical Prostheses. Clinical Infectious Diseases 1999 Dec 1;29 (6):1 371-1377.

(68) Slane J, Vivanco J, Rose W, Ploeg HL, Squire M. Mechanical, material, and antimicrobial properties of acrylic bone cement impregnated with silver nanoparticles. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2015 March; 48: 188-196.

(69) Aurore V, Caldana F, Blanchard M, Kharoubi Hess S, Lannes N, Mantel PY, et al. Silver-nanoparticles increase bactericidal activity and radical oxygen responses against bacterial pathogens in human osteoclasts. Nanomedicine 2018 February;14 (2): 601-607.

(70) Kalishwaralal K, BarathManiKanth S, Pandian SR, Deepak V, Gurunathan S. Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. Colloids Surf B Biointerfaces 2010 September 1; 79 (2): 340-344.

(71) Ashbaugh AG, Jiang X, Zheng J, Tsai AS, Kim WS, Thompson JM, et al. Polymeric nanofiber coating with tunable combinatorial antibiotic delivery prevents biofilm-associated infection in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 2016 November 8; 113 (45): E6919-E6928.

(72) Min J, Choi KY, Dreaden EC, Padera RF, Braatz RD, Spector M, et al. Designer Dual Therapy Nanolayered Implant Coatings Eradicate Biofilms and Accelerate Bone Tissue Repair. ACS Nano 2016 April 26; 10 (4): 4441-4450.

(73) Junter GA, Thebault P, Lebrun L. Polysaccharide-based antibiofilm surfaces. Acta Biomater 2016 January; 30: 13-25.

(74) Palumbo FS, Bavuso Volpe A, Cusimano MG, Pitarresi G, Giammona G, Schillaci D. A polycarboxylic/amino functionalized hyaluronic acid derivative for the production of pH sensible hydrogels in the prevention of bacterial adhesion on biomedical surfaces. Int J Pharm 2015 January 15; 478 (1): 70-77.

(75) Schmelcher M, Shen Y, Nelson DC, Eugster MR, Eichenseher F, Hanke DC, et al. Evolutionarily distinct bacteriophage endolysins featuring conserved peptidoglycan cleavage sites protect mice from MRSA infection. J Antimicrob Chemother 2015 May; 70 (5): 1453-1465.

(76) Peng X, Zhang Y, Bai G, Zhou X, Wu H. Cyclic di-AMP mediates biofilm formation. Mol Microbiol 2016 March; 99 (5): 945-959.

(77) Fernicola S, Paiardini A, Giardina G, Rampioni G, Leoni L, Cutruzzolà F, et al. *In Silico* Discovery and *In Vitro* Validation of Catechol-Containing Sulfonohydrazide Compounds as Potent Inhibitors of the Diguanylate Cyclase PleD. J Bacteriol 2016; 198 (1): 147.

(78) Totsika M, Kostakioti M, Hannan TJ, Upton M, Beatson SA, Janetka JW, et al. A FimH inhibitor prevents acute bladder infection and treats chronic cystitis caused by multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* ST131. J Infect Dis 2013 September; 208 (6): 921-928.

(79) Baker P, Hill PJ, Snarr BD, Alnabelseya N, Pestrak MJ, Lee MJ, et al. Exopolysaccharide biosynthetic glycoside hydrolases can be utilized to disrupt and prevent *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Sci Adv 2016 May 20; 2 (5): e1501632.

(80) Okshevsky M, Regina VR, Meyer RL. Extracellular DNA as a target for biofilm control. Curr Opin Biotechnol 2015 June; 33: 73-80.

(81) Manzenreiter R, Kienberger F, Marcos V, Schilcher K, Krautgartner WD, Obermayer A, et al. Ultrastructural characterization of cystic fibrosis sputum using atomic force and scanning electron microscopy. Journal of Cystic Fibrosis 2011; 11 (2): 84-92.

(82) DiGiandomenico A, Warrener P, Hamilton M, Guillard S, Ravn P, Minter R, et al. Identification of broadly protective human antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharide Psl by phenotypic screening. J Exp Med 2012 July 2; 209 (7): 1273-1287.

(83) Flores-Mireles, Pinkner, Caparon, Hultgren. EbpA vaccine antibodies block binding of *Enterococcus faecalis* to fibrinogen to prevent catheter-associated bladder infection in mice. Science translational medicine 2014;6(254) 254ra 127.

(84) Brady RA, O'May GA, Leid JG, Prior ML, Costerton JW, Shirtliff ME. Resolution of *Staphylococcus aureus* biofilm infection using vaccination and antibiotic treatment. Infect Immun 2011 April; 79 (4): 1797-1803.

(85) Novotny LA, Jurcisek JA, Goodman SD, Bakaletz LO. Monoclonal antibodies against DNA-binding tips of DNABII proteins disrupt biofilms in vitro and induce bacterial clearance in vivo. EBioMedicine 2016; 10: 33-44.

(86) Estelles A, Woischnig AK, Liu K, Stephenson R, Lomongsod E, Nguyen D, et al. A High-Affinity Native Human Antibody Disrupts Biofilm from *Staphylococcus aureus* Bacteria and Potentiates Antibiotic Efficacy in a Mouse

Implant Infection Model. Antimicrob Agents Chemother 2016 March 25; 60(4): 2292-2301.

(87) Barraud N, Schleheck D, Klebensberger J, Webb JS, Hassett DJ, Rice SA, et al. Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. J Bacteriol 2009 December; 191 (23): 7333-7342.

(88) Barraud N, Kelso MJ, Rice SA, Kjelleberg S. Nitric oxide: a key mediator of biofilm dispersal with applications in infectious diseases. Curr Pharm Des 2015; 21 (1): 31-42.

(89) Howlin RP, Cathie K, Hall-Stoodley L, Cornelius V, Duignan C, Allan RN, et al. Low-Dose Nitric Oxide as Targeted Anti-biofilm Adjunctive Therapy to Treat Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in Cystic Fibrosis. Mol Ther 2017 September 6; 25 (9): 2104-2116.

(90) Barraud N, Kardak BG, Yepuri NR, Howlin RP, Webb JS, Faust SN, et al. Cephalosporin-3'-diazeniumdiolates: targeted NO-donor prodrugs for dispersing bacterial biofilms. Angew Chem Int Ed Engl 2012 September 3; 51 (36): 9057-9060.

(91) Whiteley M, Diggle SP, Greenberg EP. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. Nature 2017; 551 (7680): 313-320.

(92) Swift S, Allan Downie J, Whitehead NA, Barnard AML, Salmond GPC, Williams P. Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. Advances in Microbial Physiology 2001; 45: 199-270.

(93) Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. Annu Rev Microbiol 2001; 55: 165-199.

(94) Lauderdale KJ, Malone CL, Boles BR, Morcuende J, Horswill AR. Biofilm dispersal of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on orthopedic implant material. J Orthop Res 2010 January; 28 (1): 55-61.

(95) Simonetti O, Cirioni O, Ghiselli R, Goteri G, Scalise A, Orlando F, et al. RNAIII-inhibiting peptide enhances healing of wounds infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52 (6): 2205-2211.

(96) Starkey M, Lepine F, Maura D, Bandyopadhaya A, Lesic B, He J, et al. Identification of anti-virulence compounds that disrupt quorum-sensing regulated

acute and persistent pathogenicity. PLoS Pathog 2014 August 21; 10 (8): e1004321.

(97) Brackman G, Cos P, Maes L, Nelis HJ, Coenye T. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo. Antimicrob Agents Chemother 2011 June; 55(6): 2655-2661.

(98) Hentzer M, Riedel K, Rasmussen TB, Heydorn A, Andersen JB, Parsek MR, et al. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. Microbiology 2002; 148 (1): 87-102.

(99) Peterson BW, He Y, Ren Y, Zerdoum A, Libera MR, Sharma PK, et al. Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges. FEMS Microbiol Rev 2015 Mar; 39 (2): 234-245.

(100) Miquel S, Lagrafeuille R, Souweine B, Forestier C. Anti-biofilm Activity as a Health Issue. Front Microbiol 2016 Apr 26; 7: 592.

(101) Nodzo SR, Tobias M, Ahn R, Hansen L, Luke-Marshall NR, Howard C, et al. Cathodic Voltage-controlled Electrical Stimulation Plus Prolonged Vancomycin Reduce Bacterial Burden of a Titanium Implant-associated Infection in a Rodent Model. Clin Orthop Relat Res 2016 Jul; 474 (7): 1668-1675.

(102) Boyd TJM, Sanderson JJ. The Physics of Plasmas. Cambridge: Cambridge University Press; 2003.

(103) Fridman A. Plasma Chemistry. Cambridge: Cambridge University Press; 2008.

(104) Vijay Nehra, Ashok Kumar, H K Dwivedi. Atmospheric Non-Thermal Plasma Sources. Int J Eng 2008; 2 (1): 53-68.

(105) Scholtz V, Pazlarova J, Souskova H, Khun J, Julak J. Nonthermal plasma-A tool for decontamination and disinfection. Biotechnol Adv 2015 November 1; 33 (6 Pt 2): 1108-1119.

(106) Tendero C, Tixier C, Tristant P, Desmaison J, Leprince P. Atmospheric pressure plasmas: A review. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy 2006; 61 (1): 2-30.

(107) Paschen F. Ueber die zum Funkenübergang in Luft, Wasserstoff und Kohlensäure bei verschiedenen Drucken erforderliche Potentialdifferenz. Ann Phys 1889; 273 (5): 69-96.

(108) Lu P, Cullen PJ, Ostrikov K. Chapter 4 - Atmospheric Pressure Nonthermal Plasma Sources. Cold Plasma in Food and Agriculture 2016: 83-116.

(109) Chu PK. Low temperature plasma technology: methods and applications: CRC Press, London; 2014.

(110) H. Akiyama, T. Sakugawa, T. Namihira, K. Takaki, Y. Minamitani, N. Shimomura. Industrial Applications of Pulsed Power Technology. IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation 2007; 14 (5): 1051-1064.

(111) W. Jiang, H. Sugiyama, A. Tokuchi. Pulsed Power Generation by Solid-State LTD. IEEE Transactions on Plasma Science 2014; 42 (11): 3603-3608.

(112) Tao S, Kaihua L, Cheng Z, Ping Y, Shichang Z, Ruzheng P. Experimental study on repetitive unipolar nanosecond-pulse dielectric barrier discharge in air at atmospheric pressure. J Phys D 2008; 41 (21): 215203.

(113) Walsh JL, Kong MG. 10ns pulsed atmospheric air plasma for uniform treatment of polymeric surfaces. Appl Phys Lett 2007; 91 (25): 251504.

(114) U. Kogelschatz. Filamentary, patterned, and diffuse barrier discharges. IEEE Transactions on Plasma Science 2002; 30 (4): 1400-1408.

(115) Roth JR. Industrial plasma engineering: Volume 2: Applications to nonthermal plasma processing. CRC press; 2001.

(116) A. Schutze, J. Y. Jeong, S. E. Babayan, Jaeyoung Park, G. S. Selwyn, R. F. Hicks. The atmospheric-pressure plasma jet: a review and comparison to other plasma sources. IEEE Transactions on Plasma Science 1998; 26 (6): 1685-1694.

(117) Jeong JY, Babayan SE, Tu VJ, Park J, Henins I, Hicks RF, et al. Etching materials with an atmospheric-pressure plasma jet. Plasma Sources Sci Technol 1998;7 (3): 282-285.

(118) Winter J, Brandenburg R, Weltmann K-. Atmospheric pressure plasma jets: an overview of devices and new directions. Plasma Sources Science Technology 2015; 24: 064001.

(119) Lu X, Laroussi M, Puech V. On atmospheric-pressure non-equilibrium plasma jets and plasma bullets. Plasma Sources Sci Technol 2012; 21 (3): 034005.

(120) Fridman G, Friedman G, Gutsol A, Shekhter AB, Vasilets VN, Fridman A. Applied plasma medicine. Plasma Processes and Polymers 2008; 5 (6): 503-533.

(121) Kong MG, Kroesen G, Morfill G, Nosenko T, Shimizu T, Van Dijk J, et al. Plasma medicine: an introductory review. new Journal of Physics 2009; 11 (11): 115012.

(122) Morfill GE, Kong MG, Zimmermann JL. Focus on plasma medicine. New Journal of Physics 2009; 11 (11): 115011.

(123) Hulburt EO. Atmospheric Ionization by Cosmic Radiation. Phys Rev 1931; 37 (1): 1-8.

(124) Golde MF. Reactions of N2(A3 Σ). Int J Chem Kinet 1988; 20(1): 75-92.

(125) Schröter S, Wijaikhum A, Gibson AR, West A, Davies HL, Minesi N, et al. Chemical kinetics in an atmospheric pressure helium plasma containing humidity. Physical chemistry chemical physics. PCCP 2018; 20 (37): 24263-24286.

(126) Graves DB. The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. J Phys D 2012; 45 (26): 263001.

(127) Fridman G, Brooks AD, Balasubramanian M, Fridman A, Gutsol A, Vasilets VN, et al. Comparison of Direct and Indirect Effects of Non-Thermal Atmospheric-Pressure Plasma on Bacteria. Plasma Processes Polym 2007; 4 (4): 370-375.

(128) Laroussi M, Leipold F. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. International Journal of Mass Spectrometry 2004; 233 (1): 81-86.

(129) Lu X, Ye T, Cao Y, Sun Z, Xiong Q, Tang Z, et al. The roles of the various plasma agents in the inactivation of bacteria. J Appl Phys 2008; 104 (5): 053309.

(130) Han L, Patil S, Boehm D, Milosavljević V, Cullen PJ, Bourke P. Mechanisms of Inactivation by High-Voltage Atmospheric Cold Plasma Differ

for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Appl Environ Microbiol 2015; 82 (2): 450-458.

(131) Freebairn D, Linton D, Harkin-Jones E, Jones DS, Gilmore BF, Gorman SP. Electrical methods of controlling bacterial adhesion and biofilm on device surfaces. Expert Review of Medical Devices 2013; 10 (1): 85-103.

(132) Joshi RP, Schoenbach KH. Bioelectric effects of intense ultrashort pulses. Critical Reviews[™] in Biomedical Engineering 2010; 38 (3).

(133) Stoodley P, deBeer D, Lappin-Scott H. Influence of electric fields and pH on biofilm structure as related to the bioelectric effect. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41 (9): 1876.

(134) D. A. Mendis, M. Rosenberg, F. Azam. A note on the possible electrostatic disruption of bacteria. IEEE Transactions on Plasma Science 2000; 28 (4): 1304-1306.

(135) Laroussi M, Mendis DA, Rosenberg M. Plasma interaction with microbes. New Journal of Physics 2003; 5: 41.

(136) Sysolyatina E, Mukhachev A, Yurova M, Grushin M, Karalnik V, Petryakov A, et al. Role of the Charged Particles in Bacteria Inactivation by Plasma of a Positive and Negative Corona in Ambient Air. Plasma Process Polym 2014; 11 (4): 315-334.

(137) Weltmann K, von Woedtke T. Plasma medicine—current state of research and medical application. Plasma Phys Controlled Fusion 2016; 59 (1): 014031.

(138) Kaushik NK, Ghimire B, Li Y, Adhikari M, Veerana M, Kaushik N, et al. Biological and medical applications of plasma-activated media, water and solutions. Biol Chem 2018 December 19; 400 (1): 39-62.

(139) Verlackt CCW, Van Boxem W, Bogaerts A. Transport and accumulation of plasma generated species in aqueous solution. Phys Chem Chem Phys 2018; 20 (10): 6845-6859.

(140) Kaushik NK, Ghimire B, Li Y, Adhikari M, Veerana M, Kaushik N, et al. Biological and medical applications of plasma-activated media, water and solutions. Biol Chem 2018 December 19; 400 (1): 39-62.

(141) Dobrynin D, Fridman G, Friedman G, Fridman A. Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. New Journal of Physics 2009; 11 (11): 115020.

(142) Vatansever F, de Melo WCMA, Avci P, Vecchio D, Sadasivam M, Gupta A, et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species – bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. FEMS Microbiology Reviews 2013 Nov 1; 37 (6): 955-989.

(143) Abramzon N, Joaquin JC, Bray J, Brelles-Mariño G. Biofilm destruction by RF high-pressure cold plasma jet. IEEE Trans Plasma Sci 2006; 34 (4): 1304-1309.

(144) Cooper M, Fridman G, Fridman A, Joshi SG. Biological responses of Bacillus stratosphericus to Floating Electrode-Dielectric Barrier Discharge Plasma Treatment. J Appl Microbiol 2010; 109 (6): 2039-2048.

(145) Brelles Mariño G. Induction of a viable-but-non-culturable state in bacteria treated with gas discharge plasma. J Appl Microbiol 2012; 112.

(146) Joshi SG, Cooper M, Yost A, Paff M, Ercan UK, Fridman G, et al. Nonthermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative DNA damage and membrane lipid peroxidation in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 2011 March; 55(3): 1053-1062.

(147) Alkawareek MY, Algwari QT, Laverty G, Gorman SP, Graham WG, O'Connell D, et al. Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms by Atmospheric Pressure Non-Thermal Plasma. PLOS ONE 2012; 7(8): e44289.

(148) M. J. Gallagher, N. Vaze, S. Gangoli, V. N. Vasilets, A. F. Gutsol, T. N. Milovanova, et al. Rapid Inactivation of Airborne Bacteria Using Atmospheric Pressure Dielectric Barrier Grating Discharge. IEEE Transactions on Plasma Science 2007; 35 (5): 1501-1510.

(149) Boxhammer V, Morfill GE, Jokipii JR, Shimizu T, Klämpfl T, Li Y, et al. Bactericidal action of cold atmospheric plasma in solution. New Journal of Physics 2012; 14 (11): 113042.

(150) Sureshkumar A, Sankar R, Mandal M, Neogi S. Effective bacterial inactivation using low temperature radio frequency plasma. Int J Pharm 2010 August 30; 396 (1-2): 17-22.

(151) Moreau M, Orange N, Feuilloley MGJ. Non-thermal plasma technologies: New tools for bio-decontamination. Biotechnology Advances 2008; 26 (6): 610-617.

(152) E. Stoffels, Y. Sakiyama, D. B. Graves. Cold Atmospheric Plasma: Charged Species and Their Interactions With Cells and Tissues. IEEE Transactions on Plasma Science 2008; 36 (4): 1441-1457.

(153) Ermolaeva SA, Varfolomeev AF, Chernukha MY, Yurov DS, Vasiliev MM, Kaminskaya AA, et al. Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds. J Med Microbiol 2011 January; 60 (Pt 1): 75-83.

(154) Xiong Z, Du T, Lu X, Cao Y, Pan Y. How deep can plasma penetrate into a biofilm? Appl Phys Lett 2011; 98 (22): 221503.

(155) Pei X, Lu X, Liu J, Liu D, Yang Y, Ostrikov K, et al. Inactivation of a 25.5 μ mEnterococcus faecalisbiofilm by a room-temperature, battery-operated, handheld air plasma jet. J Phys D 2012; 45 (16): 165205.

(156) Duan J, Lu X, He G. On the penetration depth of reactive oxygen and nitrogen species generated by a plasma jet through real biological tissue. Phys Plasmas 2017; 24 (7): 073506.

(157) Coenye T, Goeres D, Van Bambeke F, Bjarnsholt T. Should standardized susceptibility testing for microbial biofilms be introduced in clinical practice? Clin Microbiol Infect 2018 June; 24 (6): 570-572.

(158) Lourenço A, Coenye T, Goeres DM, Donelli G, Azevedo AS, Ceri H, et al. Minimum information about a biofilm experiment (MIABiE): standards for reporting experiments and data on sessile microbial communities living at interfaces. Pathogens and disease 2014; 70 (3): 250-256.

(159) Gilmore BF, Flynn PB, O'Brien S, Hickok N, Freeman T, Bourke P. Cold Plasmas for Biofilm Control: Opportunities and Challenges. Trends Biotechnol 2018 June; 36 (6): 627-638.

(160) Kolpen M, Hansen CR, Bjarnsholt T, Moser C, Christensen LD, van Gennip M, et al. Polymorphonuclear leucocytes consume oxygen in sputum from chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in cystic fibrosis. Thorax 2010; 65 (1): 57.

(161) Kolpen M, Kühl M, Bjarnsholt T, Moser C, Hansen CR, Liengaard L, et al. Nitrous oxide production in sputum from cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. PloS one 2014; 9(1): e84353.

(162) Sønderholm M, Bjarnsholt T, Alhede M, Kolpen M, Jensen ØP, Kühl M, et al. The Consequences of Being in an Infectious Biofilm: Microenvironmental Conditions Governing Antibiotic Tolerance. International Journal of Molecular Sciences 2017; 18 (12).

(163) Alshraiedeh NH, Higginbotham S, Flynn PB, Alkawareek MY, Tunney MM, Gorman SP, et al. Eradication and phenotypic tolerance of *Burkholderia cenocepacia* biofilms exposed to atmospheric pressure non-thermal plasma. International Journal of Antimicrobial Agents 2016; 47 (6): 446-450.

(164) Chan C, Burrows LL, Deber CM. Alginate as an auxiliary bacterial membrane: binding of membrane-active peptides by polysaccharides*. The Journal of Peptide Research 2005; 65 (3): 343-351.

(165) Tseng BS, Zhang W, Harrison JJ, Quach TP, Song JL, Penterman J, et al. The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. Environ Microbiol 2013 October; 15 (10): 2865-2878.

(166) Doroshenko N, Tseng BS, Howlin RP, Deacon J, Wharton JA, Thurner PJ, et al. Extracellular DNA Impedes the Transport of Vancomycin in *Staphylococcus epidermidis* Biofilms Preexposed to Subinhibitory Concentrations of Vancomycin. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58 (12): 7273.

(167) Alkawareek MY, Alshraiedeh NH, Higginbotham S, Flynn PB, Algwari QT, Gorman SP, et al. Plasmid DNA Damage Following Exposure to Atmospheric Pressure Nonthermal Plasma: Kinetics and Influence of Oxygen Admixture. Plasma Medicine 2014; 4 (1-4): 211-219.

(168) Yost AD, Joshi SG. Atmospheric Nonthermal Plasma-Treated PBS Inactivates *Escherichia coli* by Oxidative DNA Damage. PLOS ONE 2015;10 (10): e0139903.

(169) Stewart PS, Roe F, Rayner J, Elkins JG, Lewandowski Z, Ochsner UA, et al. Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Appl Environ Microbiol 2000; 66 (2): 836-838.

(170) Flynn PB, Higginbotham S, Alshraiedeh NH, Gorman SP, Graham WG, Gilmore BF. Bactericidal efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma (APNTP) against the ESKAPE pathogens. International Journal of Antimicrobial Agents 2015; 46(1): 101-107.

(171) Mai-Prochnow A, Bradbury M, Ostrikov K, Murphy AB. Pseudomonas aeruginosa Biofilm Response and Resistance to Cold Atmospheric Pressure Plasma Is Linked to the Redox-Active Molecule Phenazine. PLOS ONE 2015; 10 (6): e0130373.

(172) Zimmermann JL, Shimizu T, Schmidt H, Li Y, Morfill GE, Isbary G. Test for bacterial resistance build-up against plasma treatment. New Journal of Physics 2012; 14 (7): 073037.

(173) Alkawareek MY, Gorman SP, Graham WG, Gilmore BF. Potential cellular targets and antibacterial efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma. International Journal of Antimicrobial Agents 2014; 43 (2): 154-160.

(174) Lunov O, Zablotskii V, Churpita O, Lunova M, Jirsa M, Dejneka A, et al. Chemically different non-thermal plasmas target distinct cell death pathways. Scientific Reports 2017; 7 (1): 600.

(175) Barraud N, Storey MV, Moore ZP, Webb JS, Rice SA, Kjelleberg S. Nitric oxide-mediated dispersal in single- and multi-species biofilms of clinically and industrially relevant microorganisms. Microbial Biotechnology 2009; 2 (3): 370-378.

(176) Schlag S, Nerz C, Birkenstock TA, Altenberend F, Götz F. Inhibition of *Staphylococcal* Biofilm Formation by Nitrite. J Bacteriol 2007; 189 (21): 7911.

(177) Douat C, Hübner S, Engeln R, Benedikt J. Production of nitric/nitrous oxide by an atmospheric pressure plasma jet. Plasma Sources Sci Technol 2016; 25 (2): 025027.

(178) Hao X, Mattson AM, Edelblute CM, Malik MA, Heller LC, Kolb JF. Nitric Oxide Generation with an Air Operated Non-Thermal Plasma Jet and Associated Microbial Inactivation Mechanisms. Plasma Process Polym 2014; 11 (11): 1044-1056.

(179) Lobysheva II, Stupakova MV, Mikoyan VD, Vasilieva SV, Vanin AF. Induction of the SOS DNA repair response in *Escherichia coli* by nitric oxide donating agents: dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands and S-nitrosothiols. FEBS Letters 1999; 454 (3): 177-180.

(180) Hassett DJ, Ma JF, Elkins JG, McDermott TR, Ochsner UA, West SE, et al. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. Mol Microbiol 1999 December; 34 (5): 1082-1093.

(181) Ziuzina D, Boehm D, Patil S, Cullen PJ, Bourke P. Cold Plasma Inactivation of Bacterial Biofilms and Reduction of Quorum Sensing Regulated Virulence Factors. PLOS ONE 2015; 10 (9): e0138209.

(182) Klämpfl TG, Isbary G, Shimizu T, Li Y, Zimmermann JL, Stolz W, et al. Cold Atmospheric Air Plasma Sterilization against Spores and Other Microorganisms of Clinical Interest. Appl Environ Microbiol 2012; 78 (15): 5077.

(183) Morfill GE, Shimizu T, Steffes B, Schmidt H. Nosocomial infections—a new approach towards preventive medicine using plasmas. New Journal of Physics 2009; 11 (11): 115019.

(184) Tobias Gabriel Klämpfl. Cold atmospheric plasma decontamination against nosocomial bacteria. Technische Universität München; 2014.

(185) Shimizu S, Barczyk S, Rettberg P, Shimizu T, Klämpfl T, Zimmermann J, et al. Cold Atmospheric Plasma – a New Technology for Spacecraft Component Decontamination. Planet Space Sci 2013; 90.

(186) Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. J Bacteriol 2001; 183 (9): 2888-2896.

(187) Fernández-Rivero ME, del Pozo JL, Valentín A, Fornes V, Molina de Diego A, Pemán J, et al. Actividad de la anfotericina B y la anidulafungina, solas y combinadas, frente a biopelículas de *Candida tropicalis* formadas sobre Teflon® y titanio. Revista Iberoamericana de Micología 2017; 34 (3): 175-179.

(188) Fernández-Rivero ME, Del Pozo JL, Ramírez P, Valentín E, Ruiz-Gaitán A, Pemán J, et al. Time-kill assays of amphotericin B plus anidulafungin against *Candida tropicalis* biofilms formed on two different biomaterials. Int J Artif Organs 2018; 41 (1): 23-27.

(189) Marcelo Ernesto Fernández-Rivero. Estudio de la formación de la biopelícula de Candida spp. y evaluación de nuevas combinaciones farmacológicas. Universidad de Navarra; 2017.
(190) Lu P, Boehm D, Bourke P, Cullen PJ. Achieving reactive species specificity within plasma-activated water through selective generation using air spark and glow discharges. Plasma Process Polym 2017; 14 (8): 1600207.

(191) Naïtali M, Kamgang-Youbi G, Herry J, Bellon-Fontaine M, Brisset J. Combined Effects of Long-Living Chemical Species during Microbial Inactivation Using Atmospheric Plasma-Treated Water. Appl Environ Microbiol 2010; 76 (22): 7662.

(192) Shen J, Tian Y, Li Y, Ma R, Zhang Q, Zhang J, et al. Bactericidal Effects against *S. aureus* and Physicochemical Properties of Plasma Activated Water stored at different temperatures. Scientific reports 2016; 6: 28505.

(193) Puligundla P, Mok C. Potential applications of nonthermal plasmas against biofilm-associated micro-organisms in vitro. Journal of Applied Microbiology 2017 May; 122 (5): 1134-1148.

(194) Hee Lee M, Joo Park B, Chang Jin S, Kim D, Han I, Kim J, et al. Removal and sterilization of biofilms and planktonic bacteria by microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. New Journal of Physics 2009; 11 (11): 115022.

(195) Becker K, Koutsospyros A, Yin S, Christodoulatos C, Abramzon N, Joaquin J, et al. Environmental and biological applications of microplasmas. Plasma Phys Controlled Fusion 2005; 47: B513.

(196) Joaquin JC, Kwan C, Abramzon N, Vandervoort K, Brelles-Marino G. Is gas-discharge plasma a new solution to the old problem of biofilm inactivation? Microbiology 2009 March; 155 (Pt 3): 724-732.

(197) A. J. Zelaya, G. Stough, N. Rad, K. Vandervoort, G. Brelles-Mariño. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Inactivation: Decreased Cell Culturability, Adhesiveness to Surfaces, and Biofilm Thickness Upon High-Pressure Nonthermal Plasma Treatment. IEEE Transactions on Plasma Science 2010; 38 (12): 3398-3403.

(198) Vandervoort KG, Brelles-Mariño G. Plasma-Mediated Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Grown on Borosilicate Surfaces under Continuous Culture System. PLOS ONE 2014; 9 (10): e108512.

(199) Xu Z, Shen J, Zhang Z, Ma J, Ronghua M, Zhao Y, et al. Inactivation Effects of Non-Thermal Atmospheric-Pressure Helium Plasma Jet on *Staphylococcus aureus* Biofilms: Inactivation Effects of He APPJ on *S. aureus Biofilms*. Plasma Processes and Polymers 2015; 12.

(200) Cotter JJ, Maguire P, Soberon F, Daniels S, O'Gara JP, Casey E. Disinfection of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms using a remote non-thermal gas plasma. Journal of Hospital Infection 2011; 78(3): 204-207.

(201) Golkowski M, Golkowski C, Leszczynski J, Plimpton SR, Maslowski P, Foltynowicz A, et al. Hydrogen-peroxide-enhanced nonthermal plasma effluent for biomedical applications. IEEE Trans Plasma Sci 2012;40(8):1984-1991.

(202) Nguyen L, Lu P, Boehm D, Bourke P, Gilmore BF, Hickok NJ, et al. Cold atmospheric plasma is a viable solution for treating orthopedic infection: a review. Biol Chem 2018 December 19; 400 (1): 77-86.

(203) Traylor MJ, Pavlovich MJ, Karim S, Hait P, Sakiyama Y, Clark DS, et al. Long-term antibacterial efficacy of air plasma-activated water. J Phys D 2011; 44 (47): 472001.

8 Anexo

1 Formación de especies reactivas del radical hidroxilo OH⁻ y monóxido de nitrógeno NO⁻

Radical hidroxilo (OH ⁻)	Monóxido de nitrógeno (NO ⁻)
$H_2O + e^- \rightarrow H + OH + e^-$	
$H_2O^+ + e^- \rightarrow H + OH^-$	$N + 0 \rightarrow NO^{-1}$
$\mathrm{H_2O} + \mathrm{M^*} \rightarrow \mathrm{OH^{\cdot}} + \mathrm{H} + \mathrm{M}$	$N + OH \rightarrow NO + H$
$e^- + O_2 \rightarrow e^- + O(^{3}P) + O(^{1}D)$	$N + O_2 \rightarrow NO^{-} + O$
$0(^{1}D) + H_{2}O \rightarrow 2 OH^{-1}$	$N_2(A^{3\Sigma^3_{\mu}}) + NO_2 \rightarrow NO + O + N_2$
$N_2 + e^- \rightarrow N_2 (A^3 \sum_{\mu}^3) + e^-$	$N + 0 + M \rightarrow N0^{\circ} + M$ $N + 0_2 \rightarrow N0^{\circ} + 0$
$N_2(A^3 \sum_{\mu}^3) + H_2 0 \rightarrow 0H^2 + N_2 + H$	$N + 0_3 \rightarrow N0^{\circ} + 0_2$ $N + 0^* \rightarrow N0^{\circ} + 0$
$NO + H_2O \rightarrow OH + NO_2$	$N + O_2$ (1S) $\rightarrow NO + O$
$O_2 + H \rightarrow OH^- + O$	$N^* + 0 \rightarrow NO^\circ + 0$
$UV + H_2O \rightarrow H_2O^*$	$N^* + O \rightarrow NO^* + N$
$UV + H_2O^* \rightarrow H^+ + OH^-$	$N_2^* + 0 \rightarrow N0^\circ + 0$
$OH^- \rightarrow OH^- + e^-$	$n_2 + \sigma_3 + n_0 + \sigma_2$
Oxígeno atómico (O)	Oxígeno singlete molecular $(0_2({}^1S))$
$e^- + 0_2 \rightarrow 20 + e^-$	
$O_2 + M^* \rightarrow 20 + M$	$e^- + O_2 \rightarrow O_2(^1S)$
$O_2 + H \rightarrow OH^2 + O$	$0 + 0 \rightarrow O_2(^1S)$
$O_2 + N_2(A, B, C) \rightarrow 20 + N_2(x)$	
Nitrógeno excitado (N [*])	Superóxido (0 ⁻ ₂)
$e^- + N_2 \rightarrow N_2^* + e^-$	$e^- + O_2 \rightarrow O_2^-$
$e^- + N_2 \rightarrow N + N$	$0\mathrm{H}^{\cdot} + \mathrm{HO}_2 \rightarrow 0^{-}_2 + \mathrm{H}_2 \mathrm{O}$
$O_2^{-} + N_2 \rightarrow O_2 + N + N$	$ONOO^{-} \rightarrow NO^{-} + O_2^{-}$
Dióxido de nitrógeno (NO ₂)	Ozono (O ₃)
$2 \text{ NO} + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{NO}_2$	$0 + 0 \rightarrow 0$
$HNO_2 + OH \rightarrow HO_2 + NO_2$	$0_2 + 0 \rightarrow 0_3$
Nitritos (NO ₂ ⁻)	Nitratos (NO ₃)
	$HNO_3 \rightarrow NO_3^- + H^+$
$1110_2 \rightarrow 10_2 + 11$ $100_2 \pm 10_2 \pm 10_2 = 10^{-1} + 10^{-1} \pm 10^{-1}$	$NO_2^- + O_3 \rightarrow NO_3^- + O_2$
$NO_2 + NO_2 + H_2O \rightarrow NO_2 + NO_3 + H$	$NO_2 + NO_2 + H_2O \rightarrow NO_2 + NO_3 + H^+$
$NO + NO_2 + H_2O \rightarrow 2NO_2 + 2H$	$ONOOH \rightarrow NO_3^- + O_2$
Peroxinitrito (ONOO-)	
$0^2 + N0^- \rightarrow 0N00^-$	
$OH^{-} + NO_{2} \rightarrow ONOO^{-} + H^{+}$	

2 Actividad del ANTP sobre el biofilm de S. aureus, P. aeruginosa y C. albicans formadas en discos de titanio y PTFE. Experimentos (1-13).

En las siguientes tablas se muestran los datos correspondientes a los 13 experimentos realizados para el análisis de la actividad del ANTP sobre biofilm de *S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans* formadas en discos de titanio y PTFE. En cada tabla se muestran los datos de los discos (control, ensayo), tipo de microorganismo (*S. aureus, P. aeruginosa, C. albicans*), biomaterial utilizado (PTFE, titanio), UFC/2 mL, UFC/2 cm² el Log₁₀ UFC/cm² y la reducción logarítmica de las UFC/2 cm² entre el control y el ensayo.

Disco	Microorganismo	Biomaterial	UFC/2mL	UFC/cm2	Log ₁₀ UFC/cm2	$\Delta \\ Log_{10}$
Control	S. aureus	PTFE	1.640.000	1.294.703	6,11	0.21
Ensayo	S. aureus	PTFE	800.000	631.562	5,80	0,31
Control	S. aureus	TITANIO	572.000	451.567	5,65	2.72
Ensayo	S. aureus	TITANIO	1.080	853	2,93	2,72
Control	P. aeruginosa	PTFE	140.800.000	111.154.970	8,05	0.10
Ensayo	P. aeruginosa	PTFE	1.040.000	821.031	5,91	2,13
Control	P. aeruginosa	TITANIO	281.600.000	222.309.939	8,35	2.40
Ensayo	P. aeruginosa	TITANIO	920.000	726.297	5,86	2,49
Control	C. albicans	PTFE	3.920.000	3.094.655	6,49	2.25
Ensayo	C. albicans	PTFE	22.000	17.368	4,24	2,25
Control	C. albicans	TITANIO	170.000	134.207	5,13	0.02
Ensayo	C. albicans	TITANIO	19.800	15.631	4,19	0,95

EXPERIMENTO 1 (Exposición al ANTP durante 30 minutos)

Disco	Microorganismo	Biomaterial	UFC/2mL	UFC/cm2	Log10 UFC/cm2	Δ Log ₁₀
Control	S. aureus	PTFE	1540000	1215757	6,08	2,33
Ensayo	S. aureus	PTFE	7200	5684	3,75	
Control	S. aureus	TITANIO	760000	599984	5,78	0,77
Ensayo	S. aureus	TITANIO	128000	101050	5,00	
Control	P. aeruginosa	PTFE	130400000	102944659	8,01	5,70
Ensayo	P. aeruginosa	PTFE	260	205	2,31	
Control	P. aeruginosa	TITANIO	164400000	129786058	8,11	4,26
Ensayo	P. aeruginosa	TITANIO	9000	7105	3,85	
Control	C. albicans	PTFE	380000	299992	5,48	2,52
Ensayo	C. albicans	PTFE	1160	916	2,96	
Control	C. albicans	TITANIO	3500000	2763085	6,44	4,16
Ensayo	C. albicans	TITANIO	240	189	2,28	

EXPERIMENTO 2 (Exposición al ANTP durante 45 minutos)

EXPERIMENTO	3 (Ex	posición al A	ANTP	durante 45 minutos)
--------------------	-------	---------------	------	---------------------

Disco	Microorganismo	Biomaterial	UFC/2mL	UFC/cm2	Log ₁₀ UFC/cm2	Δ Log ₁₀
Control	S. aureus	PTFE	1320.000	10.42.078	6,02	2.49
Ensayo	S. aureus	PTFE	4.400	3.474	3,54	2,48
Control	S. aureus	TITANIO	1.080.000	852.609	5,93	5.02
Ensayo	S. aureus	TITANIO	0	0	0,00	5,93
Control	P. aeruginosa	PTFE	5.400.000	42.63.046	6,63	((2
Ensayo	P. aeruginosa	PTFE	0	0	0,00	0,05
Control	P. aeruginosa	TITANIO	142.00.000	11.210.231	7,05	7.05
Ensayo	P. aeruginosa	TITANIO	0	0	0,00	7,05
Control	C. albicans	PTFE	132.000	104.208	5,02	1 75
Ensayo	C. albicans	PTFE	2.360	1.863	3,27	1,75
Control	C. albicans	TITANIO	2.260.000	1.784.164	6,25	2.06
Ensayo	C. albicans	TITANIO	2.500	1.974	3,30	2,90

Disco	Microorganismo	Biomaterial	UFC/2mL	UFC/cm2	Log ₁₀ UFC/cm2	Δ Log ₁₀
Control	S. aureus	PTFE	1320000	1042078	6,02	0
Ensayo	S. aureus	PTFE	4820000	3805163	6,58	0
Control	S. aureus	TITANIO	1080000	852609	5,93	5.02
Ensayo	S. aureus	TITANIO	800	632	0,00	5,93
Control	P. aeruginosa	PTFE	5400000	4263046	6,63	
Ensayo	P. aeruginosa	PTFE	59600	47051	0,00	6,63
Control	P. aeruginosa	TITANIO	14200000	11210231	7,05	
Ensayo	P. aeruginosa	TITANIO	190000	149996	0,00	7,05
Control	C. albicans	PTFE	132000	104208	5,02	0.17
Ensayo	C. albicans	PTFE	594000	468935	5,67	-0,65
Control	C. albicans	TITANIO	2260000	1784164	6,25	1.0.5
Ensayo	C. albicans	TITANIO	25600	20210	4,31	1,95

EXPERIMENTO 5 (Exposición al ANTP durante 20 minutos)

Disco	Microorganismo	Biomaterial	UFC/2mL	UFC/cm2	Log10 UFC/cm2	Δ Log ₁₀
Control	S. aureus	PTFE	1.320.000	1.042.078	6,02	1.70
Ensayo	S. aureus	PTFE	26.200	20.684	4,32	1,70
Control	S. aureus	TITANIO	1.080.000	852.609	5,93	2.25
Ensayo	S. aureus	TITANIO	4.560	3.600	3,56	2,37
Control	P. aeruginosa	PTFE	5.400.000	4.263.046	6,63	
Ensayo	P. aeruginosa	PTFE	6.340.000	5.005.131	6,70	0
Control	P. aeruginosa	TITANIO	14.200.000	11.210.231	7,05	0.00
Ensayo	P. aeruginosa	TITANIO	6.640.000	5.241.967	6,72	0,33
Control	C. albicans	PTFE	132.000	104.208	5,02	
Ensayo	C. albicans	PTFE	372.000	293.676	5,47	0
Control	C. albicans	TITANIO	2.260.000	1.784.164	6,25	
Ensayo	C. albicans	TITANIO	39.600	31.262	4,50	1,76

Disco	Microorganismo	Biomaterial	UFC/2mL	UFC/cm2	Log ₁₀ UFC/cm2	Δ Log ₁₀
Control	S. aureus	PTFE	13200000	10420778	7,02	2.40
Ensayo	S. aureus	PTFE	4400	3474	3,54	3,48
Control	S. aureus	TITANIO	1080000	852609	5,93	
Ensayo	S. aureus	TITANIO	42000	33157	4,52	1,41
Control	P. aeruginosa	PTFE	10600000	8368201	6,92	
Ensayo	P. aeruginosa	PTFE	0	0	0,00	6,92
Control	P. aeruginosa	TITANIO	14200000	11210231	7,05	
Ensayo	P. aeruginosa	TITANIO	0	0	0,00	7,05
Control	C. albicans	PTFE	1320000	1042078	6,02	
Ensayo	C. albicans	PTFE	13600	10737	4,03	1,99
Control	C. albicans	TITANIO	2260000	1784164	6,25	
Ensayo	C. albicans	TITANIO	2580	2037	3,31	2,94

EXPERIMENTO 6 (Exposición al ANTP durante 60 minutos)

EXPERIMENTO 7 (Exposición al ANTP durante 45 minutos)

Disco	Microorganismo	Biomaterial	UFC/2mL	UFC/cm2	Log ₁₀ UFC/cm2	Δ Log ₁₀
Control	S. aureus	PTFE	13200000	10420778	7,02	
Ensayo	S. aureus	PTFE	1020	805	2,91	4,11
Control	S. aureus	TITANIO	1080000	852609	5,93	
Ensayo	S. aureus	TITANIO	69000	54472	4,74	1,19
Control	P. aeruginosa	PTFE	10600000	8368201	6,92	
Ensayo	P. aeruginosa	PTFE	620	489	2,69	4,23
Control	P. aeruginosa	TITANIO	14200000	11210231	7,05	
Ensayo	P. aeruginosa	TITANIO	68000	53683	4,73	2,32
Control	C. albicans	PTFE	1320000	1042078	6,02	
Ensayo	C. albicans	PTFE	1340	1058	3,02	2,99
Control	C. albicans	TITANIO	2260000	1784164	6,25	
Ensayo	C. albicans	TITANIO	2020000	1594695	6,20	0,05

Disco	Microorganismo	Biomaterial	UFC/2mL	UFC/cm2	Log ₁₀ UFC/cm2	Δ Log ₁₀
Control	S. aureus	TITANIO	7.600.000	5.999.842	6,78	
Ensayo	S. aureus	TITANIO	374.000	295.255	5,47	1,31
Ensayo	S. aureus	TITANIO	42.800	33.789	4,53	2,25
Control	S. aureus	PTFE	5.960.000	4.705.139	6,67	
Ensayo	S. aureus	PTFE	140.000	110.523	5,04	1,63
Ensayo	S. aureus	PTFE	2.520.000	1.989.421	6,30	0,37
Control	P. aeruginosa	TITANIO	2.220.000	1.752.585	6,24	
Ensayo	P. aeruginosa	TITANIO	102.000	80.524	4,91	1,34
Ensayo	P. aeruginosa	TITANIO	20.200	15.947	4,20	2,04
Control	P. aeruginosa	PTFE	2.680.000	2.115.734	6,33	
Ensayo	P. aeruginosa	PTFE	100.000	78.945	4,90	1,43
Ensayo	P. aeruginosa	PTFE	340.000	268.414	5,43	0,90
Control	C. albicans	TITANIO	4.960.000	3.915.686	6,59	
Ensayo	C. albicans	TITANIO	4.080.000	3.220.968	6,51	0,08
Ensayo	C. albicans	TITANIO	1.540.000	1.215.757	6,08	0,51
Control	C. albicans	PTFE	500.000	394.726	5,60	
Ensayo	C. albicans	PTFE	4.280.000	3.378.858	6,53	0
Ensayo	C. albicans	PTFE	1.940.000	1.531.539	6,19	0

EXPERIMENTO 8 (Exposición al ANTP durante 30 minutos)

Disco	Microorganismo	Biomaterial	UFC/2mL	UFC/cm2	Log ₁₀ UFC/cm2	Δ Log ₁₀
Control	S. aureus	TITANIO	4.580.000	3.615.694	6,56	
Ensayo A	S. aureus	TITANIO	6.560	5.179	3,71	2,84
Ensayo B	S. aureus	TITANIO	4.360	3.442	3,54	3,02
Control	S. aureus	PTFE	14.200.000	11.210.231	7,05	
Ensayo A	S. aureus	PTFE	5.480.000	4.326.202	6,64	0,41
Ensayo B	S. aureus	PTFE	6.260.000	4.941.975	6,69	0,36
Control	P. aeruginosa	TITANIO	24.800.000	19.578.432	7,29	
Ensayo A	P. aeruginosa	TITANIO	7.840.000	6.189.311	6,79	0,50
Ensayo B	P. aeruginosa	TITANIO	3.620.000	2.857.820	6,46	0,84
Control	P. aeruginosa	PTFE	77.600.000	61.261.546	7,79	
Ensayo A	P. aeruginosa	PTFE	18.200.000	14.368.043	7,16	0,63
Ensayo B	P. aeruginosa	PTFE	41.800.000	32.999.132	7,52	0,27
Control	C. albicans	TITANIO	392.000	309.466	5,49	
Ensayo A	C. albicans	TITANIO	1.600.000	1.263.125	6,10	-0,61
Ensayo B	C. albicans	TITANIO	53.000	41.841	4,62	0,87
Control	C. albicans	PTFE	12.400.000	9.789.216	6,99	
Ensayo A	C. albicans	PTFE	3.280.000	2.589.406	6,41	0,58
Ensayo B	C. albicans	PTFE	240.000	189.469	5,28	1,71

EXPERIMENTO 9 (Exposición al ANTP durante 45 minutos)

Disco	Mioroorgonismo	Piomotorial	UFC/2mI	UEC/am2	Log. UEC/am2	ALog
Curtur	Microorganismo	TITANIO	0FC/2IIIL	0FC/cm2	7.24	A Log ₁₀
Control	S. aureus	IIIANIO	27.600.000	21.788.900	7,34	
Control	S. aureus	TITANIO	18.600.000	14.683.824	7,17	
Ensayo A	S. aureus	TITANIO	3.800.000	2.999.921	6,48	0,78
Ensayo B	S. aureus	TITANIO	940.000	742.086	5,87	1,38
Control	S. aureus	PTFE	5.160.000	4.073.577	6,61	
Control	S. aureus	PTFE	12.800.000	10.104.997	7,00	
Ensayo A	S. aureus	PTFE	4.980.000	3.931.475	6,59	0,21
Ensayo B	S. aureus	PTFE	512.000	404.200	5,61	1,20
Control	P. aeruginosa	TITANIO	38.000.000	29.999.211	7,48	
Control	P. aeruginosa	TITANIO	95.200.000	75.155.917	7,88	
Ensayo A	P. aeruginosa	TITANIO	260.000	205.258	5,31	2,36
Ensayo B	P. aeruginosa	TITANIO	770.000	607.879	5,78	1,89
Control	P. aeruginosa	PTFE	52.200.000	41.209.442	7,61	
Control	P. aeruginosa	PTFE	96.400.000	76.103.260	7,88	
Ensayo A	P. aeruginosa	PTFE	1.100	868	2,94	4,81
Ensayo B	P. aeruginosa	PTFE	8.960	7.073	3,85	3,90
Control	C. albicans	TITANIO	2.300.000	1.815.742	6,26	
Control	C. albicans	TITANIO	5.780.000	4.563.038	6,66	
Ensayo A	C. albicans	TITANIO	484.000	382.095	5,58	0,88
Ensayo B	C. albicans	TITANIO	230.000	181.574	5,26	1,20
Control	C. albicans	PTFE	366.000	288.940	5,46	2,19
Control	C. albicans	PTFE	4.700.000	3.710.429	6,57	0,86
Ensayo A	C. albicans	PTFE	8.400	6.631	3,82	
Ensayo B	C. albicans	PTFE	180.000	142.102	5,15	

EXPERIMENTO 10 (Exposición al ANTP durante 45 minutos)

Disco	Microorganismo	Biomaterial	UFC/2mL	UFC/cm2	Log ₁₀ UFC/cm2	Δ Log ₁₀
Control	S. aureus	TITANIO	9.000.000	7.105.076	6,85	
Control	S. aureus	TITANIO	1.100.000	868.398	5,94	
Ensayo A	S. aureus	TITANIO	5.520	4.358	3,64	2,76
Ensayo B	S. aureus	TITANIO	56.000	44.209	4,65	1,75
Control	S. aureus	PTFE	17.600.000	13.894.371	7,14	
Control	S. aureus	PTFE	19.200.000	15.157.496	7,18	
Ensayo A	S. aureus	PTFE	29.400	23.210	4,37	2,80
Ensayo B	S. aureus	PTFE	56.400	44.525	4,65	2,51
Control	P. aeruginosa	TITANIO	4.440.000	3.505.171	6,54	
Control	P. aeruginosa	TITANIO	976.000	770.506	5,89	
Ensayo A	P. aeruginosa	TITANIO	2.760	2.179	3,34	2,88
Ensayo B	P. aeruginosa	TITANIO	180	142	2,15	4,06
Control	P. aeruginosa	PTFE	6.780.000	5.352.491	6,73	
Control	P. aeruginosa	PTFE	528.000	416.831	5,62	
Ensayo A	P. aeruginosa	PTFE	408.000	322.097	5,51	0,67
Ensayo B	P. aeruginosa	PTFE	166.000	131.049	5,12	1,06
Control	C. albicans	TITANIO	318.000	251.046	5,40	
Control	C. albicans	TITANIO	596.000	470.514	5,67	
Ensayo A	C. albicans	TITANIO	140	111	2,04	3,49
Ensayo B	C. albicans	TITANIO	400	316	2,50	3,04
Control	C. albicans	PTFE	2.680.000	2.115.734	6,33	
Control	C. albicans	PTFE	4.260.000	3.363.069	6,53	
Ensayo A	C. albicans	PTFE	940	742	2,87	3,56
Ensayo B	C. albicans	PTFE	960	758	2,88	3,55

EXPERIMENTO 11 (Exposición al ANTP durante 45 minutos)

Disco	Microorganismo	Biomaterial	UFC/2mL	UFC/cm2	Log ₁₀ UFC/cm2	Δ Log ₁₀
Control	S. aureus	TITANIO	1.180.000	931.554	5,97	
Control	S. aureus	TITANIO	3.400.000	2.684.140	6,43	
Ensayo A	S. aureus	TITANIO	1.420	1.121	3,05	3,15
Ensayo B	S. aureus	TITANIO	620	489	2,69	3,51
Control	S. aureus	PTFE	2.420.000	1.910.476	6,28	
Control	S. aureus	PTFE	8.400.000	6.631.404	6,82	
Ensayo A	S. aureus	PTFE	106.000	83.682	4,92	1,63
Ensayo B	S. aureus	PTFE	66.000	52.104	4,72	1,83
Control	C. albicans	TITANIO	176.000	138.944	5,14	
Control	C. albicans	TITANIO	2.320.000	1.831.531	6,26	
Ensayo A	C. albicans	TITANIO	20	16	1,20	4,50
Ensayo B	C. albicans	TITANIO	16.200	12.789	4,11	1,60
Control	C. albicans	PTFE	2.640.000	2.084.156	6,32	
Control	C. albicans	PTFE	1.780.000	1.405.226	6,15	
Ensayo A	C. albicans	PTFE	160.000	126.312	5,10	1,13
Ensayo B	C. albicans	PTFE	330.000	260.519	5,42	0,82
Control	P. aeruginosa	TITANIO	13.600.000	10.736.560	7,03	
Control	P. aeruginosa	TITANIO	5.480.000	4.326.202	6,64	
Ensayo A	P. aeruginosa	TITANIO	100	79	1,90	4,94
Ensayo B	P. aeruginosa	TITANIO	60	47	1,68	5,16
Control	P. aeruginosa	PTFE	10.400.000	8.210.310	6,91	
Control	P. aeruginosa	PTFE	7.000.000	5.526.170	6,74	
Ensayo A	P. aeruginosa	PTFE	31.800	25.105	4,40	2,43
Ensayo B	P. aeruginosa	PTFE	1.120	884	2,95	3,88

EXPERIMENTO 12 (Exposición al ANTP durante 45 minutos)

Disco	Microorganism 0	Biomateria l	UFC/2mL	UFC/cm 2	Log ₁₀ UFC/cm2	Δ Log ₁₀
Control A	S. aureus	TITANIO	130.000	102.629	5,01	
Control B*	S. aureus	TITANIO				
Ensayo A	S. aureus	TITANIO	20.800	16.421	4,22	0,80
Ensayo B	S. aureus	TITANIO	0	0	Esterilidad	Esterilidad
Control A	S. aureus	PTFE	5.360.000	4.231.468	6,63	
Control B	S. aureus	PTFE	2.120.000	1.673.640	6,22	
Ensayo A	S. aureus	PTFE	21.400	16.894	4,23	2,20
Ensayo B	S. aureus	PTFE	4.540	3.584	3,55	2,87
Control A	C. albicans	TITANIO	782.000	617.352	5,79	
Control B	C. albicans	TITANIO	600	474	2,68	
Ensayo A	C. albicans	TITANIO	260	205	2,31	1,92
Ensayo B	C. albicans	TITANIO	300	237	2,37	1,86
Control A	C. albicans	PTFE	700.000	552.617	5,74	
Control	C. albicans	PTFE	44.200	34.894	4,54	
Ensayo A	C. albicans	PTFE	15.800	12.473	4,10	1,05
Ensayo B	P. aeruginosa	PTFE	12.400	9.789	3,99	1,15
Control A	P. aeruginosa	TITANIO	64.000	50.525	4,70	
Control B	P. aeruginosa	TITANIO	7.520.000	5.936.686	6,77	
Ensayo A	P. aeruginosa	TITANIO	100	79	1,90	3,84
Ensayo B	P. aeruginosa	TITANIO	240	189	2,28	3,46
Control A	P. aeruginosa	PTFE	2.240.000	1.768.375	6,25	
Control B	P. aeruginosa	PTFE	7.200.000	5.684.061	6,75	
Ensayo A	P. aeruginosa	PTFE	59.000	46.578	4,67	1,83
Ensayo B	P. aeruginosa	PTFE	66.200	52.262	4,72	1,78

EXPERIMENTO 13 (Exposición al ANTP durante 45 minutos)

3 Actividad del ANTP sobre el biofilm de S. aureus, P. aeruginosa y C. albicans formadas en discos de titanio y PTFE. Datos de letalidad.

En la siguiente tabla se muestran los datos de letalidad en porcentaje que se ha utilizado para el análisis estadística ANOVA multifactorial. Se muestran los datos correspondientes al número de experimento, disposición espacial de los discos, tipo de material (titanio, PTFE), microorganismo (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*), tiempo de exposición al plasma, recuento de UFC/cm² en los discos expuestos y la letalidad en %.

Para el cálculo de la letalidad usamos la siguiente fórmula

1. Letalidad =
$$100 - \left(\frac{\frac{\text{UFC disco expuesto}}{\text{cm}^2}}{\frac{\text{UFC disco no expuesto}}{\text{cm}^2}}\right) * 100$$

2. Siendo $\frac{\text{UFC}}{\text{cm}^2} = \left(\frac{\frac{\text{ufc}}{2\text{ml}}}{1,2667 \text{ cm}^2}\right)$ dato, que se muestran en la tabla previa

Datos de letalidad

Ensayo	Disposición espacial	Material	Microorganismo	Tiempo	Recuento UFC/cm ² control	Recuento UFC/cm ² expuesto	Letalidad %
1	1	Titanio	S. aureus	30	451.567	853	99,81
1	1	Titanio	P. aeruginosa	30	222.309.939	726.297	99,67
1	1	Titanio	C. albicans	30	134.207	15.631	88,35
1	1	PTFE	S. aureus	30	1.294.703	631.562	51,22
1	1	PTFE	P. aeruginosa	30	111.154.970	821.031	99,26
1	1	PTFE	C. albicans	30	3.094.655	17.368	99,44
2	2	Titanio	S. aureus	45	599.984	101.050	83,16

Ensayo	Disposición espacial	Material	Microorganismo	Tiempo	Recuento UFC/cm ² control	Recuento UFC/cm ² expuesto	Letalidad %
2	2	Titanio	P. aeruginosa	45	129.786.058	7.105	99,99
2	2	Titanio	C. albicans	45	2.763.085	189	99,99
2	2	PTFE	S. aureus	45	1.215.757	5.684	99,53
2	2	PTFE	P. aeruginosa	45	102.944.659	205	100,00
2	2	PTFE	C. albicans	45	299.992	916	99,69
3	2	Titanio	S. aureus	45	852.609	0	100,00
3	2	Titanio	P. aeruginosa	45	11.210.231	0	100,00
3	2	Titanio	C. albicans	45	1.784.164	1.974	99,89
3	2	PTFE	S. aureus	45	1.042.078	3.474	99,67
3	2	PTFE	P. aeruginosa	45	4.263.046	0	100,00
3	2	PTFE	C. albicans	45	104.208	1.863	98,21
4	2	Titanio	S. aureus	30	852.609	632	99,93
4	2	Titanio	P. aeruginosa	30	11.210.231	149.996	98,66
4	2	Titanio	C. albicans	30	1.784.164	20.210	98,87
4	2	PTFE	S. aureus	30	1.042.078	3.805.163	0
4	2	PTFE	P. aeruginosa	30	4.263.046	47.051	98,90
4	2	PTFE	C. albicans	30	104.208	468.935	-350,00
5	2	Titanio	S. aureus	20	852.609	3.600	99,58
5	2	Titanio	S. aureus	60	852.609	33.157	96,11
5	2	Titanio	P. aeruginosa	20	11.210.231	5.241.967	53,24
5	2	Titanio	P. aeruginosa	60	11.210.231	0	100,00
5	2	Titanio	C. albicans	20	1.784.164	31.262	98,25
5	2	Titanio	C. albicans	60	1.784.164	2.037	99,89
5	2	PTFE	S. aureus	20	10.420.778	20.684	99,80
5	2	PTFE	S. aureus	60	10.420.778	33.157	99,68
5	2	PTFE	P. aeruginosa	20	4.263.046	5.005.131	0
5	2	PTFE	P. aeruginosa	60	4.263.046	0	100,00
5	2	PTFE	C. albicans	20	104.208	293.676	0
5	2	PTFE	C. albicans	60	1.042.078	10.737	98,97
6	2	Titanio	S. aureus	48	852.609	54.472	93,61
6	2	Titanio	P. aeruginosa	48	11.210.231	53.683	99,52
6	2	Titanio	C. albicans	48	1.784.164	1.594.695	10,62
6	2	PTFE	S. aureus	48	1.042.078	805	99,92
6	2	PTFE	P. aeruginosa	48	4.263.046	489	99,99

Anexo

Ensayo	Disposición espacial	Material	Microorganismo	Tiempo	Recuento UFC/cm ² control	Recuento UFC/cm ² expuesto	Letalidad %
6	2	PTFE	C. albicans	48	104.208	1.058	98,98
7	3	Titanio	S. aureus	30	5.999.842	164.522	97,26
7	3	Titanio	P. aeruginosa	30	1.752.585	48.236	97,25
7	3	Titanio	C. albicans	30	3.915.686	2.218.363	43,35
7	3	PTFE	S. aureus	30	4.705.139	1.049.972	77,68
7	3	PTFE	P. aeruginosa	30	2.115.734	173.680	91,79
7	3	PTFE	C. albicans	30	394.726	2.455.199	0
8	3	Titanio	S. aureus	45	3.615.694	4.310	99,88
8	3	Titanio	P. aeruginosa	45	19.578.432	4.523.565	76,90
8	3	Titanio	C. albicans	45	309.466	652.483	0
8	3	PTFE	S .aureus	45	11.210.231	4.634.089	58,66
8	3	PTFE	P. aeruginosa	45	61.261.546	23.683.587	61,34
8	3	PTFE	C. albicans	45	9.789.216	1.389.437	85,81
9	4	Titanio	S .aureus	45	18.236.362	1.871.003	89,74
9	4	Titanio	P. aeruginosa	45	52.577.564	406.568	99,23
9	4	Titanio	C. albicans	45	3.189.390	281.835	91,16
9	4	PTFE	S. aureus	45	7.089.287	2.167.838	69,42
9	4	PTFE	P. aeruginosa	45	58.656.351	3.971	99,99
9	4	PTFE	C. albicans	45	1.999.684	74.366	96,28
10	5	Titanio	S. aureus	60	3.986.737	24.284	99,39
10	5	Titanio	P. aeruginosa	60	2.137.838	1.160	99,95
10	5	Titanio	C. albicans	60	360.780	213	99,94
10	5	PTFE	S .aureus	60	14.525.934	33.868	99,77
10	5	PTFE	P. aeruginosa	60	2.884.661	226.573	92,15
10	5	PTFE	C. albicans	60	2.739.402	750	99,97
11	5	Titanio	S. aureus	60	1.807.847	805	99,96
11	5	Titanio	P. aeruginosa	60	7.531.381	63	100,00
11	5	Titanio	C. albicans	60	985.237	6.402	99,35
11	5	PTFE	S. aureus	60	4.270.940	67.893	98,41
11	5	PTFE	P. aeruginosa	60	6.868.240	12.994	99,81
11	5	PTFE	C. albicans	60	1.744.691	193.416	88,91
12	5	Titanio	S. aureus	120	102.629	8.210	92,00
12	5	Titanio	P. aeruginosa	120	2.993.605	134	100,00
12	5	Titanio	C. albicans	120	308.913	197	99,94

Ensayo	Disposición espacial	Material	Microorganismo	Tiempo	Recuento UFC/cm ² control	Recuento UFC/cm ² expuesto	Letalidad %
12	5	PTFE	Saureus	120	2.952.554	10.239	99,65
12	5	PTFE	P. aeruginosa	120	3.726.218	49.420	98,67
12	5	PTFE	C. albicans	120	293.755	11.131	96,21

4 Actividad del ANTP sobre las células planctónicas de S. aureus P. aeruginosa y *C. albicans*. Datos de letalidad.

En la siguiente tabla se muestran los datos de letalidad en porcentaje correspondientes a la exposición al ANTP de células planctónicas de *S. aureus P. aeruginosa y C. albicans*. Se muestran los datos correspondientes al número de experimento, discos (control, ensayo), microorganismo (*S. aureus, P. aeruginosa, C. albicans*), tiempo de exposición al plasma, concentración, recuento de UFC/ ml en los discos expuestos y no expuestos, Δ Log10 entre discos expuestos y no expuestos y la letalidad en %.

Para el cálculo de la letalidad usamos la siguiente fórmula:

1.
$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \left(\frac{\text{Colonias enumeradas}}{0.1 \text{ ml sembrados}}\right) * \text{ Factor de dilución}$$

2. **Letalidad** = $100 - \left(\frac{\frac{\text{UFC disco problema}}{\text{ml}}}{\frac{\text{UFC disco control}}{\text{ml}}}\right) * 100$

Ensayo	Tipo de muestra	Micro- organismos	Tiempo	Concentración	Recuento (UFC/ml)	Δ Log10	Letalid ad %
1	Control	S. aureus	90	10 ⁸	139.000.000		
1	Ensayo	S. aureus	90	10 ⁸	120	6,06	100,00
1	Ensayo	S. aureus	90	10 ⁸	290	5,68	100,00
1	Ensayo	S. aureus	90	10 ⁸	2.300	4,78	100,00
1	Control	S. aureus	90	107	9.500.000		
1	Ensayo	S. aureus	90	107	220	4,64	100,00
1	Ensayo	S. aureus	90	107	4.900	3,29	99,95
1	Ensayo	S. aureus	90	107	5.200	3,26	99,95
1	Control	S. aureus	90	10^{6}	2.700.000		
1	Ensayo	S. aureus	90	10^{6}	40	4,83	100,00
1	Ensayo	S. aureus	90	10^{6}	620	3,64	99,98
1	Ensayo	S. aureus	90	10^{6}	1.820	3,17	99,93
1	Control	S. aureus	90	10 ⁵	25.000		
1	Ensayo	S. aureus	90	10 ⁵	0	Esterilidad	100,00
1	Ensayo	S. aureus	90	10 ⁵	150	2,22	99,40
1	Ensayo	S. aureus	90	10 ⁵	170	2,17	99,32
1	Control	S. aureus	90	10 ⁴	2.560		
1	Ensayo	S. aureus	90	10 ⁴	0	Esterilidad	100,00
1	Ensayo	S. aureus	90	10 ⁴	60	1,63	97,66
1	Ensayo	S. aureus	90	10 ⁴	30	1,93	98,83
1	Control	S. aureus	90	10 ³	380		
1	Ensayo	S. aureus	90	10 ³	0	Esterilidad	100,00
1	Ensayo	S. aureus	90	10 ³	0	Esterilidad	100,00
1	Ensayo	S. aureus	90	10 ³	0	Esterilidad	100,00
2	Control	S. aureus	60	105	494.000		
2	Ensayo	S. aureus	60	10 ⁵	216.000	0,36	56,28
2	Control	S. aureus	60	10 ⁴	58.000		
2	Ensayo	S. aureus	60	104	36.800	0,20	36,55
2	Control	S. aureus	60	10 ³	7.600		
2	Ensayo	S. aureus	60	10 ³	3.140	0,38	58,68

Ensayo	Tipo de muestra	Micro- organismos	Tiempo	Concentración	Recuento (UFC/ml)	Δ Log10	Letalid ad %
2	Control	P. aeruginosa	60	10 ⁵	240.000		
2	Ensayo	P. aeruginosa	60	10 ⁵	201.000	0,08	16,25
2	Control	P. aeruginosa	60	10^{4}	22.900		
2	Ensayo	P. aeruginosa	60	10^{4}	23.600	-0,01	-3,06
2	Control	P. aeruginosa	60	10 ³	2.520		
2	Ensayo	P. aeruginosa	60	10 ³	2.040	0,09	19,05
2	Control	C. albicans	60	10^{4}	29.400		
2	Ensayo	C. albicans	60	10^{4}	14.300	0,31	51,36
2	Control	C. albicans	60	10 ³	3.030		
2	Ensayo	C. albicans	60	10 ³	1.280	0,37	57,76
2	Control	C. albicans	60	10^{2}	340		
2	Ensayo	C. albicans	60	10 ²	180	0,28	47,06
3	Control	S. aureus	60	10 ⁵	330.000		
3	Ensayo	S. aureus	60	10 ⁵	148.000	0,35	55,15
3	Control	S. aureus	60	10^{4}	14.000		
3	Ensayo	S. aureus	60	10 ⁴	14.200	-0,01	-1,43
3	Control	S. aureus	60	10 ³	3.300		
3	Ensayo	S. aureus	60	10 ³	1.440	0,36	56,36
3	Control	P. aeruginosa	60	10 ⁵	130.000		
3	Ensayo	P. aeruginosa	60	10 ⁵	3.600	1,56	97,23
3	Control	P. aeruginosa	60	10 ⁴	23.000		
3	Ensayo	P. aeruginosa	60	10^{4}	290	1,90	98,74
3	Control	P. aeruginosa	60	10 ³	1.470		
3	Ensayo	P. aeruginosa	60	10 ³	70	1,32	95,24
3	Control	C. albicans	60	10^{4}	30.000		
3	Ensayo	C. albicans	60	10^{4}	9.000	0,52	70,00
3	Control	C. albicans	60	10 ³	1.000		
3	Ensayo	C. albicans	60	10 ³	550	0,26	45,00
3	Control	C. albicans	60	10 ²	620		
3	Ensayo	C. albicans	60	10 ²	90	0,84	85,48

Ensayo	Tipo de muestra	Micro- organismos	Tiempo	Concentración	Recuento (UFC/ml)	Δ Log10	Letalid ad %
4	Control	S. aureus	90	105	292.000		
4	Ensayo	S. aureus	90	10 ⁵	0	Esterilidad	100,00
4	Control	S. aureus	90	10^{4}	29.200	Esterilidad	
4	Ensayo	S. aureus	90	10^{4}	0	Esterilidad	100,00
4	Control	S. aureus	90	10 ³	5.840	Esterilidad	
4	Ensayo	S. aureus	90	10 ³	0	Esterilidad	100,00
4	Control	P. aeruginosa	90	10 ⁵	990.000		
4	Ensayo	P. aeruginosa	90	10 ⁵	0	Esterilidad	100,00
4	Control	P. aeruginosa	90	10^{4}	99.000		
4	Ensayo	P. aeruginosa	90	10^{4}	0	Esterilidad	100,00
4	Control	P. aeruginosa	90	10 ³	9.900	Esterilidad	
4	Ensayo	P. aeruginosa	90	10 ³	0	Esterilidad	100,00
4	Control	C. albicans	90	10^{4}	29.000	Esterilidad	
4	Ensayo	C. albicans	90	10^{4}	0	Esterilidad	100,00
4	Control	C. albicans	90	10 ³	9.800	Esterilidad	
4	Ensayo	C. albicans	90	10 ³	0	Esterilidad	100,00
4	Control	C. albicans	90	10^{2}	420	Esterilidad	
4	Ensayo	C. albicans	90	10^{2}	0	Esterilidad	100,00
5	Control	S. aureus	90	108	339.000.000		
5	Ensayo	S. aureus	90	10 ⁸	70	6,69	100,00
5	Control	S. aureus	90	107	39.900.000		
5	Ensayo	S. aureus	90	107	0	Esterilidad	100,00
5	Control	S. aureus	90	106	1.770.000	Esterilidad	
5	Ensayo	S. aureus	90	106	0	Esterilidad	100,00
5	Control	S. aureus	90	10 ⁵	25.000	Esterilidad	
5	Ensayo	S. aureus	90	10 ⁵	0	Esterilidad	100,00
5	Control	S. aureus	90	10^{4}	7.000	Esterilidad	
5	Ensayo	S. aureus	90	10^{4}	0	Esterilidad	100,00
5	Control	S. aureus	90	10 ³	30		
5	Ensayo	S. aureus	90	10 ³	0	Esterilidad	100,00

Ensayo	Tipo de muestra	Micro- organismos	Tiempo	Concentración	Recuento (UFC/ml)	Δ Log10	Letalid ad %
5	Control	P. aeruginosa	90	10 ⁸	153.000.000	Esterilidad	
5	Ensayo	P. aeruginosa	90	10 ⁸	0	Esterilidad	100,00
5	Control	P. aeruginosa	90	107	28.000.000		
5	Ensayo	P. aeruginosa	90	107	20	6,15	100,00
5	Control	P. aeruginosa	90	106	3.180.000		
5	Ensayo	P. aeruginosa	90	10 ⁶	0	Esterilidad	100,00
5	Control	P. aeruginosa	90	10 ⁵	17.000		
5	Ensayo	P. aeruginosa	90	10 ⁵	0	Esterilidad	100,00
5	Control	P. aeruginosa	90	10^{4}	600	Esterilidad	
5	Ensayo	P. aeruginosa	90	10^{4}	0	Esterilidad	100,00
5	Control	P. aeruginosa	90	10 ³	140	Esterilidad	
5	Ensayo	P. aeruginosa	90	10 ³	0	Esterilidad	100,00
5	Control	C. albicans	90	10 ⁸	7.000.000	Esterilidad	
5	Ensayo	C. albicans	90	10 ⁸	214.000	1,51	96,94
5	Control	C. albicans	90	107	200.000		
5	Ensayo	C. albicans	90	107	130	3,19	99,94
5	Control	C. albicans	90	106	16.000		
5	Ensayo	C. albicans	90	10^{6}	0	Esterilidad	100,00
5	Control	C. albicans	90	10 ⁵	1.000	Esterilidad	
5	Ensayo	C. albicans	90	10 ⁵	0	Esterilidad	100,00
5	Control	C. albicans	90	10^{4}	380	Esterilidad	
5	Ensayo	C. albicans	90	10^{4}	0	Esterilidad	100,00
5	Control	C. albicans	90	10 ³	0	Esterilidad	
5	Ensayo	C. albicans	90	10 ³	0	Esterilidad	#;DIV/ 0!
6	Control	S. aureus	90	108	172.000.000		
6	Ensayo	S. aureus	90	10 ⁸	0	Esterilidad	100,00
6	Control	S. aureus	90	107	51.500.000	Esterilidad	
6	Ensayo	S. aureus	90	107	0	Esterilidad	100,00
6	Control	S. aureus	90	10 ⁶	1.240.000	Esterilidad	

Ensayo	Tipo de muestra	Micro- organismos	Tiempo	Concentración	Recuento (UFC/ml)	Δ Log10	Letalid ad %
6	Ensayo	S. aureus	90	106	0	Esterilidad	100,00
6	Control	S. aureus	90	10 ⁵	70.000	Esterilidad	
6	Ensayo	S. aureus	90	10 ⁵	0	Esterilidad	100,00
6	Control	S. aureus	90	10^{4}	3.600		
6	Ensayo	S. aureus	90	10^{4}	0	Esterilidad	100,00
6	Control	S. aureus	90	10 ³	280		
6	Ensayo	S. aureus	90	10 ³	0	Esterilidad	100,00
6	Control	P. aeruginosa	90	10 ⁸	27.000.000	Esterilidad	
6	Ensayo	P. aeruginosa	90	10 ⁸	0	Esterilidad	100,00
6	Control	P. aeruginosa	90	107	10.100.000	Esterilidad	
6	Ensayo	P. aeruginosa	90	107	0	Esterilidad	100,00
6	Control	P. aeruginosa	90	106	4.930.000	Esterilidad	
6	Ensayo	P. aeruginosa	90	106	0	Esterilidad	100,00
6	Control	P. aeruginosa	90	10 ⁵	16.100	Esterilidad	
6	Ensayo	P. aeruginosa	90	10 ⁵	0	Esterilidad	100,00
6	Control	P. aeruginosa	90	10^{4}	1.200		
6	Ensayo	P. aeruginosa	90	10^{4}	0	Esterilidad	100,00
6	Control	P. aeruginosa	90	10 ³	170	Esterilidad	
6	Ensayo	P. aeruginosa	90	10 ³	0	Esterilidad	100,00
6	Control	C. albicans	90	10 ⁸	2.300.000	Esterilidad	
6	Ensayo	C. albicans	90	10 ⁸	0	Esterilidad	100,00
6	Control	C. albicans	90	107	120.000	Esterilidad	
6	Ensayo	C. albicans	90	107	0	Esterilidad	100,00
6	Control	C. albicans	90	106	39.000	Esterilidad	
6	Ensayo	C. albicans	90	10^{6}	0	Esterilidad	100,00
6	Control	C. albicans	90	10 ⁵	1.500	Esterilidad	
6	Ensayo	C. albicans	90	10 ⁵	0	Esterilidad	100,00
6	Control	C. albicans	90	10^{4}	9.000	Esterilidad	
6	Ensayo	C. albicans	90	10^{4}	0	Esterilidad	100,00
6	Control	C. albicans	90	10 ³	0	Esterilidad	

Anexo

Ensayo	Tipo de muestra	Micro- organismos	Tiempo	Concentración	Recuento (UFC/ml)	Δ Log10	Letalid ad %
6	Ensayo	C. albicans	90	10 ³	0	Esterilidad	100,00