

04-040

## FUNCTIONAL COATINGS ON 3D PRINTED COOKING TOOLS

Muro-Fraguas, Ignacio <sup>(1)</sup>; Sainz-García, Ana <sup>(1)</sup>; Del Campo-Pedrosa, Rocío <sup>(1)</sup>;  
Múgica-Vidal, Rodolfo <sup>(1)</sup>; Alba-Elías, Fernando <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Universidad de La Rioja

Nowadays, desktop 3D printers are increasingly used to produce everyday custom objects, being cooking equipment the most important ones. These tools have rough surfaces suitable for microbial proliferation. The aim of this research is the reduction in bacterial biofilm formation on 3D printed polylactic acid (PLA) plates via application of coatings generated by atmospheric pressure cold plasma (APCP). Cooking equipment designed for people with hand mobility problems are one of the main target of these coatings. Acrylic acid (AcAc) and tetraethyl orthosilicate (TEOS) were chosen as liquid precursors; furthermore, nitrogen (99.99%) was the generator plasma gas. Three different bacteria were studied: Echerichia coli CECT515, Listeria monocytogenes CECT911 and Pseudomonas aeruginosa PAO1. Finally, coatings that decrease bacterial biofilm formation on PLA plates were identified. The highest effectivity was obtained with AcAc treatment that could reduce each bacteria biofilm formation almost to half of the initial levels. Meanwhile, TEOS treatment was effective only for L. monocytogenes. These results are promising for future investigations on antibiofilm capacities of different food surfaces.

*Keywords: atmospheric pressure cold plasma; antibiofilm; coatings; food contact surfaces; 3D printing.*

## RECUBRIMIENTOS FUNCIONALES SOBRE UTENSILIOS DE COCINA IMPRESOS EN 3D

Las impresoras 3D de escritorio son cada vez más utilizadas para la fabricación de objetos personalizados para el día a día, siendo los utensilios de cocina unos de los más habituales. Estas piezas poseen superficies rugosas idóneas para la proliferación de bacterias. Este trabajo pretende la disminución de la formación de biofilm bacteriano en placas de ácido poliláctico (PLA) impresas en 3D a partir de la aplicación de recubrimientos generados por plasma atmosférico frío. Uno de los destinatarios de estos recubrimientos serían los utensilios de cocina específicamente diseñados para personas que poseen problemas de movilidad en sus manos (enfermos de Parkinson o con parálisis cerebral). Los precursores líquidos utilizados fueron ácido acrílico (AcAc) y tetraetil ortosilicato (TEOS) y el gas generador de plasma, nitrógeno (99,99%). Las bacterias estudiadas fueron Echerichia coli CECT515, Listeria monocytogenes CECT911 y Pseudomonas aeruginosa PAO1. Finalmente, se encontraron recubrimientos que reducen la formación de biofilms en placas de PLA. La mayor efectividad se obtuvo empleando AcAc ya que permitió reducir la formación de biofilm de las tres bacterias casi a la mitad. En cuanto al TEOS, éste sólo fue efectivo para L. monocytogenes. Estos resultados son prometedores para futuras investigaciones relacionadas con capacidades antibiofilm de diferentes superficies alimentarias.

*Palabras clave: plasma atmosférico frío; antibiofilm; recubrimientos; superficies alimentarias; impresión 3D*

Correspondencia: Ignacio Muro Fraguas ignacio.muro@unirioja.es



## 1. Introducción

En la última década se ha producido un notable incremento de la tecnología de impresión 3D, tanto a nivel industrial como amateur. Dicho auge en este sector se debe probablemente a la expiración de las patentes de Stratasys en el año 2014 (Chang, 2016; Domínguez-Robles et al., 2019) donde se pasa de una tasa de crecimiento anual del 20% en el año 2013 al 33% en el año 2014 (Gardan, 2016; Wohlers Associates, 2017); y a la disminución de precios de los equipos de impresión (Campbell *et al.*, 2011; Chiulan et al., 2018)

El ácido poli-láctico (PLA) es el material más empleado con la tecnología de deposición de filamento fundido (FDM) de impresión 3D (Gardan, 2016; Zhang et al., 2016; Chiulan et al., 2018; Baran & Erbil, 2019; Domínguez-Robles et al., 2019). A diferencia de la mayoría de los polímeros empleados, el PLA no es un material derivado del petróleo, sino que se trata de un termoplástico fabricado a partir de recursos renovables como el almidón de maíz o la caña de azúcar. Es un material fácil de imprimir y su baja temperatura de fusión (180°C) hace innecesaria la impresión en cámara cerrada y con base calefactada. El PLA da lugar a piezas de gran calidad, precisión y acabado superficial (Chiulan et al., 2017; Baran & Erbil, 2019; Domínguez-Robles et al., 2019). Todas estas ventajas hacen que este material de impresión 3D sea ideal para aplicaciones biomédicas y envasado de alimentos (Jin, 2010; Guo, Jin & Yang, 2014; Chiulan et al., 2017; Baran & Erbil, 2019).

El sector alimentario es uno de los sectores en los que más ha crecido el empleo de PLA impreso en 3D. Las aplicaciones de impresión 3D para piezas en contacto con alimentos no responden únicamente a razones de diseño y personalización artística; sino que también existe la necesidad de llevar a cabo mejoras ergonómicas adaptando utensilios al usuario final (pacientes con discapacidades relacionadas con la movilidad de sus manos) (Lipton et al., 2015). Esta personalización no es posible con otros procesos de fabricación convencionales.

A pesar de las ventajas mencionadas, dos aspectos deben ser considerados a la hora de imprimir objetos en 3D destinados a aplicaciones en contacto con alimentos. Por un lado, numerosos estudios y proveedores de filamentos destacan las modificaciones químicas que se producen en los filamentos de PLA al fundir dicho filamento durante el proceso de impresión (Zhu et al., 2015; Oskui et al., 2016). Estas modificaciones desaconsejan el empleo de piezas de PLA para contacto con alimentos, independientemente de que el propio filamento cuente con la aprobación de la FDA (3DFilaPrint, 2015; Filaments.ca, 2020; Voltivo, 2020). Por otro lado, diversos estudios han analizado cómo el propio patrón de la tecnología FDM (caracterizado por una superficie compuesta por una serie de surcos derivados de la aportación del material en sucesivas hileras) es un lugar ideal para la adhesión y proliferación bacteriana. Los riesgos aumentan cuando los objetos impresos están en contacto con alimentos crudos y de forma repetitiva. A su vez, la baja temperatura de transición vítrea del PLA (60°C), imposibilita su limpieza en lavavajillas, aumentando el riesgo de infección (Lipton et al., 2015; Formalabs, 2019).

A pesar de los esfuerzos realizados hasta la fecha, no se han desarrollado revestimientos adecuados capaces de reducir el crecimiento bacteriano en piezas impresas en 3D. Alguno se degradan y desprenden con el tiempo, exponiendo la superficie original de las piezas, de nuevo, a posibles contaminaciones (Sandler et al., 2014; Formalabs, 2019). Otros no son adecuados ya que modifican las propiedades mecánicas del sustrato (Domínguez-Robles et al., 2019).

La tecnología de chorro de plasma a presión atmosférica (APPJ) es un método novedoso a la hora de aplicar recubrimientos funcionales. Dicha tecnología es capaz de producir modificaciones fisicoquímicas en la superficie del sustrato sin alterar sus propiedades

mecánicas. Se trata de un proceso limpio y libre de solventes, que no requiere equipo de vacío, con bajos costes de procesamiento y una sencilla escalabilidad para la aplicación industrial en línea (Borcia & Brown, 2007; Bismarck et al., 2008; Merche, Vandencastele & Reniers, 2012; Bashir, Rees & Zimmerman, 2013). Actualmente, son diversos los estudios que han analizado el éxito de aplicación de la tecnología APPJ sobre piezas impresas en 3D puesto que la baja temperatura alcanzada en el proceso de plasma (inferior a 50°C) es fundamental para evitar el deterioro de piezas impresas con PLA (Sardella et al., 2005; Stallard et al., 2012; Baran & Erbil, 2019).

## **2. Objetivos**

En el presente estudio se aplican recubrimientos mediante plasma-polimerización a presión atmosférica, empleando tecnología APPJ, sobre objetos de PLA impresos en 3D. El objetivo final se trata de conseguir recubrimientos que eviten la adhesión bacteriana y, por consiguiente, reduzcan el biofilm generado sobre las piezas impresas. A diferencia de los objetos impresos en el ámbito doméstico, puede que no exista la posibilidad de reimprimir los utensilios diseñados específicamente para usuarios con discapacidad con la periodicidad necesaria. Por lo que el desarrollo de recubrimientos ANTI-biofilm resultaría útil para paliar las limitaciones de la impresión 3D en dichas aplicaciones.

## **3. Metodología**

### **3.1. Materiales**

El filamento de impresión empleado fue PLA WHITE RS PRO con un diámetro de 1.75 mm (RS PRO, España). El precursor añadido en los tratamientos de plasma-polimerización fue tetraethyl orthosilicate 98% (TEOS;  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ ) (Acros-Organics, EE. UU). Para evitar la contaminación ambiental de las placas éstas fueron cubiertas, después del tratamiento de plasma, con una tapa esterilizada de 35 mm de diámetro de poliestireno (PS) (Thermo-Scientific, EE. UU.).

### **3.2. Impresión 3D**

Las piezas fueron fabricadas con la impresora “Original Prusa i3 MK3” (Prusa3D, República Checa). La temperatura del extrusor fue de 215°C y la de la base de impresión de 60°C. El grosor de las distintas capas fue de 0.2 mm con un porcentaje de relleno del 80%.

Las piezas impresas sobre las que se evalúa la capacidad ANTI-biofilm de los recubrimientos presentaban una geometría que tiende a simular la forma de las placas de petri. Las muestras de PLA impresas tenían un diámetro interior de 31 mm, diámetro exterior de 35 mm y altura de 15 mm (Figura 1[a]).

### **3.3. Tratamientos de plasma a presión atmosférica**

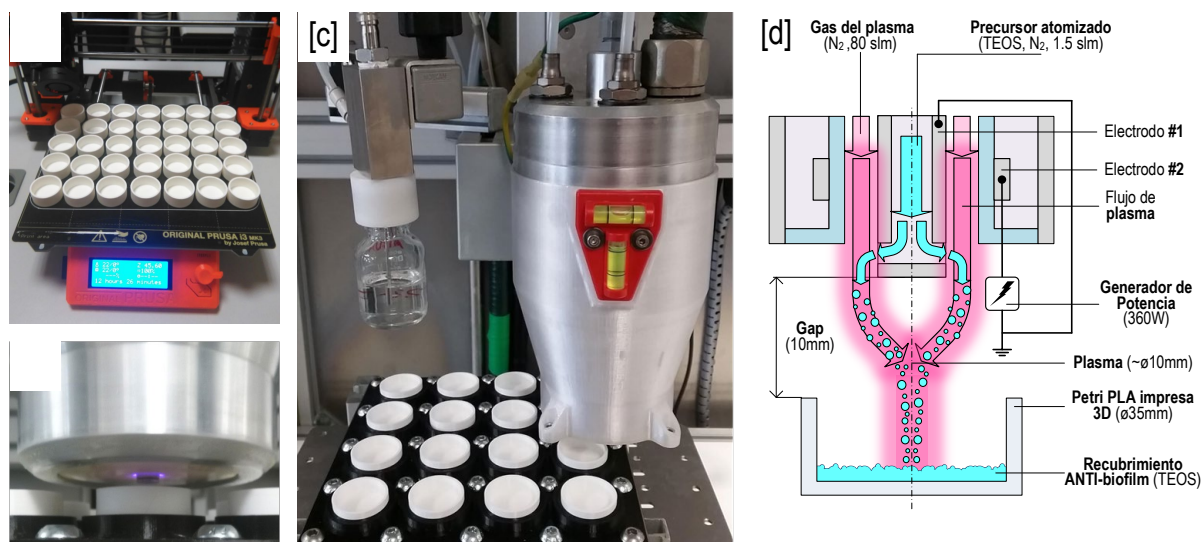
Los tratamientos de plasma-polimerización fueron aplicados sobre las piezas de PLA impresas en 3D. Se empleó el equipo de chorro de plasma a presión atmosférica (APPJ) PlasmaSpot500® (MPG, Luxemburgo). El equipo está formado por dos electrodos coaxiales (el externo conectado a una fuente de alta tensión y el interno a tierra) entre los cuales discurre un tubo dieléctrico de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Los recubrimientos aplicados en este estudio emplearon un flujo de 80 slm de nitrógeno como gas de plasma y 1.5 slm de nitrógeno como gas de precursor. La potencia del plasma fue de 360 W. Se depositaron 3 recubrimientos de TEOS en los que se modifica el número de pasadas (Tabla 1). Los recubrimientos fueron aplicados con un patrón de escaneado en el que la velocidad de la pistola fue de 100 mm/s,

con un paso de 2 mm y la distancia (gap) entre la pistola y la base de las placas de PLA de 10 mm. Cada recubrimiento fue realizado por cuadruplicado.

**Tabla 1. Designación de muestras**

Muestra	Nº Pasadas
PLA 3D	-
Te2p	2
Te6p	6
Te12p	12

**Figura 1: Secuencia del proceso: [a] Impresión 3D, [b] Vista detalle del proceso de deposición, [c] Equipo plasma-polimerización (APPJ), [d] Esquema del proceso de plasma-polimerización, [e] Petri de PLA impresa en 3D y [f] Imagen SEM (x100) de la muestra PLA 3D**



### 3.4. Caracterización fisicoquímica de las muestras tratadas

La topografía superficial fue analizada a través de imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM) obtenidas con el microscopio Multimode (Bruker Corporation) con Nanoscope V en el Instituto Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga (UMA). Se analizó un área de  $40\ \mu\text{m} \times 40\ \mu\text{m}$  con una frecuencia de escaneo de 50 Hz. La rugosidad promedio ( $R_a$ ) fue obtenida mediante el software NanoScope Analysis 1.4. El microscopio SEM HITACHI S-2400 con un voltaje de 18kV fue empleado para estudiar la morfología superficial de las muestras de PLA, las cuales deben ser previamente metalizadas con oro y paladio.

Se empleó la tecnología de X-ray Photoelectron Spectrometer (XPS) para cuantificar la composición química superficial de las muestras. El equipo empleado fue Kratos AXIS Supra con analizador hemisférico de electrones y una fuente de rayos X Monochromatic AlK $\alpha$ . Los espectros fueron recogidos a una energía constante de 160 eV (espectros generales) y 20 eV (espectros de alta resolución). Durante el proceso de adquisición se mantuvo una presión residual de la cámara de análisis inferior a  $1.33 \cdot 10^{-7}$  Pa. Las energías de enlace se referenciaron con el espectro del C1s centrado con el carbono adventicio a 285 eV. Las

deconvoluciones de los espectros XPS se realizaron con el programa PeakFit 4.12 (SPSS Inc.).

Se empleó el método de la gota sésil (10  $\mu$ L de agua destilada) para la medición del ángulo de contacto. Ante la imposibilidad de medir el WCA en las muestras de PLA (debido al patrón superficial característico de la impresión 3D), los recubrimientos fueron aplicados sobre superficies de acero inoxidable.

Cada una de las muestras fue analizada por triplicado, de modo que los resultados se corresponden con el valor medio de las tres mediciones.

### 3.5. Cuantificación del biofilm

Para analizar el biofilm generado sobre las placas impresas en 3D, éstas fueron inoculadas con *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Escherichia coli* CECT515 y *Listeria monocytogenes* CECT911. Dichas cepas fueron cultivadas en agar Brain-Heart Infusion (BHI) (Pronadisa, España) a 37°C. Se cuantificó el biofilm producido mediante el método de tinción con cristal violeta (CV) (Peeters, Nelis & Coenye, 2008). Las placas de PLA fueron inoculadas con una concentración inicial de 10<sup>6</sup> UFC/mL preparado en 3 mL de caldo Mueller Hinton (MH) (Pronadisa, España) a partir de cultivos nocturnos en agar BHI. Posteriormente, dichas placas se incubaron a 37°C durante 24 horas con el fin de obtener una biopelícula madura. Una vez finalizado el periodo de incubación, se retiró el medio y se lavó el biofilm con solución salina tampón de fosfato (PBS). Posteriormente, se fijó usando metanol durante 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez que el metanol fue eliminado, las placas se secaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadieron 3 mL de solución CV (Sigma, concentración final al 10% en PBS) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. El exceso de CV se eliminó bajo agua corriente y se secó. Finalmente, el CV fijado a la biopelícula se resolubilizó en 3 mL de ácido acético al 66%, y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. La absorbancia se midió a 570 nm utilizando un lector de placas (lector de microplacas POLARstar Omega, BMG Labtech). Se utilizaron cuatro placas de Petri de PLA por cada recubrimiento y microorganismo. Se incluyen como controles placas de PLA sin recubrir (PLA 3D).

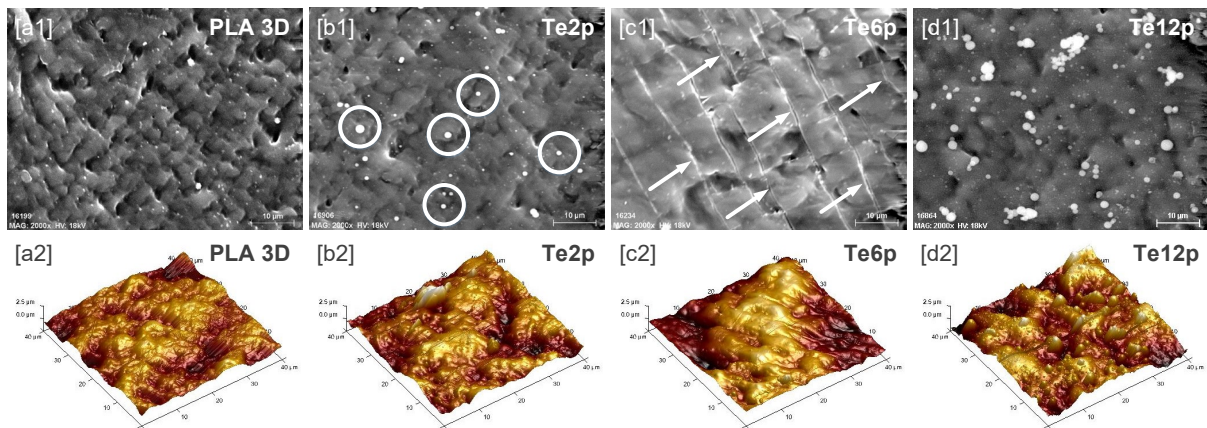
## 4. Resultados

### 4.1. Caracterización morfológica (SEM y AFM)

La Figura 2 recoge las imágenes SEM y AFM de la superficie de la muestra sin recubrir (Figura 2[a]) y las muestras recubiertas a base de TEOS con 2, 6 y 12 pasadas (Figura 2[b-d]). En la Figura 3 se representa la rugosidad (Ra) de cada uno de los recubrimientos realizados.

La superficie de la muestra sin recubrir (Figura 2[a]) presenta un aspecto grumoso con numerosos huecos; patrón característico de la impresión 3D mediante FDM. La deposición del recubrimiento de TEOS provoca que dichos huecos superficiales vayan disminuyendo conforme aumenta el número de pasadas. En la muestra recubierta con 6 pasadas (Figura 2[c]), se pueden apreciar una serie de fracturas superficiales. Dichas fracturas son ocasionadas por el estrés térmico residual producido en recubrimientos basados en precursores siloxanos (Sainz-García et al., 2017). En la muestra recubierta con 12 pasadas (Figura 2[d]) se observan partículas esféricas provenientes de la agrupación de los óxidos de silicio (Sainz-García et al., 2017). Dichas partículas se pueden observar (en menor cantidad) en muestras con menor número de pasadas.

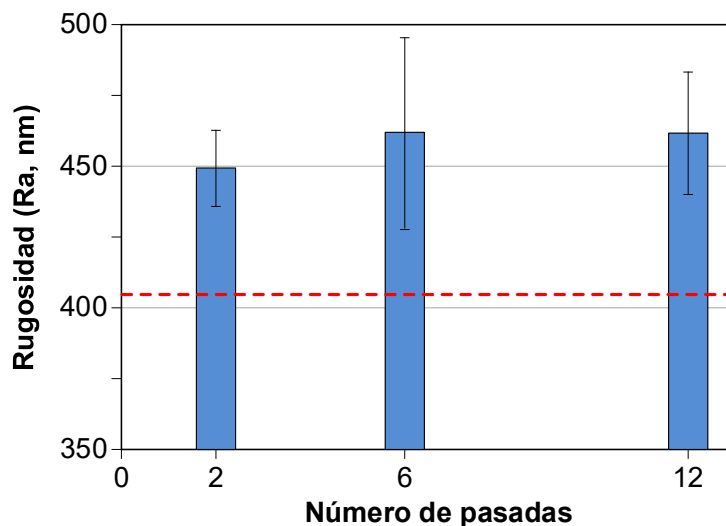
**Figura 2: Caracterización morfológica de las muestras: [1] Imágenes SEM (x2000) y [2] Imágenes AFM (40x40  $\mu\text{m}$ )**



Los círculos blancos señalan las partículas de óxido de silicio. Las flechas blancas indican las fracturas del recubrimiento.

La aplicación de los distintos recubrimientos de plasma provoca un ligero aumento de la rugosidad superficial respecto a la muestra de control; que se acentúa conforme aumenta el número de pasadas (Figura 3). El aumento de la rugosidad se debe a que las partículas plasma-polimerizadas durante las primeras pasadas se depositan sobre los grumos de la superficie de PLA, a la vez que van rellenando los huecos. Este doble efecto provoca que la muestra Te6p alcance el valor máximo de todas las muestras recubiertas ( $R_a$ : 462 nm). Sin embargo, las diferencias en la rugosidad entre los distintos recubrimientos no son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

**Figura 3: Rugosidad media ( $R_a$ ) de las muestras**



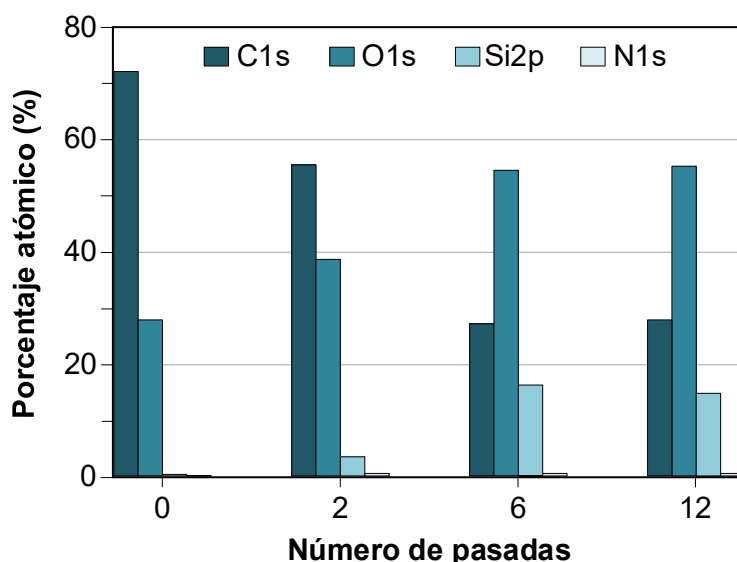
La línea roja discontinua representa la rugosidad de la muestra PLA 3D (control):  $408.8 \pm 14.4$  nm

#### 4.2. Caracterización química (XPS)

La Figura 4 muestra los componentes químicos totales presentes en la superficie de las muestras en función del número de pasadas del recubrimiento aplicado. Tal y como se puede ver, la deposición de dichos recubrimientos provoca un aumento en el grado de

oxidación superficial de las muestras, el cual aumenta con el número de pasadas. En las muestras sobre las que se aplican recubrimientos de más de 2 pasadas, se produce un aumento de la concentración de silicio (Si2p). Por el contrario, la concentración de nitrógeno (N1s) es prácticamente nula (<1%) independientemente del recubrimiento depositado. No se aprecian modificaciones en la concentración química superficial de las muestras cuando los recubrimientos aplicados son de más de 6 pasadas.

**Figura 4: Porcentajes atómicos de C1s, O1s, Si2p y N1s en función del número de pasadas**



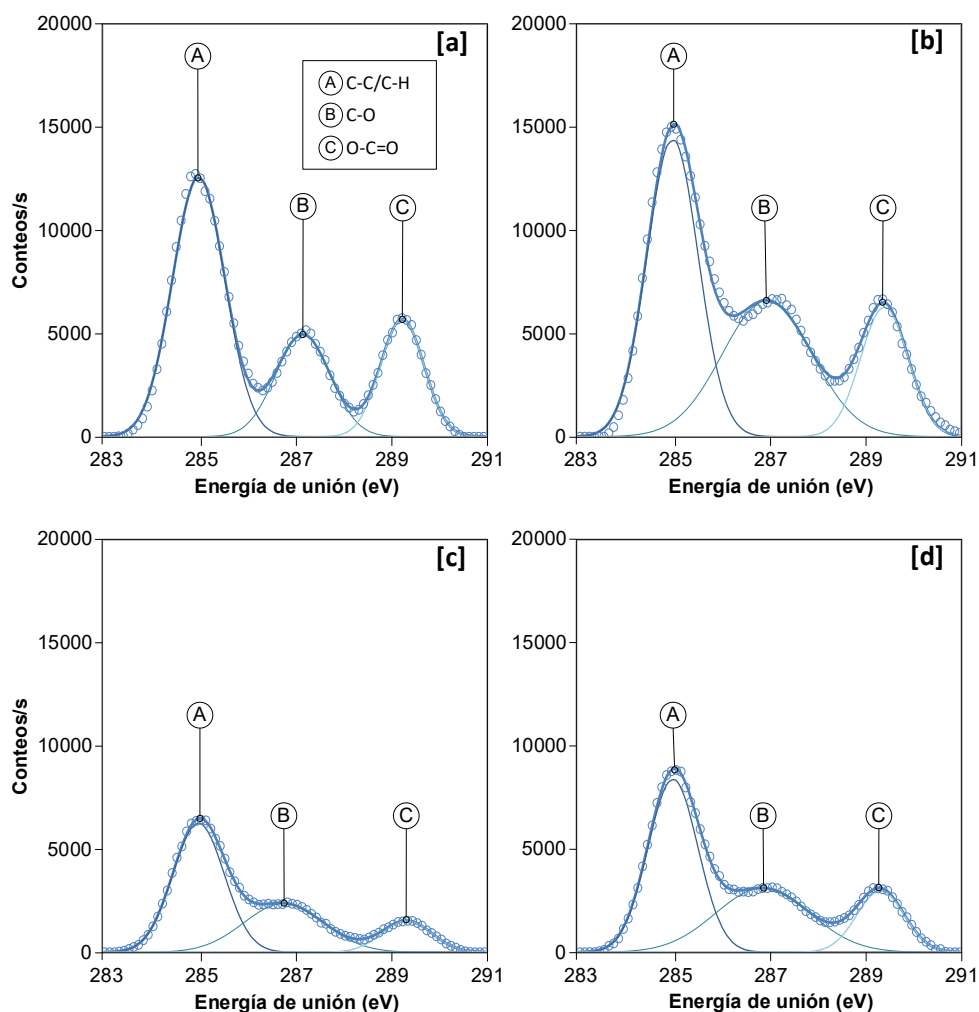
En la Figura 5 se muestran las deconvoluciones del espectro de alta resolución C1s de las muestras analizadas. Para cada una de las deconvoluciones se han obtenido tres picos, previamente identificados por otros autores: C-C/C-H a 285eV, C-O a 286.5-287.2eV y O-C=O a 288.5-289.3eV (Jacobs et al., 2012; Zhao et al., 2013; Wang et al., 2016; Abourayana, Dobbyn & Dowling, 2018). Las energías de unión y los picos mencionados, junto con los porcentajes relativos de cada uno de ellos quedan recogidos en la Tabla 2. Conforme va aumentando el número de pasadas de TEOS, el incremento en el grado de oxidación mencionado anteriormente se traduce en un aumento en los grupos funcionales basados en oxígeno (C-O, O-C=O) en detrimento de los grupos basados en carbono (C-C/C-H). Asimismo, las modificaciones químicas son notables desde las primeras pasadas (Te2p). A medida que aumenta el número de pasadas, el pico O-C=O disminuye y el pico C-C/C-H se eleva. El pico restante (C-O) no varía.

**Tabla 2. Porcentajes atómicos relativos al espectro C1s**

Muestra	C-C/C-H (285 eV)	C-O (286.5-287.2 eV)	O-C=O (288.5-289.4 eV)
PLA 3D	57.31	22.35	19.35
Te2p	45.40	36.29	18.31
Te6p	51.79	32.93	15.28
Te12p	49.02	34.42	16.56



Figura 5: Deconvoluciones del espectro C1s: [a] PLA 3D, [b] Te2p, [c] Te6p y [d] Te12p

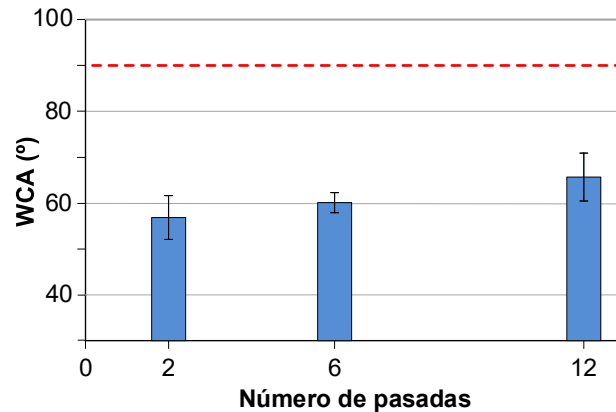


### 4.3. Humectabilidad

La propia morfología del PLA impreso característica de la tecnología FDM, impide la medición del ángulo de contacto (WCA), ya que la gota de agua queda alojada en los surcos generados entre las hileras de filamento fundido. Por lo tanto, se optó por seleccionar el acero inoxidable como material soporte sobre el que medir la humectabilidad de los recubrimientos de TEOS, puesto que es el material más comúnmente empleado en la industria alimentaria (Dürr, 2007). El acero inoxidable sobre el que se aplican los recubrimientos de plasma presenta un WCA de 89.5°. Los recubrimientos a base de TEOS aumentan la hidrofiliidad del sustrato. El número de pasadas influye en el grado de humectabilidad (Figura 6). Conforme menor es el número de pasadas, mayor es el grado de hidrofiliidad del sustrato. Tras aplicar dos pasadas, el WCA de la muestra es de 56.7°, aumentando ligeramente hasta los 65.5° en las muestras Te12p. Los resultados de humectabilidad están relacionados con los observados anteriormente en el XPS. El aumento en el ratio O/C (Kim & Masuoka, 2009; Jordá-Vilaplana et al., 2015; Swilem et al., 2016; Lima Da Silva et al., 2018) y específicamente el enlace O-C=O (Wang et al., 2016; Baran & Erbil, 2019); aumentan el carácter hidrófilo de los recubrimientos aplicados.



**Figura 6: WCA (°) medido sobre acero inoxidable en función del número de pasadas**

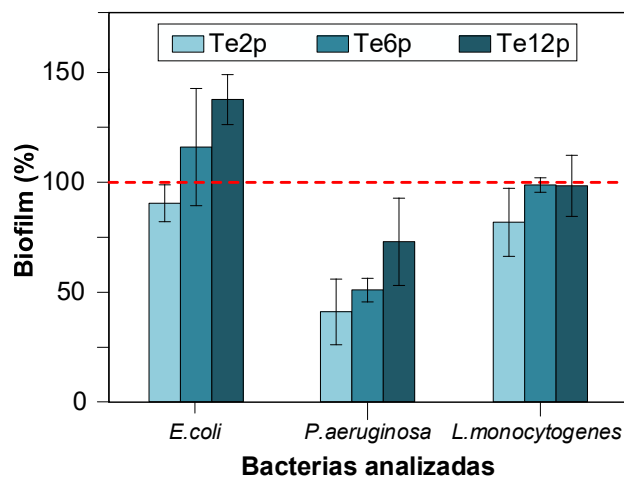


La línea roja discontinua representa el WCA de la muestra PLA 3D (control):  $89.5 \pm 12.6^\circ$

#### 4.4. Cuantificación del biofilm

La Figura 7 recoge el porcentaje de biofilm generado por cada bacteria en función del número de pasadas de TEOS aplicadas respecto a las muestras de PLA sin recubrir. Los recubrimientos que generan un porcentaje de biofilm inferior al de las muestras sin recubrir (<100%) son considerados como ANTI-biofilm; mientras que, aquellos recubrimientos que generan un porcentaje de biofilm superior al de las muestras de control (>100%); son considerados como PRO-biofilm. Para las tres bacterias estudiadas, la producción relativa de biofilm presenta la misma tendencia (Figura 7). La capacidad ANTI-biofilm del recubrimiento aumenta conforme disminuye el número de pasadas. El recubrimiento en el que se aplicaron dos pasadas (Te2p) genera la menor cantidad de biofilm, siendo el único que presenta un carácter ANTI-biofilm para las tres bacterias analizadas. La efectividad de dichos recubrimientos varía en función de la cepa analizada; siendo *P. aeruginosa* la bacteria que mejores resultados presenta. El biofilm generado sobre las placas de PLA impresas en 3D (respecto a las muestras sin tratar) sometidas previamente a un tratamiento con dos pasadas de TEOS es 40.9% en *P. aeruginosa*, 81.6% en *L. monocytogenes* y 90.1% en *E. coli*.

**Figura 7: Biofilm generado respecto al control (%) sobre placas de PLA impresas en 3D inoculadas con *E. coli*, *P. aeruginosa* y *L. monocytogenes***



La línea roja discontinua representa la producción de biofilm en la muestra PLA 3D (control): 100%

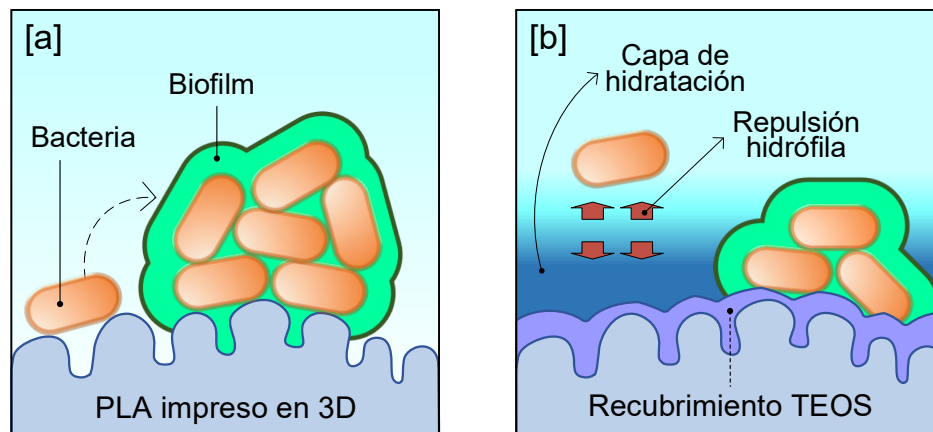
## 5. Discusión

La deposición de los recubrimientos a base de TEOS provoca un ligero incremento de la rugosidad a medida que se van rellenando las imperfecciones de la superficie del PLA impreso conforme aumenta el número de pasadas. Sin embargo, no se han encontrado evidencias que justifiquen que la capacidad ANTI-biofilm de los mismos está provocada por las modificaciones morfológicas producidas.

Diversos autores establecen una relación entre la adhesión bacteriana (primera fase en la generación de biofilm) y la capa de hidratación formada en superficies hidrófilas. Cuando se dispone de una superficie hidrófila sumergida en un fluido, se crean interacciones atractivas entre las moléculas de agua del medio y los grupos funcionales presentes en la superficie del sustrato. De este modo, las moléculas de agua tienden a orientarse hacia la superficie, generando la denominada capa de hidratación. Dicha capa, genera fuerzas de repulsión en la superficie de la muestra; dificultando la adhesión de las bacterias y, por tanto, el posterior biofilm generado (Peng, Song & Fort, 2006; Díaz et al., 2007; Chang et al., 2008; Temmen et al., 2014).

Para explicar por qué la capacidad ANTI-biofilm de los recubrimientos aumenta conforme disminuye el número de pasadas, es necesario analizar los resultados relativos a la composición química (ver apartado 4.2) y la humectabilidad de las muestras (ver apartado 4.3). Esto es debido a las fuerzas de repulsión generadas por la naturaleza hidrófila de los recubrimientos. El aumento en la cantidad de los grupos polares (C-O y O-C=O) provoca un incremento en la hidrofiliidad superficial (Tabla 2 y Figura 6). Concretamente, el enlace O-C=O se asocia con la formación de grupos carboxilo (COOH), los cuales poseen un fuerte carácter hidrófilo (Ba et al., 2016; Sardella et al., 2016; Ramkumar et al., 2017; Shen et al., 2019). Los recubrimientos basados en TEOS poseen una mayor cantidad de grupos O-C=O conforme disminuye el número de pasadas (Tabla 2).

**Figura 8: Justificación comportamiento ANTI-biofilm: [a] PLA 3D (control), [b] Muestras plasma-polimerizadas a base de TEOS**



## 6. Conclusiones

En el presente estudio se han desarrollado una serie de recubrimientos aplicados mediante plasma-polimerización a base de TEOS con el fin de reducir el biofilm generado por una serie de bacterias comunes en el ámbito alimentario y clínico (*P. aeruginosa*, *E. coli* y *L. monocytogenes*) sobre superficies de PLA impresas en 3D. En los distintos recubrimientos depositados se modificó el número de pasadas.

Las principales conclusiones obtenidas han sido las siguientes:

- La capacidad ANTI-biofilm aumentó conforme disminuyó el número de pasadas.
- Los recubrimientos con 2 pasadas fueron ANTI-biofilm para las tres bacterias analizadas. Este tratamiento fue el mejor, con una producción relativa de biofilm de 40.9% en *P. aeruginosa*, 81.6% en *L. monocytogenes* y 90.1% en *E. coli*; respecto a las muestras sin tratar.
- La efectividad de los recubrimientos radica en el carácter hidrófilo de los mismos, el cual promueve la formación de una capa de hidratación en la superficie de las muestras que reduce la adhesión de las bacterias y el posterior biofilm generado.
- La hidrofiliidad superficial aumentó conforme lo hacen los grupos polares basados en oxígeno (C-O y O-C=O). Los recubrimientos a base de TEOS presentaron una mayor cantidad de grupos O-C=O conforme disminuyó el número de pasadas. Este hecho podría explicar la reducción de biofilm tras aplicar recubrimientos con menor número de pasadas.

En futuras investigaciones se tratará de dar respuesta al distinto comportamiento del recubrimiento en función de la bacteria analizada; aumentando el número de precursores empleados y las cepas bacterianas inoculadas.

## Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad a través del proyecto AGL2017-82779-C2-1-R. Los test XPS fueron realizados por Laboratorio de Microscopía Avanzado (LMA) del Instituto de Nanociencia de Aragón (INA), Universidad de Zaragoza (España). Los autores quieren agradecer a LMA e INA el acceso a su equipamiento así como su experiencia. Los test AFM fueron realizados por los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI), Universidad de Málaga (España).

El autor, I. Muro-Fraguas agradece al programa de contratos pre-doctorales su formación como personal investigador financiado por la Universidad de La Rioja.

El autor, R. del Campo-Pedrosa, agradece a la beca de Iniciación a la Investigación su formación como personal investigador financiado por la Universidad de La Rioja.

## 7. Referencias

- 3DFilaPrint (2015). Data Sheet PLA PUREMENT ANTI MICROBIAL. Obtenido el 3 de marzo de 2020: <https://shop.3dfilaprint.com/purement-anti-microbial-filament-blue-175mm-1461-p.asp>
- Abourayana, H., Dobbyn, P. & Dowling, D. (2018). Enhancing the mechanical performance of additive manufactured polymer components using atmospheric plasma pre-treatments. *Plasma Processes and Polymers*, 15(3).
- Ba, O. M., Marmey, P., Anselme, K., Duncan, A. C. & Ponche, A. (2016). Surface composition XPS analysis of a plasma treated polystyrene: Evolution over long storage periods. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 145, pp. 1–7.
- Baran, E. & Erbil, H. (2019). Surface Modification of 3D Printed PLA Objects by Fused Deposition Modeling: A Review. *Colloids and Interfaces*, 3(2), p. 43.
- Bashir, M., Rees, J. M. & Zimmerman, W. B. (2013). Plasma polymerization in a microcapillary using an atmospheric pressure dielectric barrier discharge. *Surface and Coatings Technology*, 234, pp. 82–91.

- Bismarck, A., Brostow, W., Chiu, R., Hagg Lobland, H. E. & Ho, K. C. (2008). Effects of surface plasma treatment on tribology of thermoplastic polymers. *Polymer Engineering & Science*, 48(10), pp. 1971–1976.
- Borcia, G. & Brown, N. M. D. (2007). Hydrophobic coatings on selected polymers in an atmospheric pressure dielectric barrier discharge. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 40(7), pp. 1927–1936.
- Campbell, T., Williams, C., Ivanova, O. & Garrett, B. (2011). Could 3D Printing Change the World? Technologies, Potential, and Implications of Additive Manufacturing. Obtenido el 2 de mayo de 2019 de Atlantic Council: [http://www.atlanticcouncil.org/images/files/publication\\_pdfs/403/101711\\_ACUS\\_3DPri nting.PDF](http://www.atlanticcouncil.org/images/files/publication_pdfs/403/101711_ACUS_3DPri nting.PDF)
- Chang, S. H. (2016). *Exploring the evolution of additive manufacturing industry : a study of stakeholder requirements and architectural analysis of Desktop three-dimensional printing Segment*. Tesis doctoral no publicada, Massachusetts Institute of Technology.
- Chang, Y., Cheng, T. Y., Shih, Y. J., Lee, K. R. & Lai, J. Y. (2008). Biofouling-resistance expanded poly(tetrafluoroethylene) membrane with a hydrogel-like layer of surface-immobilized poly(ethylene glycol) methacrylate for human plasma protein repulsions. *Journal of Membrane Science*, 323(1), pp. 77–84.
- Chiulan, I., Frone, A. N., Brandabur, C. & Panaitescu, D. M. (2017). Recent Advances in 3D Printing of Aliphatic Polyesters. *Bioengineering*, 5(1), p. 2.
- Díaz, C., Cortizo, M. C., Schilardi, P. L., Gómez de Saravia, S. G. & Lorenzo de Mele, M. A. (2007). Influence of the nano-micro structure of the surface on bacterial adhesion. *Materials Research*. pp. 11–14.
- Domínguez-Robles, J., Martin, N. K., Fong, M. L., Stewart, S. A., Irwin, N. J., Rial-Hermida, M. I., Donnelly, R. F. & Larrañeta, E. (2019). Antioxidant PLA Composites Containing Lignin for 3D Printing Applications: A Potential Material for Healthcare Applications. *Pharmaceutics*, 11(4), p. 165.
- Dürr, H. (2007). Influence of surface roughness and wettability of stainless steel on soil adhesion, cleanability and microbial inactivation. *Food and Bioproducts Processing*, 85(1 C), pp. 49–56.
- Filaments.ca (2020). Data Sheet PLA Filaments.ca. Obtenido el 18 de febrero de 2020: <https://filaments.ca/products/true-food-safe-pla-black-licorice-1-75mm>
- Formalabs (2019). The Essential Guide to Food Safe 3D Printing Obtenido el 26 de febrero de 2020: <https://formlabs.com/blog/guide-to-food-safe-3d-printing/>
- Gardan, J. (2016). Additive manufacturing technologies: state of the art and trends. *International Journal of Production Research*, 54(10), pp. 3118–3132.
- Guo, M., Jin, T. Z. & Yang, R. (2014). Antimicrobial Polylactic Acid Packaging Films against *Listeria* and *Salmonella* in Culture Medium and on Ready-to-Eat Meat. *Food and Bioprocess Technology*, 7(11), pp. 3293–3307.
- Jacobs, T., Declercq, H., De Geyter, N., Cornelissen, R., Dubruel, P., Leys, C., Beaurain, A., Payen, E. & Morent, R. (2012). Plasma surface modification of polylactic acid to promote interaction with fibroblasts. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(2)
- Jin, T. (2010). Inactivation of *Listeria monocytogenes* in Skim Milk and Liquid Egg White by Antimicrobial Bottle Coating with Polylactic Acid and Nisin. *Journal of Food Science*, 75(2), pp. M83–M88.
- Jordá-Vilaplana, A., Sánchez-Nácher, L., Fombuena, V., García-García, D. & Carbonell-Verdú, A. (2015). Improvement of mechanical properties of polylactic acid adhesion joints with bio-based adhesives by using air atmospheric plasma treatment. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(32).
- Kim, M. C. & Masuoka, T. (2009). Degradation properties of PLA and PHBV films treated with CO<sub>2</sub>-plasma. *Reactive and Functional Polymers*, 69(5), pp. 287–292

- Lima Da Silva, R. C., Alves Júnior, C., Reinaldo, J., Neves, O., Araujo, R. & Pinto Teixeira, V. M. (2018). Controlling Wettability of the Each Side of the PLA Fabric through Orientation of the Working Gases (O<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub>) During Cold Plasma Treatment. *Materials Research*, 21(1)
- Lipton, J., Witzleben, J., Green, V., Ryan, C. & Lipson, H. (2015). Demonstrations of Additive Manufacturing for the Hospitality Industry. *3D Printing and Additive Manufacturing*, 2(4), pp. 204–208
- Merche, D., Vandencastele, N. & Reniers, F. (2012). Atmospheric plasmas for thin film deposition: A critical review. *Thin Solid Films*, pp. 4219–4236
- Oskui, S. M., Diamante, G., Liao, C., Shi, W., Gan, J., Schlenk, D. & Grover, W. H. (2016). Assessing and Reducing the Toxicity of 3D-Printed Parts. *Environmental Science & Technology Letters*, 3(1), pp. 1–6.
- Peeters, E., Nelis, H. J. & Coenye, T. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*, 72(2), pp. 157–165.
- Peng, C., Song, S. & Fort, T. (2006). Study of hydration layers near a hydrophilic surface in water through AFM imaging. *Surface and Interface Analysis*, 38(5), pp. 975–980.
- Ramkumar, M. C., Navaneetha Pandiyaraj, K., Arun Kumar, A., Padmanabhan, P. V. A., Cools, P., De Geyter, N., Morent, R., Uday Kumar, S., Kumar, V., Gopinath, P., Jaganathan, S. K. & Deshmukh, R.R. (2017). Atmospheric pressure non-thermal plasma assisted polymerization of poly (ethylene glycol) methylether methacrylate (PEGMA) on low density polyethylene (LDPE) films for enhancement of biocompatibility. *Surface and Coatings Technology*, 329, pp. 55–67.
- Sainz-García, E., Alba-Elías, F., Múgica-Vidal, R. & González-Marcos, A. (2017). Antifriiction aminopropyltriethoxysilane films on thermoplastic elastomer substrates using an APPJ system. *Surface and Coatings Technology*, 310, pp. 239–250.
- Sandler, N., Salmela, I., Fallarero, A., Rosling, A., Khajeheian, M., Kolakovic, R., Genina, N., Nyman, J. & Vuorela, P. (2014). Towards fabrication of 3D printed medical devices to prevent biofilm formation. *International Journal of Pharmaceutics*, 459(1–2), pp. 62–64.
- Sardella, E., Gristina, R., Ceccone, G., Gilliland, D., Papadopoulou-Bouraoui, A., Rossi, F., Senesi, G. S., Detomaso, L., Favia, P. & D'Agostino, R. (2005). Control of cell adhesion and spreading by spatial microarranged PEO-like and pdAA domains. *Surface and Coatings Technology*, 200(1–4) pp. 51–57.
- Sardella, E., Palumbo, F., Camporeale, G. & Favia, P. (2016). Non-equilibrium plasma processing for the preparation of antibacterial surfaces. *Materials*, 9(7).
- Shen, X., Liu, P., Xia, S., Liu, J., Wang, R., Zhao, H., Liu, Q., Xu, J. & Wang, F. (2019). Anti-fouling and anti-bacterial modification of poly(vinylidene fluoride) membrane by blending with the capsaicin-based copolymer. *Polymers*, 11(2).
- Stallard, C. P., McDonnell, K. A., Onayemi, O. D., O'Gara, J. P. & Dowling, D. P. (2012). Evaluation of protein adsorption on atmospheric plasma deposited coatings exhibiting superhydrophilic to superhydrophobic properties. *Biointerphases*, 7(1–4), pp. 1–12.
- Swilem, A. E., Lehocký, M., Humpolíček, P., Kucekova, Z., Junkar, I., Mozetič, M., Hamed, A. A. & Novák, I. (2016). Developing a biomaterial interface based on poly(lactic acid) via plasma-assisted covalent anchorage of D-glucosamine and its potential for tissue regeneration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 148, pp. 59–65.
- Temmen, M., Ochedowski, O., Schleberger, M., Reichling, M. & Bollmann, T. R.J. (2014). Hydration layers trapped between graphene and a hydrophilic substrate. *New Journal of Physics*, 16.
- Voltivo (2020). Application Note PLA Food Contact FDA Approval Voltivo. Obtenido el 7 de marzo de 2020: <https://voltivo.com/voltivo-media/latest/product/ef-abs-pla/datasheet/Filament-Food-Contact.pdf>
- Wang, M., Favi, P., Cheng, X., Golshan, N. H., Ziemer, K. S., Keidar, M. & Webster, T. J.

(2016). Cold atmospheric plasma (CAP) surface nanomodified 3D printed polylactic acid (PLA) scaffolds for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, 46, pp. 256–265.

Wohlers Associates (2017). Wohlers Report 2017 Service Survey Results. Obtenido el 26 de enero de 2020: <https://www.i3dmfg.com/wp-content/uploads/2017/07/Wohlers-Report-2017-Provider-Survey-Results.pdf>



Provider

Service-

Zhang, B., Seong, B., Nguyen, V. & Byun, D. (2016). 3D printing of high-resolution PLA-based structures by hybrid electrohydrodynamic and fused deposition modeling techniques. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 26(2), p. 25015.

Zhao, Y., Fina, A., Venturello, A. & Geobaldo, F. (2013). Effects of gas atmospheres on poly(lactic acid) film in acrylic acid plasma treatment. *Applied Surface Science*, 283, pp. 181–187.

Zhu, F., Friedrich, T., Nugegoda, D., Kaslin, J. & Wlodkowic, D. (2015). Assessment of the biocompatibility of three-dimensional-printed polymers using multispecies toxicity tests. *Biomicrofluidics*, 9(6).

**Comunicación alineada con los Objetivos de Desarrollo Sostenible**

