



Universidad  
de Alcalá

SECUAH  
2021

VI Congreso  
de Señalización  
Celular

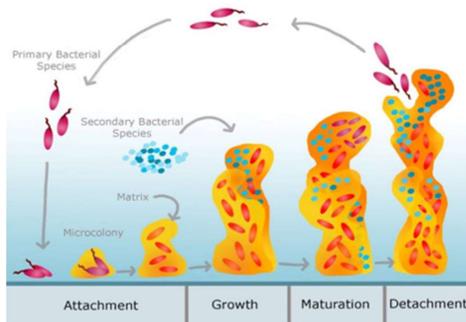


**Destrucción “on-the-fly” de biofilms bacterianos  
empleando micromotores de dicalcogenuros de  
metales de transición impulsados por luz visible**

Víctor de la Asunción-Nadal, Javier Bujalance-Fernández, Beatriz Jurado-Sánchez, Alberto Escarpa

# Introducción

## ¿QUÉ ES UN BIOFILM BACTERIANO?



Las bacterias tienen una gran capacidad para adherirse a superficies húmedas y desarrollar en ellas colonias. Estas son capaces de sintetizar matrices proteicas de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), formadas principalmente por polisacáridos. Estas matrices facilitan su adhesión, tanto a las superficies, como entre ellas mismas, además de servir como capa protectora, dificultando su eliminación. Este tipo de organización bacteriana es muy común, se denomina *biofilm* y fue descrito por primera vez por *Zobell & Anderson* en el año 1936.

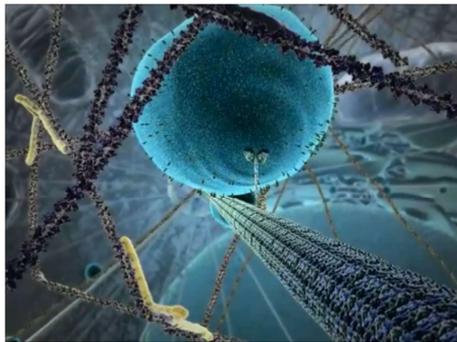
Los *biofilms* o biopelículas bacterianas se encuentran tanto en superficies de materiales artificiales creados por el ser humano, como en la propia naturaleza. La aparición de *biofilms* de bacterias multirresistentes a antibióticos en materiales quirúrgicos o en la industria alimentaria tiene consecuencias directas en el ser humano, causando la propagación de un gran número de enfermedades y grandes pérdidas económicas anuales.

En la figura de la derecha, se ve una herida, en la que ha crecido un *biofilm* bacteriano.

# Introducción

**Micromotores:** Micro y nanodispositivos que pueden convertir energía en movimiento para realizar numerosas tareas en disolución

PROTEÍNAS NATURALES



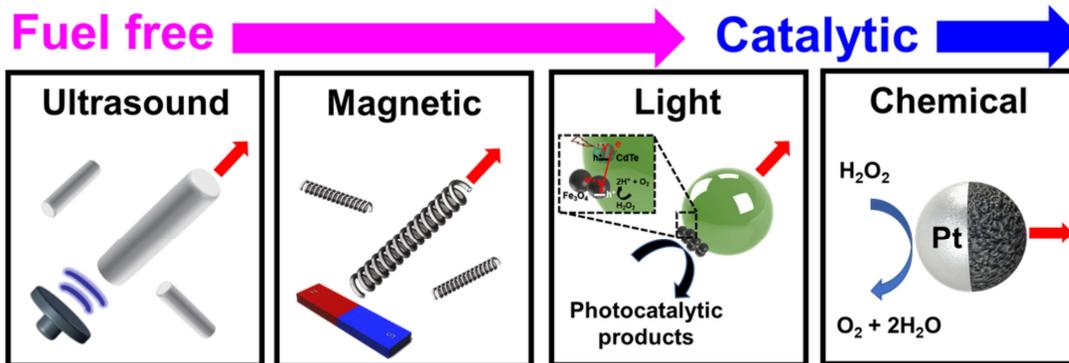
MICROMOTORES



Para la mitigación de estos *biofilms*, proponemos un enfoque basado en micromotores. Los micromotores, son micro y nanodispositivos capaces de convertir energía de distintos tipos en movimiento. En los últimos años, los micromotores han sido empleados para aplicaciones en distintos campos tales como *drug delivery*, remediación ambiental, aplicaciones energéticas o determinación de biomarcadores y otras moléculas de interés clínico o industrial.

# Introducción

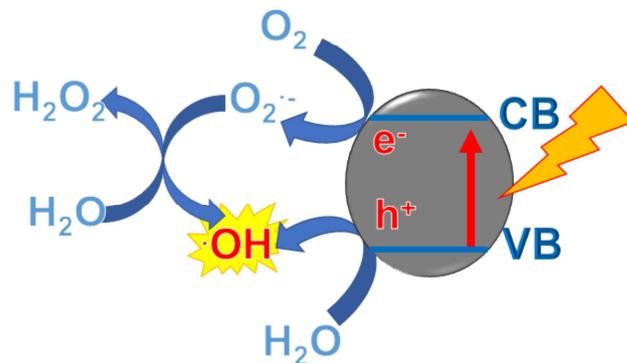
Micromotores: Propulsión autónoma



Como hemos mencionado en la anterior diapositiva, se han descrito micromotores que emplean distintos estímulos para su propulsión. Entre ellos podemos distinguir dos tipos principales, los catalíticos, que emplean sustancias químicas para la generación de burbujas o gradientes de concentración que fomenten el movimiento de estos motores y los "fuel free" que aprovechan energías alternativas tales como los ultrasonidos, la aplicación de campos magnéticos y electromagnéticos. Entre estos métodos de propulsión, el uso de luz presenta claras ventajas ya que es un método intrínsecamente biocompatible y mediante la utilización de fibras ópticas, es posible propulsarlos en zonas de difícil acceso.

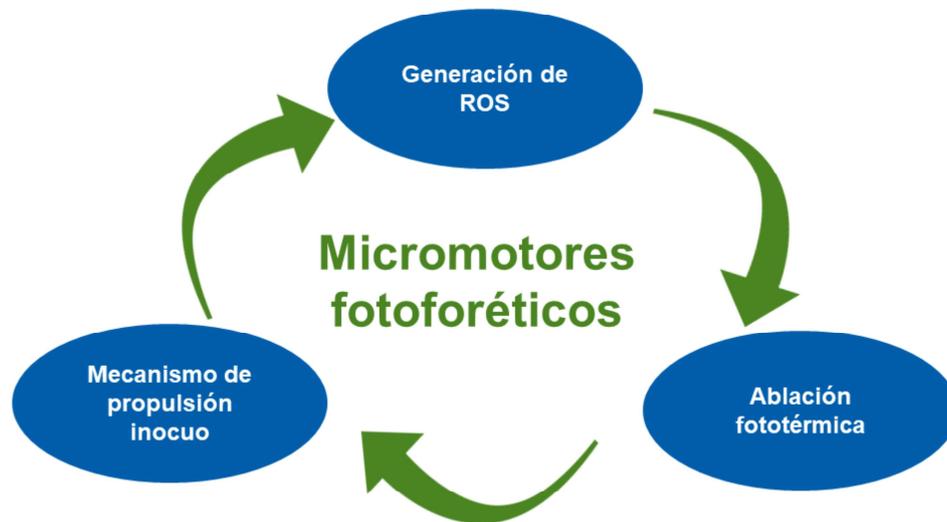
## Introducción

Dicalcogenuros de Metales de Transición (TMD): Generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)



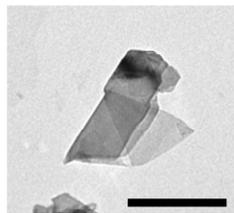
Para la síntesis de estos micromotores, emplearemos los dicalcogenuros de metales de transición o TMD, ya que estos materiales además de poseer propiedades fotoforéticas, son capaces de generar radicales libres en presencia de una luz que se encuentre en el rango de su *band gap*. Esto es debido a que al iluminarse, son capaces de promocionar un electrón desde su banda de valencia a la banda de conducción, dejando un hueco en su estructura electrónica. Estos electrones y huecos son capaces de recombinarse con el agua y el oxígeno disuelto en el medio generando peróxido de hidrógeno, aniones superóxido y radicales hidroxilo, entre otras especies reactivas.

## Hipótesis y objetivos

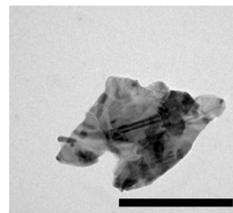


Dada la capacidad de propulsión biocompatible, la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno y la capacidad de los micromotores de dañar las bacterias mediante un mecanismo termoforético inducido por la luz, para esta aplicación optamos por el uso de micromotores fotoforéticos basados en dicalcogenuros de metales de transición.

## Procedimiento experimental



**MoS<sub>2</sub>/PEG-μFlakes**

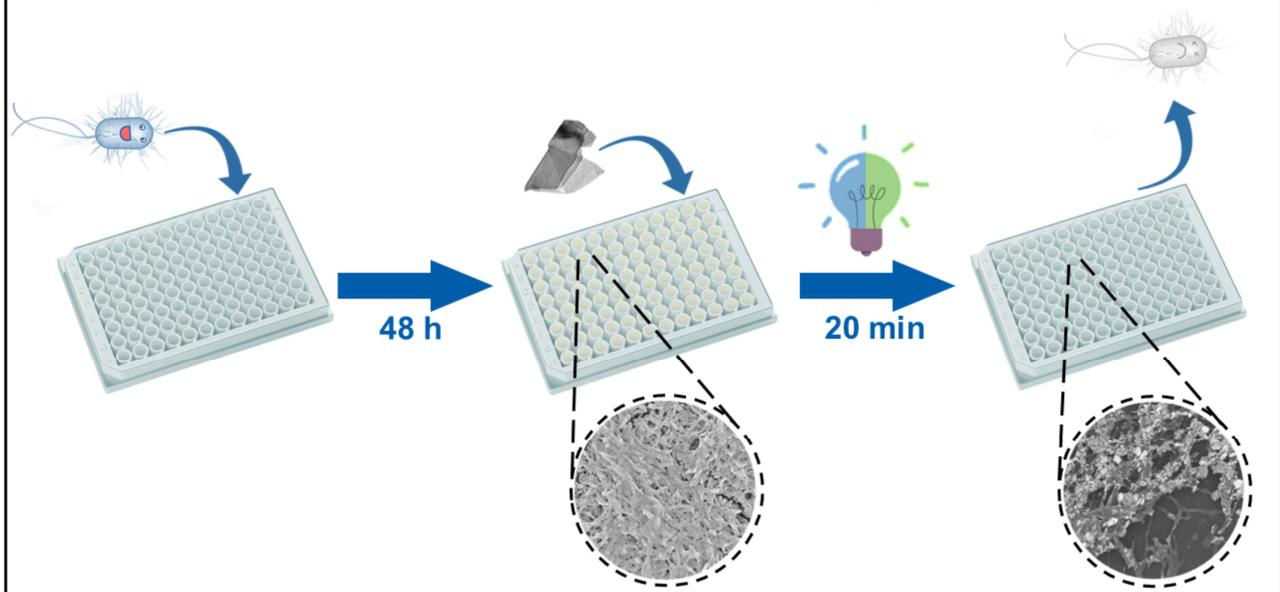


**WS<sub>2</sub>/PEG-μFlakes**

Escala 0,5 μm

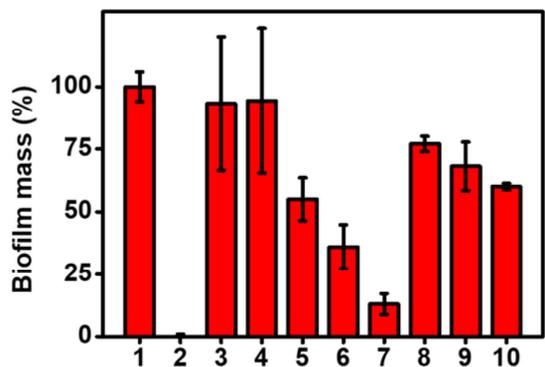
La preparación de estos micromotores es sencilla, ya que se parte del material comercial que se sonica en un homogeneizador por ultrasonidos. Una vez se consigue dispersar los *flakes*, se añade polietilenglicol (PEG) en exceso y se sigue sonicando. Una vez completada la modificación, se separan y se limpian los *flakes* mediante centrifugación obteniendo los micromotores o *microflakes* modificados y listos para su utilización.

## Procedimiento experimental



Para estudiar las capacidades de los *microflakes* para destruir *biofilms*, se cultivaron las bacterias en placas multipocillo durante 48 horas, tras esto se añadieron dispersiones de distintos TMDs (sulfuros de wolframio y de molibdeno), y se utilizó una fuente de luz visible de alta intensidad (535 nm y 480 nm) para producir el movimiento del material y la producción de ROS por parte de los TMDs. Para evaluar la viabilidad del *biofilm* tras el tratamiento, se utilizó cristal violeta y se midió la densidad óptica, comparando los resultados con los pocillos de control positivo y con los blancos.

## Resultados y discusión



- 1 Control
- 2 Blanco
- 3 Crecidas con MoS<sub>2</sub>
- 4 Crecidas con WS<sub>2</sub>
- 5 MoS<sub>2</sub> oscuridad
- 6 MoS<sub>2</sub> azul
- 7 MoS<sub>2</sub> verde
- 8 WS<sub>2</sub> oscuridad
- 9 WS<sub>2</sub> azul
- 10 WS<sub>2</sub> verde

En esta gráfica se pueden observar el porcentaje de *biofilm* que sigue vivo tras el tratamiento. Para calcular el porcentaje, se hizo una recta de calibrado con los controles positivos (*biofilm* sin tratar) y los blancos (pocillos solo con el medio estéril sin ninguna bacteria).

Las condiciones 3 y 4, son el cultivo de los *biofilms* durante 48 horas en presencia de micromotores de sulfuro de molibdeno y de wolframio, respectivamente.

En las columnas 5, 6 y 7, podemos ver el efecto de los *microflakes* sobre los *biofilms* durante 20 minutos en oscuridad, en presencia de luz azul de una longitud de onda de 480 nm, que produce la muerte del 64% de las bacterias y en presencia de luz verde de longitud de onda 535 nm que produce la muerte de un 87% de las bacterias.

Por otra parte, en las columnas 8, 9 y 10 vemos el efecto del sulfuro de wolframio, en oscuridad, en presencia de luz azul y verde, que como puede observarse es menos significativo que el efecto producido por los micromotores basados en sulfuro de wolframio.

## Conclusiones

- **Eliminación de hasta el 87% del biofilm bacteriano en 20 minutos de exposición**
- **La modificación con polietilenglicol (PEG) disminuye la toxicidad del material, aumentando su aplicabilidad en tejidos vivos**
- **La propulsión fotoforética es un mecanismo biocompatible**
- **Síntesis rápida, sencilla y reproducible de los *microflakes***

Por último, podemos concluir que mediante este método, hemos conseguido la eliminación de hasta el 87% del biofilm bacteriano en tan solo 20 minutos de exposición, así como daños significativos en la estructura del *biofilm* facilitando tratamientos simultáneos. Se han modificado los materiales con polietilenglicol, que disminuye la toxicidad del material y aumenta la aplicabilidad de este método en tejidos vivos. Por otra parte, se ha empleado con éxito un método de propulsión biocompatible que no está basado en el uso de combustibles químicos. Finalmente, se ha descrito un método de síntesis de estos micromotores rápida, sencilla y reproducible.

## Bibliografía

- Zobell, C. E., & Anderson, D. Q. (1936). Observations on the multiplication of bacteria in different volumes of stored sea water and the influence of oxygen tension and solid surfaces. *The biological bulletin*, 71(2), 324-342.
- Vickery, K., Pajkos, A., & Cossart, Y. (2004). Removal of biofilm from endoscopes: evaluation of detergent efficiency. *American journal of infection control*, 32(3), 170-176.
- Reffuveille, F., Josse, J., Vallé, Q., Gangloff, C. M., & Gangloff, S. C. (2017). Staphylococcus aureus Biofilms and their Impact on the Medical Field. *The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in Staphylococcus aureus*, (11), 187.
- Even, C., Marlière, C., Ghigo, J. M., Allain, J. M., Marcellan, A., & Raspaud, E. (2017). Recent advances in studying single bacteria and biofilm mechanics. *Advances in colloid and interface science*, 247, 573-588.