



# ***UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA***

***FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS***

***DEPARTAMENTO DE QUÍMICA***

---

***Trabajo de Tesis Doctoral:***

***Interacción de los Materiales Biofuncionales y/o Bioactivos  
con los Medios Biológicos. Riesgos Emergentes y  
Estrategias Innovadoras de Mejora***

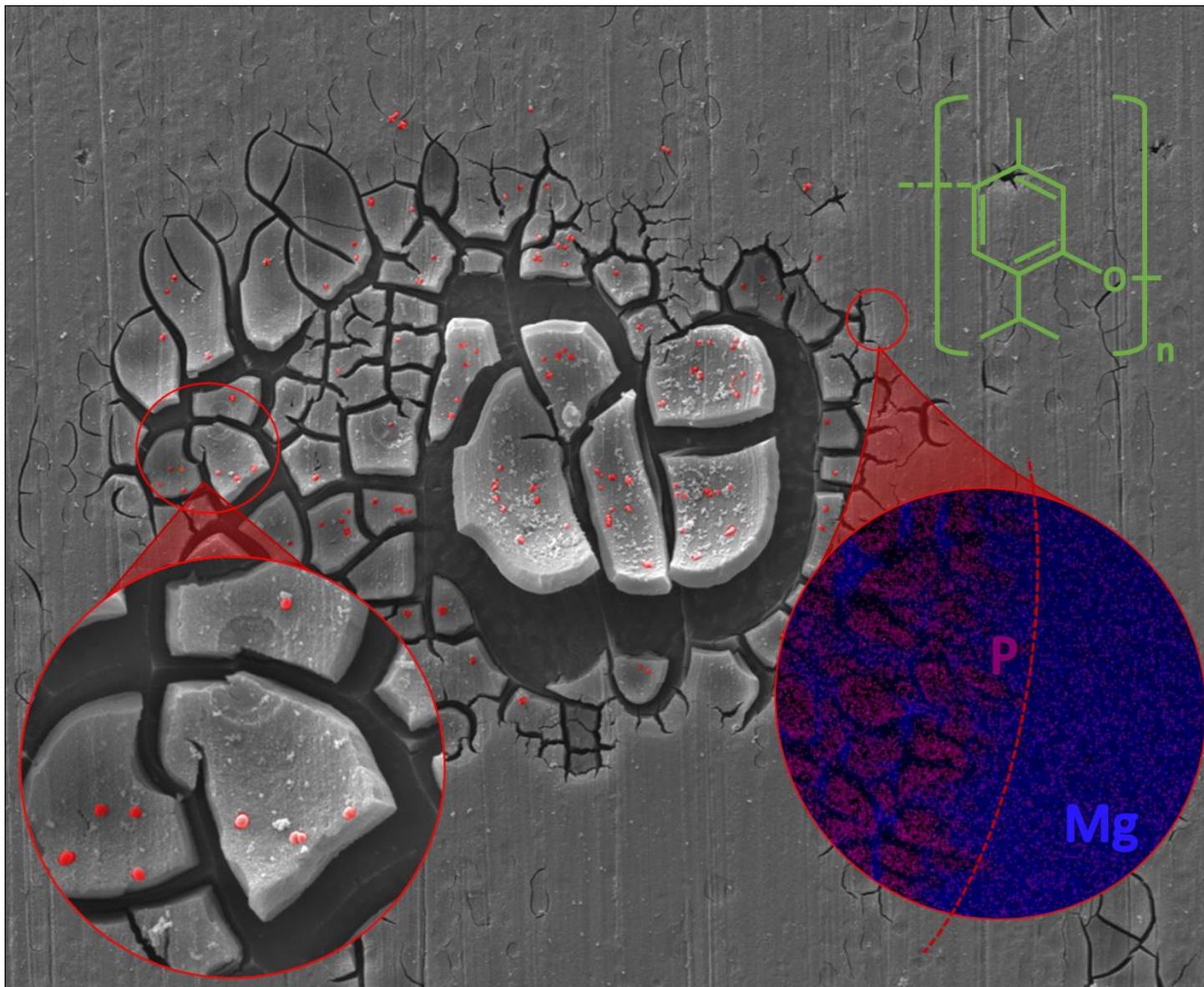
---

***Tesista: Lic. Marcos Bertuola***

***Directora: Dra. Mónica A. Fernández Lorenzo***

***Codirectora: Dra. Claudia A. Grillo***

***Año: 2019***



El presente trabajo de tesis, para optar al grado Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas área Ciencias Químicas, fue realizado en el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de las Dras. Mónica A. Fernández Lorenzo y Claudia A. Grillo.

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional de La Plata y a la Facultad de Ciencias Exactas, por mi formación de posgrado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por haberme otorgado el financiamiento que me permitió dedicarme a este trabajo de tesis.

Al INIFTA y todos sus investigadores, becarios, técnicos y personal administrativo que de alguna forma colaboraron con mi trabajo.

A mis directoras Mónica y Claudia por tanta enseñanza y apoyo científico y moral.

A todos mis compañeros del IMBioMat: Natalia, Claudia T., Claudia G., Egly, Ariel, Maru, Cecilia, Alejandro y Mónica por haberme apoyado tanto tiempo y a los chicos del 3° Norte por compartir tantas experiencias juntos.

Un agradecimiento especial al laboratorio de los Dres. Mónica González y Daniel Mártire por la oportunidad de utilizar el equipo de ATR-FTIR. Muchas gracias al Lic. Damián Rodríguez por la asistencia técnica. Al Dr. Ángel Catalá por la predisposición en la utilización del espectrofotómetro.

Agradezco a mi esposa Victoria por respaldarme creativamente y afectivamente de principio a fin de mi tesis.

Gracias a mi familia por haberme acompañado en este tramo. En especial, gracias a la Nona y a mi abuela Delia por brindarme tanto cariño incondicional. A Papá, a Ana, y mis hermanos por hacer todo lo posible por mis estudios y por todos los momentos felices de mi vida. Gracias a mis tíos Analía, Carlos, Víctor y Roxana, Alejandro y Julia por tanta motivación, apoyo y afecto recibidos.

Agradezco a Oscar y Adrián por tantas anécdotas, por prepararme tanto laboral como profesionalmente y por brindarme la posibilidad de trabajar mientras avanzaba en mi carrera de licenciatura.

Agradezco a todos mis primos y primas que me han ayudado a enfrentar la gran tarea de encarar a la sociedad.

Gracias a todos mis amigos por despejarme tantos fines de semanas, y por hacer mi vida más divertida.

# **Interacción de los materiales biofuncionales y/o bioactivos con los medios biológicos. Riesgos emergentes y estrategias innovadoras de mejora**

## **RESUMEN**

El incremento considerable del uso de biomateriales para implantes ha incentivado el estudio y diseño de nuevos materiales capaces de promover respuestas deseables en los tejidos adyacentes. Los metales biodegradables (MB) que interactúan con los medios biológicos (bioactivos), por ejemplo Cu, Mg y aleaciones son promisorios para la confección de implantes y dispositivos dado que su biofuncionalidad transcurre en simultáneo con la degradación del material. En tal sentido, el control de la velocidad de degradación debe ser óptimo para mantener su integridad mecánica durante la recuperación del tejido y reducir los efectos citotóxicos ocasionados en los tejidos adyacentes por acumulación de iones y nano-micropartículas. Adicionalmente, en la industria, la degradación de materiales metálicos como el Cu genera productos que contaminan el medio ambiente impactando negativamente sobre los organismos vivos. Una alternativa para controlar la degradación metálica es utilizar inhibidores de corrosión, sin embargo, en muchos casos, se desconoce su toxicidad y su impacto ambiental. Otro problema asociado a los MB es la adhesión de bacterias sobre su superficie generando biofilms microbianos que conducen a la falla del implante por falta de fijación en las aplicaciones médicas y a daños de distinto grado en dispositivos e instalaciones industriales.

Frente a los riesgos emergentes de la degradación de los MB y de la susceptibilidad para formar biopelículas microbianas, la utilización de fitocompuestos podría ser una estrategia innovadora y ecocompatible (EIE). Se consideró entonces como hipótesis del presente trabajo, que sería posible adsorber y/o electropolimerizar los fitocompuestos fenólicos (FF) seleccionados sobre superficies de MB, logrando así, controlar la corrosión de manera eficiente y biocompatible e inhibir la adhesión bacteriana sobre las mismas. Se investigó la interacción de FF tales como carvacrol, timol, ácido trans-ferúlico, ácido gálico y aceites esenciales de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* y *Origanum x apalii* con MB de baja tasa de degradación como el Cu y de alta tasa de degradación como el Mg y sus aleaciones, empleando el Pt como control. Los objetivos particulares fueron: evaluar la biocompatibilidad de los FF en sistemas biológicos; estudiar la actividad electroquímica de los FF sobre superficies de Pt, Cu y Mg caracterizando los productos generados; reducir la tasa de degradación del Cu y Mg y sus aleaciones utilizando los FF seleccionados y evaluar los efectos biológicos (mejora de la biocompatibilidad y antiadherencia de bacterias) originados por las modificaciones superficiales de los MB estudiados.

Con esos propósitos, en este trabajo, de características multidisciplinarias, se emplearon diversas técnicas fisicoquímicas y biológicas. Entre ellas se encuentran técnicas electroquímicas (voltamperometría cíclica, cronoamperometría, barridos lineales de potencial, registros de potencial a circuito abierto, curvas de Tafel) que permitieron llevar a cabo y analizar la adsorción y electropolimerización de los FF, así como evaluar la degradación y la inhibición de la corrosión metálica. Se realizaron también estudios superficiales utilizando espectroscopías infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), de dispersión de energía de rayos X (EDS), de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS), microscopía electrónica de barrido (SEM) y de fuerza atómica (AFM) y se emplearon técnicas de absorción atómica y colorimétricas para medición de iones metálicos liberados. Estos estudios se complementaron con ensayos biológicos utilizando cultivos de distintas líneas celulares que incluyeron análisis de biocompatibilidad de las drogas puras y combinadas con productos de degradación metálica y de viabilidad celular de cultivos en contacto con los materiales modificados superficialmente.

Los recubrimientos con electropolímeros de timol (polyTOH) y carvacrol (polyCarv) logrados resultaron altamente protectores de la corrosión del Cu y, consecuentemente, generaron una mejora significativa de la biocompatibilidad, presentando una mayor *performance* las películas poliméricas obtenidas aplicando potencial constante y en particular las de polyCarv, dando lugar a una posible estrategia para su utilización en dispositivos intrauterinos (DIUs) y estructuras en contacto con medios acuosos. Por otra parte, las películas de polyTOH generadas sobre una aleación de Mg revelaron propiedades inhibitorias de la corrosión metálica, reduciendo la formación de precipitados de productos de degradación tales como fosfatos y carbonatos, logrando así disminuir la adhesión bacteriana 30 veces frente al control sin recubrimiento.

En base a los resultados obtenidos se pudo concluir que los FF utilizados son biocompatibles y que, adsorbidos o electropolimerizados sobre las superficies poseen características relevantes para aplicaciones en MB, tales como propiedades antimicrobianas y antibiofilm y capacidad de controlar la velocidad de disolución metálica. Las propiedades resultantes de las modificaciones superficiales variaron según las características del FF (estructura molecular, capacidad de adsorberse y electropolimerizarse sobre la superficie metálica) y del MB (alta o baja velocidad de degradación). Los tratamientos diseñados constituyen EIE de utilidad, tanto para ambientes industriales como médicos, con capacidad de reducir los riesgos emergentes del contacto de los MB y el medio con actividad biológica.

# INDICE GENERAL

|  |    |
|--|----|
| <b>Capítulo 1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....  | 12 |
| <b>1.1.INTRODUCCIÓN</b> .....  | 13 |
| <b>1.1.1. Biomateriales implantables</b> .....   | 14 |
| 1.1.1.1. <i>Biomateriales metálicos biodegradables</i> .....                                 | 16 |
| 1.1.1.2. <i>Biomateriales de baja velocidad de degradación: Cu</i> .....                     | 19 |
| 1.1.1.3. <i>Biomateriales de alta velocidad de degradación: Mg y aleaciones</i> .....        | 20 |
| <b>1.1.2. Control de la velocidad de corrosión con técnicas ecocompatibles</b> .....         | 22 |
| <b>1.1.3. Utilización de fitocompuestos como inhibidores de la corrosión</b> .....           | 23 |
| 1.1.3.1. <i>Electropolimerización de compuestos fenólicos</i> .....                          | 23 |
| <b>1.1.4. Utilización de fitocompuestos como inhibidores de la adhesión bacteriana</b> ..... | 24 |
| 1.1.4.1. <i>Biofilms bacterianos</i> .....   | 24 |
| 1.1.4.2. <i>Métodos de impedir la formación de biofilms</i> .....                            | 26 |
| <b>1.2.OBJETIVOS</b> .....   | 26 |
| <br>   |    |
| <b>Capítulo 2. TÉCNICAS EXPERIMENTALES</b> .....   | 28 |
| <b>A. ENSAYOS FISICOQUÍMICOS</b> .....   | 29 |
| <b>2.1.TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS</b> .....  | 29 |
| 2.1.1. <b>Barrido lineal de potencial</b> .....  | 32 |
| 2.1.2. <b>Voltametría cíclica</b> .....  | 33 |
| 2.1.3. <b>Cronoamperometría</b> .....  | 35 |
| 2.1.4. <b>Registro de potencial a circuito abierto</b> .....                                 | 35 |
| 2.1.5. <b>Equipamiento utilizado para las medidas electroquímicas</b> .....                  | 36 |
| <b>2.2.ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)</b> .....                | 37 |
| <b>2.3.ESPECTROSCOPIA DE FOTOELECTRONES EMITIDOS POR RAYOS X (XPS)</b> .....                 | 39 |
| <b>2.4.MICROSCOPIA ÓPTICA</b> .....  | 40 |
| <b>2.5.MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)</b> .....                                    | 41 |
| <b>2.6.ESPECTROSCOPIA DE DISPERSIÓN DE ENERGÍA DE RAYOS X (EDS)</b> .....                    | 42 |
| <b>2.7.MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM)</b> .....   | 43 |
| <b>B. ENSAYOS BIOLÓGICOS</b> .....   | 45 |
| <b>2.8. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR</b> .....  | 45 |
| 2.8.1. <b>Medio de cultivo (MC)</b> .....  | 45 |
| 2.8.2. <b>Ensayos de citotoxicidad</b> .....   | 45 |
| 2.8.2.1. <i>Ensayo de reducción de MTT</i> .....   | 46 |
| 2.8.2.2. <i>Ensayo de viabilidad mediante tinción con naranja de acridina</i> .....          | 47 |
| 2.8.2.3. <i>Ensayo de formación de colonias</i> .....  | 47 |

|   |    |
|---|----|
| <b>2.8.3. Ensayos microbiológicos</b> .....   | 48 |
| 2.8.3.1. <i>Tratamiento con antibiótico de bacterias sésiles</i> .....  | 48 |
| <b>Capítulo 3. FITOCOMPUESTOS: PROPIEDADES E IMPACTO BIOLÓGICO</b> .....  | 49 |
| <b>3.1. INTRODUCCIÓN</b> .....  | 50 |
| <b>3.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....  | 51 |
| <b>3.3. ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES E IMPACTO BIOLÓGICO</b> .....   | 51 |
| <b>3.3.1. Carvacrol</b> .....   | 51 |
| 3.3.1.1. <i>Ensayos de citotoxicidad realizados con carvacrol</i> .....   | 53 |
| <b>3.3.2. Timol</b> .....   | 53 |
| 3.3.2.1. <i>Ensayos de citotoxicidad realizados con timol</i> .....   | 55 |
| <b>3.3.3. Ácido trans-ferúlico</b> .....  | 55 |
| 3.3.3.1. <i>Ensayos de citotoxicidad realizados con ácido trans-ferúlico</i> .....                                | 56 |
| <b>3.3.4. Ácido gálico</b> .....  | 57 |
| 3.3.4.1. <i>Ensayos de citotoxicidad realizados con ácido gálico</i> .....  | 58 |
| <b>3.3.5. Análisis comparativo de los resultados de los compuestos puros</b> .....                                | 59 |
| <b>3.3.6. Aceites esenciales de tomillo y orégano</b> .....   | 60 |
| 3.3.6.1. <i>Thymus vulgaris</i> .....   | 60 |
| 3.3.6.1.A. <i>Ensayos de citotoxicidad realizados con aceite de Thymus vulgaris</i> ....                          | 61 |
| 3.3.6.2. <i>Origanum vulgare</i> .....  | 61 |
| 3.3.6.2.A. <i>Ensayos de citotoxicidad realizados con aceite de Origanum vulgare</i> ...                          | 62 |
| 3.3.6.3. <i>Origanum x applii</i> .....   | 63 |
| 3.3.6.3.A. <i>Ensayos de citotoxicidad realizados con aceite de Origanum x applii</i> . .                         | 63 |
| <b>3.3.7. Análisis comparativo de los resultados de los aceites esenciales</b> .....                              | 64 |
| <b>3.4. CONCLUSIONES</b> .....  | 65 |
| <b>Capítulo 4. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS RESPUESTAS FISICOQUÍMICAS DE LOS FITOCOMPUESTOS SOBRE Pt Y Cu</b> ..... | 66 |
| <b>4.1. INTRODUCCIÓN</b> .....  | 67 |
| <b>4.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....  | 68 |
| <b>4.2.1. Estudio del comportamiento electroquímico de los fitocompuestos</b> .....                               | 68 |
| <b>4.2.2. ATR-FTIR de los productos generados a partir de ensayos electroquímicos</b> .....                       | 69 |
| <b>4.2.3. Ensayo de capacidad inhibitoria de la corrosión del Cu con tratamiento</b> ...                          | 69 |
| <b>4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....  | 69 |
| <b>A. RESPUESTA ELECTROQUÍMICA DE FITOCOMPUESTOS SOBRE Pt. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS FORMADOS</b> .....   | 69 |
| <b>4.3.1. Respuesta electroquímica de fitocompuestos sobre Pt</b> .....   | 69 |

|               |  |     |
|---------------|--|-----|
| 4.3.1.1       | <i>Carvacrol y timol</i> .....   | 70  |
| 4.3.1.2.      | <i>Ácido trans-ferúlico</i> .....  | 72  |
| 4.3.1.3.      | <i>Ácido gálico</i> .....  | 73  |
| 4.3.1.4.      | <i>Aceite esencial de Thymus vulgaris</i> .....  | 74  |
| 4.3.1.5.      | <i>Aceite esencial de Origanum vulgare</i> .....   | 76  |
| 4.3.1.5.A.    | Comparación del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> con la mezcla Carv/TOH.....                                 | 77  |
| 4.3.1.6.      | <i>Aceite esencial de Origanum x applii</i> .....  | 78  |
| 4.3.1.7.      | <i>Evaluación comparativa de los resultados obtenidos con los distintos fitocompuestos</i> .....                       | 79  |
| <b>4.3.2.</b> | <b>Caracterización de los productos de oxidación de los fitocompuestos formados sobre Pt. Espectros ATR-FTIR</b> ..... | 79  |
| 4.3.2.1.      | <i>Carvacrol y timol</i> .....   | 80  |
| 4.3.2.2.      | <i>Ácido trans-ferúlico</i> .....  | 82  |
| 4.3.2.3.      | <i>Ácido gálico</i> .....  | 84  |
| 4.3.2.4.      | <i>Aceite esencial de Thymus vulgaris</i> .....  | 85  |
| 4.3.2.5.      | <i>Aceite esencial de Origanum vulgare</i> .....   | 86  |
| 4.3.2.6.      | <i>Aceite esencial de Origanum x applii</i> .....  | 87  |
| <b>4.3.3.</b> | <b>Comparación de los resultados obtenidos por voltamperometría cíclica y espectroscopía ATR-FTIR sobre Pt</b> .....   | 88  |
| <b>B.</b>     | <b>RESPUESTA ELECTROQUÍMICA DE FITOCOMPUESTOS SOBRE Cu. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS FORMADOS</b> .....           | 89  |
| <b>4.3.4.</b> | <b>Respuesta electroquímica de fitocompuestos sobre Cu</b> .....   | 89  |
| 4.3.4.1.      | <i>Carvacrol y timol</i> .....   | 89  |
| 4.3.4.2.      | <i>Ácido trans-ferúlico</i> .....  | 90  |
| 4.3.4.3.      | <i>Ácido gálico</i> .....  | 93  |
| 4.3.4.4.      | <i>Aceite esencial de Thymus vulgaris</i> .....  | 94  |
| 4.3.4.5.      | <i>Aceite esencial de Origanum vulgare</i> .....   | 96  |
| 4.3.4.6.      | <i>Aceite esencial de Origanum x applii</i> .....  | 98  |
| <b>4.3.5.</b> | <b>Caracterización de los productos de oxidación de los fitocompuestos formados sobre Cu. Espectros ATR-FTIR</b> ..... | 99  |
| 4.3.5.1.      | <i>Timol y Carvacrol</i> .....   | 99  |
| 4.3.5.2.      | <i>Ácido trans-ferúlico</i> .....  | 100 |
| 4.3.5.3.      | <i>Ácido gálico</i> .....  | 103 |
| 4.3.5.4.      | <i>Aceite esencial de Thymus vulgaris</i> .....  | 105 |
| 4.3.5.5.      | <i>Aceite esencial de Origanum vulgare</i> .....   | 106 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.3.6. Evaluación de la susceptibilidad a la corrosión del Cu antes y después de los tratamientos realizados .....   | 107 |
| 4.3.7. Comparación de los resultados obtenidos por voltamperometría cíclica y espectroscopía ATR-FTIR sobre Cu ..... | 109 |
| 4.4. CONCLUSIONES .....  | 110 |
| <b>Capítulo 5. MATERIALES METÁLICOS CON BAJA VELOCIDAD DE DEGRADACIÓN</b> .....                                      | 113 |
| 5.1. INTRODUCCIÓN .....  | 114 |
| 5.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....  | 116 |
| 5.2.1. Materiales .....  | 116 |
| 5.2.2. Ensayos biológicos .....  | 117 |
| 5.2.2.1. Ensayos de viabilidad celular mediante reducción de MTT .....   | 117 |
| 5.2.2.2. Ensayos de viabilidad celular mediante naranja de acridina .....  | 118 |
| 5.2.2.3. Ensayo clonogénico .....  | 118 |
| 5.2.3. Ensayos fisicoquímicos (superficiales y electroquímicos).....   | 119 |
| 5.2.3.1. Ensayos de adsorción de carvacrol y timol sobre Cu .....  | 119 |
| 5.2.3.2. Ensayos electroquímicos .....   | 119 |
| 5.2.3.2.A. Formación de películas electropolimerizadas sobre Cu .....  | 119 |
| 5.2.3.2.B. Ensayos electroquímicos de corrosión .....  | 120 |
| 5.2.3.3. Análisis superficial por XPS, ATR-FTIR, AFM y SEM.....  | 121 |
| 5.2.3.4. Medidas de liberación de iones Cu <sup>2+</sup> .....   | 122 |
| 5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....  | 122 |
| 5.3.1. Estudio de la capacidad antioxidante de los fitocompuestos frente a extractos de Cu .....                     | 123 |
| 5.3.2. Ensayos de adsorción de carvacrol y timol sobre Cu.....   | 127 |
| 5.3.2.1. Análisis superficial por ATR-FTIR y XPS.....  | 127 |
| 5.3.2.2. Ensayos electroquímicos de reducción de óxidos formados en adCarvCu y adTOHCu.....                          | 130 |
| 5.3.2.3. Ensayos de viabilidad celular en función de la distancia al metal .....                                     | 133 |
| 5.3.3. Formación de electropolímeros de carvacrol y timol sobre Cu y su impacto biológico .....                      | 135 |
| 5.3.3.1. Electropolimerización potenciodinámica de carvacrol y timol sobre Cu .....                                  | 136 |
| 5.3.3.1.A. Formación de películas poliméricas de timol y carvacrol sobre Cu.....                                     | 136 |
| 5.3.3.1.B. Microscopía AFM de las películas de polyCarv y polyTOH .....  | 139 |
| 5.3.3.1.C. Respuesta electroquímica de las películas de polyCarv y polyTOH sobre Cu en solución de cloruros .....    | 139 |
| 5.3.3.1.D. Medidas de liberación de iones Cu <sup>2+</sup> .....   | 142 |

|   |     |
|---|-----|
| 5.3.3.1.E. Espectroscopía ATR-FTIR de las películas poliméricas de polyCarv y polyTOH obtenidas sobre Cu .....  | 144 |
| 5.3.3.1.F. Análisis XPS de las películas poliméricas sobre Cu .....   | 146 |
| 5.3.3.1.G. Ensayos de viabilidad celular.....   | 148 |
| 5.3.3.2. <i>Electropolimerización potenciales estática de carvacrol y timol sobre Cu</i> .....  | 149 |
| 5.3.3.2.A. Registros cronoamperométricos .....  | 150 |
| 5.3.3.2.B. Espectroscopía ATR-FTIR de las películas poliméricas de fitocompuestos obtenidas sobre Cu .....  | 152 |
| 5.3.3.2.C. Microscopía AFM de las películas de polyCarv y polyTOH .....   | 159 |
| 5.3.3.2.D. Liberación de iones $\text{Cu}^{2+}$ en presencia y ausencia de películas poliméricas.....   | 164 |
| 5.3.3.2.E. Mecanismo de formación de polyTOH y polyCarv utilizando modelos de nucleación y crecimiento .....  | 165 |
| 5.3.3.2.F. Análisis comparativo de las características de las películas obtenidas.  | 168 |
| 5.3.3.2.G. Ensayos biológicos: ensayo clonogénico.....  | 169 |
| 5.3.3.3. <i>Mecanismo de polimerización propuesto</i> .....   | 172 |
| 5.3.3.4. <i>Estudio comparativo de la electropolimerización de Carv y TOH combinados y aceites esenciales de Thymus vulgaris y Origanum vulgare</i> ..... | 174 |
| 5.3.3.5. <i>Comportamiento de polyCarvCu-400mV en fluido uterino</i> .....  | 179 |
| <b>5.4. CONCLUSIONES</b> .....  | 182 |
| <br>  |     |
| <b>Capítulo 6. MATERIALES METÁLICOS CON ALTA VELOCIDAD DE DEGRADACIÓN</b>   | 186 |
| <b>6.1. INTRODUCCIÓN</b> .....  | 187 |
| <b>6.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....  | 188 |
| 6.2.1. <b>Materiales</b> .....  | 188 |
| 6.2.2. <b>Ensayos fisicoquímicos (superficiales y electroquímicos)</b> .....  | 189 |
| 6.2.2.1. <i>Ensayos electroquímicos</i> .....   | 189 |
| 6.2.2.1.A. Formación de películas electropolimerizadas sobre Mg y aleaciones ..   | 189 |
| 6.2.2.1.B. Ensayos electroquímicos de corrosión.....  | 190 |
| 6.2.2.2. <i>Análisis superficial por ATR-FTIR y SEM</i> .....   | 190 |
| 6.2.2.3. <i>Medidas de liberación de iones <math>\text{Mg}^{2+}</math></i> .....  | 190 |
| 6.2.3. <b>Ensayos biológicos</b> .....  | 191 |
| 6.2.3.1. <i>Ensayos de viabilidad celular sobre la superficie</i> .....   | 191 |
| 6.2.3.2. <i>Ensayos microbiológicos</i> .....   | 191 |
| 6.2.3.3. <i>Tratamiento mixto de bacterias sésiles utilizando películas poliméricas y un antibiótico</i> .....  | 192 |
| <b>6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....  | 192 |
| 6.3.1. <b>Electroformación de polímeros de timol y carvacrol sobre Mg</b> .....   | 192 |
| 6.3.1.1. <i>Registros potenciodinámicos</i> .....   | 192 |

|  |            |
|--|------------|
| 6.3.1.2. Respuesta electroquímica de las películas de polyCarv y polyTOH sobre Mg en medio biológico DMEM .....  | 193        |
| <b>6.3.2. Electroformación de polímeros de timol, carvacrol y ácido trans-ferúlico sobre AZ31 .....</b>  | <b>196</b> |
| 6.3.2.1. Registros potenciodinámicos.....  | 196        |
| 6.3.2.2. Espectros ATR-FTIR de electropolímeros sobre AZ31.....  | 198        |
| 6.3.2.3. Ensayos de corrosión en medio biológico DMEM.....   | 201        |
| 6.3.2.4. Distribución específica de bacterias sobre AZ31. Protección de la corrosión e inhibición de la adhesión bacteriana por una película polimérica de timol | 204        |
| 6.3.2.4.A. Análisis de la corrosión de AZ31 por SEM y EDS .....  | 204        |
| 6.3.2.4.B. Distribución de bacterias adheridas sobre AZ31 sin recubrimiento durante la degradación .....   | 207        |
| 6.3.2.4.C. Estudios de corrosión y caracterización de productos de corrosión formados sobre polyTOH-AZ31 .....   | 209        |
| 6.3.2.4.D. Liberación de iones Mg <sup>2+</sup> de polyTOH-AZ31 y AZ31 en caldo nutritivo .  | 210        |
| 6.3.2.4.E. Análisis EDS de las zonas corroídas en polyTOH-AZ31 .....   | 212        |
| 6.3.2.4.F. Distribución y conteo de bacterias adheridas a polyTOH-AZ31.....  | 214        |
| 6.3.2.4.G. Tratamiento con antibiótico de las bacterias adheridas sobre AZ31 y polyTOH-AZ31.....   | 215        |
| 6.3.2.4.H. Ensayo de viabilidad celular sobre polyTOH-AZ31 .....   | 217        |
| 6.3.2.4.I. Interacciones de las bacterias con los productos de corrosión formados sobre AZ31 y polyTOH-AZ31 .....  | 218        |
| 6.3.2.4.J. Conclusiones de efectos encontrados en AZ31 y polyTOHAZ31.....  | 221        |
| <b>6.3.3. Electropolimerización de timol y carvacrol sobre ZEK100 .....</b>  | <b>222</b> |
| 6.3.3.1. Registros potenciodinámicos.....  | 222        |
| 6.3.3.2. Ensayos de corrosión en medio biológico DMEM.....   | 225        |
| <b>6.4. CONCLUSIONES .....</b>   | <b>227</b> |
| <b>Capítulo 7. CONCLUSIONES GENERALES .....</b>  | <b>229</b> |
| <b>Referencias bibliográficas .....</b>  | <b>236</b> |
| <b>Apéndice.....</b>   | <b>249</b> |
| A.1. Estudio de la capacidad antioxidante de los fitocompuestos frente a sustancias oxidantes .....  | 249        |
| A.2. Comparación de la adhesión bacteriana en polyCarv-AZ31 y polyTOH-AZ31 .....   | 251        |
| A.3. Abreviaturas utilizadas en el texto .....   | 253        |
| <b>TRABAJOS EN EVENTOS CIENTÍFICO-TECNOLÓGICOS PUBLICADOS .....</b>  | <b>255</b> |
| <b>TRABAJOS PUBLICADOS EN REVISTAS INDEXADAS .....</b>   | <b>255</b> |

# **Introducción general**

## **Capítulo 1**

## Capítulo 1- Introducción general

### 1.1. INTRODUCCIÓN

La degradación de los materiales metálicos en medios biológicos es un aspecto importante a tener en cuenta debido a los riesgos asociados a la salud y al medio ambiente de los productos de corrosión. Las consecuencias ambientales de la corrosión metálica, debido a la generación de desechos producto del deterioro de los materiales, son severas y complejas y frecuentemente se extienden mucho más allá del impacto económico provocado por las pérdidas de material [1–3]. La contaminación por metales puede presentar riesgos para los seres humanos y el ecosistema debido a la ingestión directa o al contacto con la fuente contaminada, la bioacumulación en la cadena alimenticia, la reducción de la calidad de los alimentos a través de la fitotoxicidad, etc. [4]. Algunos iones metálicos, como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$  y  $\text{Co}^{+2}$  entre otros, presentes en materiales implantables, pueden inducir la formación de especies reactivas que generan en el ser humano daño en el ADN, peroxidación lipídica y cambios conformacionales en las proteínas que pueden conducir a la modulación del ciclo celular, carcinogénesis o apoptosis [1,2,5–7]. Asimismo, diversos reportes hacen referencia a incertidumbres sobre la toxicidad de los metales nano-particulados y a la necesidad de obtener más información sobre el manejo de los mismos para prevenir los efectos sobre la salud y el medio ambiente después de una exposición prolongada [8]. Diversos trabajos reportan que la toxicidad de Zn, Cu y Fe causa disminución en el crecimiento, desarrollo y metabolismo, y provoca la inducción de daño oxidativo en macromoléculas de varias especies de plantas. El daño oxidativo de dichos metales genera efectos mutagénicos debido a modificaciones en las bases del ADN, enlaces cruzados entre ácidos nucleicos y las proteínas, rupturas de cadenas y reordenamientos del ADN [9]. De manera similar, considerando los ecosistemas acuáticos, la ingesta tanto de Cu como de Fe induce una disminución de la tasa de crecimiento de diversos organismos debido al estrés oxidativo producido por un aumento de radicales libres y la acumulación específica de dichos metales en los tejidos [10].

Debido a la biodegradación de los metales (Materiales Biodegradables: MB) existen diversos métodos de control y prevención de dicha degradación que incluyen el uso de inhibidores de la corrosión, sustancias que, cuando se agregan en pequeñas concentraciones a los medios corrosivos, disminuyen o evitan la reacción del metal con el medio. Aunque muchos compuestos sintéticos evidencian una excelente actividad anticorrosiva, la mayoría de ellos son altamente tóxicos para los seres humanos y el medio

ambiente. Dichas consecuencias han llevado en los últimos años a la implementación de productos naturales como inhibidores de la corrosión ecológicos e inocuos, como una rama de la química conocida como “química verde”. Entre ellos se pueden mencionar varios inhibidores de la corrosión ecológicos alternativos, que comprenden desde tierras raras hasta compuestos orgánicos [11].

El uso de fitocompuestos en la implementación de estrategias de modificación superficial de materiales metálicos podría dar lugar a la generación de superficies multifuncionales debido a sus características antimicrobianas, antioxidantes y biocompatibles y su posible capacidad de funcionar como inhibidores de la corrosión. Por ese motivo se asume como hipótesis de trabajo que es posible reducir o controlar la degradación de materiales metálicos utilizados tanto en la industria como en la biomedicina, mediante estrategias de mejora que utilicen fitocompuestos y asimismo, considerando la capacidad antimicrobiana de los mismos, podrían inhibir la formación de biofilms bacterianos sobre las superficies de MB. En consecuencia, podrían disminuirse los efectos adversos que se producen en el organismo y en el medio ambiente.

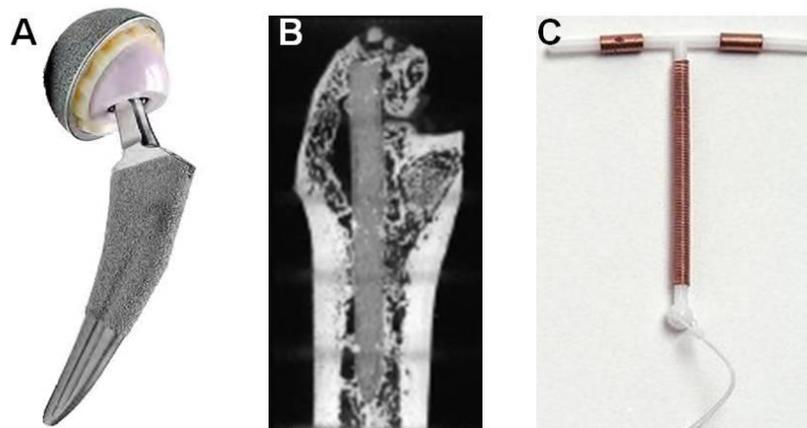
### **1.1.1. Biomateriales implantables**

Un biomaterial es un material “no viable” utilizado en un dispositivo médico, destinado a interactuar con los sistemas biológicos. La investigación y el desarrollo de biomateriales han sido impulsados por los avances en biología celular y molecular, química, ciencia de materiales e ingeniería. Los biomateriales y los dispositivos médicos que ellos componen se emplean comúnmente como prótesis en cirugía cardiovascular, ortopédica, dental, oftalmológica y reconstructiva, y en otras intervenciones como suturas quirúrgicas, bioadhesivos y dispositivos de liberación controlada de fármacos. Se pueden citar algunos ejemplos tales como reemplazo de válvula cardíaca fabricadas a base de elastómeros, plásticos, metales o fibras de carbono; prótesis de articulación de cadera a base de titanio, acero inoxidable, aleaciones especiales de alta resistencia, cerámica, materiales compuestos y polímeros; implantes y prótesis dentales generalmente a base de titanio, alúmina y fosfato de calcio; *stents* fabricados generalmente de aleaciones de titanio-níquel, entre otros [12].

Para que un material pueda ser empleado como biomaterial debe ser biocompatible, o sea debe generar una respuesta adecuada del tejido y del organismo hospedador en una

aplicación específica, evitando una respuesta inflamatoria, reacciones alérgicas y efectos carcinogénicos [12,13]. En base a la biocompatibilidad, los biomateriales pueden ser biotolerantes, inertes, biodegradables o bioactivos. Los materiales biotolerantes provocan una respuesta mínima de los tejidos del hospedador y en ocasiones son aislados por tejidos fibrosos. Si bien todo material implantado genera una respuesta de los tejidos vivos, se considera al titanio como biomaterial inerte, ya que la liberación de iones del Ti y la respuesta del organismo hospedador son mínimas (Fig.1.1A). Por su parte un biomaterial metálico biodegradable (BMB) suministra un soporte mecánico temporal hasta que el tejido natural se regenere y recupere su estructura y funcionalidad. Para que un dispositivo de soporte temporal funcione correctamente debe producirse una transferencia de tensión gradual: a medida que el tejido natural se regenera, el implante degradable debe debilitarse gradualmente (Fig.1.1B). Por otro lado, los materiales bioactivos son intermedios entre los reabsorbibles (BMB) y los bioinertes. Un material bioactivo provoca una respuesta biológica específica en la interfaz del material, lo que resulta en la formación de interacciones entre los tejidos y el material.

En los últimos años se ha incrementado considerablemente tanto la utilización de biomateriales metálicos implantables como el diseño de nuevos materiales biofuncionales capaces de promover respuestas deseables en las células y tejidos que entran en contacto con el implante y que pueden además interactuar con los medios biológicos.



*Fig. 1.1. Ejemplos de biomateriales. A) Articulación de cadera a base de titanio, inerte; B) Implante ortopédico a base de magnesio, biodegradable; C) DIU a base de cobre, biofuncional.*

Estos materiales biofuncionales están diseñados para ser sensibles a estímulos, detectando y respondiendo al entorno fisiológico circundante. Como ejemplo de biomateriales metálicos implantables y biofuncionales se pueden citar los dispositivos intrauterinos (DIU) ya sea a base de hormonas o a base de cobre (Fig. 1.1C) utilizados como sistemas anticonceptivos. En este último caso el alambre de cobre se puede considerar BMB de baja velocidad de degradación.

#### 1.1.1.1. Biomateriales metálicos biodegradables

Dentro de la variedad de biomateriales existente en el desarrollo de este trabajo de tesis nos ocuparemos del cobre, componente de los DIUs que es un BMB de baja velocidad de degradación y de los BMB base Mg, de alta velocidad de degradación. Los DIUs constituyen uno de los métodos de anticoncepción reversible más utilizada en el mundo por su bajo costo y efectividad por un período extenso (entre 5 y 10 años) [14]. Como se observa en la Fig.1.1C, los DIUs a base de Cu están formados por un tallo de plástico en forma de T que se adapta a la cavidad uterina, sobre el cual se enrolla un alambre de Cu electrolítico puro. Dichos dispositivos exhiben su efecto anticonceptivo a través de la disolución de iones de cobre, que crea una respuesta inflamatoria estéril y espermicida a nivel del endometrio, disminuyendo así la movilidad del esperma en el mucus cervical. Los estudios *in útero* e *in vivo* de DIUs de cobre evidencian, luego de la inserción, una liberación inicial exacerbada de iones cúpricos denominada *burst release*, seguido de una estabilización de la liberación de cobre a lo largo del tiempo. Múltiples factores influyen en la velocidad de liberación de cobre, incluido el pH del fluido uterino, la fase del ciclo menstrual, la liberación de hemoglobina durante la menstruación y las concentraciones locales de urea intrauterina, proteínas y oxígeno [14]. Se ha reportado que la exposición a altas concentraciones de iones  $\text{Cu}^{2+}$  de los tejidos alrededor del DIU aumentan la respuesta inflamatoria generando cambios histológicos y celulares en el endometrio y en el cérvix [15], por lo que debería evitarse el *burst release* inicial controlando la liberación de cobre mediante métodos biocompatibles.

Los BMB base Mg tienen una extensa aplicación en una amplia gama de especialidades tales como ortopédica, odontológica, cardiovascular, ginecológica, etc. [16,17] debido a su alta resistencia y tenacidad, resistencia a la fatiga y fácil procesamiento [18]. Los BMB son metales que sufren un proceso de degradación *in vivo* que debe ser controlado ya que, al igual que los DIU, debe producir una respuesta adecuada del huésped frente a los

productos de corrosión liberados. En el caso de los BMB, su degradación debe ser paralela a la regeneración del tejido dañado, llegando a la disolución completa cuando se ha logrado la reparación íntegra de la lesión. La necesidad de ajustar la velocidad de degradación de un dispositivo de soporte temporal para la renovación del tejido circundante representa uno de los principales desafíos en el diseño de dichos dispositivos. Por lo tanto, los componentes principales de los BMB deben ser elementos metálicos esenciales que puedan ser metabolizados por el organismo y demostrar tasas y modos de degradación apropiados [19].

Como ejemplos de BMB se encuentran los *stents* y los implantes ortopédicos biodegradables a base de Mg (Fig.1.1B). Los *stents* biodegradables surgen como alternativa a los permanentes de acero inoxidable 316L debido a ciertas limitaciones que incluyen disfunción endotelial a largo plazo, retardo en la remodelación del endotelio, altos índices de trombogénesis, reacciones locales inflamatorias e irritación crónicas, desajustes en el comportamiento mecánico entre áreas de vasos con y sin *stent*, incapacidad para adaptarse al crecimiento en pacientes jóvenes, entre otras [20]. En contraste, aquéllos a base de Mg presentan una baja tasa de trombogénesis, son biocompatibles y no carcinogénicos [20]. Generalmente, dado que el Mg puro posee una acelerada degradación, los estudios *in vivo* se centran en aleaciones base Mg, las cuales han logrado una positiva remodelación vascular y la ampliación del diámetro del lumen, resultados similares a los obtenidos con otros *stents* metálicos pero con la posibilidad de degradarse de manera segura después de 4 meses [19,20].

Por otro lado, el empleo de materiales base Mg como implantes ortopédicos degradables presentaría grandes ventajas debido a su biocompatibilidad, efecto oseointeractivo, y la capacidad de modular la tasa de degradación mediante elementos aleantes y modificaciones superficiales [19,21]. Dada la capacidad del organismo del hospedador para recuperar y regenerar gradualmente el tejido dañado, un BMB a base de Mg ofrecería una reparación fisiológicamente menos invasiva que los implantes permanentes y, a su vez, un soporte temporal durante la recuperación del tejido óseo, tal como se observa en la Fig. 1.1B. Después de cumplir su función, este implante sería eliminado, siendo reabsorbido por el organismo humano [22]. La regeneración ósea ocurre en tres etapas: inflamación, reparación y remodelación, como se muestra en la Fig. 1.2. En los primeros días de la lesión, ocurre una respuesta inflamatoria típica debido a la presencia de hematomas (1-7 días). Luego toma lugar la fase de reparación, en la cual durante las

primeras dos o tres semanas posteriores a la lesión se forma el callo blando, involucrando la proliferación y diferenciación de células en osteoblastos (células que formarán el nuevo tejido óseo), osteoclastos (células que reabsorben y remodelan el hueso) y condroblastos (células que crean tejidos cartilagosos), para dar lugar posteriormente a la mineralización. El proceso de reparación puede durar entre 3 y 6 meses dependiendo la configuración y ubicación de la fractura, el estado de los tejidos blandos adyacentes y las características del paciente. Finalmente, el nuevo tejido óseo es reemplazado por hueso cortical y se restaura la cavidad medular en la etapa de remodelación ósea que puede llevar varios años [19].

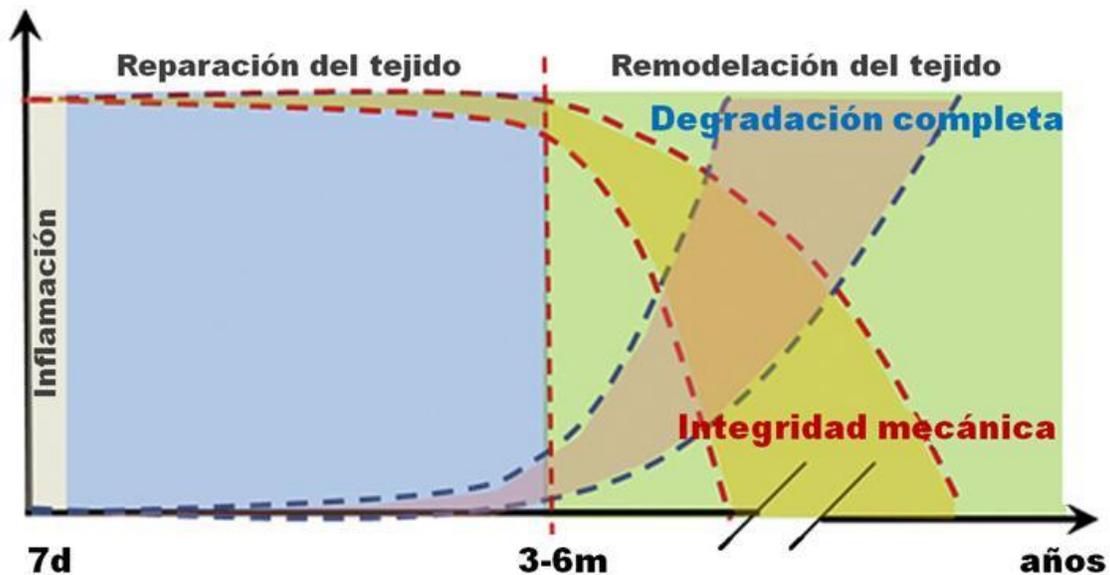


Fig. 1.2. Esquema del comportamiento de degradación y el cambio de la integridad mecánica de los BMB durante el proceso de regeneración ósea. Modificado de Witte et al. [19].

Debe considerarse que durante la interacción de los biomateriales implantables con medios biológicos activos, los productos de degradación y desgaste son acumulados localmente en tejidos aledaños pudiendo inducir daño en el ADN, peroxidación lipídica y modificaciones en las proteínas [5,23]. Por lo tanto, resulta de interés el estudio de la toxicidad potencial de los nuevos biomateriales incluyendo la seguridad de su implementación [24] y su impacto en los medios biológicos [25,26], así como la necesidad de mejorar la biocompatibilidad de muchos de ellos [8]. Por estos motivos su degradación debe ser minuciosamente controlada mediante métodos biocompatibles.

Tal como se mencionó previamente, los BMB se pueden clasificar de acuerdo a su velocidad de degradación. Un aspecto interesante relacionado con el estudio de la corrosión se refiere a la liberación de iones metálicos al medio que puede generar toxicidad en el tejido o ambiente aledaño [1]. En particular, la alta velocidad de corrosión de los materiales implantables base Mg produce cambios locales de pH, liberación de iones  $Mg^{2+}$  y burbujas de  $H_2$  induce efectos nocivos al tejido de las zonas aledañas al implante y disminuye las propiedades mecánicas del metal [19,27–30]. Para reducir los efectos nocivos de la biodegradación de los BMB se han desarrollado diversas aleaciones con componentes adecuados y modificaciones superficiales como estrategias para controlar la tasa de corrosión pero no se ha hallado una solución definitiva para eliminar dichos efectos.

#### 1.1.1.2. Biomateriales de baja velocidad de degradación: Cu

Los MB base Cu se utilizan ampliamente en la industria debido a sus excelentes propiedades térmicas, conductividad eléctrica y maleabilidad. Por otra parte, la industria médica ha invertido en investigaciones en Cu y sus aleaciones ya que pueden ser utilizados para transporte de señales, en pequeños implantes, en herramientas de diagnóstico, en DIUs y también para aplicaciones odontológicas. La liberación de iones  $Cu^{2+}$  al estar en contacto con medios acuosos genera especies radicalarias reactivas que pueden conducir al daño del tejido circundante por peroxidación lipídica, roturas de cadenas de ácidos nucleicos, depleción de sulfhidrilos de proteínas, entre otros efectos [31–33]. Los iones  $Cu^{2+}$  provenientes de la degradación del Cu metálico, son reducidos a  $Cu^{1+}$  en presencia de reductores biológicos como el glutatión (principal antioxidante celular). Los iones  $Cu^{1+}$  son capaces de catalizar la formación de radicales hidroxilos ( $\bullet OH$ ) a través de la descomposición de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por la reacción de Fenton.



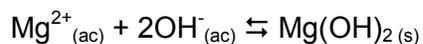
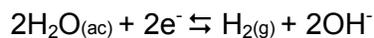
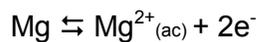
Se ha demostrado que utilizando compuestos con alto poder antioxidante, como el ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), desferoxamina, manitol, entre otros, en presencia de Cu metálico o iones actúan previniendo la peroxidación lipídica, secuestrando especies reactivas de oxígeno (ROS) y consecuentemente impidiendo el daño celular inducido [31,32]. Por este motivo, es de esperarse que otros compuestos naturales antioxidantes puedan actuar de forma similar.

Por otro lado, la liberación de iones cobre produce otros efectos perjudiciales en ambientes industriales que es necesario disminuir. Se han propuesto una amplia variedad de compuestos orgánicos sintéticos como inhibidores de la corrosión en forma de films adsorbidos sobre la superficie metálica [34,35]. Sin embargo, algunos de ellos que contienen heterociclos han impactado negativamente en el medio ambiente [1,34–37], pudiendo causar daños reversibles (temporales) o irreversibles (permanentes) en seres vivos. Su toxicidad puede manifestarse durante la síntesis, aplicación o disposición final del compuesto [38]. Consecuentemente, es necesario idear estrategias ecocompatibles que permitan controlar la disolución del cobre.

### 1.1.1.3. Biomateriales de alta velocidad de degradación: Mg y aleaciones

Tal como se ha mencionado previamente, el Mg y sus aleaciones son BMB que se han propuesto como implantes temporales ortopedicos y cardiovasculares debido a sus destacadas propiedades mecánicas frente a otros tipos de materiales biodegradables. En particular, diversos parámetros como la densidad, módulo elástico, resistencia a la compresión y tracción del Mg y sus aleaciones son más cercanos a las correspondientes al hueso, comparado con materiales metálicos convencionales utilizados en aplicaciones ortopédicas [19,28,39]. Además, el Mg es esencial para el metabolismo humano y se encuentra naturalmente presente en la composición del tejido óseo [19]. Sin embargo, estos materiales sufren una alta tasa de degradación en fluidos biológicos que contienen iones cloruros, por lo que resulta fundamental controlar su corrosión y, simultáneamente mantener la integridad mecánica durante la regeneración del tejido (3-4 meses) [40].

La corrosión del Mg y aleaciones generalmente produce óxidos, hidróxidos, gas hidrógeno y liberación de iones  $Mg^{2+}$  tal como muestran las siguientes ecuaciones:



Los productos de corrosión  $MgO$  y  $Mg(OH)_2$ , se depositan en la superficie del metal formando una película débilmente protectora [41]. Mientras que el hidrógeno gaseoso se acumula en el tejido circundante pudiendo generar lesiones [42]. Por otro lado, los productos de corrosión liberados por la degradación de aleaciones de Mg en medios biológicos conteniendo iones cloruro son capaces de generar efectos positivos al inhibir el

proceso de osteolisis inducida por osteoclastos, promoviendo así el crecimiento de osteoblastos en zonas aledañas al implante y adicionalmente mostrando ciertas propiedades antimicrobianas [43].

Varios autores han reportado propiedades antimicrobianas del Mg y sus aleaciones atribuyéndolas al incremento de pH y su alta concentración de iones Mg asociados con el proceso de degradación del metal. Asimismo, recientemente se han propuesto films conteniendo Mg para reducir la formación de biofilms sobre titanio [44,45].

Los fenómenos de la interfaz BMB/medio biológico son muy complejos. Si bien la alcalinidad producida por la corrosión del Mg y sus aleaciones puede resultar benéfica porque reduce la proliferación bacteriana, dicha degradación también induce efectos dañinos al tejido de las zonas aledañas al implante, relacionadas con el incremento de pH, liberación de H<sub>2</sub> (asociados al proceso de corrosión) y disminución de las propiedades mecánicas del metal [19,27–30]. Al respecto, se han encontrado formaciones de cavidades gaseosas subcutáneas en el sitio de implantación de materiales base Mg frecuentemente formadas en períodos iniciales postimplante, generando respuesta inflamatoria en experimentos *in vivo* [19].

El Mg puro como biomaterial presenta una alta tasa de degradación por lo que no es capaz de proporcionar la integridad mecánica necesaria durante la regeneración del tejido óseo [41]. Para reducir los efectos de la corrosión se han propuesto estrategias tales como la adición de aleantes adecuados y modificaciones superficiales. Entre estas últimas se pueden citar los recubrimientos de AZ31 con anodizados por oxidación con microarco conteniendo Si y P [46], recubrimientos de fluoruros [47–50], películas de hidroxiapatita y otras obtenidas por oxidación electrolítica por plasma con policaprolactona [51,52] e implantación de Ni y Zr [53]. En cuanto a la adición de aleantes se ha reportado que, tanto el agregado de Al como La y Gd al Mg mejoran la resistencia a la corrosión de dichos biomateriales manteniendo un nivel de liberación de iones de los elementos aleantes que resulta tolerable y biocompatible [54–56]. Por ese motivo, en el presente trabajo se utiliza una aleación que contiene Al y Zn como la AZ31 (3,10±0,16 at% Al; 0,312±0,029 at% Zn; 0,078±0,019 at% Mn; con balance de Mg) y otra que incluye tierras raras (ZEK100 conteniendo 0,96 wt.% zinc, 0,21 wt.% zirconio y 0,3 wt.% tierras raras) sobre las que se estudiará el efecto de recubrimientos protectores.

### **1.1.2. Control de la velocidad de corrosión con técnicas ecocompatibles**

En las secciones previas se ha expuesto la importancia del control de la corrosión de MB como el cobre y aleaciones de Mg mediante métodos ecocompatibles. Las distintas estrategias planteadas en el presente trabajo de tesis doctoral se encuadran en el concepto de bioeconomía que está ligado al aprovechamiento de productos naturales en la aplicación de tecnologías, con el propósito de desarrollar estrategias que conduzcan a mejorar las propiedades de los materiales sin dañar el entorno biológico. Está asociada al uso de recursos biológicos renovables y su conversión en alimentos, bioenergía, productos y coberturas de base biológica (bioproductos) con el fin de generar nuevas oportunidades de mercado, valor agregado y diversificar la estructura productiva del país [57]. Dentro de la bioeconomía, la denominada “roja”, que abarca las biotecnologías y nanotecnologías aplicadas a la salud, productos medicinales y farmacéuticos y producción de biomateriales [58,59]. Ligada a la bioeconomía se encuentra la “química verde” definida como el diseño de productos y procesos químicos con el fin de reducir o eliminar el empleo y la generación de sustancias dañinas al medio ambiente [60]. El daño ambiental asociado a las síntesis químicas puede surgir tanto de la naturaleza de la materia prima que se utiliza en las transformaciones químicas, así como de los productos finales. Una tecnología “verde” debe planificarse meticulosamente cumpliendo con los 12 principios de la “química verde”, entre los que se incluyen la reducción de residuos del proceso, maximización de la eficiencia, utilización y generación de sustancias de baja o nula toxicidad al ambiente y a la salud, empleo de materias primas renovables, eliminación o disminución del uso de sustancias auxiliares como solventes o agentes de separación y minimización de los requerimientos energéticos y el impacto económico [61]. Pueden citarse diversas aplicaciones incluidas dentro de Química verde como la generación de bioproductos y energía a partir de desechos de la producción de biodiesel, el empleo de CO<sub>2</sub> supercrítico como reemplazo de solventes convencionales para reducir la cafeína del café, la reutilización de lignina proveniente de desechos de la industria papelera como dispersante, aditivo, y precursor de vainillina, rediseño de surfactantes clásicos a biodegradables, entre otras [61]. También se incluye el desarrollo de inhibidores de corrosión ecocompatibles, que es un gran desafío en la actualidad debido a la necesidad de control de la liberación de iones al ambiente como a la prohibición de la utilización de productos tóxicos como inhibidores. Por esos motivos, el

presente trabajo se focaliza en el diseño de las estrategias de control de la corrosión basadas en los principios de la “Química verde”.

### **1.1.3. Utilización de fitocompuestos como inhibidores de la corrosión**

Dentro de los fitocompuestos, los aceites esenciales y sus compuestos fenólicos constituyentes son metabolitos secundarios producidos por diversas especies vegetales que desempeñan un papel importante en la protección de las plantas como antibacterianos, antivirales, antifúngicos, insecticidas y también contra herbívoros al reducir su apetito por tales plantas [62]. En especial, los aceites esenciales provenientes de plantas aromáticas representan una fuente rica en compuestos fenólicos, terpenos y terpenoides y se caracterizan por dos o tres componentes principales en concentraciones altas (20 a 70%) en comparación con otros compuestos presentes en cantidades traza [62]. Dichos compuestos naturales presentan propiedades biológicas interesantes tales como antifúngicas, antibacterianas, antibiofilms, antiinflamatorias, cicatrizantes, antioxidantes, inhibidoras de la corrosión de diversos metales, etc. [62–67], y su implementación como recubrimientos de MB surge como EIE tanto para el control de la corrosión como por su efecto antimicrobiano.

En los últimos años se han profundizado las investigaciones de ciertos compuestos naturales adsorbidos en superficies metálicas con el objeto de reducir la liberación de iones al medio biológico, tal como han demostrado estudios realizados con varias biomoléculas sobre Cu [15,68], disminuyendo así los efectos adversos inducidos por iones  $\text{Cu}^{2+}$  y evitando el empleo de inhibidores sintéticos tóxicos. Se ha reportado además, que algunos aceites esenciales contienen componentes activos con capacidad de inhibir la corrosión [66,69,70] y con un amplio espectro de efectos biológicos [71]. Particularmente aquéllos aceites provenientes de plantas aromáticas que contienen fitocompuestos fenólicos, y algunos de sus compuestos constituyentes puros, han mostrado una destacada acción antioxidante con posibles aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética, alimentaria, etc. [72–74]. Por otra parte, ciertos fitocompuestos fenólicos podrían electropolimerizarse sobre diversas superficies metálicas, generando películas protectoras con el objeto de reducir la liberación de iones metálicos [75,76].

#### **1.1.3.1. Electropolimerización de compuestos fenólicos**

En la literatura se encuentran diversos trabajos sobre procesos de adsorción y polimerización de fenoles y derivados sobre superficies catalíticas como Pt o sobre carbón vítreo mediante técnicas electroquímicas [76–80]. En dichos trabajos se reporta que la respuesta electroquímica de compuestos fenólicos depende de la ubicación, número y naturaleza de los sustituyentes del anillo fenólico, como de la magnitud de la interacción entre las moléculas con la superficie metálica.

Las películas electropoliméricas presentan importantes ventajas frente a inhibidores adsorbidos o en solución, como pueden ser una mayor durabilidad, homogeneidad y adherencia a la superficie [81–86]. Sin embargo, la mayoría de los trabajos reportados se basan en la utilización de compuestos sintéticos. Por lo tanto, la utilización de fitocompuestos es una estrategia prometedora para controlar la degradación de los BMB utilizando EIE.

#### **1.1.4. Utilización de fitocompuestos como inhibidores de la adhesión bacteriana**

Otro aspecto importante a tener en cuenta en el diseño e innovación de MB y, en particular, de BMB es la formación de biofilms bacterianos sobre las superficies. Según reportes de la Organización Mundial de la Salud existen más de 14 millones de personas por día en todo el mundo que sufren infecciones nosocomiales, entre los cuales el 60% está relacionado con el uso de dispositivos médicos [18] y la contaminación de los ambientes hospitalarios. Los pacientes con implantes ortopédicos o cardíacos son propensos a sufrir infecciones bacterianas relacionadas con la formación de biofilms sobre el implante frecuentemente asociado a contaminaciones durante el procedimiento quirúrgico.

##### **1.1.4.1. Biofilms bacterianos**

Un biofilm bacteriano es una acumulación de colonias formadas por una o múltiples especies para adaptarse al entorno natural. El componente principal son sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que envuelven a las bacterias, hacen que se asocien para formar un complejo estructurado específico y finalmente se adhieran irreversiblemente a la superficie del implante [18].

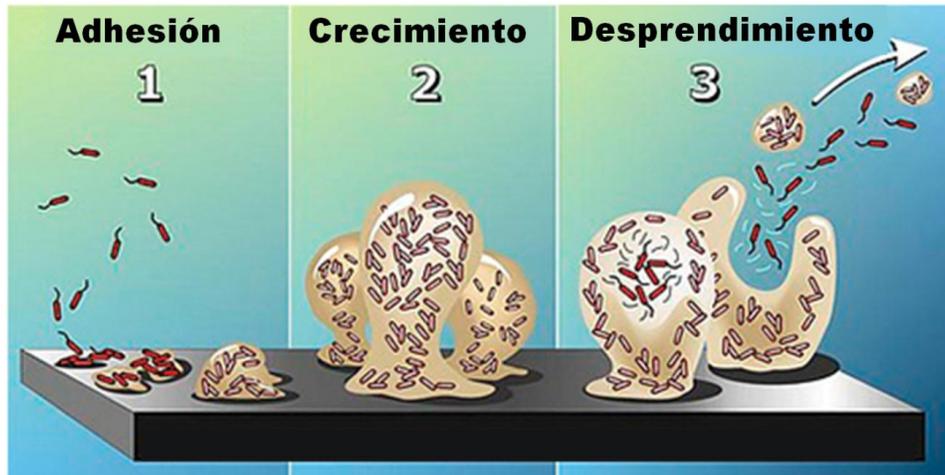


Fig. 1.3. Ciclo de vida de un biofilm modificado del Center for Biofilm Engineering [87].

El ciclo de vida de un biofilm, ejemplificado en la Fig. 1.3. involucra una primera etapa de adhesión en la cual las bacterias planctónicas, en pocos minutos, se adhieren reversiblemente a un sustrato. Posteriormente comienzan a producir EPS y colonizan la superficie. En la segunda etapa la producción de EPS permite a la comunidad emergente del biofilm desarrollar, en cuestión de horas, una estructura tridimensional compleja que está influenciada por una variedad de factores ambientales. Por último, el biofilm puede propagarse a través del desprendimiento de bacterias individuales o en grupos. Cualquiera de los dos tipos de desprendimiento permite que las bacterias se adhieran a una superficie corriente abajo de la comunidad original [88].

Las infecciones relacionadas con la formación de biofilms microbianos sobre las superficies de los materiales implantados constituyen un motivo de preocupación médica y podrían ser contrarrestadas por nuevas tecnologías de modificación superficial [89–91]. Estas infecciones generan rechazo del implante y la necesidad de una segunda cirugía para extraerlo, aumentando así la tasa morbilidad y de mortalidad [52,92]. Dichos biofilms generalmente son resistentes al tratamiento sistémico con antibióticos [93,94], el cual presenta diversas desventajas como el empleo de altas concentraciones de agentes antimicrobianos que pueden causar toxicidad sistémica y favorecer el crecimiento de bacterias resistentes emergentes. Esta resistencia de los biofilms se atribuye parcialmente a la acción protectora de la matriz polimérica extracelular que, entre otros efectos, reduce la tasa de difusión de los antibióticos. Además, el descenso de la actividad metabólica de las bacterias internas del biofilm disminuye la eficacia de los antibióticos antiproliferativos.

#### **1.1.4.2. Métodos de impedir la formación de biofilms**

Las modificaciones superficiales de implantes metálicos son alternativas innovadoras para lograr propiedades antibacterianas o antiadherentes empleando diferentes métodos tales como la pulverización con plasma, adiciones de elementos antibacterianos como cobre, plata y flúor y compuestos antibacterianos [18]. Se ha comprobado que la adhesión microbiana se ve desfavorecida mediante la modificación de la topografía, regulando los parámetros de rugosidad superficial a la escala nano y sub-micrométrica, lo que provoca alteraciones en el desarrollo, disminución de tamaño bacteriano y mayor formación de EPS, entre otras consecuencias [95]. Por otro lado, las modificaciones químicas de la superficie son muy variadas, y van desde la deposición polimérica y la adsorción de nanopartículas, hasta la generación de superficies fotocatalíticas de  $\text{TiO}_2$  y de liberación controlada de antibióticos. Con una superficie antiadherente bacteriana se beneficiaría la colonización del implante por células propias del tejido y la posterior integración del mismo. Por lo tanto, el desarrollo de recubrimientos multifuncionales constituiría una gran ventaja en la prevención de la colonización bacteriana y la formación de biofilms sobre superficies clínicamente relevantes y biocompatibles [96].

En el presente trabajo de tesis doctoral se estudiará la utilización de compuestos fenólicos naturales, con conocidas propiedades antimicrobianas, en modificaciones superficiales de MB para generar recubrimientos que, además de controlar la corrosión, inhiban la adhesión de bacterias. Cabe destacar que esta temática se relaciona con los núcleos estratégicos del plan Argentina Innovadora 2020. Específicamente está conectada con Salud/Fitomedicina/Nanomedicina, Bioingeniería aplicada a la Medicina Regenerativa/Desarrollo de nuevos biomateriales y en Agroindustria/Desarrollo de innovaciones para obtener compuestos derivados de biomasa (plantas aromáticas).

#### **1.2. OBJETIVOS**

En el marco anteriormente descrito se consideró como hipótesis de trabajo de la Tesis Doctoral que sería posible generar estrategias innovadoras de mejora superficial de MBs y BMBs tanto de baja como de alta velocidad de corrosión, en relación al control de la degradación y la inhibición de la adherencia bacteriana, utilizando fitocompuestos fenólicos los cuales poseen una amplia gama de propiedades biológicas interesantes. Los objetivos particulares fueron:

1. Evaluar la biocompatibilidad de fitocompuestos fenólicos (carvacrol, timol, ácido gálico, ácido trans-ferúlico y aceites esenciales de tomillo y orégano) en soluciones acuosas mediante ensayos de viabilidad celular.
2. Estudiar las interacciones de los fitocompuestos con superficies de Pt (control) y Cu y evaluar la capacidad de adsorberse y/o formar recubrimientos poliméricos sobre sus superficies mediante técnicas electroquímicas. Analizar la composición y las propiedades de las películas generadas, incluida su biocompatibilidad, con el fin de seleccionar la mejor combinación fitocompuesto/metal.
3. Diseñar y optimizar técnicas de adsorción/electropolimerización de los compuestos fenólicos naturales seleccionados sobre Cu con el fin de controlar la velocidad de degradación de ese metal. La técnica seleccionada será empleada para controlar la corrosión del cobre en medios biológicos con el fin de disminuir la liberación de iones metálicos al ecosistema y mejorar el funcionamiento de los DIUs. Evaluar asimismo la capacidad antioxidante de Carv y TOH frente al estrés oxidativo generado por productos de degradación de Cu.
4. Controlar la corrosión de BMBs de alta velocidad de degradación, como el Mg y aleaciones, con el fin de que estos metales mantengan sus propiedades mecánicas un período mayor. Con ese propósito se desarrollará y optimizará un procedimiento de electropolimerización de fitocompuestos sobre estas superficies.
5. Evaluar la biocompatibilidad celular, así como la distribución y posible reducción de la adhesión bacteriana sobre una aleación de Mg modelo (la aleación AZ31) sin y con recubrimiento electropolimérico.

# **Técnicas experimentales**

## **Capítulo 2**

## Capítulo 2- Técnicas experimentales

### A- ENSAYOS FISICOQUÍMICOS

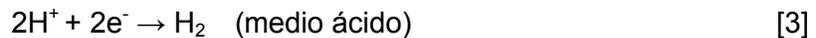
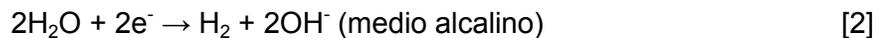
#### 2.1. TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS

La corrosión en un medio acuoso es el resultado destructivo de la reacción entre un metal o aleación metálica y el ambiente que involucra el intercambio de electrones. Sobre la superficie metálica que se corroe o degrada se llevan a cabo dos reacciones electroquímicas, la anódica (el metal pierde uno o más electrones) y la catódica (el agua, los  $H^+$  o el  $O_2$  presente en el agua consumen dichos electrones). Estas dos reacciones (Fig. 2.1) se llevan a cabo en lugares diferentes y, consideradas conjuntamente, constituyen el proceso global de corrosión. La reacción anódica puede formularse como sigue,

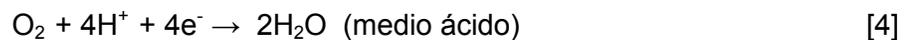


y dependiendo del pH de la solución y de la presencia o no de oxígeno en un electrolito acuoso el proceso de reducción corresponde a alguna de las siguientes reacciones:

Evolución de hidrógeno



Reducción de oxígeno



Es decir, los átomos metálicos, después de entrar en contacto con un electrolito, especialmente aquéllos con iones agresivos tales como cloruros, se oxidan a cationes metálicos mediante la reacción anódica (ecuación 1) y los electrones generados son consumidos por la reacción catódica correspondiente a (ecuación 2-4 de acuerdo al pH).

En la Fig. 2.1 se esquematiza la corrosión metálica localizada, en la cual se pueden observar las reacciones anódicas y catódicas con la simultánea deposición de productos de corrosión ( $M(OH)_n$ ).

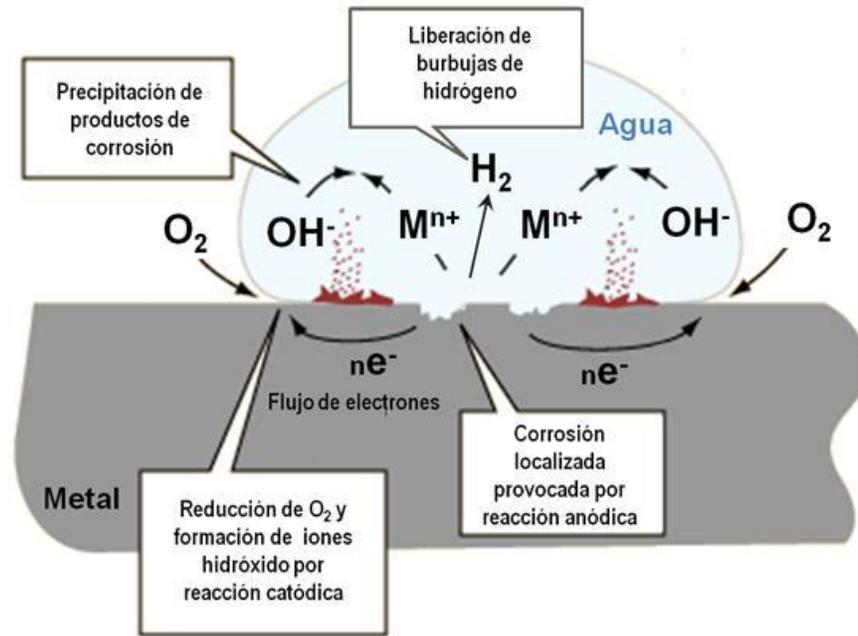


Fig. 2.1. Esquema de corrosión electroquímica en una superficie metálica. Modificado de Lower [97].

En el caso del Fe las reacciones en medio neutro/alcalino serían



Cada hemi-reacción [1a], [2a] en el equilibrio está caracterizada por una corriente de intercambio  $i_o$  que se corresponde con un potencial de óxido reducción  $E_{eq}$ :

$$E_{eq} = E_{oxid} = E_{red} \quad i_o = nFC_{red}k_{ox} \exp\left(\frac{\alpha nFE_{eq}}{RT}\right) \quad i_o = nFC_{ox}k_{red} \exp\left(\frac{\beta nFE_{eq}}{RT}\right) \quad [6]$$

donde  $n$  es el número de electrones intercambiados,  $F$  equivale a 96.500C,  $C_{red}$  y  $C_{ox}$  corresponden a las concentraciones de las especies que se reducen y de la que se oxidan respectivamente,  $k_{red}$  y  $k_{ox}$  corresponden a las constantes heterogéneas de la velocidad de reacción de oxidación y de reducción respectivamente, y  $\alpha$  y  $\beta$  son los coeficientes de transferencia de carga anódico y catódico respectivamente; esta relación representa un equilibrio dinámico para dicha hemireacción.

La polarización mediante un sobrepotencial  $\eta$  es el cambio de potencial de la hemi-reacción desde el valor del equilibrio ( $\eta = E - E_{eq}$ ). Cuando la velocidad de la reacción está

controlada predominantemente por la transferencia de carga, los sobrepotenciales para las reacciones anódica y catódica serán:

$$\eta_a = \beta_a \log (i_a/i_o) \quad [7]$$

$$\eta_c = \beta_c \log (i_c/i_o) \quad [8]$$

Siendo  $\eta_a$  y  $\eta_c$  los sobrepotenciales, anódico y catódico,  $\beta_{a/c} = 2.3RT/\alpha nF$  (donde  $\alpha$  es la fracción de sobrepotencial correspondiente a cada reacción, anódica y catódica),  $i_a$  y  $i_c$  el flujo de densidad de corriente anódica y catódica, respectivamente. Como ambas reacciones ocurren sobre la misma superficie cada uno de los potenciales de las hemireacciones cambia hasta hacerse iguales a un potencial denominado potencial mixto o potencial de corrosión,  $E_{corr}$ , tal como se indica en la Fig. 2.2.

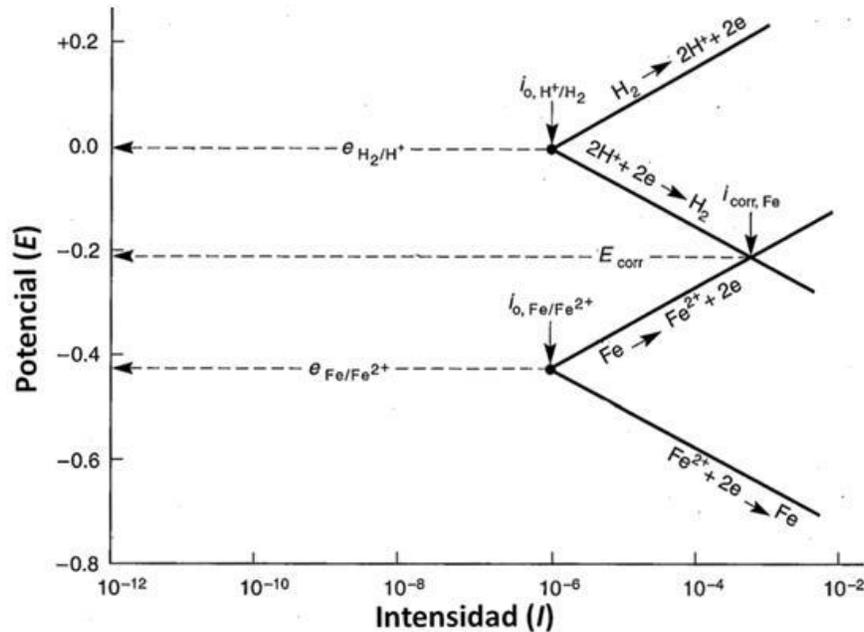


Fig. 2.2. Representación de hemirreacciones catódicas y anódicas presentes simultáneamente en superficies de hierro en solución ácida. Se muestran los correspondientes potenciales de óxido reducción de cada hemirreacción y el potencial mixto o de corrosión ( $E_{corr}$ ). Modificado de Jones [98].

Para dicho potencial se cumple que

$$i_a = i_c = i_{corr} \quad [9]$$

Mediante técnicas de polarización se puede forzar el desplazamiento del estado  $E_{corr}$ ,  $i_{corr}$  en ambas direcciones (anódica o catódica), permitiendo obtener curvas corriente/potencial de las cuales se puede determinar  $i_{corr}$ ,  $E_{corr}$  como también otros parámetros electroquímicos que se explicarán a continuación.

### **2.1.1. Barrido lineal de potencial**

El barrido lineal de potencial es una técnica utilizada frecuentemente para realizar estudios de corrosión de metales en diversos electrolitos que permite determinar la densidad de corriente  $i_{corr}$  y el potencial mixto  $E_{corr}$ . Consiste en aplicar al electrodo de trabajo una perturbación de potencial que varía linealmente con el tiempo, dicho sobrepotencial desplaza el potencial desde la situación  $E_{corr}$  en dirección anódica o catódica.

Al representar la corriente en escala logarítmica ( $\log i$  vs  $E$ ) se pueden generar los gráficos conocidos como curvas de Tafel, de donde se calculan los parámetros  $E_{corr}$  e  $i_{corr}$  mediante un método de extrapolación de las pendientes obtenidas (Fig. 2.3). El método de extrapolación utilizado en el presente trabajo de tesis se basó en el trabajo reportado por Badea *et. al.* [99], donde proponen que para una extrapolación precisa, al menos una de las ramas de la curva de polarización debe mostrar el comportamiento de Tafel (es decir, lineal en la escala logarítmica) durante al menos una década de densidad de corriente. Además, la extrapolación debe comenzar entre los 50-100mV de potencial anódico y catódico frente a  $E_{corr}$ .

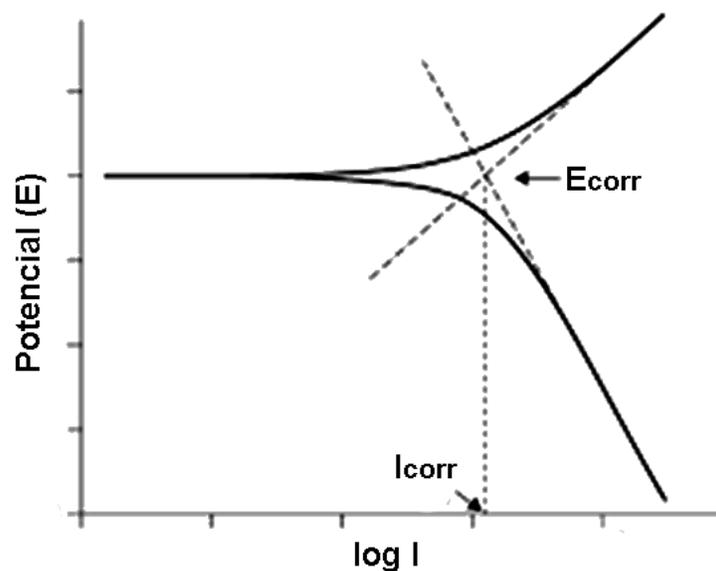


Fig. 2.3. Representación de una curva de Tafel.

### 2.1.2. Voltametría cíclica

La voltamperometría cíclica es una técnica que aplica un potencial ( $E$ ) (medido respecto a un electrodo de referencia) que varía linealmente en el tiempo, con una determinada velocidad de barrido, entre dos límites de potencial definidos ( $E_i$  y  $E_\lambda$ ) primero en sentido anódico y luego en sentido catódico, completando así un ciclo que se repite un total de  $n$  veces establecidas por el operador.

Sobre un electrodo de trabajo inerte como el Pt es posible estudiar propiedades redox de compuestos químicos presentes en el electrolito, así como propiedades de la interfaz. Para un sistema reversible como, por ejemplo, el proceso redox  $\text{Fe}^{3+} + e^- \rightleftharpoons \text{Fe}^{2+}$  registrado sobre Pt, se puede aplicar la ecuación de Nernst (simplificada, a 25°C):

$$E = E^0 + \frac{59\text{mV}}{n} \log \frac{C_{\text{Fe}^{3+}}}{C_{\text{Fe}^{2+}}} \quad \text{ó} \quad \frac{n(E-E^0)}{59\text{mV}} = \log \frac{C_{\text{Fe}^{3+}}}{C_{\text{Fe}^{2+}}} \quad [10]$$

dónde  $E$  es el potencial aplicado al sistema,  $E^0$  representa el potencial normal redox de la reacción (0,46V en presencia de oxígeno) y  $C$  corresponde a las concentraciones de  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$ , respectivamente. Se observa que la perturbación aplicada produce cambios en la dirección de la reacción redox, en particular a potenciales mucho menores que  $E^0$  la reacción no se produce ya que el potencial del electrodo no es suficiente para reducir el  $\text{Fe}^{3+}$ , y no se registra densidad de corriente ( $i$ ) asociada a dicha reacción. De acuerdo a la ecuación [10], cuando  $E$  es igual al potencial normal de la reacción, las concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ , son similares. Se puede notar en la Fig. 2.4 que la corriente que circula sobre el electrodo, debido a los electrones consumidos por la reacción, aumenta notablemente hasta alcanzar un valor máximo. Dado que la especie que reacciona ( $\text{Fe}^{3+}$ ) es consumida en la superficie del electrodo, la densidad de corriente registrada luego disminuye a medida que se aumenta el potencial. Una vez alcanzado el valor de potencial final  $E_\lambda$ , el barrido de potencial es invertido y la corriente desciende hasta hacerse negativa ( $i < 0$ ) llegando a un valor máximo. Dos valores importantes para el análisis del proceso redox, son las corrientes obtenidas en los máximos, llamados corriente de pico anódico ( $i_{pa}$ ) y corriente de pico catódico ( $i_{pc}$ ), respectivamente (Fig. 2.4).

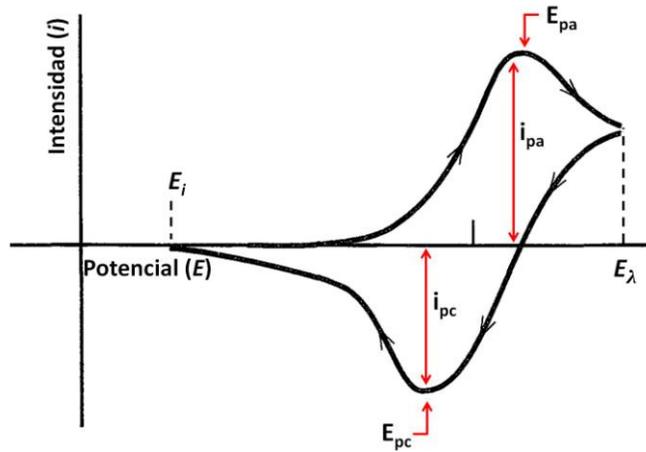


Fig. 2.4. Representación de un registro voltamperométrico indicando los parámetros potencial y densidad de corriente de los picos anódico ( $E_{pa}$  e  $I_{pa}$ ) y catódico ( $E_{pc}$  e  $I_{pc}$ ).

En un proceso irreversible, como el representado en la Fig. 2.5, correspondiente a la electropolimerización de un compuesto fenólico sobre Pt en un electrolito alcalino, se puede observar que durante el primer ciclo se registra el pico anódico ( $E_{pa}$  e  $I_{pa}$ ) que conduce al bloqueo del electrodo debido a la polimerización del compuesto fenólico sobre la superficie del mismo impidiendo la penetración de otras moléculas fenólicas a través de la capa polimérica y su posterior oxidación, así como los procesos de oxidación y reducción del metal, observándose una corriente residual mínima durante el registro del segundo ciclo potenciodinámico [77,80].

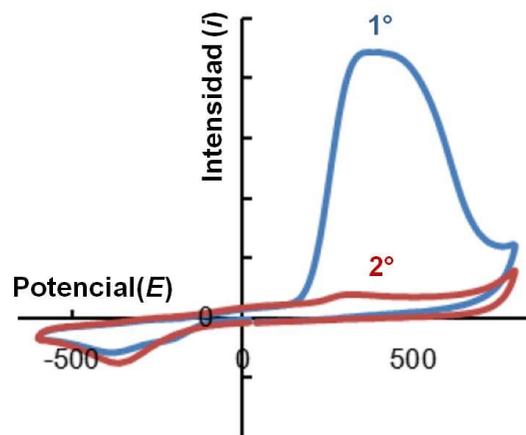
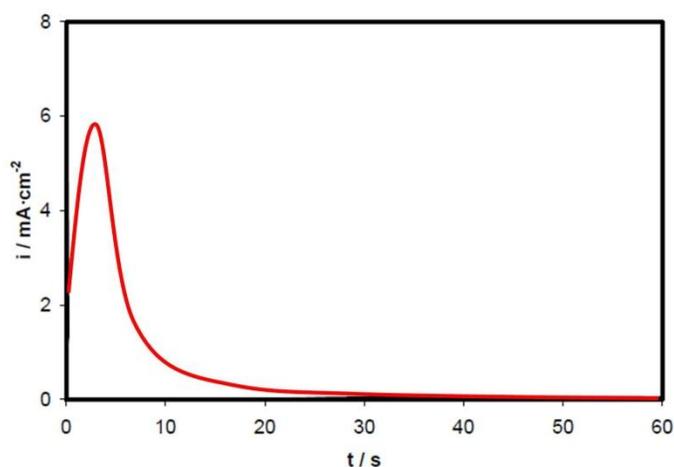


Fig. 2.5. Representación de un registro voltamperométrico durante el proceso de electropolimerización de un compuesto fenólico sobre Pt. Modificado de Matsushita et al. [100].

Por lo tanto, mediante la técnica de voltamperometría cíclica es posible estudiar el proceso de electropolimerización de compuestos orgánicos sobre superficies metálicas, pudiéndose observar en los registros de  $i$  vs  $E$  la presencia de picos de oxidación de los compuestos y la formación de una película o recubrimiento sobre el electrodo de trabajo.

### **2.1.3. Cronoamperometría**

En base a los datos de los potenciales de los picos de oxidación observados por voltamperometría, se pueden seleccionar diversos potenciales de interés y aplicarlos de manera constante en el tiempo, técnica denominada cronoamperometría o polarización potencioestática que dan lugar al registro de un transitorio de corriente. Por medio de esta técnica se pueden obtener información sobre el proceso de nucleación y crecimiento de películas generadas sobre el electrodo de trabajo tal como se describirá en el Capítulo 5. En la Fig. 2.6 se muestra un registro cronoamperométrico típico de la formación de una cobertura protectora sobre un metal.

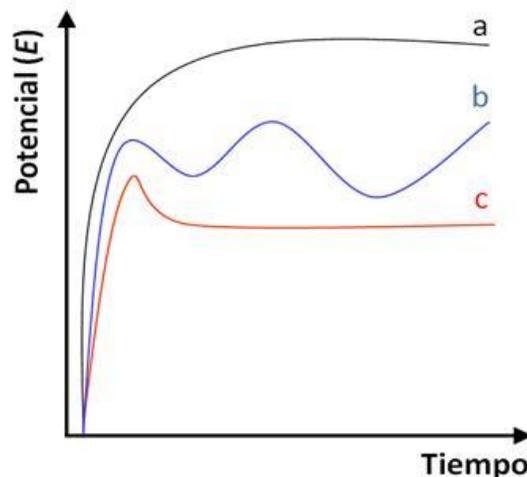


*Fig. 2.6. Representación de un registro cronoamperométrico durante el proceso de electropolimerización de fenol sobre Pt. Tomado de Xavier et al. [101].*

### **2.1.4. Registro de potencial a circuito abierto**

Las medidas de potencial a circuito abierto, determinan la diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo en contacto con un electrolito y el electrodo de referencia, por ejemplo el electrodo de calomel saturado (SCE). Dicho potencial varía con el tiempo e inicialmente tiene un valor similar al potencial mixto o potencial de corrosión obtenido mediante curvas

de Tafel. Esta medida constituye una herramienta útil para la comprensión de la disolución de un metal en medio dado y presenta distintas características según el tipo de ataque corrosivo que se desarrolle. Como se observa en la Fig. 2.7, en una superficie de un metal pasivo, por ejemplo titanio, la evolución del registro muestra que el potencial asciende inicialmente hasta alcanzar un valor estable en el tiempo luego de la formación de una película de óxido muy pasivante (Fig. 2.7a). Por otro lado, si el electrodo de trabajo sufre corrosión localizada, como en el caso de Mg, el ataque se produce en regiones confinadas de la superficie como consecuencia de la ruptura de la película protectora y se propaga hacia el interior del metal. En ese caso (Fig. 2.7b) el registro del potencial a circuito abierto se torna inestable cuando se inicia el proceso de corrosión localizada y el potencial oscila siguiendo los procesos de disolución y repasivación de las zonas corroídas. Por último, en un proceso de corrosión generalizada uniforme el ataque se extiende de forma homogénea sobre toda la superficie metálica y el potencial, si bien inicialmente varía, luego se estabiliza y permanece constante (Fig. 2.7c).



*Fig. 2.7. Representación de registros de potencial a circuito abierto para diversos procesos sobre electrodos de trabajo: a) pasividad, b) corrosión localizada y c) corrosión generalizada.*

### **2.1.5. Equipamiento utilizado para las medidas electroquímicas**

Para todas las experiencias se utilizó un potenciostato-galvanostato Teq-03 (Fig. 2.8), una celda electroquímica de tres electrodos con electrodo de calomel saturado como electrodo

de referencia, electrodo de lámina de platino como contraelectrodo y como electrodo de trabajo alguno de los diversos materiales metálicos estudiados (Fig. 2.9). Las soluciones electrolíticas empleadas resultaron de composiciones variadas dependiendo de las técnicas implementadas, cuya información se detalla adecuadamente en los capítulos respectivos.



Fig. 2.8. Potenciostato-galvanostato Teq-03 utilizado para las experiencias electroquímicas en el presente trabajo.

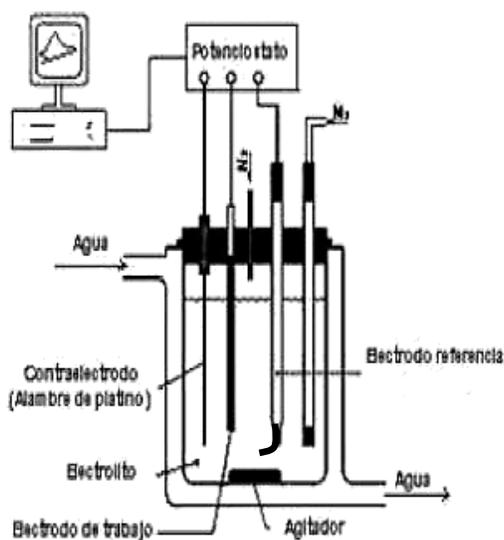


Fig. 2.9. Esquema de celda electroquímica.

## **2.2. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)**

La espectroscopía infrarroja es una espectrometría de absorción que utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético cuya longitud de onda ( $\lambda$ ) está comprendida entre

los  $4000\text{cm}^{-1}$  (2500nm) y los  $400\text{cm}^{-1}$  (25000nm). Se la utiliza para identificar un compuesto o investigar la composición de una muestra orgánica.

La espectroscopía infrarroja detecta vibraciones de enlaces moleculares y vibraciones rotacionales a través de la absorción de luz infrarroja. Dado que diferentes grupos funcionales absorben a diferentes frecuencias, la espectroscopía IR puede ser utilizada para el estudio de la estructura molecular y constituye una “huella dactilar”.

En este trabajo se utilizaron dos modos de detección, el más común es la técnica de transmitancia en el cual se fabrica una pastilla de KBr con el compuesto a analizar sobre la cual incide el haz de luz infrarroja y, con un detector del otro lado de la muestra, se determina qué fracción de la radiación incidente (longitud de onda) ha sido adsorbida.

La otra técnica de detección utilizada en el presente trabajo consistió en FTIR por Reflectancia Total Atenuada (ATR-FTIR), la cual permite el estudio de absorbancia de radiación infrarroja de compuestos químicos depositados sobre una superficie. Este modo de detección utiliza la propiedad de reflexión interna total dando como resultado una onda evanescente. El haz de luz infrarroja pasa en forma longitudinal al cristal de ATR y se refleja en la superficie interna del mismo, la cual está en contacto con la muestra a analizar (Fig. 2.10). Esta reflexión genera una onda evanescente que se propaga por la muestra. Luego el haz se colecta en un detector en el otro extremo del cristal.



Fig. 2.10. Diagrama explicativo del paso del haz de luz infrarroja en el modo ATR-FTIR.

La transformada de Fourier de la información obtenida permite una representación interpretable del espectro, generando un espectro de transmitancia o absorbancia, el cual muestra a cuáles longitudes de onda la muestra absorbe la radiación y permite una interpretación de los enlaces y/o grupos funcionales que están presentes en la muestra.

En el presente trabajo se utilizó un espectrómetro Varian 660 equipado con un accesorio de reflexión total atenuada (ATR) (MIRacle ATR, Pike Technologies) con un prisma de

ZnSe. Alternativamente se utilizó un espectrómetro Agilent Cary 630 con accesorio Diamond ATR.

En todos los casos se obtuvo, en primer lugar, el espectro de los fitocompuestos en estado puro analizado mediante la formación de una pastilla de KBr para lo cual se mezcló aproximadamente un miligramo de dicha sustancia con 100-300mg de polvo de KBr. La mezcla se realizó con un mortero y posteriormente se la colocó en un dispositivo que permite armar una pastilla. A continuación, el disco se colocó en la trayectoria del haz del instrumento para su examen espectroscópico.

Las muestras metálicas con los recubrimientos generados y los fitocompuestos puros en estado líquido y en polvo se analizaron mediante espectroscopía ATR-FITR en el rango de 600 y 4000 $\text{cm}^{-1}$ .

### **2.3. ESPECTROSCOPIA DE FOTOELECTRONES EMITIDOS POR RAYOS X (XPS)**

La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) es uno de los métodos de caracterización de superficies más ampliamente utilizados hoy en día debido al alto contenido de información que suministra y a la flexibilidad para ser utilizada en una gran variedad de muestras. Su principio de funcionamiento se basa en la fotoionización y el análisis de la dispersión de energía de los fotoelectrones emitidos para estudiar la composición y el estado electrónico de una región de la superficie. Un análisis básico de una superficie mediante XPS empleando excitación débil (200-2000eV) de rayos X puede proporcionar información cualitativa y cuantitativa de todos los elementos presentes en concentraciones mayores al 0,1% en los primeros 10nm de profundidad, excepto H y He. Además, esta técnica permite la determinación semicuantitativa de la composición elemental de la superficie con un error menor que 10%. Asimismo, brinda información acerca del entorno molecular: estado de oxidación, átomos enlazantes, orbitales moleculares, etc., y sobre estructuras aromáticas o insaturadas.

Cabe recordar que cuando un fotón se encuentra con un átomo pueden ocurrir varios sucesos: que el electrón atraviese la muestra sin interactuar con sus átomos; que el electrón pase lo bastante cerca del núcleo como para ser atraído por su carga positiva, sufriendo una desviación de su trayectoria inicial (dispersión elástica); que el electrón sufra una desviación de su trayectoria y además una pérdida de energía, es decir, que experimente una dispersión inelástica; o que el fotón interaccione con un electrón de un

orbital atómico con una transferencia total de la energía del fotón hacia el electrón, ocurriendo la emisión del electrón del átomo. Este último suceso es el que es relevante para esta técnica. El proceso de fotoemisión resulta ser extremadamente rápido,  $10^{-16}$  s, y su física básica se describe mediante la ecuación de Einstein:

$$E_B = h\nu - KE \quad [3]$$

donde  $E_B$  es la energía de enlace del electrón en el átomo,  $h\nu$  es la energía de la fuente de rayos X, y  $KE$  es la energía cinética del electrón detectado que es medida por el espectrómetro del XPS. Los espectros XPS son obtenidos cuando una muestra es irradiada con rayos X y, simultáneamente, se miden la energía cinética y el número de electrones que escapan de la superficie del material analizado.

En el presente trabajo se utilizó esta técnica para analizar la adsorción de los inhibidores orgánicos de la corrosión sobre la superficie del cobre y la estructura de los electropolímeros formados por electropolimerización. Se empleó un equipo con una fuente de  $Al K\alpha$  (XR50, Specs GmbH) y un analizador de energía (PHOIBOS 100, Specs GmbH).

#### **2.4. MICROSCOPIA ÓPTICA**

En el presente trabajo se utilizó un microscopio óptico Olympus BX51 (Olympus Corp., Tokyo, Japón) (Fig. 2.11) para observaciones en campo claro de los procesos de corrosión en los diversos materiales utilizados y en modo de epifluorescencia para analizar viabilidad de células eucariotas y adhesión bacteriana mediante tinciones con naranja de acridina.



*Fig. 2.11. Microscopio de epifluorescencia y de campo claro utilizado en el presente trabajo.*

El microscopio de fluorescencia consta de los mismos componentes de un microscopio óptico al que se le añaden una fuente luminosa y filtros especiales con la finalidad de que emita, de manera selectiva, radiaciones de determinadas longitudes de onda: radiación ultravioleta u ondas luminosas de color violeta, azul ó verde. En el microscopio de epifluorescencia la radiación excitatoria es aplicada sobre la muestra a través de un sistema incorporado al objetivo y no atraviesa el espécimen. Además, posee espejo divisor de haces, cuya función es reflejar hacia el espécimen la longitud de onda filtrada y seleccionada, mientras que las radiaciones que no fueron bloqueadas por el filtro excitador atraviesan el espejo divisor y continúan su trayectoria sin ser reflejados.

### **2.5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)**

El microscopio electrónico de barrido (SEM, Scanning Electron Microscope) posee una alta resolución y su gran capacidad de foco (aproximadamente entre 100 y 1000 veces mayor que la de un microscopio óptico a la misma magnificación) permite observar la muestra como una imagen tridimensional.

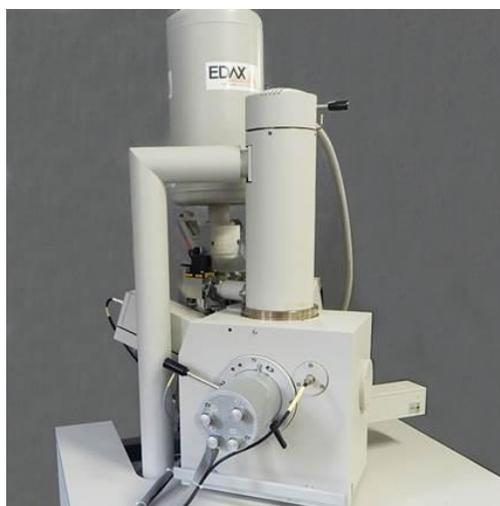
El equipo utilizado en el presente trabajo cuenta con capacidad analítica por rayos X mediante el agregado de un detector de energía dispersiva (EDS, Energy Dispersive Spectrometer). De esta manera puede obtenerse simultáneamente información topográfica y composicional de la misma área, adicionando un “mapeo” de elementos en la superficie.

Este tipo de microscopio electrónico posee una fuente generadora de electrones y campos electromagnéticos que actúan como lentes concentradoras de los haces de electrones o como ampliadoras de imágenes.

Los electrones se aceleran y concentran hasta formar un haz sumamente delgado, cuyo diámetro puede medir desde 5nm hasta algunas micras, que “barre” la superficie de la muestra. Los electrones son reflejados por los componentes de la misma o al chocar con ellos generan electrones secundarios. En ambos casos los electrones se colectan mediante un detector que se encuentra conectado a un amplificador que envía señales en forma de rayos catódicos a la pantalla de un monitor de computadora.

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido fueron tomadas utilizando un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 200 (Fig. 2.12) a 20kV con un detector ETD en modo de detección de electrones secundarios. Las muestras con material biológico

adherido se fijaron con glutaraldehído al 2% en PBS por 2 h a 4°C, y se deshidrataron con una serie de soluciones de etanol a 4°C seguido de secado por punto crítico y un posterior metalizado con una capa fina de oro. Por otro lado, para observar las características estructurales de los electropolímeros generados sobre los diversos biomateriales, las muestras fueron metalizadas con una fina capa de oro y observadas por microscopía SEM.



*Fig. 2.12. Microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 200 equipado con detector EDS utilizado en el presente trabajo.*

## **2.6. ESPECTROSCOPIA DE DISPERSIÓN DE ENERGÍA DE RAYOS X (EDS)**

La espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS) es una técnica utilizada para el análisis elemental o caracterización química de una muestra. Se basa en la investigación de la interacción de una fuente de excitación de rayos X y una muestra. Cada elemento tiene una estructura atómica particular que permite obtener un único conjunto de picos en su espectro de rayos X. Para estimular la emisión de rayos X característico de una muestra un haz de alta energía de partículas cargadas, tales como electrones o protones, o un haz de rayos X incide sobre la muestra excitando un electrón de un nivel interior, provocando así la creación de un “hueco” donde éste se encontraba. A continuación, un electrón de un nivel de mayor energía llena ese espacio vacante, emitiendo, en la transición un fotón de rayos X. La energía de los fotones emitidos está directamente relacionada con el peso atómico del elemento emisor. De este modo es posible asociar cada valor de energía

emitida con un elemento de la tabla periódica (análisis cualitativo). Asimismo, se puede cuantificar el número de fotones emitidos a cada energía, haciendo posible determinar la cantidad relativa de cada elemento (análisis cuantitativo).

En el presente trabajo se utilizó un espectrómetro de rayos X EDAX SDD Apollo 40 acoplado a un microscopio FEI Quanta 200 (Fig. 2.12). El “mapeo” de elementos EDS se realizó a alto voltaje (20kV) y se analizaron los espectros obtenidos en función del porcentaje atómico.

## **2.7. MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM)**

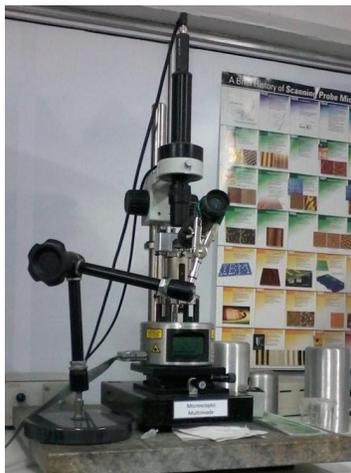
La microscopía AFM se basa en interacciones atractivas y repulsivas entre la punta y la muestra sin importar su naturaleza conductora. Las fuerzas de adhesión se presentan a una distancia de interacción de  $10^{-9}$  m y las de repulsión a  $10^{-10}$  m. Se obtiene información de morfología, topografía, rugosidad, tamaño de grano, distribución de tamaño de partículas y, gracias a sus microscopías derivadas, se pueden identificar moléculas específicas, propiedades mecánicas, magnéticas, eléctricas, entre otras. La resolución del AFM en XY es de 2 a 10nm, mientras que en Z es de 0,05nm, dado por la morfología de la punta, por este motivo no se logra resolución atómica como en la microscopía de efecto tunel. El sistema de detección del AFM se basa en un láser que incide sobre la punta flexible, luego se refleja en un espejo y de éste va a un fotodiodo de 4 cuadrantes. A medida que la punta recorre la muestra va flexionándose de acuerdo a la rugosidad de la superficie y el rayo laser reflejado va cambiando la posición en el fotodiodo, lo que se traduce en distintos voltajes que luego va a componer la imagen final.

En cuanto a las condiciones de operación, las medidas se pueden realizar en atmósfera controlada (AFM con control ambiental), en aire y en líquidos. Los modos de operación son modo contacto, modo no-contacto y modo contacto intermitente (*tapping mode*). El modo contacto, donde entran en juego fuerzas repulsivas típicas de  $10^{-6}$ - $10^{-5}$  N, tiene dos variantes: 1) fuerza constante, en el cual se aplica una fuerza constante con la punta sobre la muestra (no conveniente para muestras blandas porque la punta “arrastra” el material); 2) altura constante, donde la distancia punta-muestra no se varía (recomendable sólo para muestras lisas), logrando resolución atómica. Por otro lado, en el modo no contacto la punta se encuentra más lejos de la muestra y las fuerzas atractivas son del orden de  $10^{-12}$  N, se requieren puntas más rígidas que en el modo contacto y un sistema de detección

más sensible. Este modo se basa en el cambio de amplitud o frecuencia de las vibraciones de la punta, previamente seleccionada por el operador, cuando la atracción de la punta a la muestra varía. Por último, el modo “tapping” consiste en el cambio de vibraciones de la punta por fuerzas de atracción y repulsión, y ésta a su vez va tocando la muestra de forma intermitente, lo que produce poco daño a la muestra y permite analizar regiones más grandes que el modo no contacto.

El AFM posee un Cantilever al que se sujeta la punta característica según la técnica a emplear (<http://www.spmtips.com/how-to-choose-by-AFM-technique-tapping-mode.html>).

En el presente trabajo se utilizó un microscopio Nanoscope V (Bruker, Santa Barbara, CA) (Fig. 2.13) en modo Tapping® topográfico con una punta de silicio (Arrow™ NCR; NanoWorld, spring constant, 42 N/m; frecuencia de resonancia, 285kHz) y el software Nanoscope 7.30 para la operación del microscopio y la toma de imágenes. El análisis de las imágenes y la obtención de los parámetros de rugosidad se llevaron a cabo mediante el software Nanoscope Analysis 1.5. Dentro de los parámetros reportados se definen: Ra como el promedio de los valores absolutos de las desviaciones de altura de la superficie medidos desde el plano medio, recomendado para la caracterización de superficies aleatorias, con la desventaja de no distinguir entre picos y valles, llevando a valores similares en superficies con perfiles de rugosidad totalmente diferentes; Rq como la desviación estándar de la altura de picos y valles, el cual es más sensible a picos y valles; Rmax como la distancia vertical máxima entre los puntos más altos y más bajos en la imagen, utilizado frecuentemente para encontrar quebraduras o rajaduras inusuales en la superficie.



*Fig. 2.13. Microscopio AFM Nanoscope V utilizado en el presente trabajo.*

## **B - ENSAYOS BIOLÓGICOS**

### **2.8. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR**

#### **2.8.1. Medios de cultivo (MC)**

Los MC utilizados en este trabajo de tesis variaron de acuerdo a la línea celular utilizada, tal como se describirá en el capítulo respectivo. Se utilizaron dos medios de cultivo:

- Medio MEM modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 50UI/ml de penicilina y 50µg/ml de sulfato de estreptomicina (MCC).
- Medio Ham F12 suplementado con 10% de SFB, 50UI/ml de penicilina y 50µg/ml de sulfato de estreptomicina (MCC).

#### **2.8.2. Ensayos de citotoxicidad**

La toxicología celular puede considerarse como el conjunto de investigaciones cualitativas y cuantitativas sobre los efectos nocivos o respuestas biológicas no deseadas que experimenta un sistema celular expuesto a un determinado agente físico, químico o biológico [102].

La citotoxicidad se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a la producción de un daño que pueda ser detectado. Los criterios para el uso de ensayos de toxicidad se clasifican en: a) disminución del metabolismo “basal”, lo cual se conoce como “injuria temprana”, para lo cual se evalúan los niveles de ATP y la actividad mitocondrial; b) pérdida de integridad de la membrana, conocido como “injuria grave”, para lo cual se miden las enzimas liberadas y la exclusión de colorantes fluorescentes (ioduro de propidio) y ópticos (azul tripán), c) pérdida de células: las células muertas se despegan del sustrato, para lo que se realizan recuentos celulares de células adheridas, se mide el DNA y se cuantifican las proteínas totales.

Dentro de los ensayos más conocidos y ya validados se encuentran los que fueron utilizados en el presente trabajo: el ensayo de reducción de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, evalúa “injuria temprana”), el ensayo de viabilidad a 24h y el ensayo clonogénico a 6 días, éstos últimos mediante tinción con naranja de acridina, los cuales se describen a continuación.

### 2.8.2.1. Ensayo de reducción de MTT

Este ensayo se basa en la reducción metabólica de una sal de tetrazolio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, de color amarillo) a formazán (de color azul) mediante las enzimas deshidrogenasas de las mitocondrias que se encuentran intactas en las células vivas [103] y permite estimar la actividad mitocondrial e indirectamente la viabilidad celular.

El MTT es captado por la célula y reducido por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa a formazán, un compuesto insoluble que queda retenido en las células y que puede ser liberado según protocolo específico. La cantidad de MTT reducido se cuantifica mediante un método colorimétrico midiendo la absorbancia a 560nm, permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La capacidad de las células para reducir el MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular ya que la cantidad de células vivas es directamente proporcional a la cantidad de formazán. La determinación de la capacidad de las células de reducir el MTT a formazán después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del mismo.

El protocolo que se siguió cada vez que se realizó esta técnica es el mencionado a continuación: las células se sembraron en una placa de 96 pocillos y se las dejó crecer durante 24h a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub> en MCC. Al cabo de ese tiempo el MCC se reemplazó por MCC que contenía la sustancia de interés en las concentraciones seleccionadas. Al cabo de 24h se removi6 el MC en el que se encontraban las células y éstas se lavaron con solución buffer fosfato (PBS). Se agregó MCC con una concentración final de MTT de 1mg/ml (Sigma, St. Louis, MO, USA). Al cabo de 3h de incubación, se volvieron a lavar las células con PBS. Posteriormente, se adicionaron 100µl de dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck, Química Argentina SAIC, Argentina) a cada pocillo para provocar la lisis celular y la disolución de los cristales de formazán formados y finalmente revelar el color para poder medirlo por absorbancia a 560nm usando un lector de placas ELISA (7530 Microplate Reader Cambridge Technology, Inc., St. Watertown, MA, EE. UU.). El porcentaje de viabilidad se calculó como:

$$[(A-B) / A \times 100] \quad [4]$$

donde A y B son la absorbancia del control y las células tratadas, respectivamente. Cada experimento se repitió independientemente con un total de 32 repeticiones por punto

experimental. Los datos se interpretaron mediante el análisis de la varianza de un factor (ANOVA) y se realizaron múltiples comparaciones utilizando los valores del estadístico p de acuerdo con el método de Bonferroni.

### **2.8.2.2. Ensayo de viabilidad mediante tinción con naranja de acridina**

El naranja de acridina (NA o N,N,N',N'-tetrametilacridina, Sigma, St. Louis, MO, USA) es un colorante catiónico selectivo para los ácidos nucleicos con un máximo de excitación a 502nm y una emisión a 525nm. Por lo tanto, este colorante tiñe de verde a las células en fase de división activa, es decir, que contienen una alta cantidad de ácidos nucleicos.

El protocolo que se empleó fue el siguiente: las células se sembraron en una placa de Petri y se las dejó crecer durante 24h a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> en MCC. Al cabo de ese tiempo el MCC se reemplazó por MCC que contenía la sustancia de interés en las concentraciones seleccionadas o las muestras del material a ensayar con o sin los tratamientos superficiales. Al cabo de 24h de exposición, se removió el MCC y se lavaron las células con PBS. A continuación, las células adheridas a la placa se tiñeron con naranja de acridina (Sigma, St. Louis, MO, USA) e inmediatamente se examinaron por epifluorescencia bajo un microscopio equipado con filtro de 515-560nm (Olympus BX51, Olympus Corp., Tokyo, Japón) y conectado a una cámara de Olympus DP73 (Olympus Corp., Tokyo, Japón).

Se obtuvieron imágenes digitales de la densidad celular existente en cada placa, las cuales se analizaron luego con el programa Image-Pro Plus ®. Las imágenes se obtuvieron inmediatamente después de abrir el *shutter* del microscopio para evitar dañar la muestra con el calor de la lámpara de fluorescencia y con la radiación UV que ésta emite.

### **2.8.2.3. Ensayo de formación de colonias**

El ensayo clonogénico o de formación de colonias consiste en un test *in vitro* de supervivencia de células basado en la capacidad de una célula en generar una colonia [104]. Para este análisis las células fueron crecidas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub> en MCC en presencia del material a ensayar con y sin tratamiento superficial, ubicados en el centro de placas de petri. Se agregaron placas de petri sin muestras, como control de crecimiento celular. Luego de 6 días de incubación, las colonias obtenidas

fueron teñidas con naranja de acridina y examinadas inmediatamente por microscopía de epifluorescencia. Se analizaron los diámetros y el número de colonias en función de la distancia al material utilizando el software Image J.

### **2.8.3. Ensayos microbiológicos**

Los cultivos de *S. aureus* ATCC 25923 se crecieron en 100ml de caldo nutritivo *overnight* a 35°C con agitación a 250rpm. A la suspensión de bacterias se le añadió caldo nutritivo fresco para conseguir una concentración de bacterias de  $1 \times 10^6$  bacterias/ml y ésta fue utilizada en los ensayos siguientes. Las muestras de biomaterial tratado y sin tratar fueron montadas en placas de 6 pocillos y se sembraron 9ml de la suspensión bacteriana a cada sustrato para cultivarlas a 33°C por 2h y permitir la adhesión bacteriana. Los sustratos con bacterias adheridas fueron removidos y enjuagados con agua bidestilada estéril para eliminar las bacterias no adheridas a las muestras. Las bacterias adheridas irreversiblemente al sustrato se desprendieron en 1ml de agua bidestilada estéril, mediante sonicación por 15 min con un sonicador Testlab (Testlab SRL, Bernal Oeste, Buenos Aires, Argentina) [95]. El número de bacterias en la suspensión sonicada fue determinado por diluciones seriadas seguidas de un cultivo bacteriano en agar nutritivo. Se realizaron réplicas experimentales hasta obtener un  $n=10$  por cada condición. Adicionalmente, la adhesión bacteriana se observó por microscopía de epifluorescencia mediante tinción con naranja de acridina. Se realizó un análisis estadístico por test de student.

#### **2.8.3.1. Tratamiento con antibiótico de bacterias sésiles**

Los ensayos de viabilidad de *S. aureus* sésiles en presencia de levofloxacina se realizaron como se describió en un trabajo previo del grupo [90]. Brevemente, la concentración mínima inhibitoria (MIC) de levofloxacina para *S. aureus* planctónicas se determinó siguiendo los lineamientos de Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI Guidelines) [105]. La MIC se definen como la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo luego de un cultivo *overnight* [106]. Seguidamente, la actividad antimicrobiana de levofloxacina frente a bacterias sésiles en biomateriales tratados y sin tratar fue analizada a 0,5XMIC (0,25µg/ml) durante 20h a 37°C. Finalmente, los sustratos se enjuagaron y se realizó el conteo de bacterias adheridas como se mencionó en la sección anterior. Se analizaron los resultados estadísticamente utilizando el test no paramétrico Kolmogorov-Smirnov.

# **Fitocompuestos: propiedades e impacto biológico**

## **Capítulo 3**

## Capítulo 3- Fitocompuestos: propiedades e impacto biológico

### 3.1. INTRODUCCIÓN

En los últimos 20 años, debido a la intención de reducir los impactos negativos en el medio ambiente, se ha incrementado el desarrollo de tecnologías ecocompatibles. Tal como se ha descrito en la sección 1.1.2, para que una tecnología química sea categorizada como “química verde”, debe utilizar y generar sustancias de baja o nula toxicidad al ambiente y a la salud humana, las materias primas deben ser renovables, en lo posible no debe utilizar sustancias auxiliares como solventes o agentes de separación y los requerimientos energéticos y el impacto económico deben ser minimizados [61]. La utilización de fitocompuestos fenólicos (FF) y, en particular, los aceites esenciales y sus compuestos fenólicos constituyentes, para generar recubrimientos, surge como estrategia innovadora ecocompatible (EIE) dado la amplia gama de propiedades de impacto biológico que poseen [62–67].

Como se ha mencionado en la sección 1.1.1, existen dos problemas relacionados a los MB que necesitan el desarrollo de nuevas estrategias de mejora. Por un lado, la degradación de los MB puede producir efectos adversos en el tejido adyacente o ecosistemas asociados a la liberación de iones y productos de degradación. Por otra parte, la resistencia a los agentes antimicrobianos se ha convertido en un desafío global urgente y se necesitan soluciones alternativas inteligentes para contrarrestar las infecciones producidas por microorganismos formadores de biofilms que son resistentes a antibióticos convencionales. Se han reportado varios enfoques para convertir las superficies de los dispositivos biomédicos en superficies antiadherentes [89,107]. La estrategia más comúnmente utilizada en ambos casos es la modificación química de la superficie del implante con moléculas biofuncionales [108], por lo que podrían utilizarse para ello los fitocompuestos y aceites esenciales, tanto para reducir la colonización bacteriana como para controlar la degradación de los MB. Sin embargo, previamente debe determinarse cuál es el límite de concentración que es posible utilizar sin generar efectos nocivos.

En este capítulo se detallarán las propiedades de los FF seleccionados para ser utilizados en las posteriores estrategias de mejora de biomateriales y los ensayos de viabilidad para constatar los intervalos de concentraciones en los que no muestran toxicidad para una línea celular modelo.

## **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

Con el fin de estudiar la biocompatibilidad de los FF a utilizar en este trabajo de tesis doctoral, se realizaron ensayos de viabilidad por reducción de MTT en células de la línea CHO-K1 (células de ovario de hámster chino), utilizando distintas concentraciones de los compuestos puros y aceites esenciales. Para evaluar la viabilidad celular, las células se sembraron en una placa de 96 pocillos y se cultivaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> en medio de cultivo HAM-F12 (MCC) durante 24h. Este medio luego se reemplazó con diferentes concentraciones de fitocompuestos. Después de 24h, los cultivos se revelaron mediante la técnica de reducción de MTT (ver sección 2.8.2.1). Cada experimento se repitió independientemente con un total de 32 veces por punto experimental. Los datos se analizaron estadísticamente utilizando ANOVA de un factor y comparaciones múltiples con el método de Bonferroni [109].

En las secciones siguientes se muestran los ensayos de citocompatibilidad realizados con los distintos compuestos fenólicos (carvacrol (Carv), timol (TOH), ácido trans-ferúlico y ácido gálico) y los aceites esenciales (*Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* y *Origanum x apalii*) con el fin de evaluar la respuesta celular a distintas concentraciones de los fitocompuestos y establecer grados de toxicidad comparando los resultados obtenidos. Debido a que los resultados encontrados en bibliografía corresponden a estudios de toxicidad de fitocompuestos realizados con distintas líneas celulares, se evidencia la necesidad de ensayar en forma comparativa la biocompatibilidad de dichos FF frente a una misma línea celular.

## **3.3. ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES E IMPACTO BIOLÓGICO**

### **3.3.1. Carvacrol**

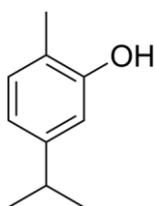


Fig. 3.1. Estructura molecular del Carv.

El carvacrol (5-isopropil-2-metil fenol) (Fig. 3.1) es un fenol monoterpénico que se encuentra en hojas de diversas plantas incluyendo bergamota, tomillo y mostaza silvestre, siendo más abundante en el orégano. Se han reportado actividades antimicrobianas y antibiofilms frente a diversas cepas bacterianas y hongos responsables de infecciones en seres humanos [108]. Es líquido a temperatura ambiente, prácticamente insoluble en agua, soluble en etanol y éter. En el Carv el grupo -OH se ubica en posición orto respecto al grupo metilo del anillo. La posición y la presencia de los sustituyentes son esenciales para las propiedades químicas y biológicas [108].

El Carv actúa como un secuestrador de radicales libres, probablemente donando átomos de hidrógeno con un electrón desapareado. Después de esta reacción, el radical Carv se estabiliza por resonancia con deslocalización de electrones en toda la molécula.

El Carv interactúa con la bicapa lipídica de la membrana citoplásmica bacteriana debido a su naturaleza hidrofóbica y se alinea entre las cadenas de ácidos grasos causando la expansión y desestabilización de la estructura de la membrana al aumentar su fluidez y permeabilidad para protones e iones. La pérdida del gradiente iónico provoca la muerte de las bacterias. Además, a concentraciones sub inhibitorias el Carv induce un incremento de ácidos grasos insaturados en la membrana de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli* [110,111]. Este fitocompuesto es efectivo para reducir la formación de biofilms de *S. aureus*, *Salmonella typhimurium*, *L. monocytogenes* y *Chromobacter violaceum*, entre otras, a diferentes concentraciones por debajo de la MIC. Además, presenta propiedades antifúngicas frente a *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae* induciendo daño en la membrana, estrés en sistema de endomembranas, bloqueando la síntesis de una provitamina denominada ergosterol, entre otras [108].

Se han llevado a cabo algunos estudios *in vivo* de biocompatibilidad del Carv, donde se reportaron resultados diversos, mostrando valores de dosis letal 50 (DL50, definida como la dosis de una sustancia que provoca la muerte del 50% de un conjunto de animales de prueba) que variaron entre 70 a 810mg/kg en ratas por distintas vías de administración [108]. Los estudios *in vitro* en líneas celulares son escasos, entre ellos figura el realizado en líneas de cáncer hepático (HepG2) y en leucemia mielogénica humana (K562) que muestran que el Carv no generaría efectos citotóxicos a concentraciones menores a 30µg/ml. [112]. Dichos estudios evidencian la necesidad de ensayar la biocompatibilidad del Carv en otras líneas celulares.

### 3.3.1.1. Ensayos de citotoxicidad realizados con carvacrol

En la Fig. 3.2 se muestran los resultados de biocompatibilidad en células CHO-K1 que evidencian una disminución significativa ( $p \leq 0,001$ ) de la viabilidad celular a partir de  $5 \mu\text{g/ml}$  de Carv, concentración menor a las reportadas en trabajos con otras líneas celulares [108,112], y una concentración  $\text{EC}_{50}$  (effective concentration 50, definida en este trabajo como la concentración de un compuesto que induce un 50% de reducción de la viabilidad celular) que se ubicaría entre  $50\text{-}75 \mu\text{g/ml}$ . A partir de  $5 \mu\text{g/ml}$  se observó un leve, aunque significativo descenso de la viabilidad celular ( $86,6 \pm 1,0\%$  con respecto al control de células). A mayores concentraciones, se evidenció un descenso drástico de la viabilidad celular a partir de  $75 \mu\text{g/ml}$  de Carv ( $44,7 \pm 1,5\%$  del control), alcanzando valores de  $8,1 \pm 0,3\%$  para  $100 \mu\text{g/ml}$  y  $6,9 \pm 0,1\%$  para  $150 \mu\text{g/ml}$ .

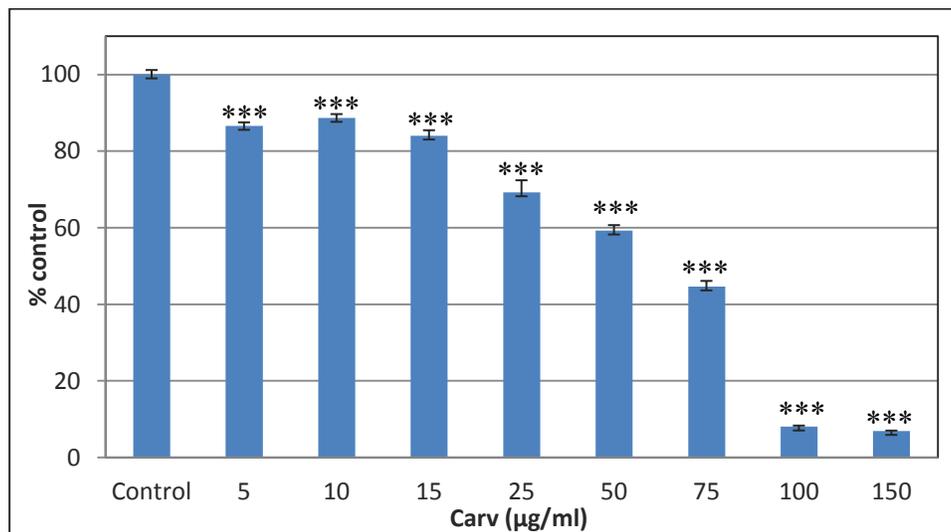


Fig. 3.2. Respuesta de las células CHO-K1 a diferentes concentraciones de Carv luego de 24h de exposición evaluada mediante el ensayo de MTT. \*\*\*,  $p \leq 0,001$ : diferencias significativas frente al control de células.

### 3.3.2. Timol

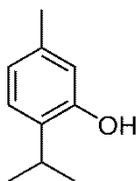


Fig. 3.3. Estructura molecular del TOH.

Timol (2-isopropil-5-metilfenol) (Fig. 3.3), isómero estructural del Carv, es el principal monoterpeno fenólico presente en aceites esenciales de diversas plantas pertenecientes a la familia de la lamiláceas, como las del género *Thymus*, *Ocimum*, *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra*, y *Monarda*, entre otras. Entre las aplicaciones más difundidas, el TOH se utiliza como aditivo en alimentos (aprobado por la Food and Drug Administration o FDA), en la formulación de insecticidas, cosméticos y antisépticos. Posee baja solubilidad en agua y una estructura cristalina a temperatura ambiente. Se caracteriza esencialmente por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anestésicas a nivel local, anticonceptivas, cicatrizantes, antisépticas, antibacterianas y antifúngicas [113].

Posee excelentes propiedades antibacterianas frente a cepas de *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus epidermidis* y otras cepas estándar y provenientes de aislamientos clínicos. El mecanismo de acción está relacionado con la habilidad del compuesto de perturbar la fracción lipídica de la membrana plasmática de las bacterias induciendo su permeabilización, despolarización y pérdida de contenido citosólico. Adicionalmente presenta actividad inhibitoria de la formación de biofilms en cepas bacterianas y fúngicas como *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [113].

Por otro lado, el efecto antioxidante del TOH se debe a sus características como secuestrador de radicales libres y de inhibición de la peroxidación lipídica [114–117]. En cultivos de células eucariotas utilizando otros sistemas oxidantes, como el de estrés celular inducido por tert-butilhidroperóxido, por radiación gama y compuestos heterocíclicos el TOH demostró acción protectora de la viabilidad [118–120].

En cuanto a su biocompatibilidad, y tomando en cuenta que es un aditivo aprobado por la FDA para su uso en alimentos, diversos estudios *in vitro* indican que el TOH en un amplio

rango de concentraciones no evidencia alteraciones en la viabilidad de células hepáticas (dosis  $\leq 100\mu\text{g/ml}$ ) [118], fibroblastos de pulmón de hámster chino (V79) (dosis  $\leq 100\mu\text{g/ml}$ ) [119], línea de leucemia mielogénica humana (K562) (EC50 entre 60 y  $75\mu\text{g/ml}$ ) [112] y de melanoma murino (B16-F10) (dosis  $\leq 60\mu\text{g/ml}$ ) [73].

### 3.3.2.1. Ensayos de citotoxicidad realizados con timol

Los resultados de biocompatibilidad en células CHO-K1 (Fig. 3.4) mostraron un comportamiento del TOH similar a los trabajos citados, con una disminución significativa ( $p \leq 0,001$ ) de la viabilidad celular a partir de  $50\mu\text{g/ml}$ , concentraciones más altas que las encontradas para el Carv (Fig. 3.2). En presencia de concentraciones bajas de TOH (entre 5 y  $25\mu\text{g/ml}$ ) la viabilidad celular presentó valores similares al control de células (cerca del 100% del control) y a partir de  $50\mu\text{g/ml}$  comienza a notarse una disminución significativa de la viabilidad ( $83,3 \pm 1,4\%$  del control). Puede observarse que la dosis EC50 para el TOH en la línea celular empleada se presenta entre 75 y  $100\mu\text{g/ml}$  cuyos porcentajes de viabilidad resultaron  $61,9 \pm 2,3$  y  $44,7 \pm 1,0\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. A la concentración más alta de TOH evaluada el porcentaje de células viables disminuyó drásticamente llegando a valores de  $17,3 \pm 0,9\%$  del control.

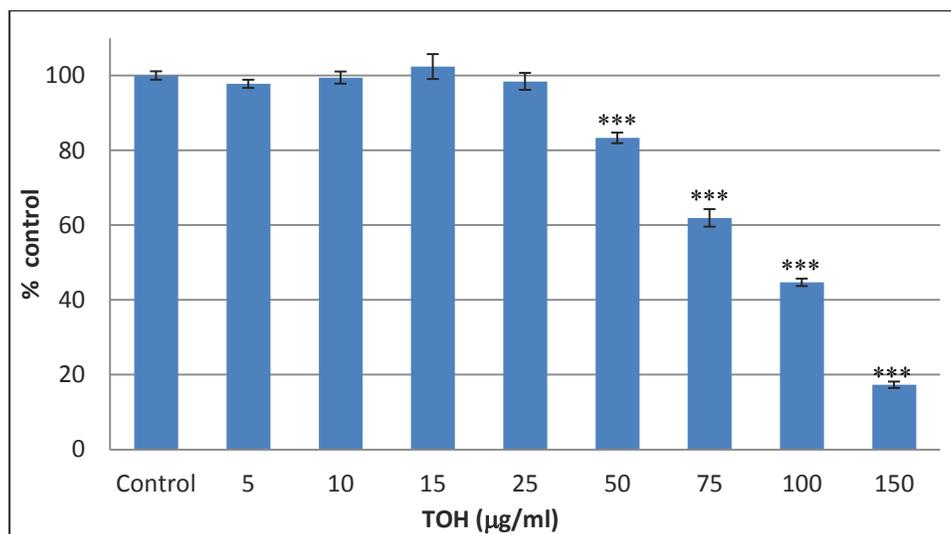


Fig. 3.4. Respuesta de las células CHO-K1 a diferentes concentraciones de TOH luego de 24h de exposición evaluada mediante el ensayo de MTT. \*\*\*,  $p \leq 0,001$ : diferencias significativas frente al control de células.

### 3.3.3. Ácido trans-ferúlico

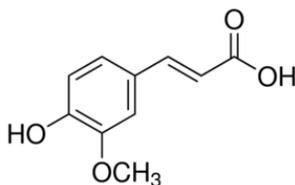


Fig. 3.5. Estructura molecular del ácido trans-ferúlico.

El ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico) (Fig. 3.5) es un ácido fenólico presente en grandes cantidades en diversas especies vegetales, como arroz, trigo, avena, soja, nueces, maní, piña, naranja, pomelo, bambú, berenjena, remolacha, etc. [121,122]. Posee una amplia variedad de actividades de interés biológico tales como efectos antioxidantes, antiapoptóticos, hepatoprotectores, anticancerígenos, antiinflamatorios, cardioprotector, entre otras [121–123].

El doble enlace presente en la cadena lateral del anillo fenólico está sujeto a una isomerización cis-trans, y el radical fenoxi estabilizado por resonancia explica su efectiva actividad antioxidante. El ácido ferúlico muestra una alta actividad de captación de peróxido de hidrógeno, superóxido, radical hidroxilo y radicales libres de dióxido de nitrógeno. El ácido ferúlico no solo elimina los radicales libres, sino que también aumenta la actividad de las enzimas que son responsables de eliminar dichos radicales e inhibe las enzimas que catalizan su producción [121].

El ácido ferúlico posee un amplio espectro de actividad antimicrobiana. Exhibe esta actividad en bacterias gram-positivas, gram-negativas y levaduras. También muestra fuertes efectos inhibidores sobre el crecimiento de la microflora gastrointestinal humana, incluyendo *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter koseri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori* y *Shigella sonnei*. El mecanismo antimicrobiano del ácido ferúlico se atribuye a su inhibición de la arilamina N-acetiltransferasa en las bacterias [23]. Además, se ha reportado que el compuesto reduce la actividad de biofilms de *S. aureus* y *P. aeruginosa* en un 70% inhibiendo la movilidad bacteriana, previniendo así la formación de biofilms de bacterias patógenas [124].

Este FF presenta una baja toxicidad con una DL50 de 2,1 a 2,4g/kg en ratas F344 [122]. Kanski *et al.* [125] evidenciaron, mediante ensayos *in vitro* en células neuronales, un efecto protector del ácido ferúlico frente a radicales peroxilos e hidroxilos, observándose que a

concentraciones de 25 a 50 $\mu$ M (5 a 10 $\mu$ g/ml) del compuesto, no se observa una reducción significativa de la viabilidad celular. Sin embargo, pocos datos se han reportado de la biocompatibilidad del compuesto en cultivos de distintas líneas celulares.

### 3.3.3.1. Ensayos de citotoxicidad realizados con ácido trans-ferúlico

Los resultados de biocompatibilidad del ácido ferúlico en células de la línea CHO-K1 (Fig. 3.6) mostraron que, a concentraciones entre 5 y 50 $\mu$ g/ml, la viabilidad celular es similar al control de células. Se observó una reducción significativa ( $p \leq 0,05$ ) de la viabilidad celular a partir de 100 $\mu$ g/ml con valores de porcentaje de células viables de  $89,9 \pm 1,8\%$  del control, mientras que empleando una concentración de 150 $\mu$ g/ml aumenta la diferencia frente al control de células ( $p \leq 0,001$ ) alcanzando valores de  $82,6 \pm 1,7\%$  del control. En base al rango de concentraciones evaluado se puede inferir que la dosis EC50 resultaría mayor a 150 $\mu$ g/ml, mostrando un amplio intervalo de biocompatibilidad.

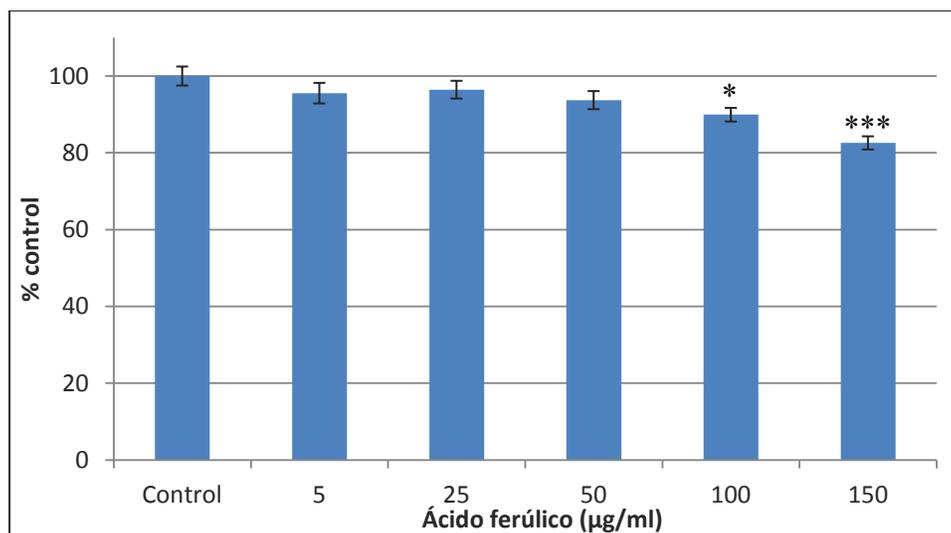


Fig. 3.6. Respuesta de las células CHO-K1 a diferentes concentraciones de ácido trans-ferúlico luego de 24h de exposición evaluada mediante el ensayo de MTT. \*\*\*,  $p \leq 0,001$ ; \*,  $p \leq 0,05$ : diferencias significativas frente al control de células.

### 3.3.4. Ácido gálico

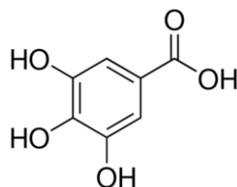


Fig. 3.7. Estructura molecular del ácido gálico.

El ácido gálico (ácido 3, 4, 5-trihidroxibenzoico) (Fig. 3.7) es un compuesto fenólico que se distribuye ampliamente en todo el reino vegetal, como las hojas de té, el aguacate, la uva, las grosellas, las raíces y la corteza de granadas y nueces [126]. También se encuentra en algunas especies de plantas de madera dura como el roble y la castaña. El ácido gálico es un cristal blanco amarillento que tiene una solubilidad en agua 1,1% a 20°C [127]. Es bien conocido por su fuerte actividad antioxidante, antimutagénica, anticancerígena, antialérgica, antiinflamatoria, antiviral, antibacteriana y antiarteriosclerosis. Se ha reportado que el ácido gálico exhibe propiedades antibacterianas contra una amplia gama de patógenos, como *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* [127].

Este FF posee una actividad de captación de radicales mayor que otros compuestos fenólicos, incluso mayor que el antioxidante sintético Trolox®. Ésta característica puede ser atribuida a la presencia de tres grupos oxhidrilos adyacentes en el anillo, mostrando así una correlación entre la estructura y la función mencionada [128].

En un estudio reportado por Sohi *et al.*, linfocitos de sangre periférica cultivados en presencia de 200µM (34µg/ml) de ácido gálico, no presentaron indicios de muerte celular programada. Dicho compuesto genera también, un efecto antiapoptótico frente al daño inducido al ADN por el peróxido de hidrógeno [128]. En células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), el tratamiento con diferentes concentraciones de derivados de ácido gálico por 24h no evidenció variaciones en la viabilidad (<150µM, o 25,5µg/ml) [129]. Por otro lado, ensayos *in vivo* evidencian un efecto protector frente a daños de diversos tejidos y órganos, incluidos el cardiovascular, riñón, neuronal, hígado, etc. [127,130,131].

### 3.3.4.1. Ensayos de citotoxicidad realizados con ácido gálico

Los resultados de biocompatibilidad del ácido gálico en células CHO-K1 se presentan en la Fig. 3.8. En ella se observa que empleando concentraciones pequeñas de ácido gálico (entre 5 y 25µg/ml) la viabilidad celular no presenta diferencias frente al control de células. Sin embargo, a partir de 50µg/ml los valores de porcentaje de células viables disminuye a  $92,1\pm 0,6\%$  para 50µg/ml,  $65,0\pm 0,6\%$  para 100µg/ml y  $38,0\pm 1,1\%$  para 150µg/ml frente al control, evidenciando una disminución significativa de la viabilidad ( $p\leq 0,001$ ). En base a los datos obtenidos se pudo inferir que la dosis EC50 se ubicaría entre 100 y 150µg/ml.

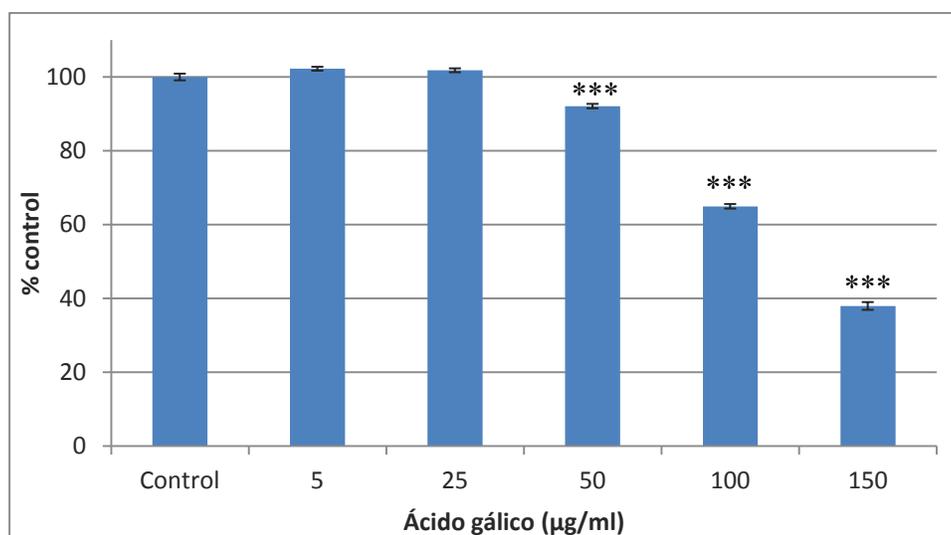


Fig. 3.8. Respuesta de las células CHO-K1 a diferentes concentraciones de ácido gálico luego de 24h de exposición evaluada mediante el ensayo de MTT. \*\*\*,  $p\leq 0,001$ : diferencias significativas frente al control de células.

### 3.3.5. Análisis comparativo de los resultados de los compuestos puros

Tomando en consideración los datos de viabilidad celular obtenidos para los compuestos puros presentados en la Tabla 3.1, podemos concluir que los ácidos fenólicos (gálico y trans-ferúlico) evidencian un rango mayor de concentraciones biocompatibles que el TOH y el Carv. El ácido trans-ferúlico no presentó disminución significativa de la viabilidad celular en todo el intervalo de concentraciones empleadas, indicando una mayor biocompatibilidad frente a todos los compuestos analizados. En particular, los resultados obtenidos para los isómeros fenólicos (Carv y TOH) mostraron una diferencia en su comportamiento frente a

la viabilidad celular indicando una menor biocompatibilidad para el Carv, dando cuenta de la influencia de la estructura molecular en la toxicidad de cada molécula.

*Tabla 3.1. Porcentajes de viabilidad celular en función de la concentración y dosis EC50 obtenidos para los fitocompuestos analizados.*

| Compuesto          | 5µg/ml    | 10µg/ml  | 15µg/ml   | 25µg/ml   | 50µg/ml  | 75µg/ml  | 100µg/ml | 150µg/ml | EC50 (µg/ml) | EC50 (M)  |
|--------------------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|--------------|-----------|
| Carv               | 86,6±1,0  | 88,7±1,0 | 84,0±1,4  | 69,2±3,2  | 59,2±1,4 | 44,7±1,5 | 8,1±0,3  | 6,9±0,1  | 50-75        | 0,33-0,50 |
| TOH                | 97,8±1,1  | 99,4±1,6 | 102,4±3,3 | 98,4±2,3  | 83,3±1,4 | 61,9±2,3 | 44,7±1,0 | 17,3±0,9 | 75-100       | 0,50-0,67 |
| Ác. trans-ferúlico | 95,5±2,7  | -        | -         | 96,4±2,3  | 93,7±2,4 | -        | 89,9±1,8 | 82,6±1,7 | >150         | >0,77     |
| Ác. gálico         | 102,2±0,5 | -        | -         | 101,8±0,5 | 92,1±0,6 | -        | 65,0±0,6 | 38,0±1,1 | 100-150      | 0,59-0,88 |

### **3.3.6. Aceites esenciales de tomillo y orégano**

#### **3.3.6.1. *Thymus vulgaris***

El aceite esencial de tomillo (*T. vulgaris*) es ampliamente utilizado en medicina popular para el tratamiento de una variedad de enfermedades que incluyen trastornos gastroentéricos y broncopulmonares, antihelmínticos, antiespasmódicos, sedantes, etc. Se ha reportado que el tomillo posee numerosas actividades biológicas, entre ellas, antibacteriana, antioxidante y antifúngico [132]. Sus constituyentes aromáticos activos se han aplicado ampliamente, por ejemplo, como componentes en pastillas para la garganta, productos de higiene dental, enjuagues bucales, lociones, cremas tópicas para la piel y como preservador de alimentos. Los principales constituyentes volátiles del aceite esencial de tomillo son: TOH (20–80%), Carv (0,5–6%), p-cimeno (9–43%), limoneno (0,2–24%) y  $\gamma$ -terpineno (0–13%) [133].

Presenta propiedades antibacterianas frente a *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. Aureus*, *L. monocytogenes* [134], *B. cereus*, *M. luteous*, *E. feacalis*, *V. alginolyticus*, y diversas cepas de *Salmonella sp.* [135].

En ensayos *in vitro* en línea celular de adenocarcinoma de pulmón (A549) se observó una baja citotoxicidad del aceite esencial de tomillo siendo la EC50=390µg/ml luego de 48 h de

exposición [136]. Otros estudios llevados a cabo en distintas líneas celulares humanas (SW872, SW982, HS 39.T, HS 5.T, HL-60, M14WM, MCF-7, HT29, HEL 12469) demostraron una baja toxicidad del aceite esencial de *T. vulgaris* [137,138]. La densidad del aceite esencial utilizado en el presente trabajo resultó 0,953g/ml, y fue obtenido, al igual que los otros dos aceites, mediante destilación por arrastre de vapor en el laboratorio de fitoquímica de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata.

### 3.3.6.1.A. Ensayos de citotoxicidad realizados con aceite de *Thymus vulgaris*

Los resultados de citotoxicidad del aceite esencial de *T. vulgaris* en células CHO-K1 se muestran en la Fig. 3.9. En ella se evidenció una disminución significativa de la viabilidad ( $p \leq 0,001$ ) a partir de 20  $\mu\text{l/ml}$  presentando un porcentaje de valor de  $87,3 \pm 1,1\%$  frente al control de células. A partir de 110  $\mu\text{l/ml}$  se observa una drástica disminución de la viabilidad celular ( $32,5 \pm 1,0\%$ ) indicando una dosis EC50 entre 20 y 110  $\mu\text{l/ml}$  ( $\sim 20$  y  $\sim 103 \mu\text{g/ml}$ ). A concentraciones mayores el porcentaje de células viables desciende a valores de  $5,8 \pm 0,1\%$  para 220  $\mu\text{l/ml}$ ,  $5,1 \pm 0,1\%$  para 430  $\mu\text{l/ml}$  y  $4,7 \pm 0,1\%$  para 650  $\mu\text{l/ml}$ .

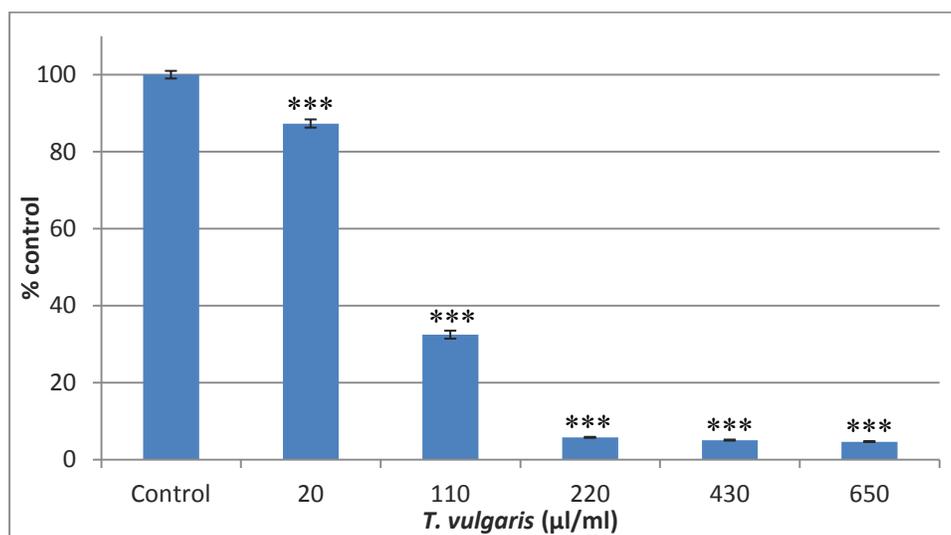


Fig. 3.9. Respuesta de las células CHO-K1 a diferentes concentraciones de aceite esencial de *T. vulgaris* luego de 24h de exposición evaluada mediante el ensayo de MTT. \*\*\*,  $p \leq 0,001$ : diferencias significativas frente al control de células.

### 3.3.6.2. *Origanum vulgare*

En el país se comercializan seis especies de orégano entre las cuales se encuentran *O. vulgare* y una especie híbrida *O. x applii* (*O. vulgare* x *O. majorana*) [139]. El aceite esencial de *O. vulgare* posee actividades antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, antiinflamatorias y analgésicas, entre otras [138]. Sus constituyentes aromáticos principales son: TOH (20-45%), Carv (<0,05-20%) y  $\gamma$ -terpineno (5-15%) [139–141]. Se utilizan ampliamente en las industrias farmacéutica y cosmética como hierba culinaria, sustancias aromatizantes de productos alimenticios, bebidas y perfumería [142]. La densidad del aceite esencial utilizado para los ensayos de viabilidad fue 0,938g/ml.

Es extremadamente efectivo como antimicrobiano frente a cepas bacterianas y fúngicas de interés clínico como ambientales como por ejemplo: *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. fecalis*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Arthrobacter protophormiae*, *Pseudomonas fragi*, *Cladosporium cladosporoides*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Chaetomium globosum* y *Penicillium chrysogenum* [138].

Estudios de biocompatibilidad llevados a cabo en distintas líneas celulares humanas (SW872, SW982, HS 39.T, HS 5.T, HL-60, M14WM, MCF-7, HT29, HEL 12469) demostraron una baja toxicidad del aceite esencial de *O. vulgare* [137,138].

#### 3.3.6.2.A. Ensayos de citotoxicidad realizados con aceite de *Origanum vulgare*

Los resultados de biocompatibilidad del aceite esencial de *O. vulgare* en células CHO-K1 se presentan en la Fig. 3.10, observándose una disminución significativa de la viabilidad celular ( $p \leq 0,001$ ) a partir de 20 $\mu$ l/ml (78,9 $\pm$ 1,9% del control), y un drástico descenso del porcentaje de células viables a partir de concentraciones mayores llegando a valores de 5,8 $\pm$ 0,1% para 110 $\mu$ l/ml, 5,2 $\pm$ 0,1% para 220 $\mu$ l/ml, 5,0 $\pm$ 0,1% para 430 $\mu$ l/ml y 5,0 $\pm$ 0,1% para 650 $\mu$ l/ml. En base a los resultados obtenidos la dosis EC50 del aceite esencial se ubica entre 20 y 110 $\mu$ l/ml (~20 y 102 $\mu$ g/ml), similar a lo obtenido con el aceite de tomillo.

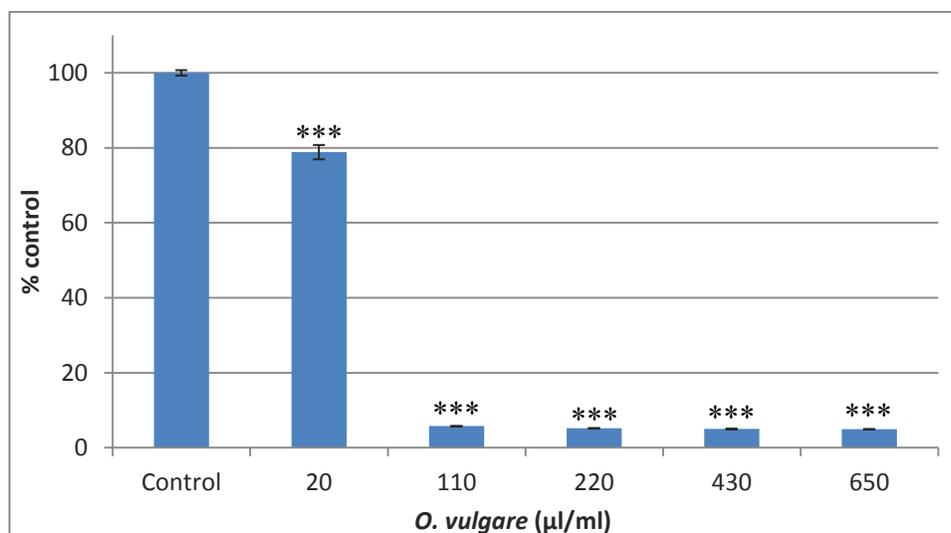


Fig. 3.10. Respuesta de las células CHO-K1 a diferentes concentraciones de aceite esencial de *O. vulgare* luego de 24h de exposición evaluada mediante el ensayo de MTT.

\*\*\*,  $p \leq 0,001$ : diferencias significativas frente al control de células.

### 3.3.6.3. *Origanum x applii*

En este trabajo se utilizó además el aceite esencial proveniente de la especie híbrida *O. x applii*, cuya densidad fue 0,883g/ml.

#### 3.3.6.3.A. Ensayos de citotoxicidad realizados con aceite de *Origanum x applii*

Los resultados de la biocompatibilidad del aceite esencial de *O. x applii* se muestran en la Fig. 3.11, donde se evidencia un porcentaje de células viables similar al control empleando una concentración de 20µl/ml (94,8±1,6%). Se observa una disminución significativa de la viabilidad celular ( $p \leq 0,001$ ) a partir de 65µl/ml (85,5±1,4%), descendiendo a 66,7±1,9% para 110µl/ml y a 10,6±1,0% para 220µl/ml. A concentraciones más altas de aceite esencial el daño celular es aún mayor, llegando a valores de 8,7±0,2% para 430µl/ml y de 8,6±0,2% para 650µl/ml. En base a los resultados obtenidos la dosis EC50 se ubica entre 110 y 220µl/ml (96 y 191µg/ml) mostrando así una mejor biocompatibilidad frente al aceite esencial de *O. vulgare* y *T. vulgaris*.

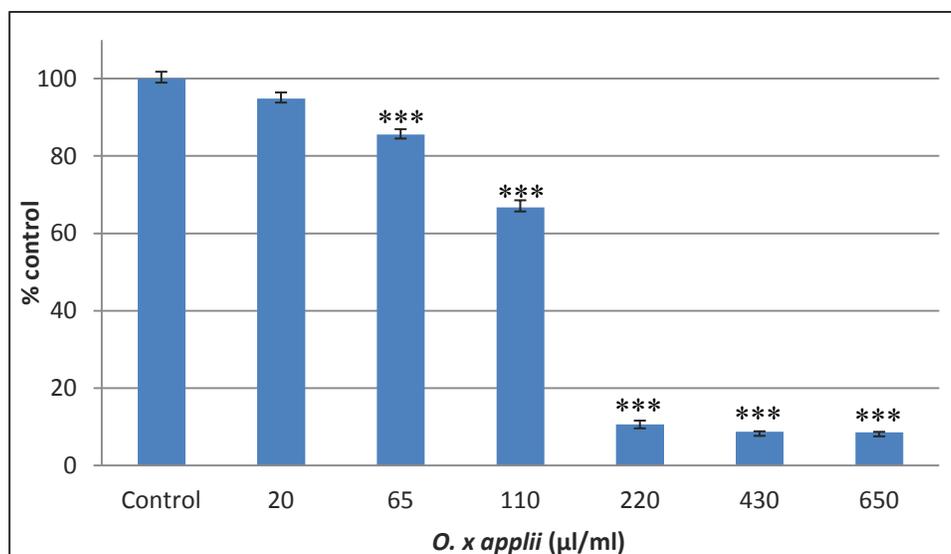


Fig. 3.11. Respuesta de las células CHO-K1 a diferentes concentraciones de aceite esencial de *O. x applii* luego de 24h de exposición evaluada mediante el ensayo de MTT.

\*\*\*,  $p \leq 0,001$ : diferencias significativas frente al control de células.

### 3.3.7. Análisis comparativo de los resultados de los aceites esenciales

Los datos de viabilidad celular obtenidos para ambos aceites esenciales se presentan comparativamente en la Tabla 3.2. En ella puede observarse una mayor biocompatibilidad por parte del aceite esencial de *O. x applii*, con una dosis EC50 entre 96-191µg/ml, seguido del aceite esencial de *T. vulgaris*, con mayores porcentajes de células viables que las obtenidas para *O. vulgare* a las mismas concentraciones.

Tabla 3.2. Porcentajes de viabilidad celular en función de la concentración y dosis EC50 obtenidos para los aceites esenciales analizados.

| Aceite esencial    | 20µl/ml  | 65µl/ml  | 110µl/ml | 220µl/ml | 430µl/ml | 650µl/ml | EC50                          |
|--------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------------------------------|
| <i>T. vulgaris</i> | 87,3±1,1 | -        | 32,5±1,0 | 5,8±0,1  | 5,1±0,1  | 4,7±0,1  | 20-110µl/ml (~20 y ~103µg/ml) |
| <i>O. vulgare</i>  | 78,9±1,9 | -        | 5,8±0,1  | 5,2±0,1  | 5,0±0,1  | 5,0±0,1  | 20-110µl/ml (~20 y ~102µg/ml) |
| <i>O. x applii</i> | 94,8±1,6 | 85,5±1,4 | 66,7±1,9 | 10,6±1,0 | 8,7±0,2  | 8,6±0,2  | 110-220µl/ml (96-191µg/ml)    |

### **3.4. CONCLUSIONES**

El National Cancer Institute estableció un criterio según el cual sólo los compuestos naturales con una EC50 <20µg/ml se consideran citotóxicos [138,143]. Los resultados obtenidos con los distintos compuestos fenólicos y aceites esenciales muestran que ninguno de los fitocompuestos a utilizar en el presente trabajo son citotóxicos para la línea celular CHO-K1 (ver Tablas 3.1 y 3.2). Al comparar la viabilidad celular de los isómeros TOH y Carv se observó que el TOH presenta un mayor rango de concentraciones biocompatibles que el Carv, evidenciando la influencia de la estructura molecular en la biocompatibilidad de la molécula. Entre los ácidos fenólicos estudiados, el ácido ferúlico mostró un rango de concentraciones biocompatibles mayor que el ácido gálico, siendo el compuesto con menor citotoxicidad observada en las condiciones experimentales empleadas. Con respecto a los aceites esenciales, la viabilidad celular evaluada evidenció una mejor biocompatibilidad para el aceite esencial de *O. x applii*.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos acerca de las diversas actividades biológicas, todos los fitocompuestos ensayados son adecuados para su utilización en modificaciones superficiales de biomateriales.

**Estudio comparativo de las  
respuestas fisicoquímicas de los  
fitocompuestos sobre Pt y Cu**

**Capítulo 4**

## Capítulo 4- Estudio comparativo de las respuestas fisicoquímicas de los fitocompuestos sobre Pt y Cu

### 4.1. INTRODUCCIÓN

El estudio de la respuesta fisicoquímica de fitocompuestos sobre Pt y Cu se utilizó como base para evaluar la reactividad de estos productos naturales sobre superficies metálicas y los posibles procesos de electropolimerización. En base a los resultados obtenidos se seleccionaron posteriormente los compuestos más adecuados para ser utilizados en modificaciones superficiales de biomateriales metálicos.

Considerando diversos reportes sobre procesos de electropolimerización de fenoles y derivados sobre superficies catalíticas, se ha observado mediante la técnica de voltametría cíclica que los picos de oxidación de dichos compuestos generalmente se presentan a potenciales mayores a 0,40V [76–80], dependiendo de la ubicación, número y naturaleza de los sustituyentes del anillo fenólico. En particular, los estudios reportados sobre electrodos de Pt indican que los fenoles y sus derivados se oxidan simultáneamente con la formación de PtO y no sobre Pt desnudo [77,79]. Una de las razones por las cuales los compuestos presentan corrientes de oxidación distintas sería la magnitud de la interacción entre las moléculas con la superficie del electrodo. Un mayor efecto inductivo electrónico en la molécula por grupos electronegativos sustituyentes del anillo fenólico supondría una mayor fuerza de interacción con la superficie de Pt debido a su orientación plana, lo que resultaría en una mayor densidad de corriente en el registro potenciodinámico [77].

El estudio de la evolución de los registros potenciodinámicos en presencia de los compuestos fenólicos puede evidenciar características particulares de las películas electropoliméricas generadas. Así, si se formara una película polimérica homogénea y compacta durante el primer ciclo voltamperométrico sobre Pt, la misma impediría la penetración de radicales fenólicos a la capa polimérica y su posterior oxidación, observándose una corriente residual mínima durante el registro del segundo ciclo potenciodinámico [77,80]. El decrecimiento de la corriente en los ciclos sucesivos puede ser explicado por la desactivación del electrodo de Pt debido al proceso de polimerización y al impedimento estérico de la difusión de los iones fenóxi a través de la superficie del electrodo por dentro del film [77]. La ausencia de un pico catódico de reducción durante la electropolimerización indicaría un proceso irreversible [80].

El objetivo de los siguientes ensayos fue estudiar el comportamiento electroquímico de diversos FF sobre Pt (como sustrato control) y Cu, y caracterizar por espectroscopía

infrarroja (ATR-FTIR) los productos generados. En base a los resultados obtenidos se seleccionarán las mejores condiciones experimentales para la formación de los electropolímeros, considerando su homogeneidad y tipos de uniones entre monómeros. Las muestras de Cu con películas electropoliméricas formadas a partir de las condiciones experimentales seleccionadas se analizarán mediante ensayos de corrosión, y los recubrimientos con mayor efecto inhibitorio de la corrosión del Cu se escogerán para estudios posteriores.

## **4.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.2.1. Estudio del comportamiento electroquímico de los fitocompuestos**

El estudio de la respuesta electroquímica de los FF a utilizar fue primeramente realizado sobre electrodo de alambre de Pt en un electrolito deaireado con N<sub>2</sub> (20min) de 0,2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conteniendo 0,01M de FF (TOH, Carv, ácido trans-ferúlico, ácido gálico) (Sigma, St. Louis, MO, USA) o concentraciones de aceites esenciales (*T. vulgaris*, *O. vulgare*, *O. x applii*) considerando similar %m/m de TOH. El electrodo de trabajo fue previamente activado en una solución 0,2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mediante 15 ciclos voltamperométricos entre -0,24V y 1,40V a 100mVs<sup>-1</sup>. Posteriormente se utilizó la técnica de voltamperometría cíclica para estudiar los procesos de oxidación de los FF sobre Pt, barriendo entre los voltajes -0,24V y 1,20V a una velocidad de barrido de 5mVs<sup>-1</sup>. Se evaluaron los potenciales de pico (E<sub>pox</sub>) para cada FF y la evolución de los ciclos sucesivos. Los potenciales en la totalidad del presente trabajo se expresan frente al electrodo de calomel saturado.

A continuación se estudió la reactividad de los FF sobre el cobre, empleando cilindros obtenidos de una barra de Cu (Cu electrolítico 99,7%, 9mm diámetro) embutidos en polioximetileno. El electrolito utilizado consistió en una solución hidroalcohólica 70/30 H<sub>2</sub>O:etanol 0,3M NaOH conteniendo 0,1M de FF o concentraciones de aceites esenciales tomando para efectos comparativos el mismo % en masa de TOH en todos los casos. Se realizaron barridos potenciodinámicos (voltamperometría cíclica entre 0,30 y 1,00V a una velocidad de barrido de 50mVs<sup>-1</sup> y un total de 39 ciclos) estudiando los picos de oxidación y la evolución de la densidad de corriente en direcciones anódicas y catódicas en todos los ciclos.

#### **4.2.2. ATR-FTIR de los productos generados a partir de ensayos electroquímicos**

Los productos generados en la superficie de los electrodos metálicos (lámina de Pt o Cu) fueron estudiados mediante ATR-FTIR en el rango de 600 y 4000 $\text{cm}^{-1}$  con un total de 256 scans y una resolución de 2 $\text{cm}^{-1}$  tal como se indicó en el Capítulo 2. Se realizaron asignaciones de bandas según bibliografía relacionada utilizando el software KnowItAll (BIORAD, California, Estados Unidos) con la base de datos correspondiente a The Sadtler Handbook of Infrared Spectra [144].

#### **4.2.3. Ensayo de capacidad inhibitoria de la corrosión del Cu con tratamiento**

Los tratamientos realizados por voltametría cíclica con fitocompuestos sobre superficies de Cu se testearon en una solución 0,136M KCl (calculada en base a concentraciones de iones  $\text{Cl}^-$  en medios de cultivos celular) mediante barridos anódicos de potencial (-1,00V a 0,20V; 1 $\text{mVs}^{-1}$ ) para evaluar su eventual comportamiento inhibitorio de la corrosión del Cu.

### **4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Esta sección consta de dos partes donde se analizan las respuestas electroquímicas y los espectros ATR-FTIR obtenidos al utilizar los fitocompuestos sobre Pt (Sección A) como control y sobre Cu (Sección B). Al finalizar se comparan los resultados obtenidos con el fin de seleccionar el compuesto cuya polimerización brinda al Cu mejores propiedades inhibitorias de la corrosión.

## **A. RESPUESTA ELECTROQUÍMICA DE FITOCOMPUESTOS SOBRE Pt. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS FORMADOS**

### **4.3.1. Respuesta electroquímica de fitocompuestos sobre Pt**

Con el fin de evaluar el comportamiento electroquímico de los fitocompuestos sobre el Pt y compararlos con la información bibliográfica, se llevaron a cabo registros

potenciodinámicos de Pt en 0,2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conteniendo TOH, Carv, ácido trans-ferúlico, ácido gálico o aceites esenciales de *T. vulgaris*, *O. vulgare*, *O. x applii*.

En un principio se realizó un registro potenciodinámico en un electrolito 0,2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (sin fitocompuestos). En el recuadro de la Fig. 4.1 se distinguen picos característicos de la adsorción de H<sub>2</sub> a potenciales catódicos con máximos de aproximadamente 50μA/cm<sup>2</sup>, un aumento de la densidad de corriente a partir de 0,70V que corresponde a la formación de óxido de Pt y durante el barrido en sentido catódico un pico de reducción del PtO de 0,50V. El registro observado es similar a los reportados con Pt en soluciones ácidas [78,79].

#### 4.3.1.1 Carvacrol y timol

La voltamperometría cíclica del Pt en presencia de carvacrol (Carv) (Fig. 4.1), mostró un pico anódico con una densidad de corriente de oxidación de 675μAcm<sup>-2</sup> a un potencial de 0,87V en el primer ciclo, reduciéndose en el segundo a 323μAcm<sup>-2</sup> y desplazando su potencial en sentido anódico a un potencial de 0,92V, observándose una continua disminución de la corriente y el corrimiento del pico en sentido anódico en los ciclos sucesivos. Durante el barrido en sentido catódico, no se observó el pico de reducción de PtO ni de H<sub>2</sub> en ninguno de los ciclos (presente en el Pt control, ver recuadro en la Fig. 4.1). Se ha reportado un corrimiento similar del potencial del pico de oxidación hacia valores más anódicos a partir del segundo ciclo en ensayos con fenoles clorinados sobre Pt, en los cuales los iones poliméricos tienen menor capacidad de relocalización de electrones por pérdida de grupos electronegativos del anillo fenólico (-Cl) [77]. En el Carv, tanto el grupo isopropilo como el oxhidrilo tienen capacidad de donar electrones. Al oxidarse el monómero a polyCarv el grupo oxhidrilo reacciona para formar uniones éter (tal como se comprueba en los espectros de FTIR que se muestran en los próximos apartados Fig. 4.9), las cuales poseen menor capacidad donante de electrones que el sustituyente –OH [145], provocando probablemente el corrimiento del potencial del pico de oxidación en los ciclos voltamperométricos siguientes.

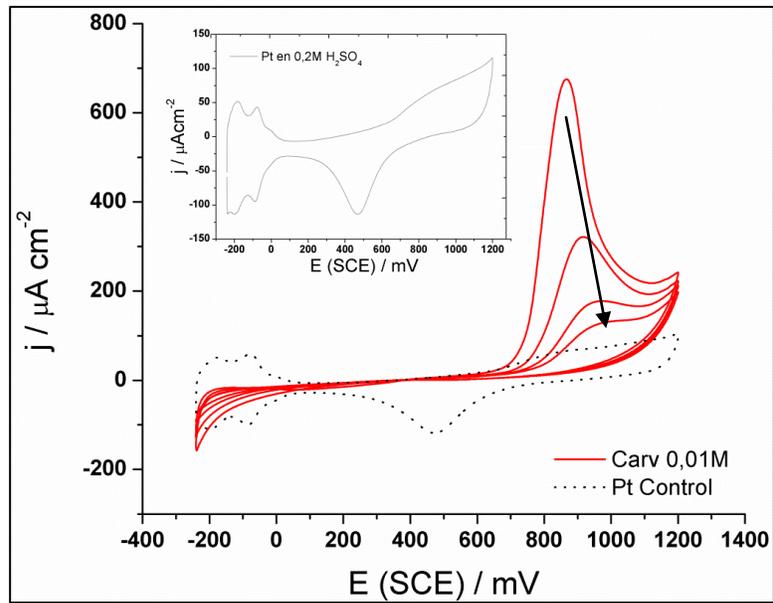


Fig. 4.1. Voltamperometría cíclica de Carv sobre Pt en  $H_2SO_4$  0,2M. La flecha indica la disminución de densidad de corriente del pico de oxidación a través de los ciclos.  
Recuadro: primer ciclo voltamperométrico de Pt en 0,2M  $H_2SO_4$

La voltametría de Pt en presencia de timol (TOH) en el electrolito (Fig. 4.2), presenta un pico de corriente de oxidación de  $675\mu Acm^{-2}$  a los 0,81V en el primer ciclo,  $402\mu Acm^{-2}$  a igual potencial en el segundo y una continua disminución de la corriente, pero sin cambios en el potencial del pico.

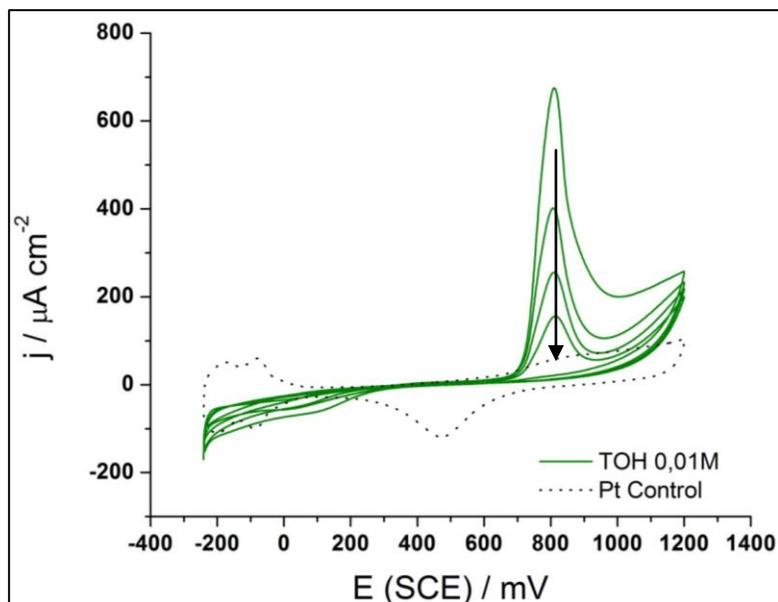


Fig. 4.2. Voltamperometría cíclica de TOH sobre Pt en  $H_2SO_4$  0,2M. La flecha indica la disminución de densidad de corriente del pico de oxidación a través de los ciclos.

Según diversos autores [77,79,80], los productos poliméricos formados a partir de voltametría cíclica sobre Pt utilizando derivados fenólicos previenen la entrada de iones fenóxi al electrodo debido a la baja permeabilidad del film provocando lo que se observa en ciclos sucesivos como una disminución de la densidad de corriente en todo el registro. Este proceso se denomina desactivación, bloqueo o “fouling” de la superficie de Pt, y la corriente residual registrada luego del primer ciclo correspondería a la oxidación total de especies orgánicas a  $\text{CO}_2$  en las capas internas del polímero, las cuales se producen a una velocidad menor que las oxidaciones parciales de la capa más externa a éter y quinonas [77]. En ambos casos, con TOH o Carv, no se observan picos de reducción durante el barrido en sentido catódico, lo cual según Sayah *et. al.* y Michelitsch *et al.* es un indicador de un proceso de polimerización irreversible, una fuerte adhesión del polímero a la superficie del electrodo y/o a la naturaleza de los productos de oxidación generados [80,146].

#### 4.3.1.2. Ácido trans-ferúlico

Los registros potenciodinámicos de Pt en presencia de ácido trans-ferúlico fueron muy distintos a los observados para Carv y TOH. Se observó un primer pico estrecho a 0,66V de  $481\mu\text{Acm}^{-2}$  y un pico ancho a los 0,94V de  $379\mu\text{Acm}^{-2}$  durante el barrido anódico del primer ciclo, mientras que en los ciclos siguientes el primer pico casi desaparece y sólo se distingue el pico de 0,94V (corrido a 0,97V de  $292\mu\text{Acm}^{-2}$ ) que se repite con igual intensidad en durante los ciclos 2° al 5° (Fig. 4.3). La voltametría cíclica del ácido ferúlico muestra en todos los ciclos, durante el barrido en sentido catódico, un pico de reducción de PtO a 0,48V de  $-128\mu\text{Acm}^{-2}$ . La respuesta electroquímica del ácido trans-ferúlico es similar a las encontradas para el ácido cafeico, el ácido dihidrocínámico y el catecol, siguiendo un mecanismo que involucra la pérdida de un electrón durante el primer pico de oxidación anódico, seguido de una rápida deprotonación y la pérdida de un segundo electrón en el segundo pico [147]. Durante el barrido en sentido catódico las contribuciones de corriente positiva asociadas a la oxidación de FF continúan hasta que comienza la reducción del óxido de Pt. La corriente negativa registrada luego del pico de reducción del óxido de Pt indicaría, en el caso del ácido trans-ferúlico, un proceso de reducción de ciertos productos orgánicos formados durante el barrido en sentido anódico [80]. La reducción de la densidad de corriente observada luego del primer ciclo voltamperométrico indica una inactivación o bloqueo de la superficie del Pt debido a una disminución de la permeabilidad del film, la

cual no se ve alterada luego del segundo y tercer ciclo. La corriente residual registrada luego del segundo ciclo correspondería a la oxidación total de especies orgánicas a  $\text{CO}_2$  en las capas internas del polímero [77] y/o a la oxidación de monómeros en las capas externas siendo luego liberados a la solución, como se observa en la electrooxidación del pirogalol sobre Pt en otros trabajos [79].

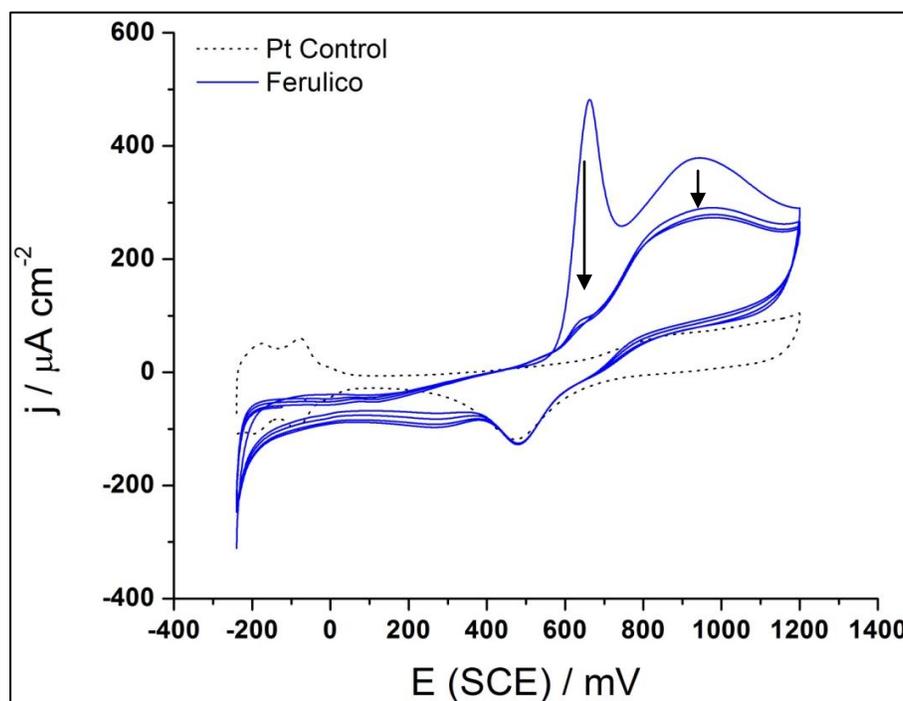


Fig. 4.3. Voltamperometría cíclica de ácido trans-ferúlico sobre Pt en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,2M. Las flechas indican la disminución de densidad de corriente de los picos de oxidación a través de los ciclos.

#### 4.3.1.3. Ácido gálico

La voltametría cíclica de Pt en presencia de ácido gálico muestra la mayor densidad de corriente observada en los ensayos electroquímicos con fitocompuestos (Fig. 4.4). Los ciclos evolucionaron aproximadamente de manera similar sin observarse bloqueo del electrodo de Pt. Se distinguieron picos a 0,58V de  $4075\mu\text{Acm}^{-2}$ , 0,94V de  $4064\mu\text{Acm}^{-2}$  y un pico de reducción a 0,46V de  $-72\mu\text{Acm}^{-2}$ . La presencia de dos picos anódicos de corriente es similar al comportamiento electroquímico del primer ciclo voltamperométrico del ácido trans-ferúlico, indicando un mecanismo de pérdida de un primer electrón, una

deprotonación y una segunda pérdida de otro electrón [147]. Sin embargo, no se observa una disminución importante de la altura de los picos anódicos durante el ciclado, existiendo una importante contribución de corriente anódica luego de revertir el sentido del barrido. Se observa una corriente de reducción durante el barrido en sentido catódico que corresponde a la reducción del óxido de Pt, tal como se observó en presencia de ácido trans-ferúlico (Fig. 4.3) [80]. La alta densidad de corriente registrada podría corresponder a la oxidación de monómeros en las capas externas del polímero formado durante los ciclos sucesivos, siendo luego liberados a la solución [79].

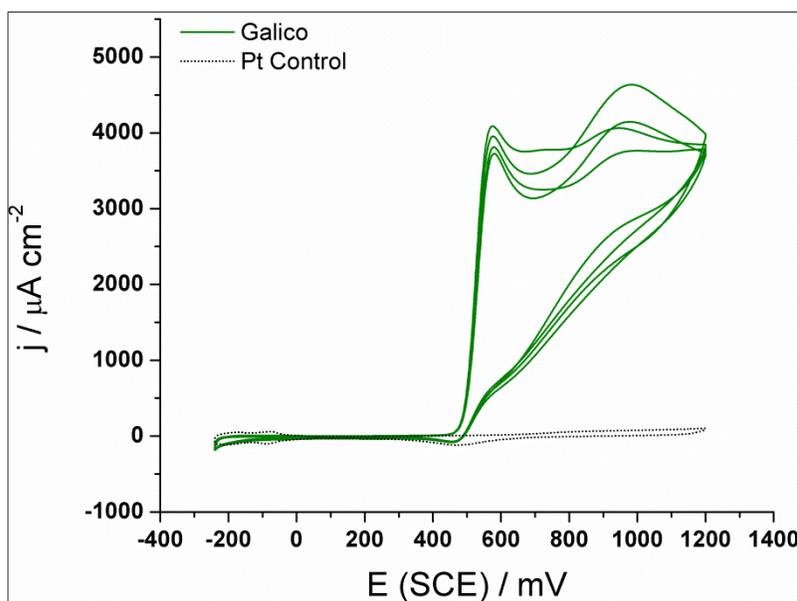


Fig. 4.4. Voltamperometría cíclica de ácido gálico sobre Pt en  $H_2SO_4$  0,2M.

#### 4.3.1.4. Aceite esencial de *Thymus vulgaris*

El registro potenciodinámico de Pt en presencia de aceite de *T. vulgaris* mostró un pico de oxidación a 0,79V ( $469\mu Acm^{-2}$ ) en el primer ciclo de la voltametría, el cual se corre levemente hacia potenciales más anódicos y con menor densidad de corriente en el segundo y tercer ciclo: 0,81V ( $166\mu Acm^{-2}$ ) y 0,84V ( $53\mu Acm^{-2}$ ) respectivamente, y está ausente en los ciclos 4º y 5º (Fig. 4.5). No se observa pico de reducción de óxido de Pt en sentido catódico dando cuenta del bloqueo superficial y de la irreversibilidad del proceso de oxidación de los FF.

Existen relativamente pocos trabajos reportados sobre estudios electroquímicos por voltamperometría sobre electrodos catalíticos utilizando mezclas de monómeros o

extractos vegetales con efecto antioxidante. Los registros observados para las mezclas muestran las contribuciones de los picos de oxidación de los monómeros involucrados [80,148] y de los compuestos más representativos de los extractos o aceites esenciales analizados [146,149,150]. Considerando que los componentes mayoritarios del aceite esencial son el TOH y el Carv, se observa que el rango de potencial de oxidación de los compuestos del aceite esencial de *T. vulgaris* se ubica entre  $\sim 0,67\text{V}$  y  $\sim 0,92\text{V}$  y se asemeja a la oxidación de TOH:  $\sim 0,70\text{V}$  y  $\sim 0,95\text{V}$  con un pico de oxidación a  $0,81\text{V}$  (ver Fig. 4.2) similar al máximo de densidad de corriente observado para el aceite esencial en cuestión. El rango de oxidación del aceite esencial también incluye al potencial de oxidación del Carv ( $0,87\text{V}$ ) dado que, frente al potencial de oxidación del TOH puro, hay pocos mV de diferencia [146]. Teniendo en cuenta que el principal componente del aceite esencial de *T. vulgaris* es el TOH ( $72,1\%$   $\mu\text{g/g}$ ) seguido por el Carv ( $3,1\%$   $\mu\text{g/g}$ ) [133], y considerando los registros de los compuestos puros, la mayor contribución en el registro voltamperométrico del aceite esencial correspondería al TOH y en menor medida al Carv.

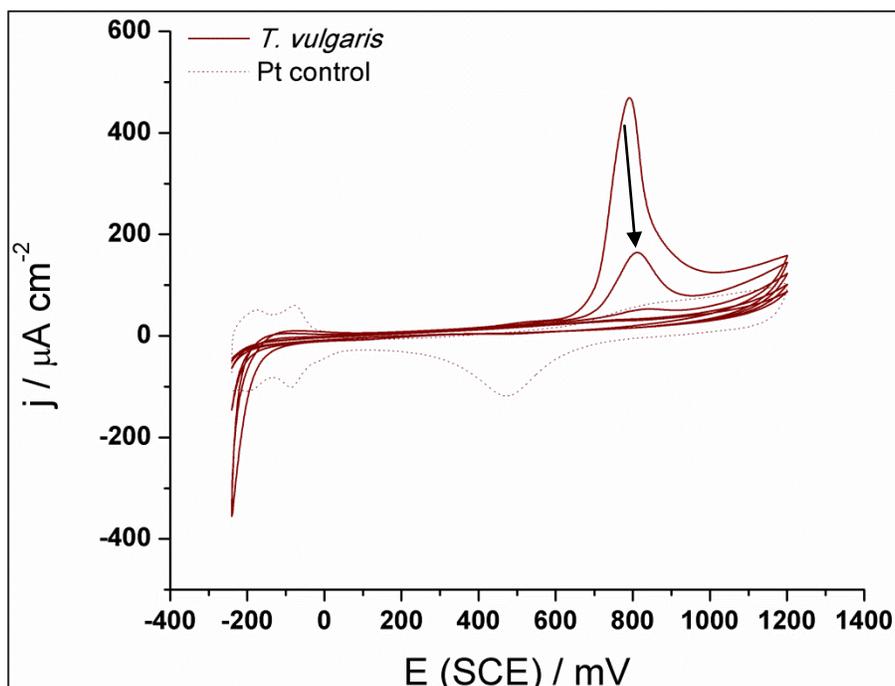


Fig. 4.5. Voltamperometría cíclica de aceite esencial de *T. vulgaris* sobre Pt en  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,2\text{M}$ . La flecha indica la disminución de densidad de corriente del pico de oxidación a través de los ciclos.

#### 4.3.1.5 Aceite esencial de *Origanum vulgare*

La voltamperometría de Pt en presencia del aceite esencial de *O. vulgare* tiene un comportamiento similar al observado para *T. vulgaris*: un primer pico de oxidación entre 0,67V y 1,09V con un máximo de densidad de corriente a 0,86V ( $701\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ). Los ciclos 2º y 3º presentan un pico a 0,96V ( $292\mu\text{A}/\text{cm}^2$  y  $112\mu\text{A}/\text{cm}^2$ , respectivamente). En ninguno de los ciclos se observa pico de reducción, y a partir del 4º ciclo no se distinguen picos de oxidación, lo que indicaría un bloqueo total del electrodo de Pt (Fig. 4.6).

Tomando en cuenta que la composición del aceite esencial de *O. vulgare*, según la bibliografía, posee entre 73 y 87% de Carv y entre 8 y 11% de TOH [151,152] se analizaron los registros potenciodinámicos en forma comparativa con los obtenidos para el TOH y el Carv (Fig. 4.1 y 4.2). El rango de potencial de oxidación del aceite esencial involucraría tanto al TOH (0,70V a 0,95V) como al Carv (0,70V a 1,09V), observándose mayor similitud con el registro voltamperométrico obtenido para el Carv en cuanto al corrimiento del potencial del pico de oxidación en los ciclos sucesivos.

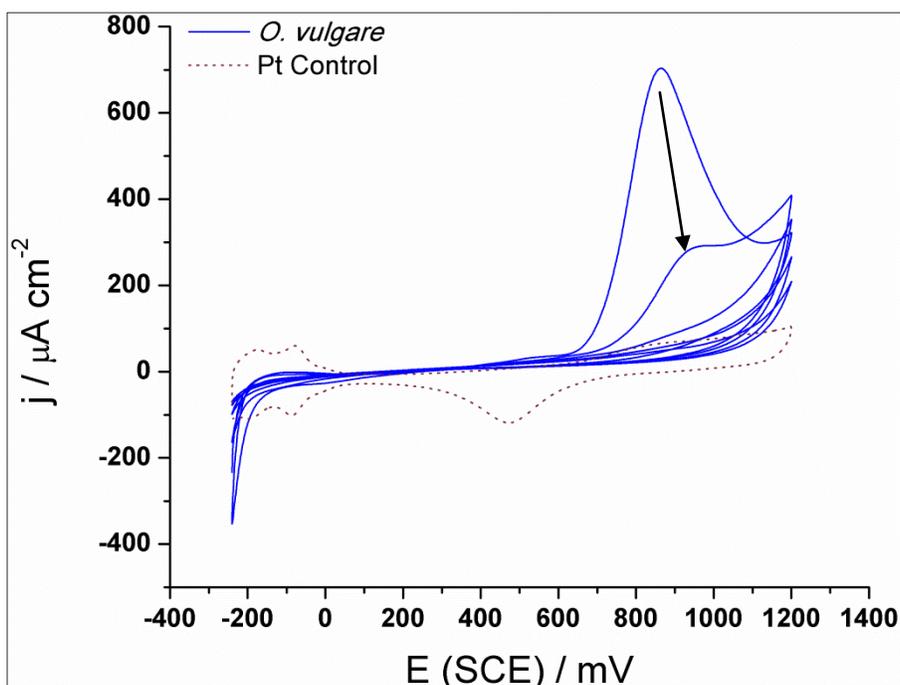


Fig. 4.6. Voltamperometría cíclica de aceite esencial de *O. vulgare* sobre Pt en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,2M. La flecha indica la disminución de densidad de corriente del pico de oxidación a través de los ciclos.

#### 4.3.1.5.A. Comparación del aceite esencial de *Origanum vulgare* con la mezcla Carv/TOH

Teniendo en cuenta que los picos de oxidación de *O. vulgare* se aproximan a los potenciales de oxidación de TOH (0,81V) y Carv (0,97V), componentes mayoritarios en el aceite esencial de *O. vulgare* [151,152], se realizaron barridos potenciodinámicos con la mezcla Carv/TOH para comprobar si realmente se podrían asignar dichos picos a TOH y Carv. Se utilizó un electrolito 0,2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conteniendo 0,005M TOH y 0,01M Carv (TOH/Carv=1/2) (Fig.4.7). Durante el primer ciclo, se pudieron observar picos de oxidación a 0,84V (860 $\mu$ Acm<sup>-2</sup>) y 0,92V (502 $\mu$ Acm<sup>-2</sup>) mientras que en el segundo se distingue la contribución a 0,93V de 502 $\mu$ Acm<sup>-2</sup> y en el tercer y cuarto ciclo se nota un leve corrimiento a 0,95V (186 $\mu$ Acm<sup>-2</sup> y 98 $\mu$ Acm<sup>-2</sup>, respectivamente). Al igual que en el caso de los compuestos puros, no se observó el pico de reducción de PtO, como así tampoco contribuciones de oxidación en el quinto ciclo, excepto en las cercanías del límite anódico. Las similitudes de los voltagramas obtenidos con el *O. vulgare* y con la mezcla Carv/TOH permite asumir que las respuestas del aceite esencial corresponde principalmente a sus componentes mayoritarios Carv y TOH.

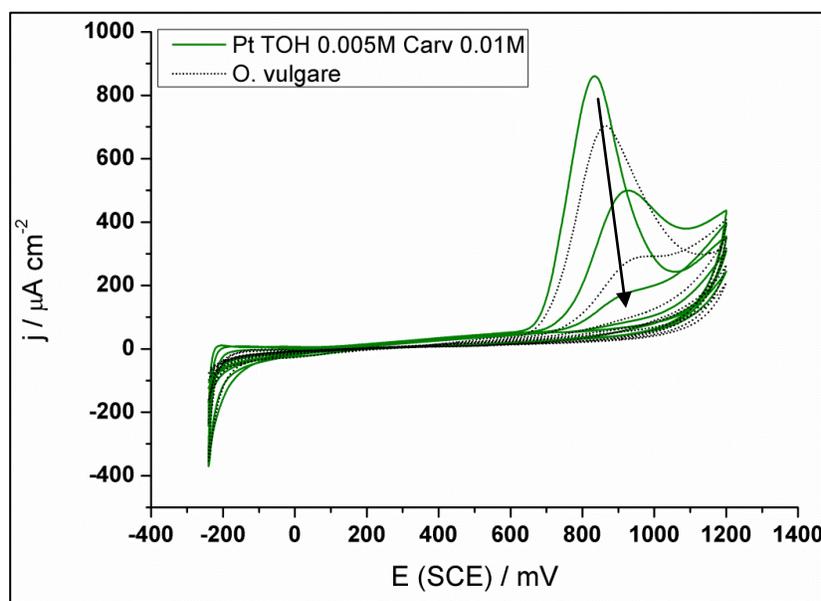


Fig. 4.7. Respuesta electroquímica de TOH/Carv=1/2 sobre electrodo de Pt en 0,2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La flecha indica la disminución de densidad de corriente del pico de oxidación a través de los ciclos.

#### 4.3.1.6. Aceite esencial de *Origanum x applii*

El registro potenciodinámico de Pt en presencia de aceite esencial de *O. x applii* mostró picos de oxidación a 0,88V ( $136\mu\text{Acm}^{-2}$ ) durante el primer ciclo, que luego se corre a potenciales más anódicos (0,90V y  $55\mu\text{Acm}^{-2}$ , en el segundo ciclo; 0,90V y  $31\mu\text{Acm}^{-2}$ , en el tercer ciclo) hasta no ser detectable en el 4º ciclo (Fig. 4.8). El trazo discontinuo de los registros indica la labilidad y poca adherencia de la película y los saltos de densidad de corriente observados en el 5º ciclo en tres ocasiones indicarían una ruptura en la pasividad por agrietamiento de la misma.

La composición del aceite esencial de *O. x applii* analizada por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (CG/MS), indicó que el componente mayoritario es el TOH (25,1%), seguido de borneol (14,1%) y otros compuestos en mayor proporción que el Carv, el cual está presente al 0,4%. El análisis del registro voltamperométrico de dicho aceite esencial muestra un rango de potencial de oxidación entre 0,70 y 1,03V que podría involucrar a la oxidación tanto del TOH y Carv como del resto de los compuestos presentes en mayor proporción que el Carv ( $>0,4\%$ ).

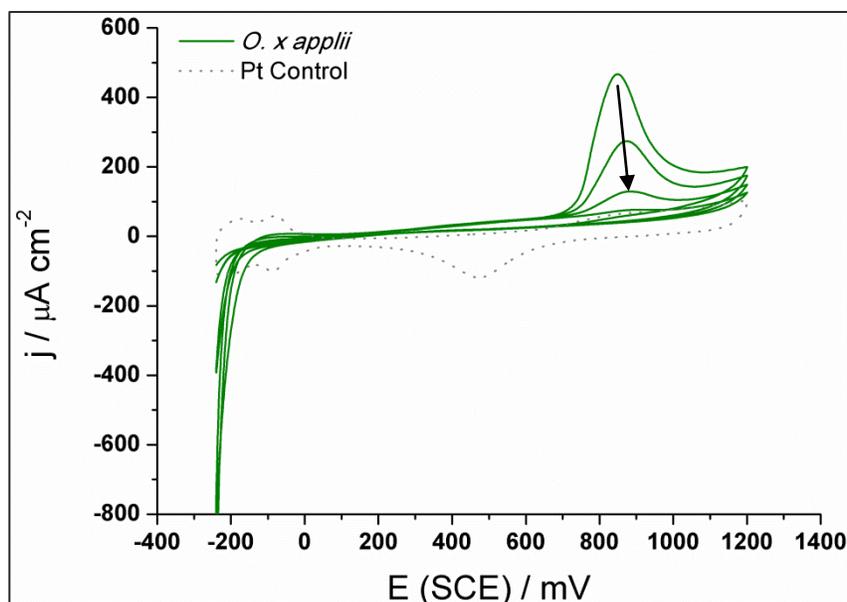


Fig. 4.8. Voltamperometría cíclica (4 ciclos) de aceite esencial de *O. x applii* sobre Pt en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,2M. La flecha indica la disminución de densidad de corriente del pico de oxidación a través de los ciclos.

#### **4.3.1.7. Evaluación comparativa de los resultados obtenidos con los distintos fitocompuestos**

Se han reportado diversos trabajos sobre la electrooxidación de los compuestos fenólicos sobre Pt [153,154], sin embargo no se ha realizado una evaluación comparativa amplia. En las Fig. 4.1 y 4.2 el Carv y el TOH muestran un comportamiento similar al de otros FF en cuanto al decrecimiento de la intensidad de corriente y al potencial del pico de oxidación [155] por lo que podría pensarse que ocurre un mecanismo similar en este tipo de compuestos, es decir, ocurre la electropolimerización que origina una cobertura superficial protectora sobre el Pt.

Por otro lado, el estudio comparativo de los ensayos electroquímicos de los aceites esenciales de *T. vulgare*, *O. vulgare* y *O. x applii* (los primeros 4 ciclos) y el de las mezclas de TOH y Carv (TOH/Carv=1/2), muestran un comportamiento similar, evidenciando además un bloqueo de la superficie de Pt. Sin embargo, el registro potenciodinámico del aceite esencial de *O. x applii* fue inestable y con quiebres en la película formada sobre Pt que podría atribuirse a la presencia de otros compuestos constituyentes del aceite esencial que interfieren en el proceso de electropolimerización.

Finalmente, los registros obtenidos para los ácidos fenólicos evidenciaron la presencia de dos picos de oxidación que, de acuerdo a la literatura, involucrarían una pérdida de dos electrones seguida de la oxidación de monómeros a través de las películas formadas o la oxidación total de especies orgánicas a CO<sub>2</sub> en las capas internas de los polímeros. El voltograma de Pt en presencia de ácido trans-ferúlico evidencia contribuciones de corriente mucho menores que el correspondiente al ácido gálico y una disminución de la densidad de corriente durante el primer ciclo potenciodinámico, principalmente observada en el primer pico de oxidación.

#### **4.3.2. Caracterización de los productos de oxidación de los fitocompuestos formados sobre Pt. Espectros ATR-FTIR**

Con el fin de analizar los productos de la oxidación de los fitocompuestos sobre Pt generados mediante voltamperometría cíclica, se llevaron a cabo estudios mediante ATR-FTIR de las superficies luego de realizados los tratamientos electroquímicos y se compararon con los espectros de los fitocompuestos puros.

#### 4.3.2.1. Carvacrol y timol

El espectro ATR-FTIR del Carv puro (ver estructura molecular en Fig. 3.1), presentó bandas reportadas como características o “fingerprint” del Carv (Fig. 4.9, superior):  $1251\text{cm}^{-1}$  [156],  $1173\text{cm}^{-1}$  [152,156],  $1116\text{cm}^{-1}$  [152,156],  $994\text{cm}^{-1}$  (sustitución 1,2,4 del anillo fenólico) [152,156],  $812\text{cm}^{-1}$  (vibración fuera de plano de -CH específica del Carv) [152,156], y otros picos reportados en trabajos previos [157,158]. Se pudieron utilizar dichos picos característicos para evidenciar la presencia de Carv y TOH en los aceites esenciales evaluados en el presente trabajo. El espectro de Carv sobre Pt (Fig. 4.9, inferior), luego de la voltametría cíclica en presencia de Carv mostró picos característicos de vibraciones en el anillo fenólico (700, 720, 756, 785, 867, 894, 942, 1001, 1030, 1152, 1270,  $1490\text{cm}^{-1}$ ), señales a  $1342\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_s$ -isopropilo),  $1361$  y  $1454\text{cm}^{-1}$  correspondientes  $\nu_{as}$ -isopropilo [158]; contribuciones características de uniones éter ( $1244$ ,  $1180$  y  $814\text{cm}^{-1}$ ), picos correspondientes a  $\nu_{as}\text{-CH}_3$  ( $2960\text{cm}^{-1}$ ),  $\nu_{as}\text{-CH}_2$  ( $2927\text{cm}^{-1}$ ) y  $\nu_s\text{-CH}_3$  ( $2869\text{cm}^{-1}$ ) y picos a  $1397$  y  $3022\text{cm}^{-1}$  atribuibles a anillo fenólico polisustituido [158]. Al comparar ambos espectros se pudo observar la aparición de picos correspondientes a uniones éter y la pérdida de la banda asignada a grupos -OH en el espectro de los productos generados sobre el electrodo de Pt tratado con Carv con respecto al espectro obtenido para la droga pura, por lo que podemos concluir que se produce una polimerización del compuesto fenólico (polímero de Carv, de ahora en más polyCarv) sobre el electrodo. El mecanismo inferido para dicha polimerización involucraría la oxidación de la totalidad de los grupos oxhidrilos de los monómeros de Carv a uniones éter entre anillos fenólicos, tal como se analizará en el capítulo 5.

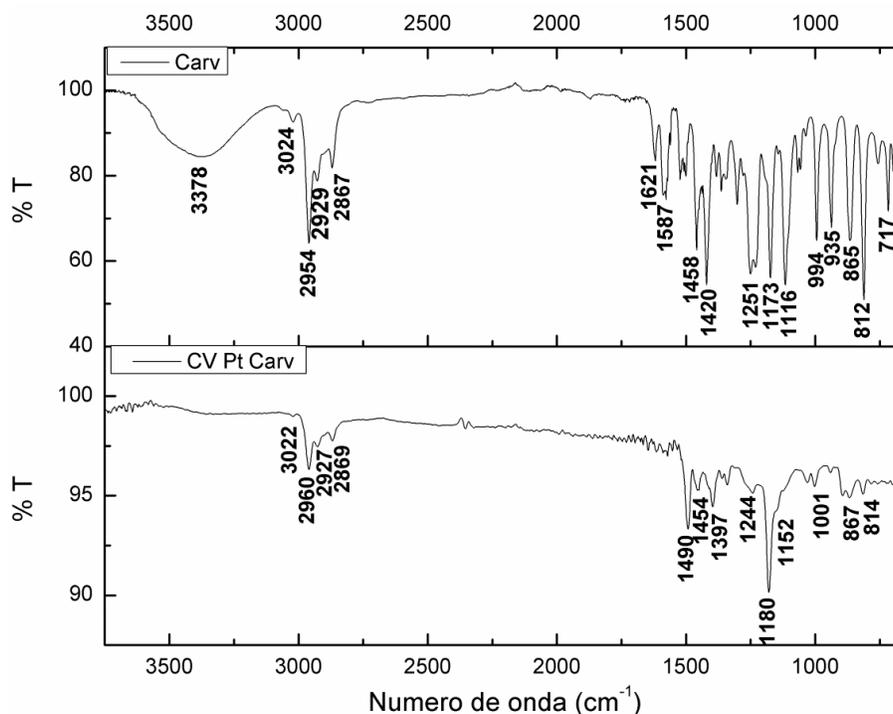


Fig. 4.9. Espectros ATR-FTIR de Carv puro (superior) y de la película de Carv formada sobre electrodo de Pt mediante VC (inferior).

El espectro ATR-FTIR de TOH puro (ver estructura molecular en Fig. 3.3) presentó las bandas reportadas en la bibliografía [152,156] (Fig. 4.10, superior):  $1286\text{cm}^{-1}$  [152,156],  $1156\text{cm}^{-1}$  (sustitución meta característica del TOH) [152],  $1090\text{cm}^{-1}$  [152,156],  $1041\text{cm}^{-1}$  (sustitución 1,3,4 característica del TOH) [152],  $943\text{cm}^{-1}$  [152,156],  $804\text{cm}^{-1}$  (vibración fuera de plano de -CH específica del TOH) [152,156] y  $740\text{cm}^{-1}$  (vibración del anillo fenólico específica del TOH) [156], entre otras reportadas como representativas o “fingerprint” de TOH en trabajos previos [157,158].

El espectro de TOH sobre Pt (Fig. 4.10, inferior) mostró contribuciones a  $743$ ,  $809$ ,  $853$ ,  $892$  y  $1006\text{cm}^{-1}$  correspondientes a energías vibracionales C-H del anillo fenólico [144,158,159]; picos a  $1328$ ,  $2877$ ,  $2921$  y  $2954\text{cm}^{-1}$  atribuibles a vibraciones de deformación y extensión de -C-H de cadenas alifáticas [144,158]; picos atribuibles a Ph-OH en  $1217$  y  $1006\text{cm}^{-1}$  [158,159]; señales correspondientes a uniones éter -C-O-C- en  $1172$ ,  $1112$ ,  $1041$  y  $809\text{cm}^{-1}$  [158]. El pico a  $809\text{cm}^{-1}$  puede corresponder tanto a vibraciones del anillo fenólico como a uniones -C-O-C- según Sadtler [144]. Considerando la presencia de picos correspondientes a uniones -C-O-C- y la ausencia de banda en la

región atribuible a grupos oxhidrilos en los productos generados sobre Pt en presencia de TOH, se puede inferir que el TOH se polimeriza sobre la superficie metálica (polímero de TOH, de ahora en más polyTOH) involucrando la oxidación de la totalidad de los grupos oxhidrilos de los monómeros de TOH a uniones éter entre anillos fenólicos, similar a lo observado para el Carv sobre Pt.

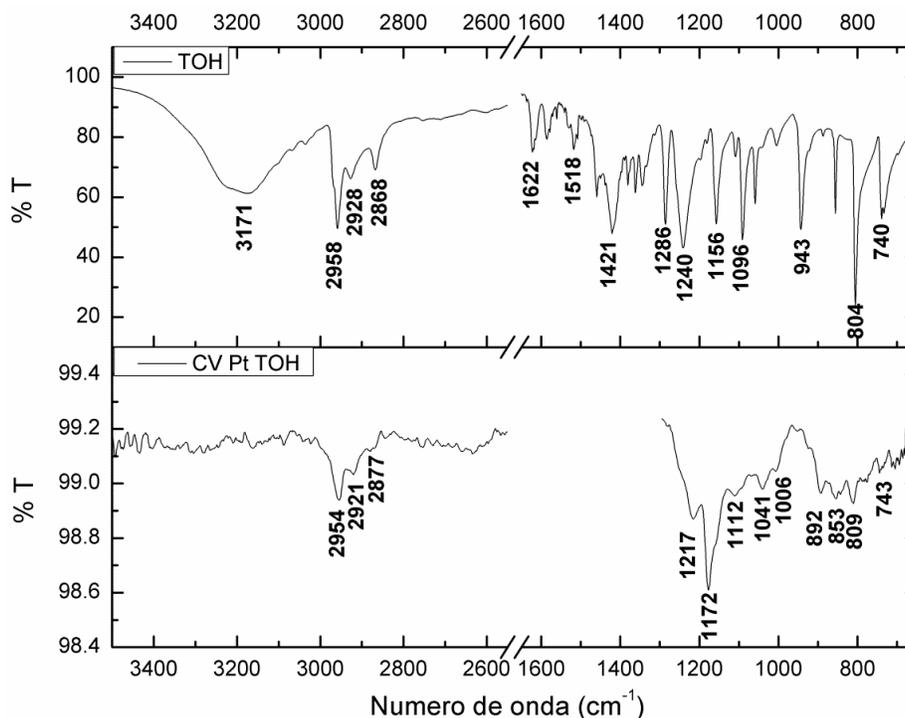


Fig. 4.10. Espectros ATR-FTIR de TOH puro (superior) y de la película de TOH formada sobre electrodo de Pt mediante VC (inferior).

#### 4.3.2.2. Ácido trans-ferúlico

El espectro ATR-FTIR de ácido trans-ferúlico puro (ver estructura molecular en Fig. 3.5) presentó picos (Fig. 4.11, superior) en 3432, 3388, 3081, 3057, 3020, 1410, 1290 y 685cm<sup>-1</sup> correspondientes a vibraciones de estiramiento y flexión de OH de grupos fenólicos y carboxílicos [144]; picos a 2842cm<sup>-1</sup> que puede atribuirse a estiramiento de C-H del grupo O-metilo del ácido trans-ferúlico [160]; un pico a 1654cm<sup>-1</sup> correspondiente a COO<sup>-</sup> [161]; picos a 1620, 1600, 1591, 1511, 1468, 1459, 1432, 1203, 1154, 935, 851, 804 y 710cm<sup>-1</sup> atribuidos a vibraciones del anillo aromático del ferúlico [144,160]; contribuciones correspondientes a uniones Ph-O-R ya sea del metilo sustituyente o de hidroxilos en 1266, 1244, 1230, 1113 y 1033cm<sup>-1</sup> [144,158,160]; una señal a 1176cm<sup>-1</sup> asignado al grupo

carbonilo del ácido ferúlico por Wang *et al.* [160]; y un pico correspondiente al sustituyente alifático en  $972\text{cm}^{-1}$  [144].

El espectro de ácido *trans*-ferúlico sobre Pt luego de la voltametría cíclica (Fig. 4.11, inferior) presentó alta intensidad de picos a  $3308\text{cm}^{-1}$  (-OH con uniones puente hidrógeno [158]),  $2863\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_s$  -CH<sub>3</sub> [158]),  $1644\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$ -C=O [158], COO- [161]) el cual concuerda con la hipótesis de Salas-Reyes *et al.* en la formación de quinonas durante la electropolimerización de ácido ferúlico y derivados [147],  $1313\text{cm}^{-1}$  (vibración de tensión de -C-O del ácido carboxílico unido a anillo bencénico, deformación de -C-OH del fenol [144]),  $1180\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$ -C-O-C- [158] muy probablemente del sustituyente Ph-O-CH<sub>3</sub>),  $1051\text{cm}^{-1}$  (vibración de tensión de -C-O [158]),  $885\text{cm}^{-1}$  (deformación de -CH en el anillo aromático [144]),  $712\text{cm}^{-1}$  (vibración de -CH en el anillo aromático [144]). En base a la presencia de contribuciones correspondientes a uniones -C-O-C-, oxhidrilos del carbonilo, oxhidrilos de fenoles y uniones -C=O del carboxilo encontrados en el espectro de los productos generados sobre Pt en presencia de ácido *trans*-ferúlico, se puede inferir que el compuesto se polimeriza sobre la superficie metálica mediante uniones éter entre monómeros y preservando estructuras ácidas y grupos -OH en su estructura.

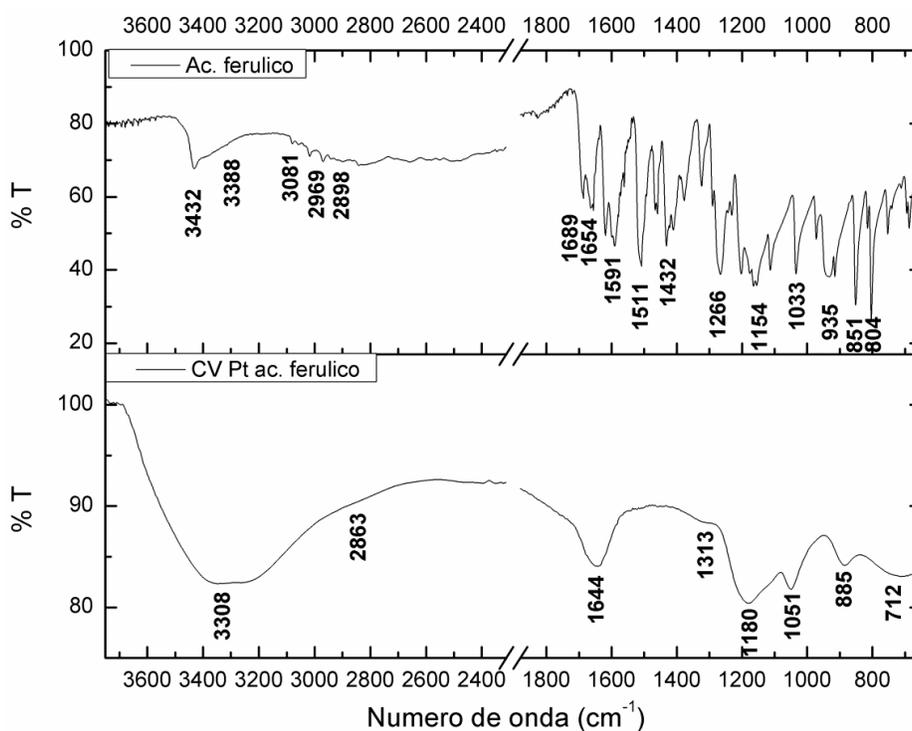


Fig. 4.11. Espectros ATR-FTIR de ácido *trans*-ferúlico puro (superior) y de la película de ácido *trans*-ferúlico formada sobre electrodo de Pt mediante VC (inferior).

### 4.3.2.3. Ácido gálico

El espectro ATR-FTIR del ácido gálico puro (ver estructura molecular en Fig. 3.7) presentó bandas (Fig. 4.12, superior) correspondientes a vibraciones de tensión y flexión de OH de grupos oxhidrilos y carbonilos en  $3493$ ,  $3337$ ,  $3268$ ,  $3061$ ,  $1696$ ,  $1216$  y  $1022\text{cm}^{-1}$  [144,158,162–164]; señales atribuidos a COOR en  $1538$ ,  $1384$  y  $1200\text{cm}^{-1}$  [162,164]; y vibraciones dentro del anillo en  $1468$ ,  $1100$ ,  $901$ ,  $766$  y  $731\text{cm}^{-1}$  [158,162,164].

El espectro del Pt luego de la voltametría cíclica en presencia de ácido gálico mostró un espectro ATR-FTIR (Fig. 4.12, inferior) de baja intensidad de transmitancia, en el cual se distinguen picos a  $3100\text{cm}^{-1}$  (vibración de tensión de -OH en Ph-COOH [144]),  $1181\text{cm}^{-1}$  (podría corresponder tanto a uniones -C-O-C- como a la banda más intensa de ácido gálico puro entre  $1230$ - $1110\text{cm}^{-1}$ ),  $1050\text{cm}^{-1}$  (vC-O [158]),  $873\text{cm}^{-1}$  (deformación de CH del anillo aromático [144]; deformación de OH del COOH [144]),  $721$  y  $696\text{cm}^{-1}$  (deformación de CH en el anillo fenólico [144]). Tomando en cuenta que el espectro obtenido de los productos generados sobre el electrodo de Pt luego de la voltametría cíclica en presencia de ácido gálico es de baja intensidad podríamos concluir que se deposita poca cantidad de productos sobre el electrodo pero no podríamos dilucidar si el compuesto se polimeriza sobre la superficie metálica mediante uniones éter o C-C entre anillos fenólicos.

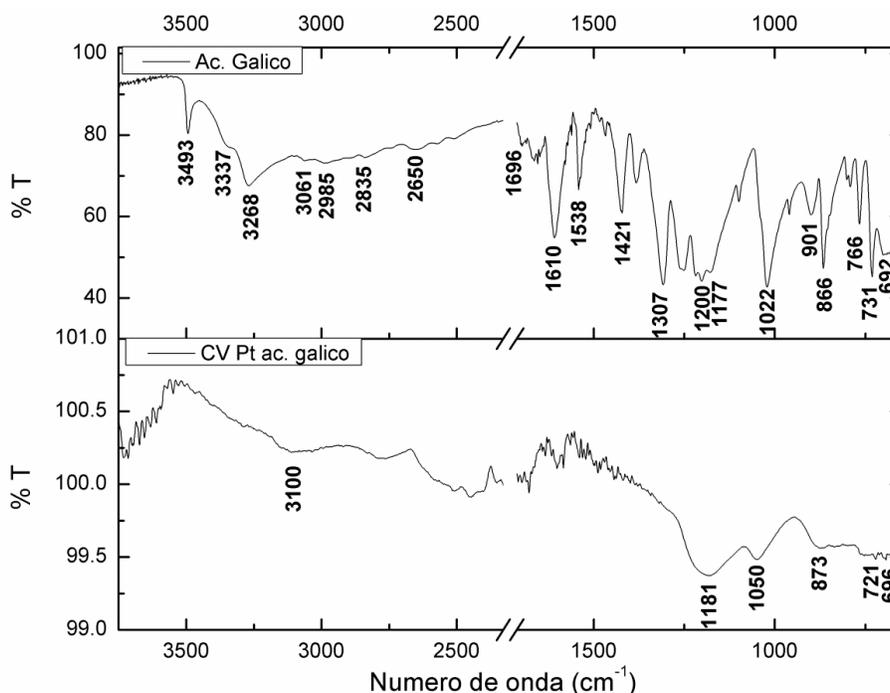


Fig. 4.12. Espectros ATR-FTIR de ácido gálico puro (superior) y de la película de ácido gálico formada sobre electrodo de Pt mediante VC (inferior).

#### 4.3.2.4. Aceite esencial de *Thymus vulgaris*

En el espectro ATR-FTIR del aceite esencial de *T. vulgaris* (Fig. 4.13, superior) se encontraron picos característicos de TOH y Carv: 1291, 1152, 1089, 945, 808 y 739 $\text{cm}^{-1}$ , señales correspondientes a TOH y 1181, 1112 y 995 $\text{cm}^{-1}$  asignadas a Carv, entre otros.

El espectro de Pt luego de la voltametría en presencia de aceite esencial de *T. vulgaris* (Fig. 4.13, inferior) presentó contribuciones a 806, 891, 1237 y 1519 $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a energías vibracionales C-H del anillo fenólico [144,158]; picos a 2861, 2916 y 2959 $\text{cm}^{-1}$  asignadas a vibración de tensión de  $-\text{CH}_2$  y  $-\text{CH}_3$  de cadenas alifáticas [158]; una señal a 1685 $\text{cm}^{-1}$  ( $-\text{C}=\text{O}$  no unido a puentes hidrógeno [158]); bandas atribuibles a uniones éter a 813, 1032, 1099 y 1161 $\text{cm}^{-1}$  [158]. En conclusión los productos depositados sobre el electrodo pueden atribuirse a compuestos orgánicos ya sean polimerizados mediante uniones éter o simplemente oxidados.

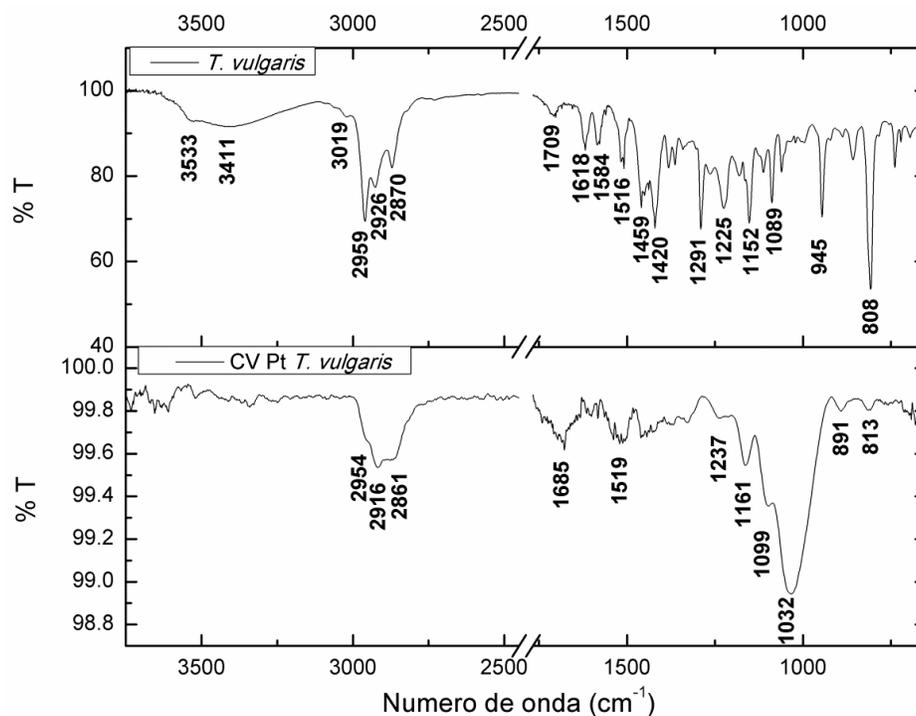


Fig. 4.13. Espectros ATR-FTIR de aceite esencial de *T. vulgaris* (superior) y de la película de *T. vulgaris* formada sobre electrodo de Pt mediante VC (inferior).

#### 4.3.2.5. Aceite esencial de *Origanum vulgare*

En espectro ATR-FTIR del aceite esencial de *O. vulgare* (Fig. 4.14, superior) se encontraron picos a 1143, 1103, 813 y  $740\text{cm}^{-1}$  correspondientes a TOH y contribuciones de  $1177$ ,  $1115$ ,  $996\text{cm}^{-1}$  correspondientes a Carv.

El espectro de Pt luego de la voltametría en presencia de aceite esencial de *O. vulgare* (Fig. 4.14, inferior) presentó bandas a 810, 851, 939, 1009 y  $1025\text{cm}^{-1}$  atribuibles a energías vibracionales de C-H del anillo fenólico [144,158]; picos a 2876, 2920 y  $2957\text{cm}^{-1}$  asignadas a vibración de -C-H de cadenas alifáticas [158]; picos correspondientes a uniones éter a 810, 1118, 1173 y  $1233\text{cm}^{-1}$  [144,158]. El pico a  $810\text{cm}^{-1}$  puede atribuirse tanto a vibraciones del anillo aromático como a -C-O-C- [144]. Considerando las señales asignadas a anillos aromáticos y uniones éter se pudo inferir que los productos generados sobre el electrodo de Pt contendrían compuestos fenólicos polimerizados que logran bloquear la superficie metálica (ver registro potenciodinámico en Fig. 4.6).

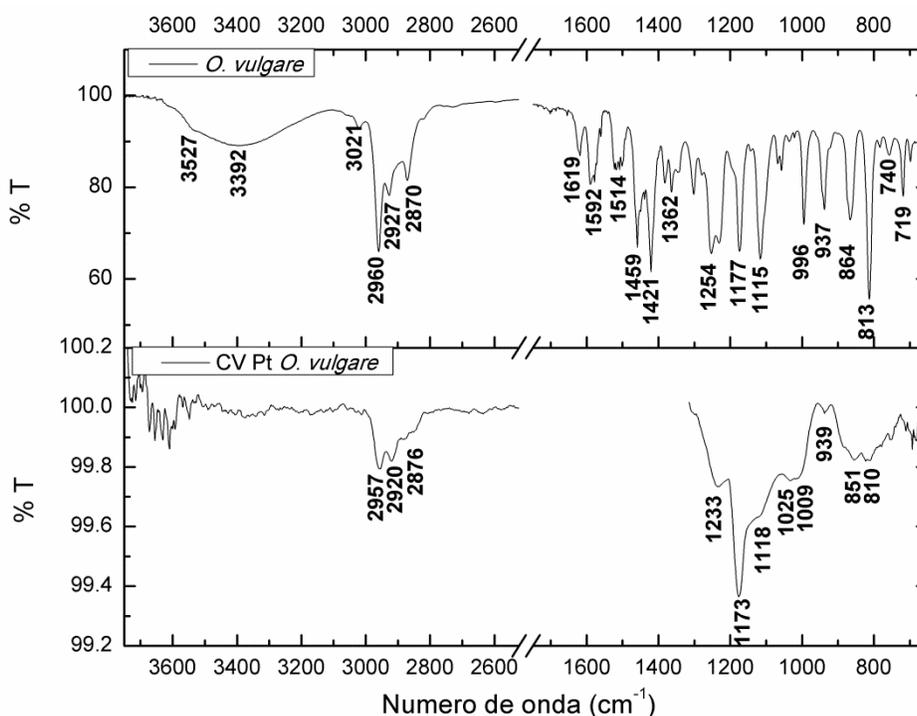


Fig. 4.14. Espectros ATR-FTIR de aceite esencial de *O. vulgare* (superior) y de la película de *O. vulgare* formada sobre electrodo de Pt mediante VC (inferior).

#### 4.3.2.6. Aceite esencial de *Origanum x applii*

El espectro ATR-FTIR del aceite esencial de *O. x applii* (Fig. 4.15, superior) presentó bandas características de Carv a 1254, 1231, 1175, 1116, 995, 813 $\text{cm}^{-1}$  según bibliografía [152,156] y otras bandas similares encontradas en espectros de Carv de este trabajo: 1068, 1036, 937, 864, 719, 699 $\text{cm}^{-1}$ . No se pueden distinguir señales características de TOH en el aceite esencial de *O. x applii*.

El espectro de Pt luego de la voltametría en presencia de aceite esencial de *O. x applii* (Fig. 4.15, inferior) presentó picos a 3286, 1677 y 1420 $\text{cm}^{-1}$  (vibración de tensión de  $-\text{OH}$  y de  $-\text{C}=\text{O}$ , deformación de  $-\text{OH}$  en  $\text{Ph}-\text{COOH}$  [144]); 1376 $\text{cm}^{-1}$  (vibración en plano de  $-\text{OH}$  [159]); 1721 $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}\dots\text{O}=\text{C}$  dentro del polímero [165]); picos a 810, 856, 890, 1023, 1444, 1454, 1488, 1501 y 1615 $\text{cm}^{-1}$  atribuibles a energías vibracionales de C-H del anillo fenólico [144,158,159,166]; señales a 2866, 2927 y 2953 $\text{cm}^{-1}$  asignadas a vibraciones de  $-\text{CH}$  de cadenas alifáticas [158]; y picos a 810, 1173, 1251 y 1285 $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a uniones éter [144,158,167,168]. Considerando las señales asignadas a anillos aromáticos y uniones éter se pudo inferir que los productos generados sobre el electrodo de Pt contendrían compuestos fenólicos polimerizados, con grupos oxhidrilos y cetonas dentro de la matriz.

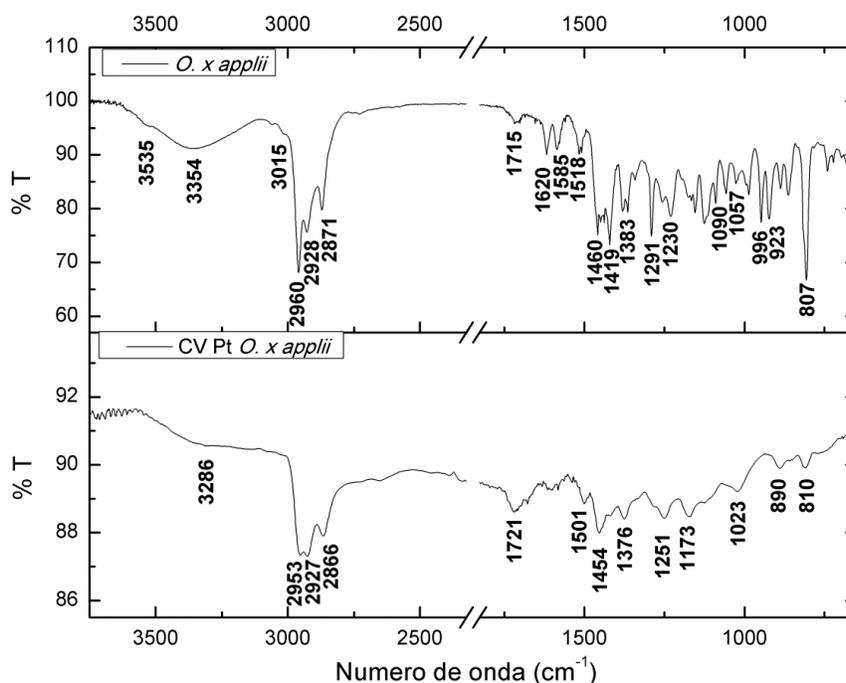


Fig. 4.15. Espectros ATR-FTIR de aceite esencial de *O. X applii* (superior) y de la película de *O. X applii* formada sobre electrodo de Pt mediante VC (inferior).

### **4.3.3. Comparación de los resultados obtenidos por voltamperometría cíclica y espectroscopía ATR-FTIR sobre Pt**

Los fitocompuestos fenólicos analizados mostraron comportamientos potenciodinámicos similares en ciertos aspectos para el caso de los aceites esenciales de *T. vulgaris*, *O. vulgare*, y sus componentes mayoritarios TOH y Carv, presentaron una importante reducción de la corriente anódica a través de los ciclos sucesivos y la desaparición del pico catódico de reducción de óxido de Pt asociada al bloqueo inducido por la película polimérica. Sin embargo el ácido ferúlico y el ácido gálico no presentaron disminución de la densidad de corriente durante los ciclos potenciodinámicos y por lo tanto no lograron formar películas protectoras. Las variadas actividades electroquímicas encontradas pueden deberse a los sustituyentes del anillo fenólico y a factores estéricos de los compuestos que conducen a diferentes afinidades de interacción de las moléculas con la superficie del electrodo dadas por su capacidad de formación y estabilidad del anión fenoxi, potencial reductor del fitocompuesto, ubicación y electronegatividad de los sustituyentes, entre otras [77,150].

Los productos formados sobre la superficie de Pt indicarían una polimerización de distintos grados, generalmente mediante uniones éter en el caso de TOH, Carv y aceites esenciales, y posiblemente uniones éter y/o uniones C-C entre anillos fenólicos en el caso de los ácidos ferúlico y gálico.

En la sección siguiente se consignan los ensayos realizados utilizando Cu y FF con el fin de constatar si al igual que en el caso del Pt, el Carv y TOH así como los aceites esenciales *O. vulgare* y *T. vulgaris* son efectivos para generar una película polimérica protectora sobre dicho metal.

## B. RESPUESTA ELECTROQUÍMICA DE FITOCOMPUESTOS SOBRE Cu. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS FORMADOS

### 4.3.4. Respuesta electroquímica de fitocompuestos sobre Cu

#### 4.3.4.1. Carvacrol y timol

Debido a la reactividad del Cu en soluciones ácidas, el estudio electroquímico de las reacciones de polimerización se realizó en medio alcalino, tal como se reporta para otros compuestos fenólicos [84,85]. Los registros potenciodinámicos de Cu en electrolito 70:30 agua/etanol (sin fitocompuesto) muestran un incremento de la densidad de corriente aproximadamente lineal para potenciales mayores a 0,4V (ver Fig. 4.16 curva negra). Dicho aumento puede ser asignado a la oxidación de etanol en la superficie de Cu, la cual llega a un máximo a potenciales mayores a 0,8V (no mostrado), en concordancia con otros trabajos reportados [84,169–171].

Los registros potenciodinámicos de Cu en electrolito hidroalcohólico alcalino conteniendo Carv, presentan un pico de oxidación a 0,40V de  $10\text{mAcm}^{-2}$  seguido de un descenso de la densidad de corriente y sólo se observan corrientes muy bajas en los ciclos sucesivos ( $0,3\mu\text{A/cm}^2$  cerca de los 39 ciclos). Comportamientos similares se reportaron para fenoles y derivados fenólicos sobre diferentes electrodos [75,172–176]. Se puede interpretar que los productos de oxidación del Carv quedan en la superficie del electrodo bloqueando los sitios activos e inhibiendo la oxidación de etanol y Carv de la solución. Al finalizar el tratamiento, la superficie de los electrodos quedó cubierta con una película transparente y homogénea de polyCarvCu (electropolímero de Carv sobre Cu).

En presencia de TOH en el electrolito se observa un pico a 0,46V con una contribución a 0,60V en sentido anódico (Fig. 4.16). Luego la densidad de corriente decrece llegando a un mínimo en 0,80V para volver a incrementarse. Durante el barrido sentido catódico se repite la contribución anódica a 0,60V indicando una oxidación persistente del fitocompuesto. A pesar del descenso de la densidad de corriente en el segundo ciclo y hasta el ciclo 5º los valores de corriente son del orden de  $400\mu\text{Acm}^{-2}$  a 1,00V (en el ciclo 39º esta corriente es de  $110\mu\text{Acm}^{-2}$ ), notablemente mayores a los encontrados para Carv ( $0,3\mu\text{Acm}^{-2}$ ). La película resultante de polyTOH (electropolímero de TOH) posee una coloración

amarronada y resulta no homogénea observándose estructuras tridimensionales como en otros polifenoles reportados [176].

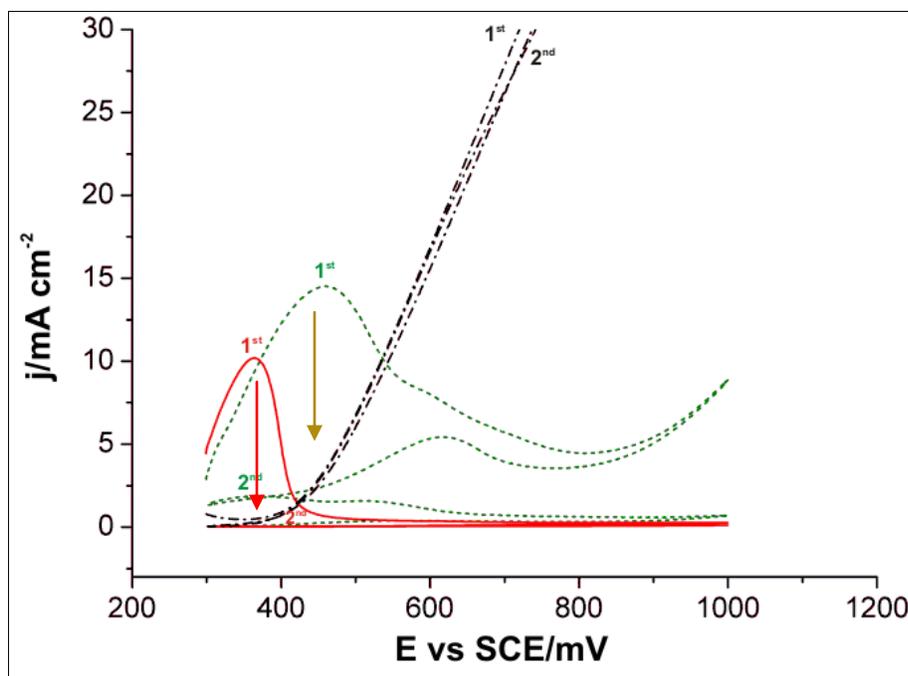


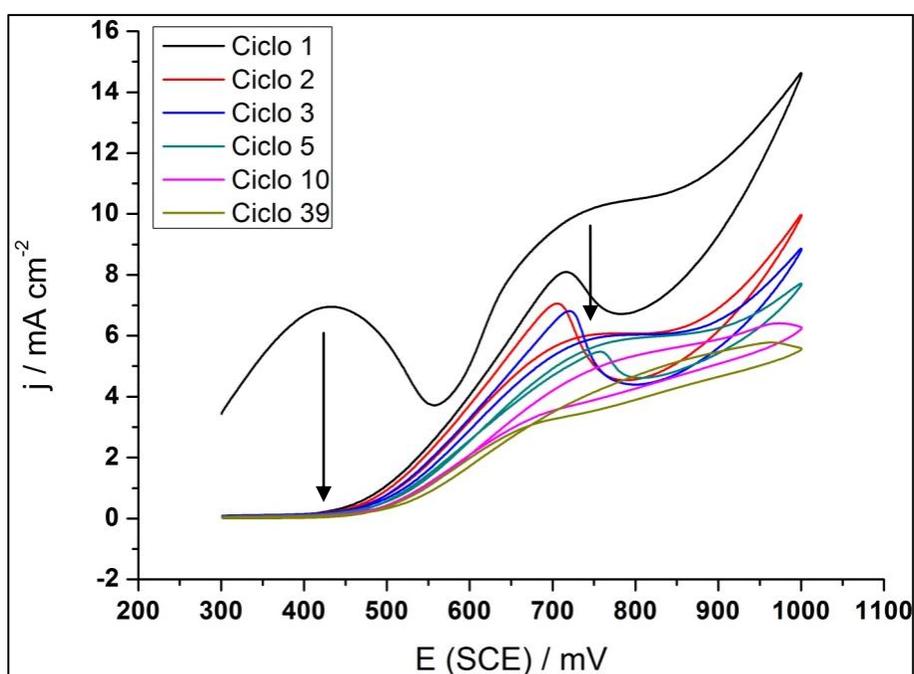
Fig. 4.16. Primer y segundo ciclo voltamperométrico de electrodos de Cu en (—) 0,1M Carv, o (-----) 0,1M TOH en 0,3M NaOH 70/30 agua/etanol; (-.-.-) control sin fitocompuesto. Las flechas indican la disminución de densidad de corriente de los picos de oxidación correspondientes a través de los ciclos.

Los mecanismos de polimerización y las características de los polímeros de TOH y Carv sobre superficies de Cu se estudiarán con mayor profundidad en el capítulo 5.

#### 4.3.4.2. Ácido trans-ferúlico

El registro potenciodinámico de Cu en electrolito hidroalcohólico alcalino conteniendo ácido trans-ferúlico se presenta en la Fig. 4.17. Se observó que la densidad de corriente en todo el registro es entre 3 y 5 mAcm<sup>-2</sup> (entre los potenciales 0,65V y 1,00V) hasta en los ciclos superiores. En el primer ciclo se presenta un pico a 0,43V (6,99 mAcm<sup>-2</sup>) ausente en los ciclos sucesivos, pudiéndose corresponder con la formación del primer radical fenoxi [79] y

se observó una contribución a 0,78V ( $10,41\text{mAcm}^{-2}$ ) que se atribuiría a la formación del segundo radical y una densidad de corriente ascendente hasta llegar a  $14,61\text{mAcm}^{-2}$  a los 1,00V. En el barrido en sentido catódico, de manera similar que lo observado en presencia de TOH, se distingue un pico estrecho a 0,72V ( $8,17\text{mAcm}^{-2}$ ). En los ciclos sucesivos se observó el pico a 0,69V en sentido catódico con densidades de corriente altas ( $3,15\text{mAcm}^{-2}$  en el ciclo 39) y, en el rango desde 0,65V a 1,00V, el registro mostró densidades de corriente entre 3 y  $6\text{mAcm}^{-2}$ , que indican que no existe un bloqueo importante sobre la superficie de Cu como ocurrió en el caso del Carv.



*Fig. 4.17. Selección de ciclos voltamperométricos registrados en superficies de Cu en electrolito hidroalcohólico alcalino conteniendo ácido trans-ferúlico 0,1M. Las flechas indican la disminución de densidad de corriente de los picos de oxidación a través de los ciclos.*

Posteriormente se realizaron medidas cronoamperométricas. En base a los resultados obtenidos por voltametría cíclica, se seleccionaron los potenciales cercanos al pico anódico de 0,40V. En ese caso se tuvo en cuenta la presencia sólo del pico en el 1º ciclo, probablemente debido a que los productos de oxidación obtenidos bloquearon la superficie del electrodo. También se realizaron medidas a 0,75V por ubicarse en la región de potencial de alta densidad de corriente. Se registró la corriente de dichos potenciales

mediante la técnica de cronoamperometría durante 20 min para dilucidar los diferentes comportamientos y productos generados sobre el electrodo de Cu. En la Fig. 4.18 se observa la evolución de los transitorios de corriente obtenidos.

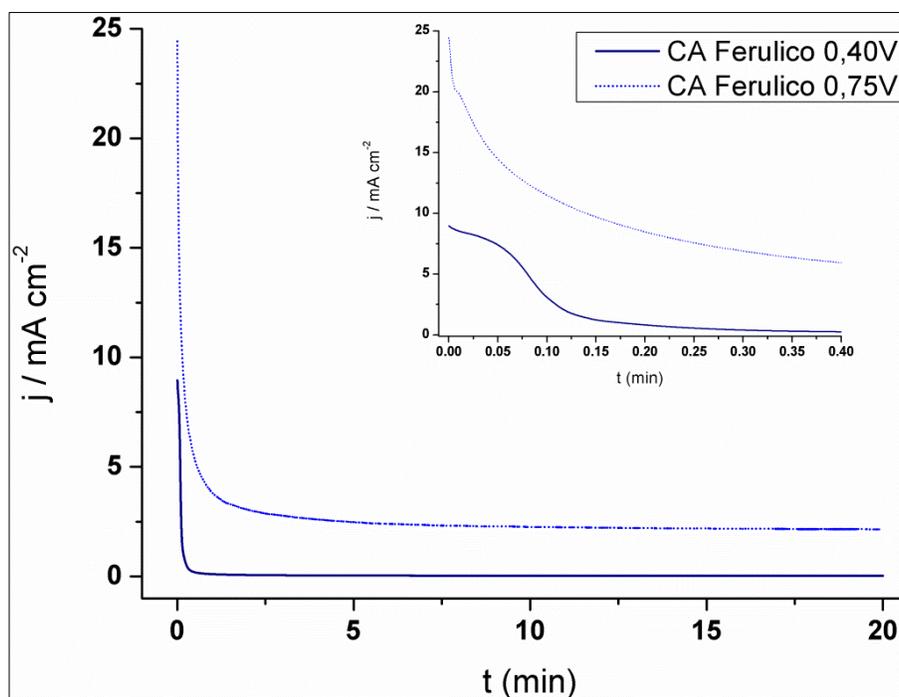


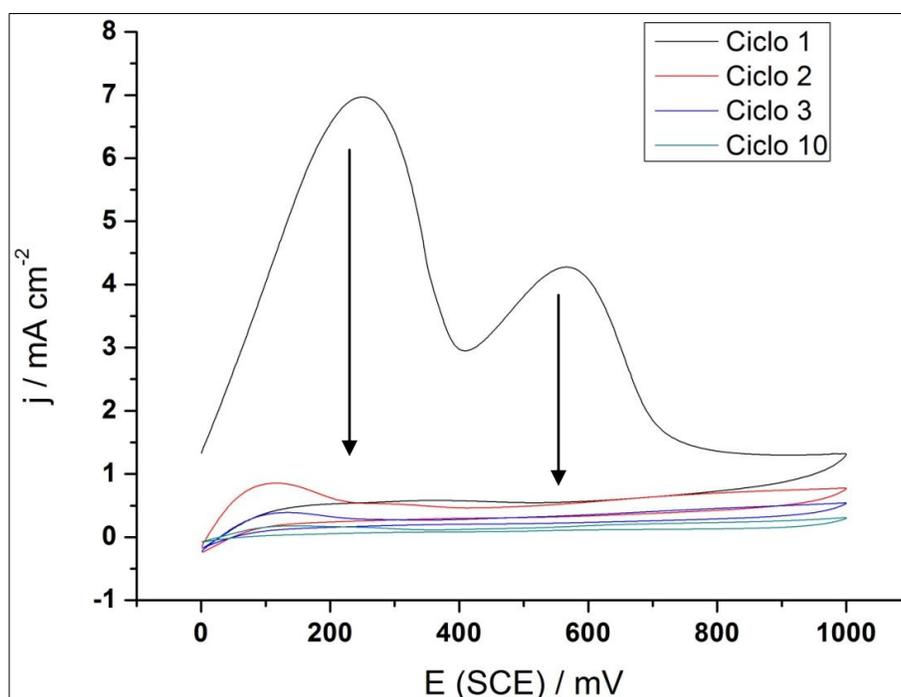
Fig. 4.18. Registros cronoamperométricos realizados sobre Cu en electrolito conteniendo ácido trans-ferúlico 0,1M. A la derecha se observa el detalle a tiempos iniciales.

El registro cronoamperométrico utilizando 0,75V como potencial constante evidenció una densidad de corriente a tiempo 0 de  $23,85 \pm 0,78 \text{ mAcm}^{-2}$  para los electrodos ensayados. En el detalle de los tiempos iniciales se observó una segunda contribución de  $18,25 \pm 2,47 \text{ mAcm}^{-2}$  durante el primer segundo del registro, seguido de un descenso progresivo de la densidad de corriente hasta llegar a  $2,48 \pm 0,46 \text{ mAcm}^{-2}$  a los 20min. Por otra parte, los registros obtenidos a 0,40V como potencial constante muestran una densidad de corriente de  $8,84 \pm 0,08 \text{ mAcm}^{-2}$  a tiempo 0, seguido de una contribución a  $8,60 \pm 0,42 \text{ mAcm}^{-2}$  a 1 segundo del registro. Posteriormente, la densidad de corriente descendió abruptamente hasta llegar a  $28 \pm 1 \mu\text{Acm}^{-2}$  a los 20min de tratamiento (Fig. 4.18). Al aplicar 0,75V, la densidad de corriente al finalizar el tratamiento es significativa, lo que podría indicar oxidaciones del compuesto y su posterior liberación a la solución, o sobreoxidación del material depositado en la superficie. Únicamente al aplicar el potencial correspondiente al primer pico voltamperométrico (0,40V) se evidenció un bloqueo del

electrodo de Cu asociado a las bajas densidades de corriente observadas a los 20 min de tratamiento. Sin embargo, el tiempo seguido para dicha disminución es mucho mayor que el necesario para el caso del Carv, tal como se verá en el capítulo 5.

#### 4.3.4.3. Ácido gálico

El estudio electroquímico del ácido gálico sobre superficies de Cu se realizó en un electrolito conteniendo 0,1M de ácido gálico a pH 7,1 dado que en la solución hidroalcohólica el registro potenciodinámico presentó evoluciones variables y no reproducibles. Se seleccionó un rango de potencial de 0,00 a 1,00V y se realizaron ciclos sucesivos a  $50\text{mVs}^{-1}$  (Fig. 4.19). En el registro potenciodinámico pueden observarse dos picos de oxidación (0,25V y 0,56V) durante el primer ciclo seguido de una disminución de la densidad de corriente, indicando un bloqueo de la superficie del Cu.



*Fig. 4.19. Selección de ciclos voltamperométricos registrados en superficies de Cu en electrolito conteniendo ácido gálico 0,1M pH7,1. Las flechas indican la disminución de densidad de corriente de los picos de oxidación a través de los ciclos.*

En base a los dos picos de alta densidad de corriente observados durante el primer ciclo de la voltametría cíclica, se realizaron cronoamperometrías a 0,25V y 0,56V durante 20min.

Los transitorios de corriente a 0,25V evidencian un bloqueo de la superficie de Cu cerca del 1° min, manteniéndose estable la densidad de corriente durante todo el registro (Fig. 4.20). Sin embargo aplicando un potencial de 0,56V la pasividad del Cu por parte del ácido gálico se rompe antes del 2° min, indicando que a dicho potencial no es posible generar una película continua sobre la superficie de Cu.

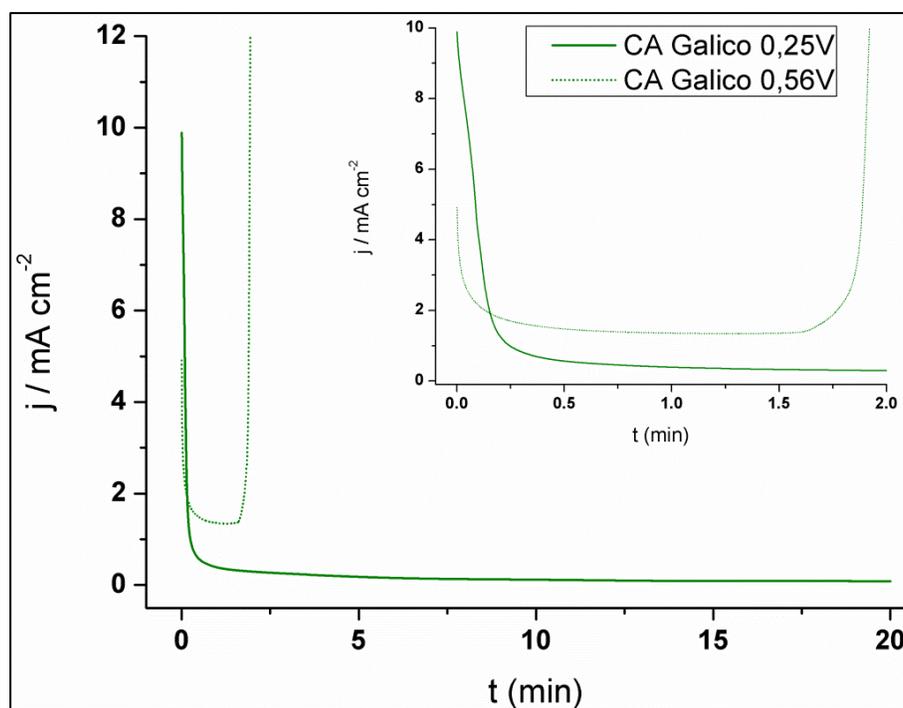


Fig. 4.20. Transitorios de corriente a 0,25V y 0,56V registrados en superficies de Cu en electrolito conteniendo ácido gálico 0,1M pH7,1.

#### 4.3.4.4. Aceite esencial de *Thymus vulgaris*

La respuesta electroquímica de *T. vulgaris* sobre Cu mostró (Fig. 4.21) contribuciones entre 0,30V y 0,75V de densidades de corriente menores  $4\text{mAcm}^{-2}$  en sentidos anódico y catódico. En el primer ciclo se distingue un pico a 0,43V ( $1,17\text{mAcm}^{-2}$ ), un aumento de la densidad de corriente que a 1,00V llega a  $15,7\text{mAcm}^{-2}$ , y un pico en sentido catódico a 0,60V ( $2\text{mAcm}^{-2}$ ). El primer pico a 0,43V desaparece en ciclos posteriores al 5° y sólo dos contribuciones ( $\sim 0,60\text{V}$  y 1,00V) se presentan en el 10° ciclo a densidades de corriente decrecientes. En los últimos ciclos sólo se observa una densidad de corriente de  $0,09\text{mAcm}^{-2}$  a 1,00V en el ciclo 39, indicando un bloqueo de la superficie del Cu.

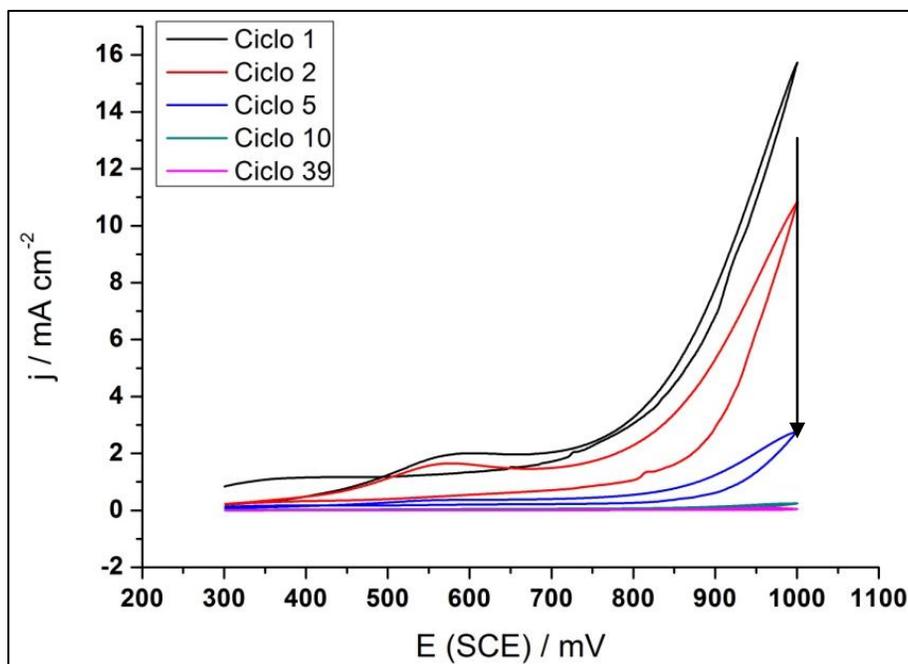


Fig. 4.21. Selección de ciclos voltamperométricos registrados en superficies de Cu en electrolito conteniendo aceite esencial de *T. vulgaris*. La flecha indica la disminución de densidad de corriente a través de los ciclos.

Considerando los picos voltamperométricos obtenidos para el aceite esencial de *T. vulgaris*, se seleccionaron los potenciales 0,40V del primer pico, 0,38V como potencial algo más catódico respecto al primer pico y 0,60V correspondiente al pico en sentido catódico para realizar las técnicas cronoamperométricas. Los transitorios de corriente a 0,38V y 0,40V muestran un pico de oxidación entre 0,6s y 1s y de una densidad de corriente de  $\sim 3,0 \text{ mA cm}^{-2}$  y  $4,6 \text{ mA cm}^{-2}$ , finalizando a los 20 min con  $\sim 6 \mu \text{ A cm}^{-2}$  en ambos casos (Fig. 4.22). Al realizar el transitorio de corriente a 0,60V la densidad de corriente inicial fue de  $8,4 \text{ mA cm}^{-2}$ , mayor a la obtenida a potenciales más catódicos, no se observó formación de picos de oxidación durante el proceso y finalizó con una densidad de corriente de  $16 \mu \text{ A cm}^{-2}$ . En todos los potenciales aplicados se observó un bloqueo de la superficie del Cu.

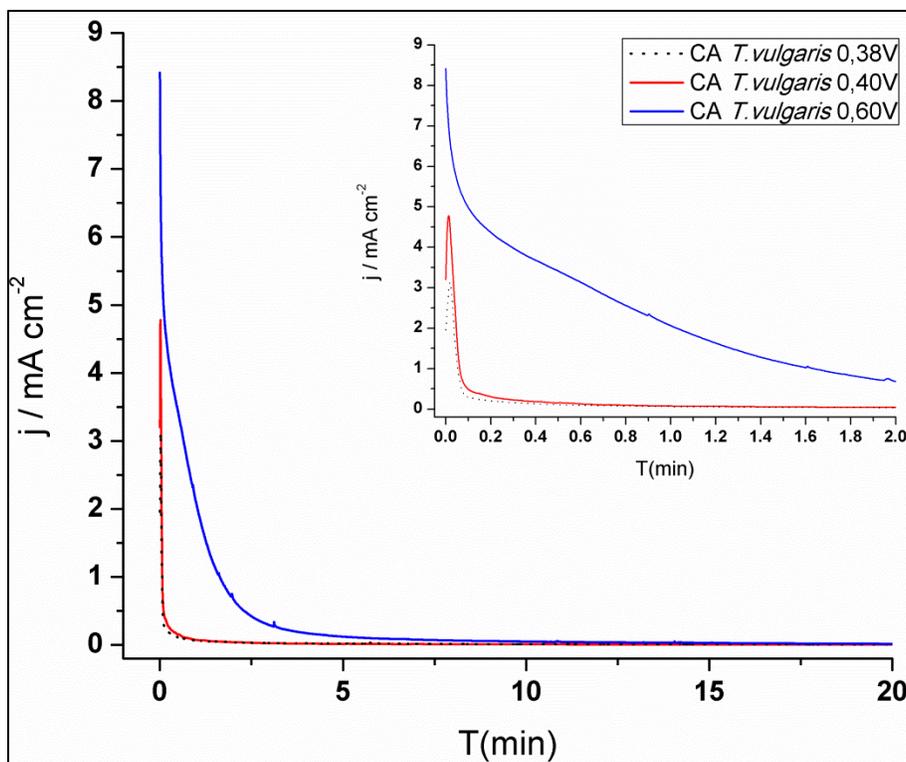


Fig. 4.22. Transitorios de corriente a 0,38V, 0,40V y 0,60V registrados utilizando superficies de Cu en electrolito conteniendo aceite esencial de *T. vulgaris*. El recuadro muestra el detalle a tiempos más cortos.

#### 4.3.4.5. Aceite esencial de *Origanum vulgare*

El registro potenciodinámico de Cu en presencia de aceite esencial de *O. vulgare* se observa en la Fig. 4.23. La densidad de corriente disminuye con el número de ciclos. Al analizar la evolución de la densidad de corriente en el primer ciclo se distinguen tres contribuciones: un pico a 0,42V (11,3mAcm<sup>-2</sup>), un segundo pico a 0,69V (12,8mAcm<sup>-2</sup>) y un aumento de la densidad de corriente que alcanza 15,1mAcm<sup>-2</sup> a los 1,00V. En sentido catódico se observa un pico a 0,63V de 7,67mAcm<sup>-2</sup> (podría corresponder a un proceso similar al que ocurre con el TOH bajo las mismas condiciones en Cu). En el segundo ciclo, la primera contribución a 0,42V desaparece, se observa un leve aumento de la densidad de corriente a 0,58V (1,6mAcm<sup>-2</sup>), a los 1,00V la corriente asciende a 16,1mAcm<sup>-2</sup> y en sentido catódico vuelve a presentarse un pico a 0,65V (9,1mAcm<sup>-2</sup>). Al finalizar los 39 ciclos la densidad de corriente del registro fue de 0,11mAcm<sup>-2</sup>, indicando el bloqueo del electrodo de Cu.

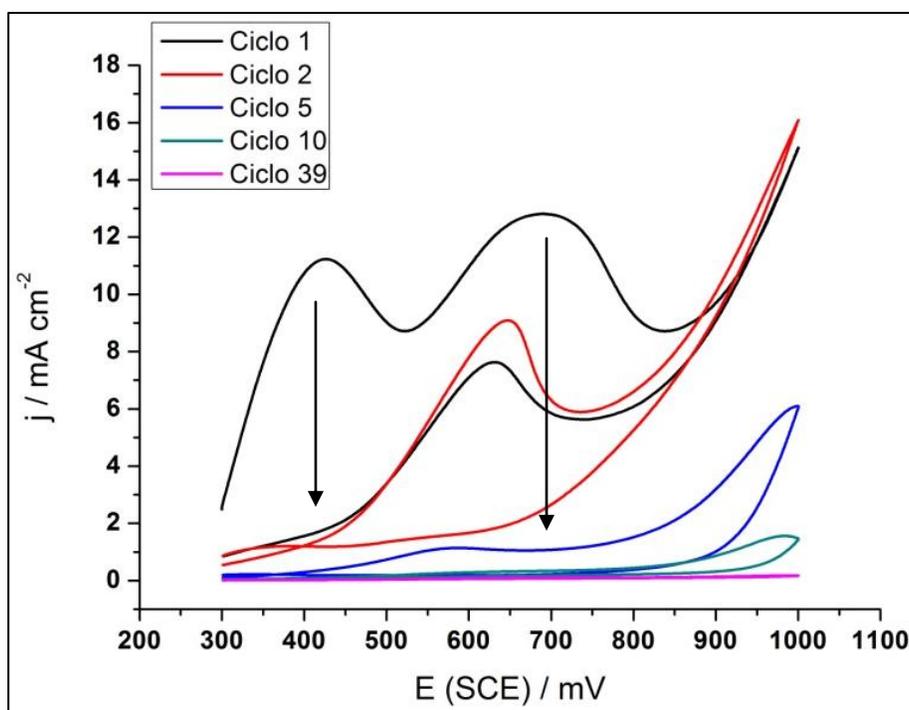


Fig. 4.23. Selección de ciclos voltamperométricos registrados en superficies de Cu en electrolito conteniendo aceite esencial de *O. vulgare*. Las flechas indican la disminución de densidad de corriente de los picos de oxidación a través de los ciclos.

Teniendo en cuenta los picos voltamperométricos obtenidos para el aceite esencial de *O. vulgare* sobre Cu, se seleccionaron los potenciales 0,42V y 0,69V para realizar los transitorios de corriente. Como se observa en la Fig. 4.24, la densidad de corriente inicial fue de  $\sim 7,0 \text{ mA cm}^{-2}$  y  $\sim 25 \text{ mA cm}^{-2}$  a 0,42V y 0,69V, respectivamente. A 0,42V se observó un pico de densidad de corriente de  $\sim 9,5 \text{ mA cm}^{-2}$  a 1s de aplicación del potencial seguido de una segunda contribución de  $\sim 4,0 \text{ mA cm}^{-2}$  entre los 4 y 5s del registro, y un descenso de la intensidad de corriente hasta llegar a  $\sim 20 \mu \text{A cm}^{-2}$  a los 20min. El transitorio de corriente a 0,69V evidenció una contribución inicial de  $\sim 14 \text{ mA cm}^{-2}$  entre los primeros 2,5 y 25s del registro, seguido de una disminución de la densidad de corriente hasta llegar a  $\sim 50 \mu \text{A cm}^{-2}$  a los 20min. Ambos tratamientos evidenciaron un bloqueo del electrodo de Cu a los 20 min de aplicación del potencial.

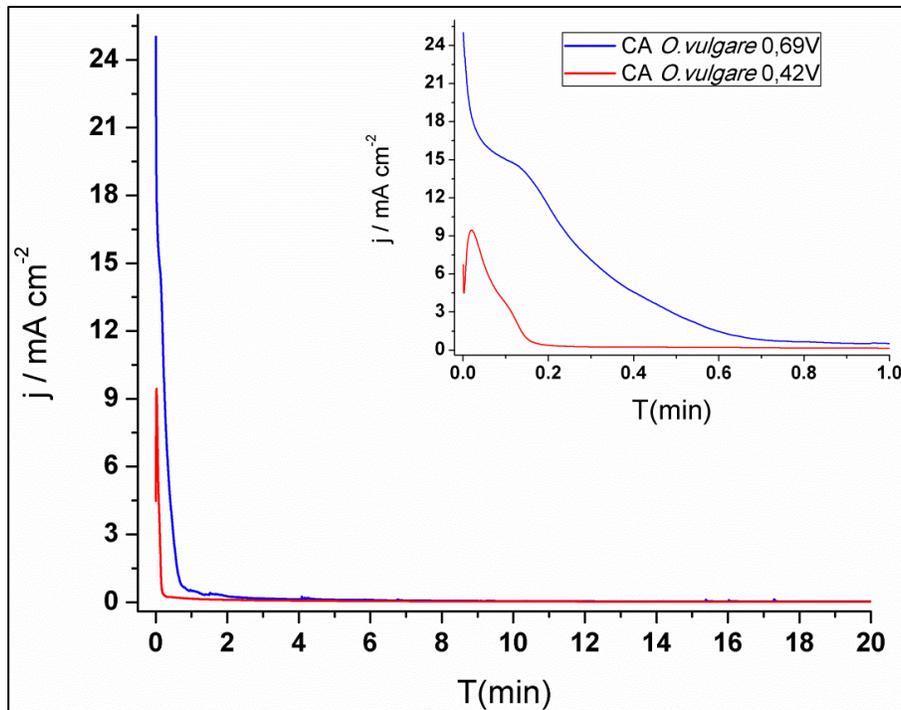


Fig. 4.24. Transitorios de corriente a 0,42V y 0,69V registrados utilizando superficies de Cu en electrolito conteniendo aceite esencial de *O. vulgare*. El recuadro muestra el detalle a tiempos más cortos.

#### 4.3.4.6. Aceite esencial de *Origanum x applii*

Los registros dinámicos de potencial de Cu en presencia de aceite esencial de *O. x applii* se realizaron con un total de 10 ciclos debido a los saltos de densidad de corriente observados en los ciclos sucesivos. En la Fig. 4.25 se evidencia un pico inicial de densidad de corriente a 0,36V ( $4,67\text{mAcm}^{-2}$ ) en el primer ciclo, seguido de una segunda contribución a 0,65V ( $4,29\text{mAcm}^{-2}$ ) y un ascenso de la densidad de corriente hasta llegar a 1,00V ( $15\text{mAcm}^{-2}$ ). En sentido catódico se puede observar un pico a 0,65V ( $9,59\text{mAcm}^{-2}$ ). En el segundo ciclo no se presenta el pico a  $\sim 0,36\text{V}$ , pero se observa una contribución a 0,77V ( $11,86\text{mAcm}^{-2}$ ) y un pico en sentido catódico a 0,70mV ( $12,00\text{mAcm}^{-2}$ ). En los ciclos sucesivos los picos observados en el segundo ciclo se presentaron con leves corrimientos de potencial y densidad de corriente. Considerando que la densidad de corriente en el ciclo 10 es alta, se puede inferir que la superficie presenta un escaso bloqueo por el aceite esencial de *O. x applii*.

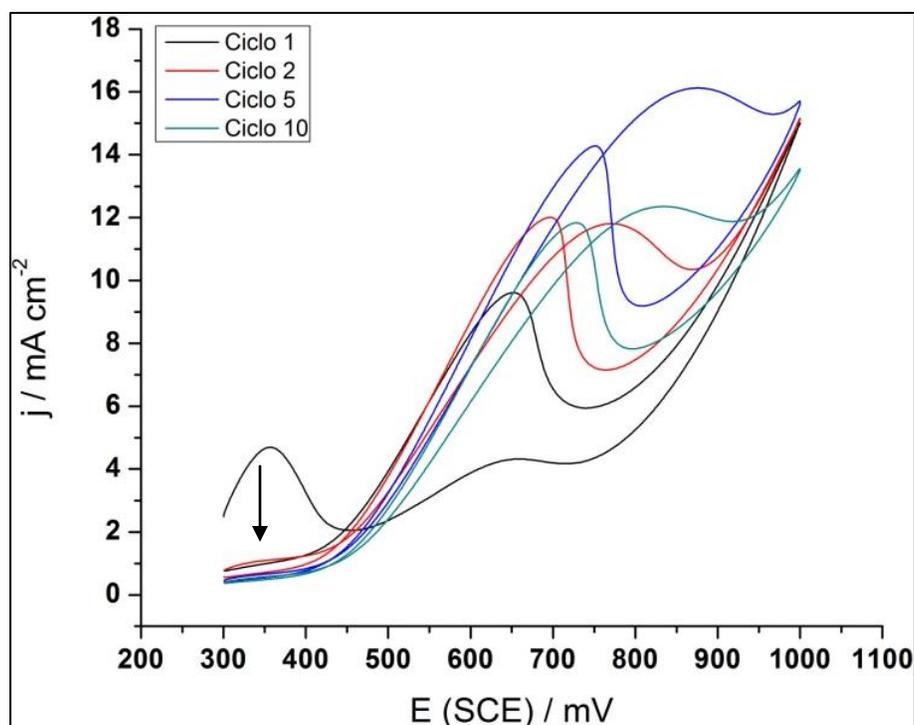


Fig. 4.25. Selección de ciclos voltamperométricos registrados en superficies de Cu en electrolito conteniendo aceite esencial de *O. x applii*. La flecha indica la disminución de densidad de corriente del pico de oxidación a través de los ciclos.

#### **4.3.5. Caracterización de los productos de oxidación de los fitocompuestos formados sobre Cu. Espectros ATR-FTIR**

##### **4.3.5.1. Timol y carvacrol**

Los espectros de polyTOH y polyCarv formados mediante VC fueron comparados frente a las drogas puras correspondientes en la Fig. 4.26. Se detectaron picos característicos de fenoles polisustituídos a  $1494$ ,  $1454$  y  $1176\text{cm}^{-1}$  que corresponden a estados polimerizados de los fitocompuestos para ambas películas. Los picos observados a  $1644\text{cm}^{-1}$  (polyCarv) y  $1640\text{cm}^{-1}$  (polyTOH) indican la presencia de estructuras cetónicas (vibración de tensión de C=O en quinonas) [75,177,178]. Los picos a  $1243$ ,  $1494$ ,  $1620$  y  $\sim 1040\text{cm}^{-1}$  pueden ser asignados a uniones éter entre fenoles sustituidos [75,144,177,179]. Las estructuras quinónicas y las uniones éter denotan la oxidación de TOH y Carv durante el proceso de electropolimerización. En particular, el espectro de polyTOHCu presenta un pico estrecho a

$3531\text{cm}^{-1}$ , ausente en polyCarvCu que puede asignarse a vibraciones  $\nu\text{-OH}$  ( $\text{HyF}/\nu\text{-OH}$ ) libre de uniones hidrógeno. Diversos trabajos indican que dicho pico se corresponde a grupos oxhidrilos en la estructura polimérica que no forman uniones de puente hidrógeno por quedar recluidas en la estructura interna, mientras que otros lo atribuyen a moléculas de agua, monómeros, oligómeros o quinonas confinadas en la matriz polimérica [144,174,177–180]. Adicionalmente, la película de polyTOHCu presenta un pico ancho a  $3447\text{cm}^{-1}$  atribuible a vibraciones de tipo vibración de tensión de  $\text{-OH}$ , correspondiente a grupos funcionales de  $\text{-OH}$  con uniones hidrógeno ( $\text{-OH}\dots\text{C=O}$ ) [179].

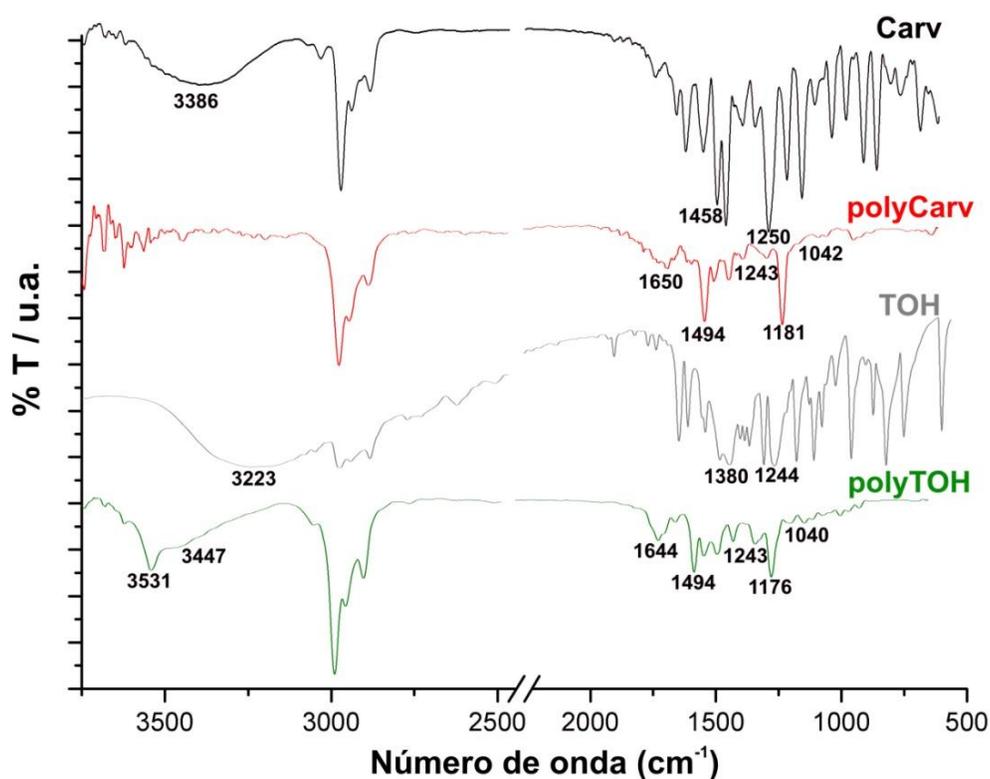
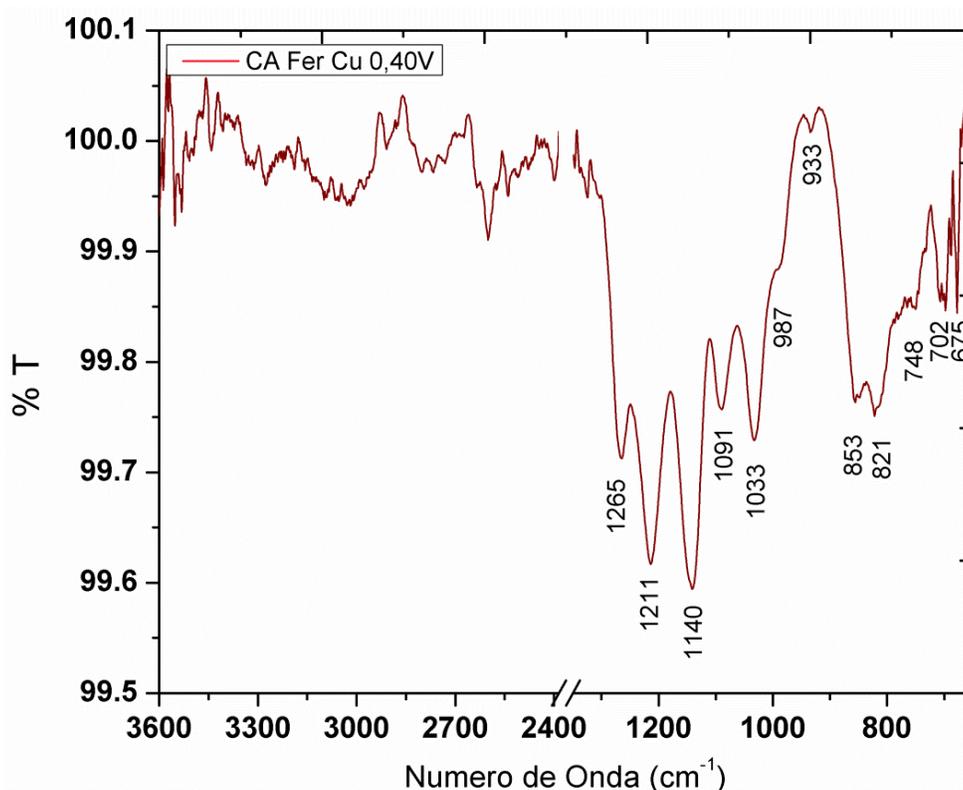


Fig. 4.26. Espectros ATR-FTIR de Carv puro, polyCarvCu, TOH puro y polyTOHCu.

#### 4.3.5.2. Ácido trans-ferúlico

En base a los estudios realizados, se eligieron diversas condiciones para realizar análisis de los productos generados por la electropolimerización del ácido trans-ferúlico sobre el Cu. Los polímeros del ácido trans-ferúlico realizados por cronoamperometría a 0,40V evidenciaron una estructura homogénea y el espectro ATR-FTIR (Fig. 4.27) mostró picos

correspondientes a vibración de tensión o deformación de C-O ( $1385$ ,  $1140$  y  $1091\text{cm}^{-1}$ ) [144,164], C-O-C del sustituyente O-Metilo ( $1265\text{cm}^{-1}$ ) [160], vibraciones del anillo aromático ( $1140$ ,  $1033$ ,  $987$ ,  $933$ ,  $748$ ,  $702$  y  $675\text{cm}^{-1}$ ) [144,164] y  $\text{CH}_3$  de cadena lineal del sustituyente del anillo ( $987\text{cm}^{-1}$ ) [144]. No se observan uniones éster ( $1700$ - $1760\text{cm}^{-1}$ ), ni presencia de vibración de flexión de OH (región entre  $3700$  y  $3000\text{cm}^{-1}$ ) indicando la reacción de los oxhidrilos sustituyentes y del grupo carboxilo originales del ferúlico que podría dar lugar a estructuras éter C-O-C. Sin embargo, no se observa el pico de éter predominante en espectros ATR-FTIR de polímeros de Carv y TOH en  $1180\text{cm}^{-1}$ .



*Fig. 4.27. Espectro ATR-FTIR de polyFerúlicoCu realizado mediante cronoamperometría sobre electrodo de Cu a  $0,40\text{V}$  en solución hidroalcohólica con  $0,1\text{M}$  ácido trans-Ferúlico.*

La electropolimerización del ácido trans-ferúlico por cronoamperometría a  $0,75\text{V}$  mostró superficie heterogénea con una zona de coloración amarillenta en los bordes del electrodo de lámina de Cu y una zona céntrica transparente. Los espectros de ambas zonas se muestran en la Fig. 4.28. Se observan leves corrimientos de picos e intensidades de los

espectros. Sin embargo, se pueden distinguir señales correspondientes a vibraciones de OH de grupos fenólicos o y carboxílicos en 3397, 3285,  $\sim 1415$ ,  $\sim 1290$  y  $\sim 2979\text{cm}^{-1}$  [144]; contribuciones a  $\sim 2846\text{cm}^{-1}$  que puede atribuirse a vibración de tensión de C-H de grupo O-metilo del ácido trans-ferúlico [160]; vibraciones del anillo aromático ( $\sim 1586$ ,  $\sim 1505$ ,  $\sim 855$  y  $\sim 808\text{cm}^{-1}$ ) [160]; vibraciones de  $\text{CH}_3$  de alifáticos en  $979\text{cm}^{-1}$  [144]; contribuciones a  $\sim 1644$  y  $\sim 1379\text{cm}^{-1}$  asignadas a  $\text{COO}^-$  [161,164]; una banda a  $1733\text{cm}^{-1}$  presente sólo en la zona de los bordes del electrodo que corresponde al grupo carbonilo o uniones éster [161,181]; señales atribuibles a uniones Ph-O-R ya sea del metilo sustituyente o de hidroxilos en  $\sim 1264$ ,  $\sim 1208$ ,  $\sim 1192$  y  $\sim 1047\text{cm}^{-1}$  [144,158,160]; picos asignados a uniones C-O en  $\sim 1136$  y  $\sim 1086\text{cm}^{-1}$  [144]; y un pico a  $\sim 1554\text{cm}^{-1}$  correspondiente a vibración de tensión de  $\text{C}=\text{O}$  [144]. En base a los resultados obtenidos en los espectros podríamos decir que la polimerización de ácido ferúlico en estas condiciones se llevaría a cabo por uniones éter principalmente en forma no uniforme observándose en la zona del borde de los electrodos de Cu uniones éster ( $1733\text{cm}^{-1}$ ).

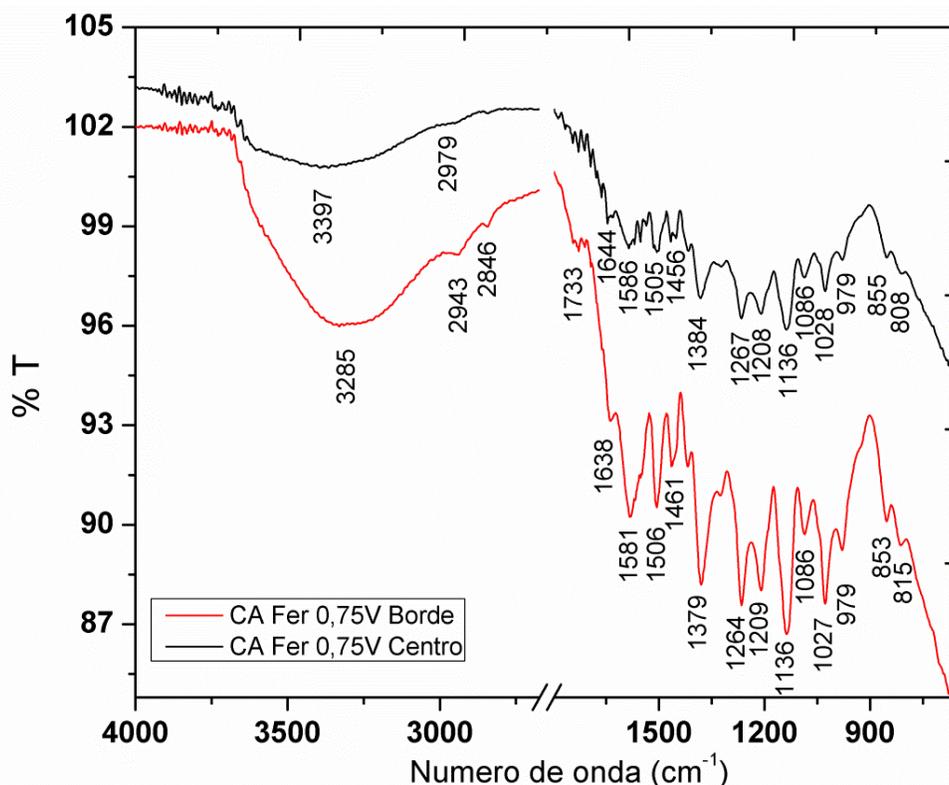


Fig. 4.28. Espectro ATR-FTIR de polyFerúlicoCu realizado mediante cronoamperometría sobre electrodo de Cu a 0,75V en solución hidroalcohólica con 0,1M ácido trans-Ferúlico.

### 4.3.5.3. Ácido gálico

La superficie de Cu luego de realizar la voltametría cíclica en el rango de potencial de 0,00 a 1,00V en un electrolito 0,1M de ácido gálico a pH7,1, resultó heterogénea con zonas cubiertas y zonas descubiertas de material orgánico. Las zonas descubiertas no presentaron señales en el espectro de ATR-FTIR. Sin embargo, en las zonas cubiertas (Fig. 4.29) se obtuvieron señales atribuibles a OH de grupos carbonilos o fenoles ( $3092$ ,  $2661$ ,  $1316$ ,  $1047$  y  $870\text{cm}^{-1}$ ) [144,158,182], C=O de carbonilos ( $1490\text{cm}^{-1}$ ) [144], C-O de carbonilos ( $1532$  y  $1396\text{cm}^{-1}$ ) [164], C-O de grupos alcoholes ( $1378$ ,  $1336$  y  $1204\text{cm}^{-1}$ ) [144], C-O ( $966\text{cm}^{-1}$ ) [144], quinonas o grupos cetonas conjugados ( $1649\text{cm}^{-1}$ ) [164] y vibraciones correspondientes al anillo ( $1490$ ,  $890$ ,  $819$ ,  $763$  y  $716\text{cm}^{-1}$ ) [144,158]. No se observaron uniones éter o éster en la superficie.

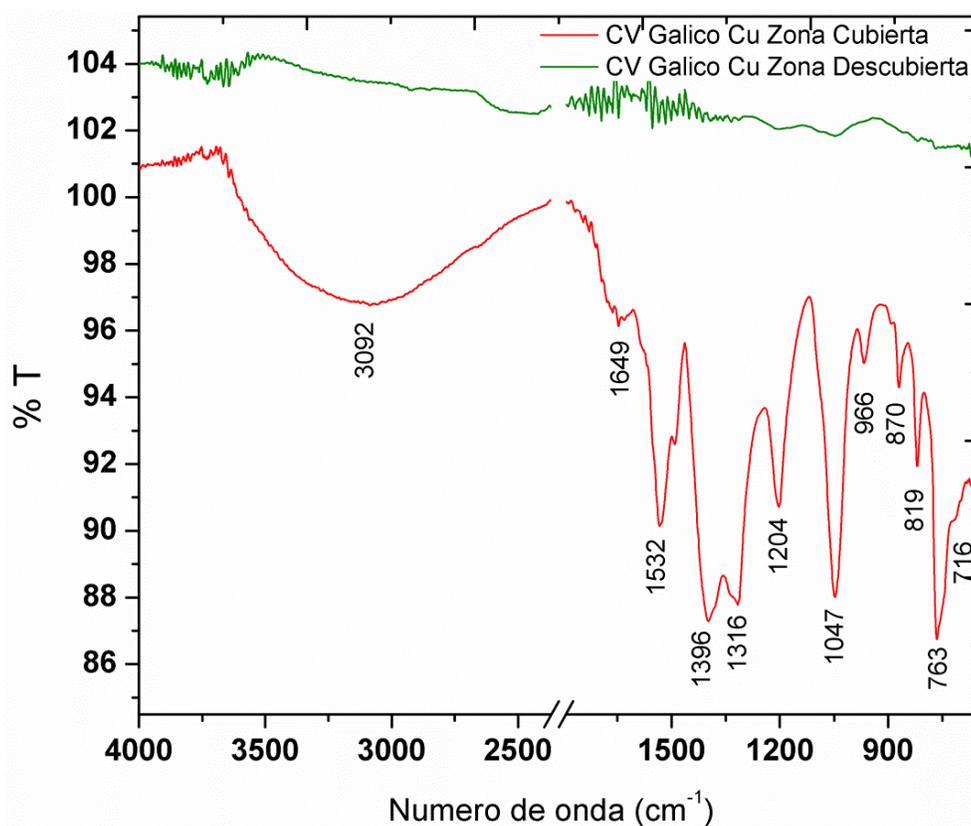


Fig. 4.29. Espectro ATR-FTIR de polyGálicoCu realizado por VC entre 0,00 y 1,00V (39 ciclos) en solución 0,1M ácido gálico pH7,1.

El espectro del polímero de ácido gálico realizado mediante cronoamperometría a 0,25V por 20 min en electrolito 0,1M de ácido gálico pH 7,1 resultó homogéneo (Fig. 4.30) y presentó picos correspondientes a OH de grupos carbonilos o fenoles ( $3348$ ,  $1340$ ,  $1284^1$ ,  $1215$ ,  $958$  y  $856\text{cm}^{-1}$ ) [144,158,182], C=O de carboácidos ( $1588$  y  $1489\text{cm}^{-1}$ ) [144], C-O de carboxilos ( $1390\text{cm}^{-1}$ ) [164], C-O de grupos alcoholes ( $1335$  y  $1098\text{cm}^{-1}$ ) [144], uniones C-C entre ácidos fenólicos ( $1057\text{cm}^{-1}$ ) [181] y vibraciones atribuibles al anillo ( $1588$ ,  $1489$ ,  $1430$ ,  $1418$ ,  $958$ ,  $818$ ,  $765$  y  $741\text{cm}^{-1}$ ) [144]. No se observan uniones éter o éster en la estructura. Considerando los resultados obtenidos de los espectros ATR-FTIR en ambas condiciones de tratamiento electroquímico, se pudo inferir que la estructura del material depositado sobre la superficie de Cu presentaría uniones C-C entre anillos fenólicos del ácido gálico conservando estructuras ácidas y oxhidrilos dentro de la matriz polimérica.

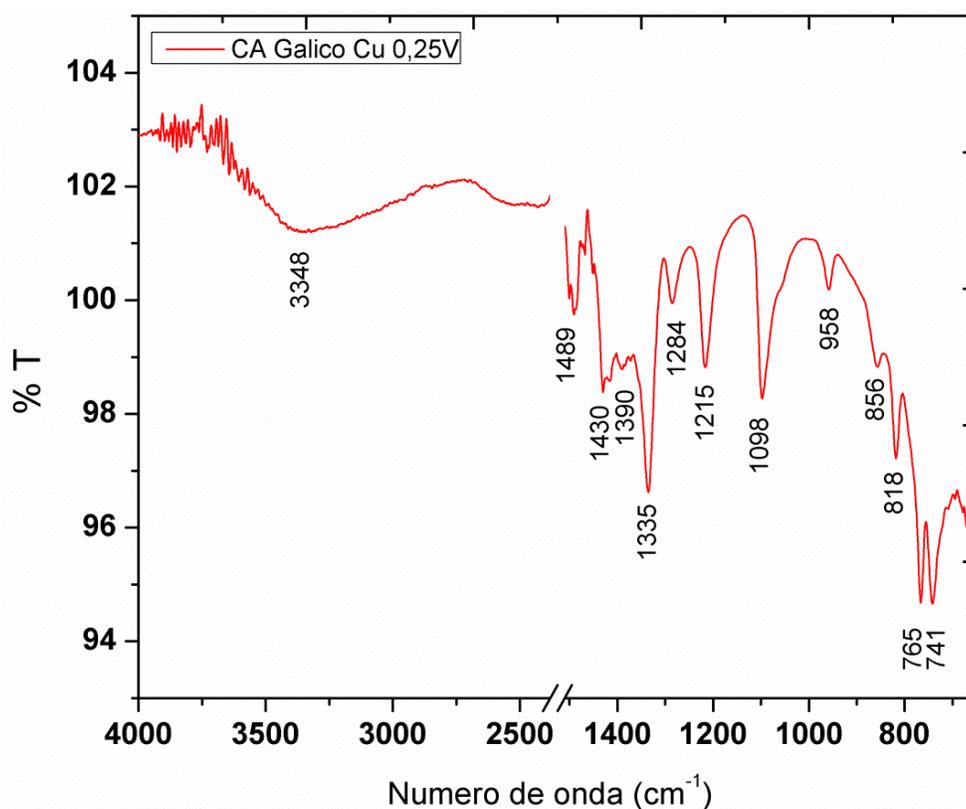


Fig. 4.30. Espectro ATR-FTIR de polyGalicoCu realizado por cronoamperometría a 0,25V por 20min en solución 0,1M ácido gálico pH7,1.

#### 4.3.5.4. Aceite esencial de *Thymus vulgaris*

Los espectros ATR-FTIR de los productos generados sobre la superficie de Cu luego de aplicar las técnicas electroquímicas utilizando aceite esencial de *T. vulgaris* se muestran en la Fig. 4.31. Para todas las condiciones de electropolimerización del aceite esencial ensayadas se observó una similitud en los espectros de ATR-FTIR con el polyCarvCu (ver espectro ATR-FTIR de polyCarvCu en Fig. 4.26). Los polímeros obtenidos con aceite esencial no evidenciaron presencia de oxhidrilos en su estructura (ausencia de banda entre 3500 y 3000 $\text{cm}^{-1}$ ). Los picos a  $\sim 1246$ ,  $\sim 1178$ ,  $\sim 1111$  y  $\sim 1040\text{cm}^{-1}$  pueden ser asignados a uniones éter entre fenoles sustituidos [75,144,177,179] indicando que todos los grupos C-OH reaccionaron para formar uniones C-O-C. Se observa la presencia de bandas a  $\sim 2957$ ,  $\sim 2922$  y  $\sim 2868\text{cm}^{-1}$  que corresponden a vibraciones  $\nu_{\text{as}}\text{-CH}_3$ ,  $\nu_{\text{as}}\text{-CH}_2$  y  $\nu_{\text{s}}\text{-CH}_3$  de sustituyentes del anillo fenólico, respectivamente [144,158]. Las señales a  $\sim 1337\text{cm}^{-1}$  corresponden a vibraciones del grupo isopropilo sustituyente del anillo fenólico [158]. Adicionalmente se observan picos asignados a vibraciones del anillo fenólico en  $\sim 1157$ ,  $\sim 1006$ ,  $\sim 892$ ,  $\sim 862$  y  $\sim 812\text{cm}^{-1}$  [158]. Los picos a  $\sim 1090$ ,  $\sim 1087$ ,  $\sim 1060$  y  $\sim 963\text{cm}^{-1}$  pueden atribuirse a grupos C-O [144,158,159]. En base a los grupos funcionales identificados en la superficie de Cu luego de los tratamientos electroquímicos, se pudo inferir que los productos depositados podrían ser anillos fenólicos unidos mediante uniones éter, sin grupos oxhidrilos, similar a lo reportado para polyCarvCu (Fig. 4.26).

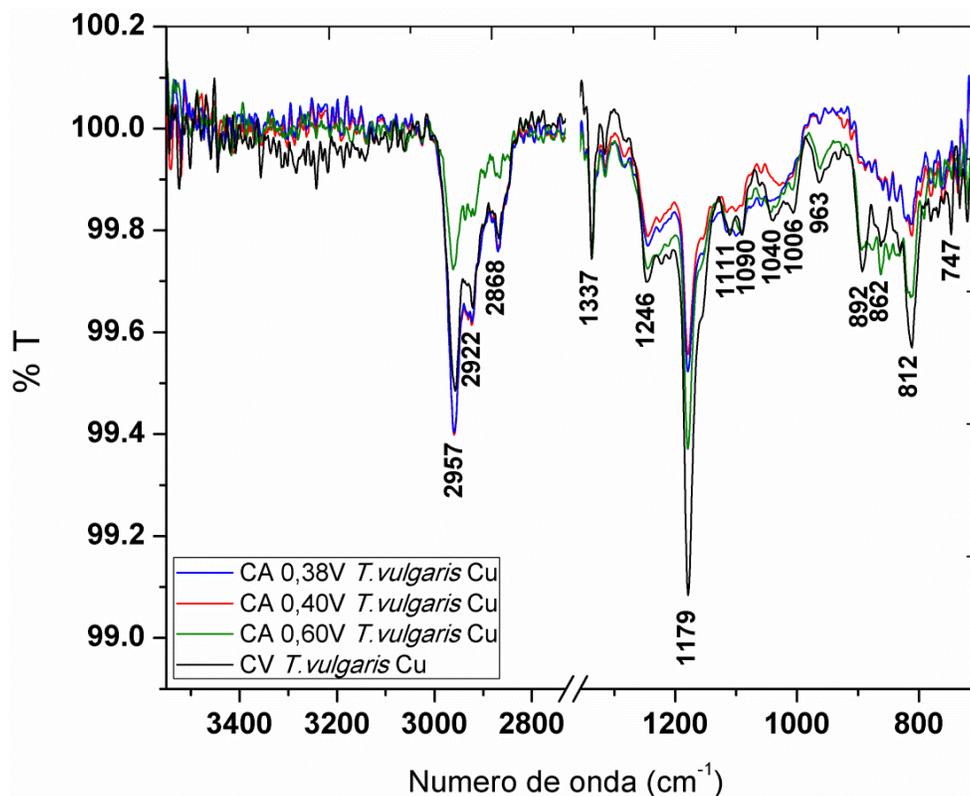


Fig. 4.31. Espectro ATR-FTIR de productos generados por electropolimerización de aceite esencial de *T. vulgaris* sobre Cu. CV: voltametría cíclica; CA: cronoamperometría a distintos potenciales.

#### 4.3.5.5. Aceite esencial de *Origanum vulgare*

Los espectros ATR-FTIR de los productos generados por técnicas electroquímicas sobre superficies de Cu utilizando aceite esencial de *O. vulgare* se observan en la Fig. 4.32. Se puede observar una similitud de los espectros con el polyCarvCu y con los productos de aceite esencial de *T. vulgaris* (Fig. 4.31). Los picos a 1242, 1177, y 1033 $\text{cm}^{-1}$  pueden ser asignados a uniones éter entre fenoles sustituidos [75,144,177,179]. No se observan señales correspondientes a grupos oxhidrilos (3500-3000 $\text{cm}^{-1}$ ). Se observa la presencia de bandas a 2960, 2928 y 2870 $\text{cm}^{-1}$  que pueden atribuirse a vibraciones  $\nu_{\text{as}}\text{-CH}_3$ ,  $\nu_{\text{as}}\text{-CH}_2$  y  $\nu_{\text{s}}\text{-CH}_3$  de sustituyentes del anillo fenólico, respectivamente [144,158]. El pico a 1336 $\text{cm}^{-1}$  corresponde a vibraciones del grupo isopropilo sustituyente del anillo fenólico [158]. Adicionalmente, se observan señales asignadas a vibraciones del anillo fenólico en 1394, 1003, 898, 869 y 816 $\text{cm}^{-1}$  [158]. En base a los grupos funcionales identificados en la superficie de Cu luego de los tratamientos electroquímicos, se pudo inferir que los

productos depositados podrían ser anillos fenólicos unidos mediante uniones éter, sin grupos oxhidrilos, similar a lo reportado para polyCarvCu (Fig. 4.26) y para los tratamientos con aceite esencial de *T. vulgaris* (Fig. 4.31).

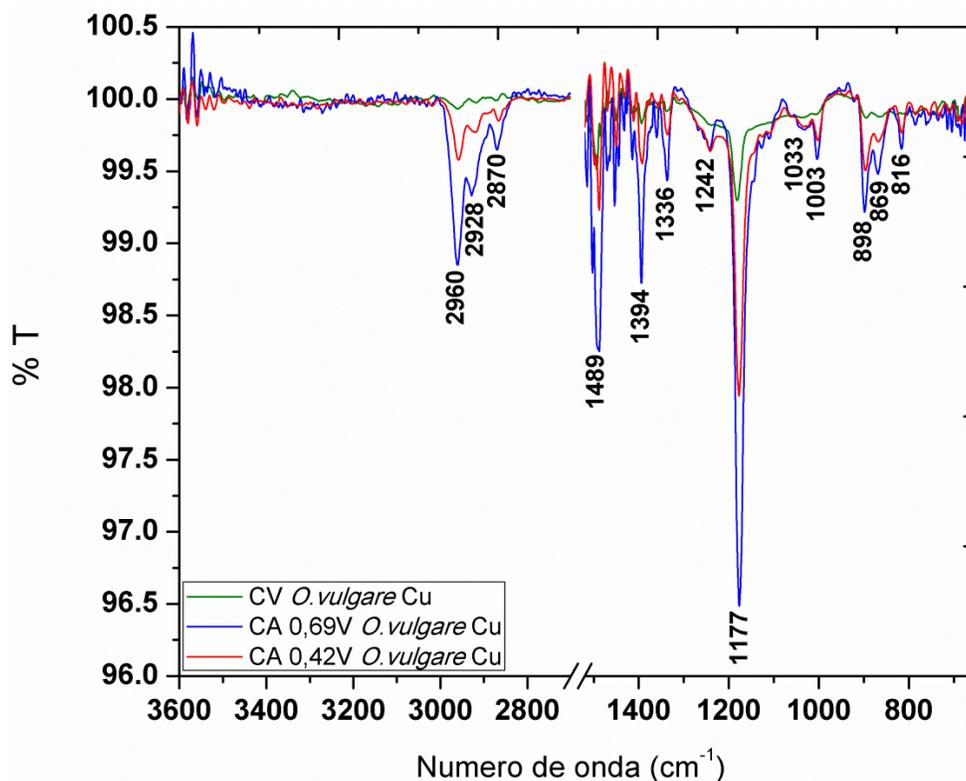


Fig. 4.32. Espectro ATR-FTIR de productos generados por electropimerización de aceite esencial de *O. vulgare* sobre Cu. CV: voltametría cíclica; CA: cronoamperometría a distintos potenciales.

#### **4.3.6. Evaluación de la susceptibilidad a la corrosión del Cu antes y después de los tratamientos realizados**

Con el fin de seleccionar el mejor tratamiento inhibitorio de la corrosión del Cu se llevaron a cabo barridos lineales de potencial de los diversos tratamientos en 0,136M KCl a  $1\text{mVs}^{-1}$ . Las curvas obtenidas sobre Cu tratado con distintos compuestos se muestran en las Fig. 4.33 y 4.34. En ellas se observa que las películas generadas con aceites esenciales y ácido ferúlico, tanto por voltametría cíclica como mediante la técnica cronoamperométrica, no modifican la corriente y el potencial de corrosión del Cu, indicando que no poseen una significativa actividad inhibitoria de la corrosión del metal (Fig. 4.33).

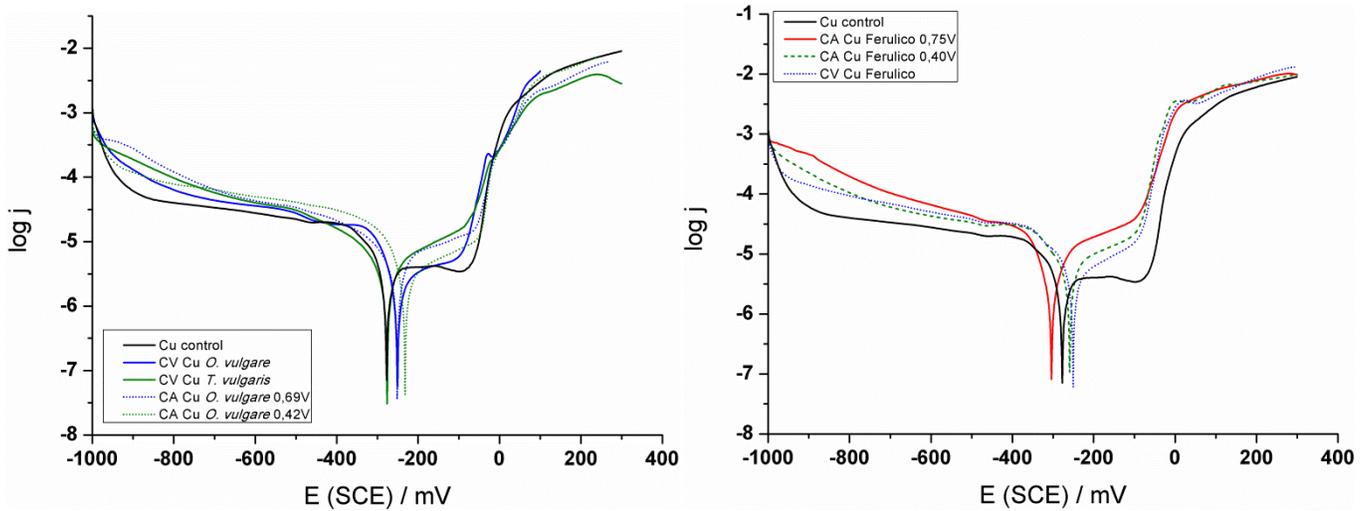


Fig. 4.33. Curvas de Tafel de registradas para películas generadas mediante CV o cronoamperometría (se indican los potenciales) con ácido ferúlico y con aceite esencial de *T. vulgaris* y de *O. vulgare* sobre Cu, realizadas a  $1\text{mVs}^{-1}$  en  $0,136\text{M KCl}$ .

Por otro lado, las películas de polyTOH y polyCarv formadas mediante VC (Fig. 4.34) disminuyen significativamente la densidad de corriente de la rama anódica y de la corriente de corrosión del Cu (aproximadamente un orden de magnitud) además de provocar un corrimiento del potencial de corrosión hacia valores más anódicos (Tabla 4.1).

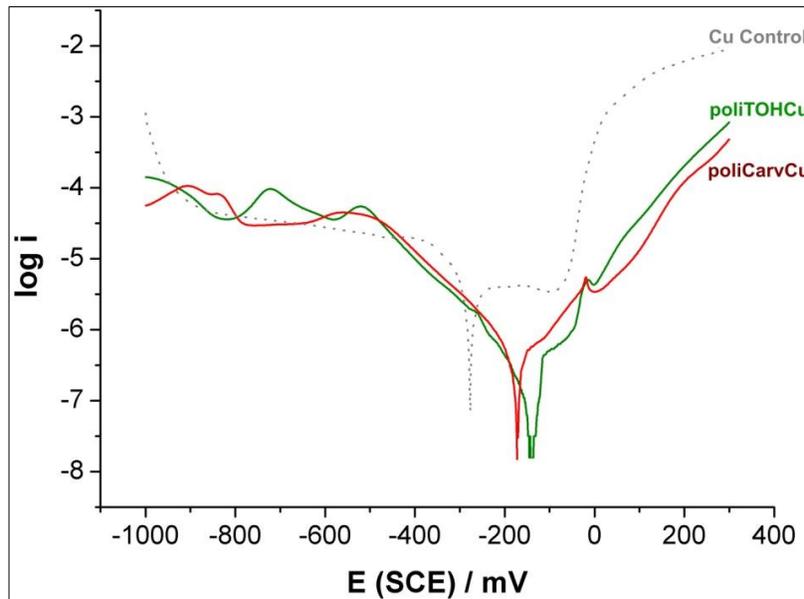


Fig. 4.34. Curvas de Tafel ( $\log i(\text{A})$  vs.  $E(\text{SCE})/\text{mV}$ ) registradas para polyCarvCu, polyTOHCu (obtenidas mediante VC) y Cu control realizadas a  $1\text{mVs}^{-1}$  en  $0,136\text{M KCl}$ .

Tabla 4.1. Parámetros de corrosión registrados para polyCarvCu y polyTOHCu en 0,136M KCl.

|                   | <b>E<sub>corr</sub> (mV)</b> | <b>I<sub>corr</sub> (μA/cm)</b> |
|-------------------|------------------------------|---------------------------------|
| <b>Cu control</b> | -264,2 ± 4,1                 | 4,0 ± 0,7                       |
| <b>polyCarvCu</b> | -182,0 ± 5,1                 | 0,4 ± 0,1                       |
| <b>polyTOHCu</b>  | -140,6 ± 1,0                 | 0,1 ± 0,1                       |

#### **4.3.7. Comparación de los resultados obtenidos por voltamperometría cíclica y espectroscopía ATR-FTIR sobre Cu**

El registro potenciodinámico del Cu tratado con ácido trans-ferúlico no mostró un bloqueo de la superficie del electrodo, sin embargo, los transitorios de corriente a 0,40V generaron una disminución significativa de la densidad de corriente a los 20 min del tratamiento. En el caso del ácido gálico, los tratamientos realizados no evidenciaron una disminución de la densidad de corriente significativa tanto a través de los ciclos sucesivos en la voltamperometría, así como a los 20 min de aplicación del potencial (0,25V) durante la cronoamperometría. No obstante, en presencia de iones cloruro, la pasividad observada en dichos tratamientos se pierde debido a la agresividad del electrolito. La electropolimerización de ácido trans-ferúlico sobre Cu involucraría uniones éter entre los monómeros preponderantemente en las zonas céntricas del electrodo y uniones éster en el borde del mismo. Por otro lado, el polímero de ácido gálico, al no presentar picos correspondientes a uniones éter ni uniones éster, presentaría un mecanismo que comprendería uniones C-C entre anillos fenólicos de los monómeros, similar al modelo propuesto por Bozic *et al.* [181]. Tomando en cuenta los espectros ATR-FTIR analizados, la electropolimerización de ácido gálico y ácido ferúlico sobre Cu generarían polímeros heterogéneos que al ser observados por microscopía presentan rajaduras y parches, dejando zonas del metal sin recubrir, por lo que no presentan actividad protectora de la corrosión del Cu en medios que contienen cloruros, tales como los biológicos. Sin embargo, podrían brindar protección en medios acuosos de menor contenido de dichos iones.

Los electropolímeros de Carv y TOH, en cambio, logran reducir la densidad de corriente a lo largo de los ciclos voltamperométricos, generando películas continuas capaces de inhibir la corrosión del metal, disminuyendo la densidad de corriente en las curvas de Tafel

realizadas en 0,136M KCl y desplazando el potencial de corrosión del Cu hacia valores más anódicos. Las estructuras de ambas películas evaluadas mediante ATR-FTIR, evidenciaron presencia de uniones éter entre monómeros y grupos cetónicos. En particular, el polyCarvCu no presentó señales correspondientes a grupos oxhidrilos y se caracterizó por poseer una superficie transparente y brillante mientras que el polyTOHCu evidenció la presencia de grupos oxhidrilos con y sin uniones puente hidrógeno o moléculas de H<sub>2</sub>O recluidas en la estructura polimérica, y la superficie del electrodo de Cu resultó de coloración amarronada y opaca.

Por otro lado, los tratamientos realizados sobre Cu en presencia de aceites esenciales de *T. vulgaris* y *O. vulgare* presentaron una disminución de la densidad de corriente significativa tanto al finalizar la voltamperometría cíclica como a los 20 min de aplicación de potencial constante. Los espectros ATR-FTIR obtenidos para todos los tratamientos realizados mostraron la formación de electropolímeros de compuestos fenólicos contenidos en los aceites mediante polimerización por uniones éter, y ausencia de grupos –OH, similar a lo obtenido para el polyCarvCu. Por otro lado, los tratamientos realizados con aceite esencial de *O. x applii* no evidenciaron un bloqueo del electrodo y la evolución de los registros potenciodinámicos y potencioestáticos mostró un comportamiento irregular involucrando saltos de corriente. Al evaluar el comportamiento electroquímico de los electrodos de Cu con tratamientos con aceites esenciales de *T. vulgaris* y *O. vulgare* en medios conteniendo cloruros, el efecto fue significativo pero algo más leve que con el compuesto puro (Carv o TOH).

#### **4.4. CONCLUSIONES**

Los estudios realizados en ambas superficies metálicas, Pt y Cu, permitieron avanzar en el conocimiento de los procesos de electropolimerización y seleccionar los fitocompuestos con mayor potencial para electropolimerizarse en forma homogénea sobre la superficie con el objeto de inhibir la corrosión, con buena biocompatibilidad y con promisorias propiedades antibacterianas.

Los resultados obtenidos utilizando Pt como electrodo muestran que los fitocompuestos aquí analizados son capaces de electropolimerizarse sobre la superficie metálica, aunque en distinto grado e involucrando diferentes tipos de uniones entre monómeros. En particular, los ácidos fenólicos, gálico y trans-ferúlico, presentan una alta actividad sobre la

superficie de Pt, involucrando probablemente la deprotonación y la pérdida de un segundo electrón del grupo carboxilo, seguido de la continua oxidación de los monómeros en las capas externas del polímero y liberación de los productos oxidados a la solución [79]. Las estructuras de los electropolímeros resultantes presentaron picos correspondientes a uniones éter (excepto los productos generados sobre Cu con ácido gálico), grupo carboxilos y oxhidrilos. Por otro lado, el Carv y TOH mostraron comportamientos potenciodinámicos similares en ciertos aspectos a los observados con los aceites esenciales de *T. vulgaris*, *O. vulgare*. Se detectó el bloqueo de la superficie del Pt a través de los ciclos voltamperométricos y la formación de polímeros a través de uniones éter entre compuestos fenólicos, ya sean puros o combinados en los aceites esenciales. Los ensayos electroquímicos y los espectros ATR-FTIR de las combinaciones TOH y Carv (proporción 1 a 4) comparado con los resultados obtenidos para el aceite esencial de *O. vulgare* reflejaron un comportamiento similar, mostrando que, en las mezclas de compuestos fenólicos presentes en el aceite esencial, el Carv juega el papel principal en la electropolimerización.

En forma similar a lo observado sobre el Pt, los resultados de las experiencias realizadas con Cu permitieron constatar que el TOH, el Carv y los aceites esenciales de *O. vulgare* y *T. vulgaris* logran electropolimerizarse y simultáneamente bloquean la superficie del Cu, tal como se observó en los registros potenciodinámicos y potencioestáticos. Los espectros ATR-FTIR de los tratamientos mencionados evidenciaron una estructura polimérica con presencia de uniones éter y ausencia de grupos oxhidrilos excepto para el polyTOHCu, en el cual se distinguen picos correspondientes a grupos -OH con y sin uniones puente hidrógeno dentro de la matriz polimérica o moléculas de agua recluidas en su estructura. Por otro lado, los resultados obtenidos con ácidos fenólicos (gálico y ferúlico) no evidencian una disminución significativa de la densidad de corriente en los registros potenciodinámicos, aunque se observó un bloqueo de la superficie del Cu en las cronoamperometrías obtenidas utilizando potenciales correspondientes al primer pico de oxidación de cada compuesto. Los espectros ATR-FTIR de los productos generados con los ácidos fenólicos indicarían una polimerización heterogénea, presentando uniones éter y éster en el caso del ácido trans-ferúlico y uniones C-C entre anillos aromáticos en el caso del ácido gálico que dan lugar a películas discontinuas.

Los ensayos para evaluar el grado de protección de las películas en soluciones 0,136M KCl, indican que los tratamientos de polyTOHCu y polyCarvCu resultan ser los más

eficientes para inhibir la corrosión metálica.

Por lo expuesto previamente se seleccionaron al Carv y TOH como los FF más prometedores y, en los capítulos siguientes, los ensayos se centran en la utilización de dichos FF, los cuales se probarán sobre Cu (baja velocidad de degradación) y aleaciones base Mg (alta velocidad de degradación) con el objetivo de controlar la velocidad de corrosión mediante la generación de películas poliméricas.

# **MATERIALES METÁLICOS CON BAJA VELOCIDAD DE DEGRADACIÓN.**

**Desarrollo de estrategias para el  
control de la degradación de Cu**

**Capítulo 5**

## Capítulo 5- Materiales metálicos con baja velocidad de degradación. *Desarrollo de estrategias para el control de la degradación de Cu*

### 5.1. INTRODUCCIÓN

Tal como se ha descrito en secciones previas, el Cu y sus aleaciones se utilizan ampliamente en diversas industrias debido a sus excelentes propiedades térmicas, conductividad eléctrica y maleabilidad. La industria médica ha invertido en investigaciones en Cu y sus aleaciones ya que puede ser utilizado para transporte de señales, en pequeños implantes, en herramientas de diagnóstico, en DIUs y también para aplicaciones odontológicas. Debido a su alta conductividad pequeños alambres de Cu son capaces de enviar y recibir señales o cargas eléctricas necesarias para operar un dispositivo [183]. Asimismo, el Cu se puede encontrar en cañerías de enfriamiento y de transporte de diversos productos. Estos metales frecuentemente se corroen en presencia de iones cloruro en los diversos ambientes que se implementan, generando desechos tóxicos que contaminan el medioambiente [1,184,185]. En particular, cabe recordar que los procesos de corrosión de dispositivos, equipos e instalaciones industriales a base de Cu conducen a la liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  en las inmediaciones del material [184]. A pesar de que el Cu es un micronutriente necesario para ciertas funciones vitales, al mismo tiempo en ciertas concentraciones puede ser tóxico para las células del organismo humano y para organismos acuáticos como crustáceos, algas y bacterias ya que posee propiedades adversas para algunos sistemas biológicos a partir de concentraciones por encima de 1ppm [186].

Por lo antes expuesto, puede concluirse que el control de la corrosión de los materiales base Cu es necesario para el cuidado del medioambiente [3] y para reducir la citotoxicidad de dispositivos biomédicos. Con el objetivo de reducir la liberación de iones Cu mediante técnicas ecocompatibles, en los últimos años se ha recomendado la utilización de inhibidores de la corrosión metálica con características más amigables con el medio ambiente como pueden ser biodegradabilidad, ausencia de bioacumulación y bajo nivel de toxicidad. Los fitocompuestos poseen dichas características, siendo una fuente renovable, de bajo costo, ecocompatible y biodisponible. Se ha reportado actividad inhibitoria de la corrosión de diversos fitocompuestos con bajo o nulo impacto ambiental [65–67,70,187–189]. Recientemente se propusieron diferentes compuestos basados en extractos

vegetales, conocidos como “green”. El-Etre y colaboradores [67] reportaron que el extracto de hojas de *Lawsonia sp.* actúa retardando la corrosión del acero, níquel y zinc, mientras que extractos naturales de *Ocimum bacilicum* y *Ambrosia maritime* se propusieron como inhibidores de la corrosión del aluminio [70,188]. Entre otros extractos de hierbas medicinales con actividades anticorrosivas [65] se encuentra el de *Thymus vulgaris*, que ha evidenciado excelente protección para el acero [66].

La acción inhibitoria de compuestos naturales se atribuye generalmente a la adsorción de los fitoquímicos a las superficies metálicas lograda a través de la incorporación de dichas sustancias al medio corrosivo, a fin de formar películas protectoras sobre la superficie metálica. Es sabido que diversos compuestos naturales como purinas, pterina y 6-mercaptopurina adsorbidos sobre superficies de Cu logran una importante reducción de la liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  (*burst release*) causada por los DIUs durante el primer día de inmersión en fluido uterino. Por otra parte, la paulatina desorción de los inhibidores adsorbidos permite controlar la velocidad de corrosión del Cu en el tiempo, asegurando así el umbral necesario para la anticoncepción [15,68]. La utilización de compuestos fenólicos provenientes de fuentes naturales resultaría en una reducción del costo de los inhibidores de corrosión frente a las biomoléculas previamente ensayadas.

En este capítulo se reporta la evaluación detallada de los compuestos seleccionados como promisorios, Carv y TOH, de acuerdo a las consideraciones de las secciones previas, a través de ensayos biológicos y fisicoquímicos. Se tuvo en cuenta primeramente que, tanto el TOH como su isómero conformacional, el Carv, poseen propiedades antioxidantes. Se ha descrito, a partir de ensayos en cultivos celulares *in vitro*, que poseen capacidad de secuestrar radicales libres (radical scavenging) testada mediante ensayos de determinación de actividad antioxidante DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), entre otros [116,117]. Al respecto, Archana *et al.* [119] reportaron una reversión del daño celular inducido por radiación en ensayos *in vitro* utilizando TOH como agente antioxidante. Por lo tanto, resulta interesante evaluar primeramente el posible efecto antioxidante de TOH y Carv en cultivos celulares utilizando productos de degradación provenientes de Cu metálico como agente generador de especies reactivas de oxígeno (Sección 5.3.1).

En segundo lugar (Sección 5.3.2), dado que se ha reportado que el TOH y sus productos de oxidación son compuestos que pueden actuar como inhibidores de la corrosión sobre hierro y derivados, aluminio, zinc y aleaciones de titanio [190–192] y teniendo en cuenta los

resultados de ensayos electroquímicos obtenidos en el Capítulo 4, se evaluaron las características del TOH y del Carv adsorbidos en la superficie de Cu como posibles inhibidores de la corrosión del metal. Para ello se llevaron a cabo ensayos electroquímicos de reducción de óxidos de Cu formados sobre la superficie luego de la inmersión del metal en un medio corrosivo. Adicionalmente, se realizaron estudios de viabilidad celular a 1 y 6 días en presencia de los materiales tratados con inhibidores adsorbidos, evaluando la posible mejora de la biocompatibilidad debido a la reducción de iones liberados al medio con potenciales implicancias para su aplicación en los DIUs.

Finalmente, en base a los resultados reportados en secciones previas, se consideró también como opción generar películas poliméricas de FF que pudieran actuar como filtros iónicos capaces de mitigar la transferencia de corriente anódica y/o catódica, u obstruir la difusión de oxígeno para inhibir la reacción catódica [84,193,194]. Los resultados del Capítulo 4 permitieron constatar que es posible electropolimerizar FF sobre Cu. En el presente capítulo se evaluará en detalle tanto la adsorción como la electropolimerización de Carv y TOH, ya que estos compuestos mostraron mayor capacidad de formar películas estables que podrían constituir una EIE para inhibir la corrosión. Las técnicas electroquímicas que se emplearon para esta sección fueron las ya mencionadas en los Capítulos 2 y 4: polarización potenciodinámica (voltamperometría cíclica) y polarización potencioestática (cronoamperometría). Adicionalmente, dado que el Carv y el TOH son isómeros estructurales, se consideró interesante conocer en detalle las diferencias del proceso de electropolimerización de ambas moléculas y las características finales de las películas obtenidas a través de análisis espectroscópicos.

## **5.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.2.1. Materiales**

El Carv, TOH y otras sustancias químicas utilizadas en los ensayos fueron de grado analítico y se empleó agua ultrapura para la preparación de las soluciones. Para los ensayos electroquímicos se utilizaron electrodos de barra cilíndrica de Cu (99.7% Cu electrolítico, 9mm de diámetro), mientras que para los ensayos biológicos se utilizaron láminas de Cu (99.7%, 0,1mm de espesor, 6mm de diámetro).

### **5.2.2. Ensayos biológicos**

Se midió la capacidad antioxidante de Carv y TOH frente al estrés oxidativo generado por productos de degradación de Cu mediante ensayos de viabilidad celular en cultivos de células eucariotas de la línea CHO-K1 en presencia de extractos conteniendo iones Cu. La metodología se adaptó del trabajo de Archana *et al.* [119] donde inducen citotoxicidad por radiación y a los cultivos celulares en combinación con distintas dosis de TOH como agente antioxidante, logrando una reversión del daño celular con una dosis de 25µg/ml de TOH.

Las soluciones conteniendo productos de degradación de Cu (extractos de Cu) se obtuvieron a partir de la inmersión de Cu metálico en medio de cultivo celular Ham F12 (MCC). Las láminas de Cu, previamente lavadas con 1M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se sumergieron en 3 ml de Ham F12 por 9, 12 y 24h a 37°C, obteniendo los extractos resultantes (Ex9, Ex12 y Ex24, respectivamente).

#### **5.2.2.1. Ensayos de viabilidad celular mediante reducción de MTT**

En base a los resultados de las curvas dosis respuesta evaluadas mediante los ensayos de reducción de MTT en células CHO-K1, se seleccionaron las concentraciones de 5 a 75µg/ml de TOH y de 5 a 25µg/ml Carv para realizar los ensayos combinados.

Para evaluar el efecto del TOH y Carv sobre el daño inducido por los productos de corrosión del Cu se utilizaron células la línea CHO-K1, las cuales se sembraron en una placa de 96 pocillos (2x10<sup>3</sup> células por pozo) y se cultivaron en condiciones normales de cultivo durante 24 h. Este medio luego se reemplazó con los diferentes extractos de Cu (conteniendo los productos de corrosión liberados al medio) combinados con distintas concentraciones de TOH o Carv. Después de 24 h, se revelaron los cultivos mediante la técnica de reducción de MTT (ver sección 2.8.2.1). Cada experimento se repitió independientemente con un total de 32 repeticiones por punto experimental. Los datos se analizaron estadísticamente utilizando ANOVA de un factor y comparaciones múltiples con el método de Bonferroni.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se llevó a cabo un preacondicionamiento de las células durante 4h en cultivo con distintas concentraciones de TOH o Carv, seguido de un cultivo combinado de 24h con extractos de Cu (Ex 12) y diluciones del FF

correspondientes. La viabilidad celular se estimó mediante el método de reducción de MTT como se explicó previamente.

### 5.2.2.2 Ensayos de viabilidad celular mediante naranja de acridina

Para el ensayo de viabilidad a 24h se utilizaron células ovario de hámster chino (CHO-K1) y células preosteoblásticas (MC3T3-E1). Las células fueron crecidas independientemente a 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub> en medio Ham F12 (para la línea CHO-K1) o DMEM (para la línea MC3T3-E1) en presencia de discos de Cu (obtenidos de láminas de Cu, 6mm de diámetro) con y sin tratamiento superficial, ubicadas en el centro de placas de petri. Paralelamente, se añadieron al ensayo cultivos celulares sin la presencia de las muestras de Cu, utilizados como control de crecimiento celular. Luego de 24h de incubación, los cultivos obtenidos fueron teñidos con naranja de acridina y examinados inmediatamente por microscopio de epifluorescencia. Se analizó el porcentaje de área cubierta por células en función de la distancia a la muestra metálica con y sin tratamiento. Se realizaron más de tres ensayos independientes para asegurar la reproducibilidad. Los análisis estadísticos para las comparaciones entre múltiples tratamientos se realizaron mediante ANOVA de un factor y el test de Bonferroni.

### 5.2.2.3 Ensayo clonogénico

El ensayo clonogénico, o de formación de colonias consiste en un test *in vitro* de supervivencia de células basado en la capacidad de una célula en generar una colonia [104]. Para este análisis las células de la línea MC3T3-E1 fueron crecidas en condiciones normales de cultivo tal como se detalló en la sección 2.8.2 en presencia de discos de Cu (obtenidos de láminas de Cu, 6mm de diámetro) con y sin tratamiento superficial, ubicadas en el centro de placas de petri. Paralelamente se añadieron al ensayo, cultivos celulares sin la presencia de las muestras de Cu, utilizados como control de crecimiento celular. Luego de 6 días de incubación, las colonias obtenidas fueron teñidas con naranja de acridina y examinadas inmediatamente por microscopio de epifluorescencia. Se contabilizó el número de colonias formadas y se analizó el diámetro de las mismas utilizando el software Image J, en función de la distancia a la muestra metálica con y sin tratamiento: Zona A (cerca del disco,  $\leq 18$  mm) y Zona B (lejana del disco,  $>18$ mm). Se realizaron al menos tres ensayos independientes para asegurar la reproducibilidad. Los análisis

estadísticos se realizaron mediante ANOVA de un factor para el diámetro de las colonias y mediante el test de Chi cuadrado en el caso del número de colonias.

### **5.2.3. Ensayos fisicoquímicos (superficiales y electroquímicos)**

#### **5.2.3.1. Ensayos de adsorción de carvacrol y timol sobre Cu**

Con el objetivo de estudiar la posible capacidad inhibitoria del TOH y el Carv sobre la corrosión de Cu se realizaron tratamientos de adsorción de los fitocompuestos (0,01M en etanol absoluto) por 24h sobre electrodos de Cu (barra de 9mm diámetro, embutidos en resina Epoxi) y láminas de Cu (6mm diámetro y 0,1mm de espesor). Luego de la inmersión se procedió al estudio electroquímico de reducción de especies oxidadas de Cu en superficie y al estudio de la viabilidad de los tratamientos en células CHO-K1 mediante el ensayo de viabilidad por tinción con el colorante fluorescente naranja de acridina, calculando el porcentaje de superficie cubierta por células y el ensayo de formación de colonias en función de la distancia al material.

#### **5.2.3.2. Ensayos electroquímicos**

##### **5.2.3.2.A. Formación de películas electropolimerizadas sobre Cu**

Se utilizó un potenciostato-galvanostato Teq-03, de industria nacional para realizar las técnicas electroquímicas de modificación superficial del Cu. La electropolimerización se llevó a cabo mediante voltametría cíclica en una celda electroquímica con electrodo de lámina de Pt como contraelectrodo y electrodo de calomel saturado como electrodo de referencia. Como electrodos de trabajo se utilizaron electrodos de Cu másico (9mm de diámetro) embutido en polioximetileno dejando un área expuesta de 0,626cm<sup>2</sup>. Los electrodos de trabajo fueron pulidos gradualmente con lijas al agua desde 400 a 2500, enjuagados con agua y etanol y secados con nitrógeno. El electrolito utilizado consistió en una solución etanólica 70/30 agua/etanol conteniendo 0,3M NaOH y 0,1M de TOH o Carv (modificado de Guenbour *et al.* y Mengoli *et al.* [83–85]). La presencia de etanol en el electrolito es necesaria para solubilizar los fitocompuestos. Las técnicas de voltametría cíclica (VC) se optimizaron hasta lograr los siguientes parámetros: 39 ciclos sucesivos entre 0,30 y 1,00V a una velocidad de barrido de 50mV/s. Cada test fue realizado por triplicado para evaluar la reproducibilidad.

Para las técnicas potenciostáticas los potenciales a utilizar fueron seleccionados de acuerdo a la zona de electrooxidación observado en la voltametría cíclica de TOH y Carv sobre Cu (0,20V-0,55V). La aplicación del potencial constante se realizó durante 20 min en el mismo electrolito empleado para la electropolimerización potenciodinámica.

Con el fin de realizar estudios superficiales, estudios de viabilidad celular y de liberación de iones Cu, se utilizaron electrodos de lámina de Cu en forma de discos (0,1mm de espesor y 6mm de diámetro). Estos electrodos fueron lavados con 1M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, enjuagados con agua ultrapura y secados con nitrógeno. La electropolimerización de TOH y Carv sobre los electrodos de discos de lámina de Cu se llevó a cabo como se mencionó previamente para electrodo de Cu másico.

#### 5.2.3.2.B. Ensayos electroquímicos de corrosión

Luego de la inmersión los electrodos de Cu tratados con fitocompuestos adsorbidos se lavaron con agua ultrapura y se incubaron a 37°C a distintos tiempos (0 h, 6 h, 24 h), en medio Ham F12 que simula las condiciones de medios biológicos activos al contener proteínas, aminoácidos y sales con concentraciones de iones cloruro de 0,136M. Se registraron barridos lineales de potencial en sentido catódico, utilizando una celda electroquímica de vidrio termostatizada de tres electrodos, electrodo de calomel saturado como electrodo de referencia, electrodo de lámina de Pt como contraelectrodo y electrodos de Cu másico con los diversos tratamientos como electrodos de trabajo. Los barridos de potencial se realizaron comenzando del potencial a circuito abierto (PCA) en dirección catódica hasta -1,4V, con una velocidad de barrido de 1mV/s. Se utilizó medio Ham F12 a 37°C como solución electrolítica. Por otro lado, para evaluar el comportamiento de adsorción y desorción de TOH sobre la superficie de Cu, se realizaron ensayos de inmersión por 24h de las muestras, con TOH previamente adsorbido, en medio Ham F12 conteniendo 25µg/ml de TOH. Cabe aclarar que, en este caso en particular, esta solución fue el electrolito utilizado en los barridos lineales de potencial.

Por otro lado, se evaluó la evolución del potencial a circuito abierto (PCA) de los electrodos de Cu con y sin películas electropoliméricas, en 0,136M KCl como electrolito durante 3h. La estabilidad de las películas protectoras se estudió mediante voltametría cíclica entre PCA y 0,07V a 50mV/s y un total de 20 ciclos en 0,136M KCl. Además, se llevaron a cabo barridos lineales de potencial desde PCA hasta 0,30V a 1mV/s en 0,136M KCl, para

evaluar la protección de la corrosión del Cu por parte de las películas. La concentración de cloruros en el electrolito utilizada es similar a la presente en medios biológicos.

Adicionalmente se testeó la capacidad inhibitoria de la corrosión de la mejor condición seleccionada utilizando una solución de fluido uterino simulado conteniendo: 0,25g/l de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,072g/l de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,167g/l de  $\text{CaCl}_2$ , 0,224g/l de  $\text{KCl}$ , 4,97g/l de  $\text{NaCl}$ , 0,50g/l de glucosa y 0,48g/l de urea [68]. Se realizaron barridos lineales de potencial de las muestras desde -1,80 a 0,30V con una velocidad de barrido de 1mV/s.

### 5.2.3.3 Análisis superficial por XPS, ATR-FTIR, AFM y SEM

Las superficies de Cu con diversos tratamientos fueron caracterizadas utilizando espectroscopía de emisión de rayos X (XPS) con una fuente Al Ka (XR50, Specs GmbH) y un analizador de energía de electrones hemisférico (PHOIBOS 100, Specs GmbH) con un paso de energía de 40eV y 10eV. La escala de energía se calibró mediante dos puntos: Au 4f7/2, binding energy BE = 84,00eV y Cu 2p3/2, BE = 932,67eV. La energía de unión de C1s a 285eV se utilizó como referencia de carga. Se calcularon parámetros Auger, los cuales fueron utilizados para estudiar las especies de Cu modificadas en la superficie, independientemente de la carga estática del sustrato.

Los espectros ATR-FTIR fueron obtenidos en un espectrómetro Varian 660 equipado con un accesorio de reflexión total atenuada (MIRacle ATR, Pike technologies) con un prisma de ZnSe. Para todos los espectros se tomaron 256 scans con una resolución de  $2\text{cm}^{-1}$ . Los análisis de XPS y ATR-FTIR de los electropolímeros se compararon con tratamientos de inmersión de láminas de Cu en 0,1M Carv o TOH en etanol absoluto por 24 h a temperatura ambiente, a fin de determinar la contribución del tratamiento electroquímico en la formación de las películas.

Para la microscopía de fuerza atómica (AFM) se utilizó un Nanoscope V (Bruker, Sana Barbara, CA) en modo tapping, con punta de silica Arrow<sup>TM</sup> NCR (NanoWorld, Neuchâtel, Switzerland; constante spring, 42 N/m; frecuencia de resonancia, 285 kHz). Las imágenes obtenidas se procesaron con el software Nanoscope Analysis 1.5 (Bruker). Adicionalmente, se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de las muestras usando un microscopio FEI Quanta 200.

#### 5.2.3.4. Medidas de liberación de iones $\text{Cu}^{2+}$

La liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  de los discos de Cu con y sin película electropolimérica fue evaluada mediante inmersión en 3ml de 0,136M KCl por 1, 3 y 6 días a temperatura ambiente. Se utilizó un método colorimétrico [195] basado en la adición de 1-(2-piridilazo) - 2-naftol (PAN) a las muestras, el cual forma un complejo coloreado con  $\text{Cu}^{2+}$  detectable por espectroscopía UV-visible. Transcurrido el período de inmersión, se retiraron los discos de Cu y se acidificó la solución de KCl resultante, hasta alcanzar una concentración de 0,25M de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . A las alícuotas de 100 $\mu\text{l}$  de dicha solución acidificada se les agregó 100 $\mu\text{l}$  de una solución etanólica 4mM de PAN y 800 $\mu\text{l}$  de agua ultrapura. La absorbancia del complejo formado se midió en un espectrómetro Shimadzu UV1800 a 560nm (máximo de absorción del complejo PAN-Cu (II)). El contenido de Cu en las muestras se determinó comparando los datos con una curva de calibración realizada previamente. Paralelamente, el contenido de  $\text{Cu}^{2+}$  liberado fue determinado mediante espectrometría de absorción atómica (Shimadzu AA-7000, Kioto, Japón) luego de una digestión ácida con 0,28M de ácido nítrico. El equipo utiliza una lámpara de cátodo hueco como fuente de radiación (límite de detección: 0,02mg/ml, usando controles de calidad internos según procedimientos estándar).

Adicionalmente se evaluó la liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  en la mejor condición de película protectora seleccionada utilizando una solución de fluido uterino simulado como modelo de DIU.

### **5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En las secciones siguientes se evalúan distintos aspectos relacionados con la interacción del Carv y TOH con el Cu. Primeramente, se estudian los efectos de la presencia de estos fitocompuestos antioxidantes sobre el efecto tóxico de los iones Cu (Sección 5.3.1). En segunda instancia se analiza el impacto de la adsorción del Carv y TOH sobre las propiedades superficiales de dicho metal (Sección 5.3.2) y sus consecuencias en el medio biológico. Finalmente se reporta el desarrollo de las nanopelículas de los fitocompuestos electropolimerizados sobre el Cu y la capacidad inhibitoria de la corrosión de dichas películas formadas bajo distintos métodos (potenciodinámico (Sección 5.3.3.1) y potencioestático (Sección 5.3.3.2)) así como el efecto sobre la biocompatibilidad del metal.

### **5.3.1. Estudio de la capacidad antioxidante de los fitocompuestos frente a extractos de Cu**

Se investigó el efecto de los productos de la degradación del Cu en medios biológicos sobre células CHO-K1 con el propósito de evaluar un posible efecto benéfico de los FF frente al daño inducido. Para ello se colocaron los extractos de Cu, obtenidos por inmersión de láminas de Cu en medio Ham F12 a 9, 12 y 24h (denominados Ex 9, Ex 12 y Ex 24, respectivamente), en combinación con distintas dosis de FF en los cultivos celulares y se incubaron por 24h en condiciones normales de cultivo. La viabilidad celular relativa al control de células (sin tratamiento) se estimó mediante el ensayo de reducción de MTT.

En las Fig. 5.1, 5.2 y 5.3 se observan los porcentajes de viabilidad celular obtenidos por MTT para los ensayos con los extractos de Cu combinados con distintas concentraciones de TOH. Los resultados muestran que el efecto citotóxico de los productos de degradación del Cu como agente oxidante se evidencia con los extractos de Cu obtenidos a 9, 12 y 24h, disminuyendo significativamente la viabilidad celular a un  $50,5\pm 1,5\%$ ,  $41,8\pm 1,2\%$  y  $27,4\pm 1,0\%$ , respectivamente ( $p\leq 0,001$ ) en concordancia con otros trabajos reportados [196,197]. Puede notarse también que el daño celular inducido por los extractos de Cu no logró revertirse con el agregado de TOH al medio de cultivo, como puede observarse en las Fig. 5.1 a 5.3, donde los porcentajes de viabilidad celular en los tratamientos combinados (extractos + TOH) resultaron similares al de los tratamientos con extractos de Cu.

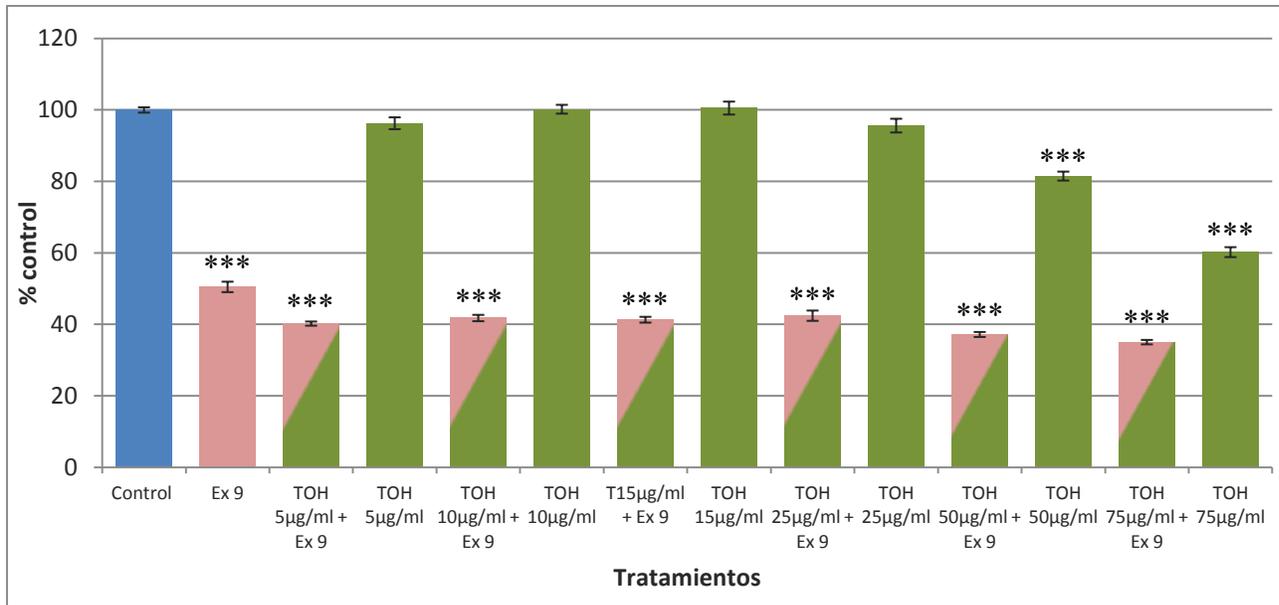


Fig. 5.1. Efecto de la exposición combinada de extracto de Cu 9h con distintas concentraciones de TOH en células CHO-K1 evaluado mediante MTT luego de 24h de exposición. \*\*\*,  $p \leq 0,001$ : diferencias significativas frente al control de células.

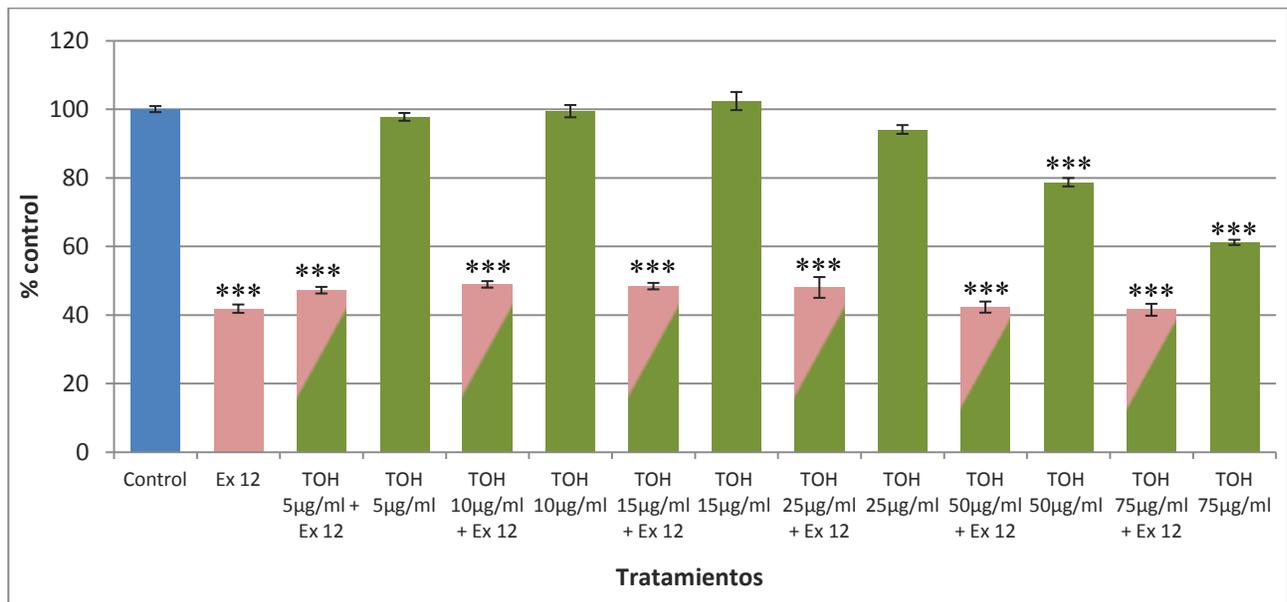


Fig. 5.2. Efecto de la exposición combinada de extracto de Cu 12h con distintas concentraciones de TOH en células CHO-K1 evaluado mediante MTT luego de 24h de exposición. \*\*\*,  $p \leq 0,001$ : diferencias significativas frente al control de células.

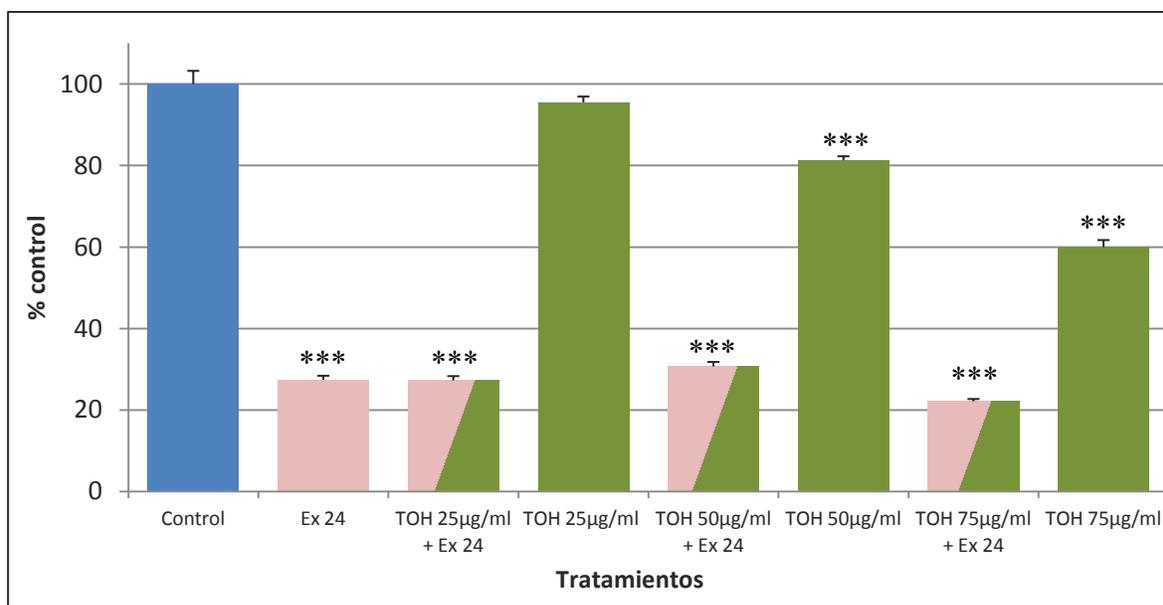


Fig. 5.3. Efecto de la exposición combinada de extracto de Cu 24h con distintas concentraciones de TOH en células CHO-K1 evaluado mediante MTT luego de 24h de exposición. \*\*\*,  $p \leq 0,001$ : diferencias significativas frente al control de células.

A diferencia de los resultados reportados en trabajos con compuestos antioxidantes fuertes, la ineffectividad del TOH para revertir la citotoxicidad inducida por los extractos de Cu podría deberse al menor efecto antioxidante comparado con ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, desferoxamina, manitol [73,116,198].

Teniendo en cuenta que ciertos compuestos antioxidantes administrados previamente a cultivos celulares, promueven la síntesis de enzimas antioxidantes endógenas como superóxido dimutasa, glutatión peroxidasa y catalasa logrando un precondicionamiento de las células frente a un posterior tratamiento de estrés oxidativo [109,199], se consideró la posibilidad de obtener una mejora mediante un tratamiento de precondicionamiento. Se evaluó entonces, la capacidad protectora celular de Carv y TOH mediante ensayos de precondicionamiento celular por 4 h con los FF. Los resultados obtenidos muestran que, tanto el Carv como el TOH no logran revertir el daño celular inducido por el extracto de Cu de 12 h, evidenciando un porcentaje de viabilidad similar entre los tratamientos sin precondicionamiento, los que fueron precondicionados y los Ex 12 (Fig. 5.4 y 5.5).

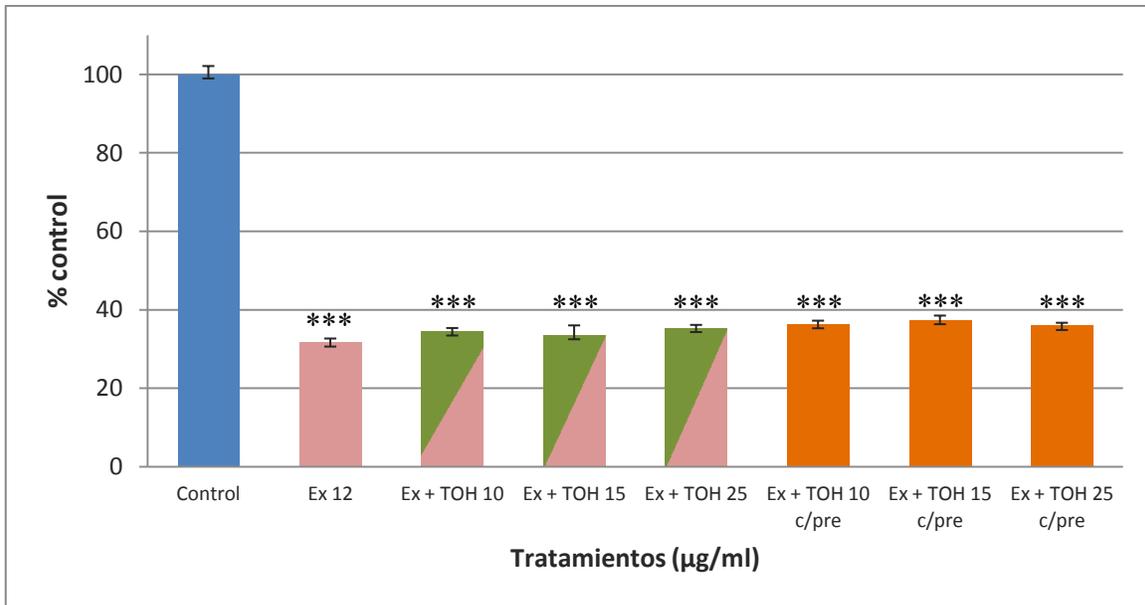


Fig. 5.4. Efecto de la exposición combinada de extracto de Cu 12h con distintas concentraciones de TOH en células CHO-K1 con preacondicionamiento con TOH de 4h, evaluado mediante MTT luego de 24h de exposición. \*\*\*,  $p \leq 0,001$ : diferencias significativas frente al control de células.

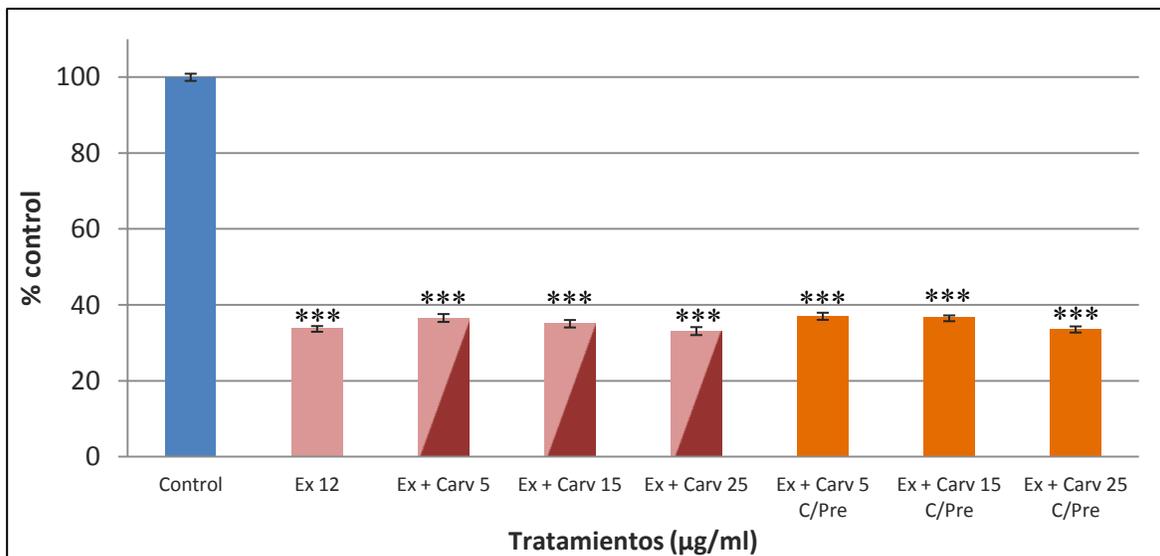


Fig. 5.5. Efecto de la exposición combinada de extracto de Cu 12h con distintas concentraciones de Carv en células CHO-K1 con preacondicionamiento con Carv de 4h, evaluado mediante MTT luego de 24h de exposición. \*\*\*,  $p \leq 0,001$ : diferencias significativas frente al control de células.

En el Apéndice del presente trabajo de tesis doctoral se pueden observar ensayos de viabilidad celular utilizando otros agentes oxidantes conocidos, como soluciones de  $\text{CuSO}_4$  ( $\text{Cu}^{2+}$ ),  $\text{FeCl}_3$  ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y tert-butilhidroperóxido (tBHP), en combinación con FF para evaluar la posible mejora de la viabilidad en células de la línea CHO-K1. De los mismos pudo concluirse que en forma similar a lo observado para los tratamientos con extractos de Cu, no se observan mejoras significativas de los tratamientos combinados frente a sus respectivos controles de agentes oxidantes. No obstante que el TOH y el Carv presentan buenas propiedades antioxidantes evaluadas en diversos sistemas oxidantes [73,114,116,198] en los modelos experimentales empleados en esta sección, ambos compuestos fenólicos carecen de actividad protectora celular.

### **5.3.2. Ensayos de adsorción de carvacrol y timol sobre Cu**

Con el objetivo de proteger la superficie del Cu de la corrosión y paralelamente disminuir el efecto citotóxico de los productos de degradación del mismo, se procedió a estudiar la posible adsorción de TOH y Carv sobre Cu mediante un proceso de inmersión durante 24 h en soluciones 0,01M de cada fitocompuesto. Luego del tratamiento se comprobó la posible adsorción de TOH y Carv mediante espectroscopía ATR-FTIR (Fig. 5.6) y XPS (Fig. 5.7).

Posteriormente se realizaron estudios sobre la capacidad de inhibición de la formación de óxidos por parte de los FF adsorbidos. Finalmente se investigó la posible mejora de la biocompatibilidad mediante el tratamiento de adsorción utilizando dos líneas celulares.

#### **5.3.2.1. Análisis superficial por ATR-FTIR y XPS**

Los espectros ATR-FTIR de Carv y TOH puro muestran contribuciones características atribuidas a  $\nu$ -OH, vibraciones de flexión de -OH y estructuras C-O a 3386, 1458 y  $1250\text{cm}^{-1}$  respectivamente, para Carv, y 3223, 1380y  $1244\text{cm}^{-1}$  para TOH [180], entre otras. Cuando se utilizaron muestras de Cu previamente sumergidas por 24h en la solución de Carv el espectro de adCarvCu mostró contribuciones correspondientes a fenoles y derivados fenólicos como los picos a  $3288\text{cm}^{-1}$  (vibración de flexión -OH) acompañado por un pico a 1457 (deformación en el plano de -OH),  $1277\text{cm}^{-1}$  (vibración de tensión de C-OH) y bandas a  $1132\text{cm}^{-1}$  y  $976\text{cm}^{-1}$  (vibración de tensión de C-O) atribuidos a la presencia de grupos -OH [144,166]. De manera similar, el espectro de adTOHCu presenta contribuciones distintivas del TOH puro con picos adicionales atribuibles a

estructuras cetónicas ( $1640\text{cm}^{-1}$ ). A diferencia de los espectros de las drogas en estado puro, se observan estructuras quinónicas a  $1649\text{cm}^{-1}$  [75,166] en los espectros de adCarvCu y adTOHCu. En conclusión, las moléculas de Carv y TOH se adsorben a la superficie de Cu y existe una oxidación parcial de los compuestos fenólicos a quinonas.

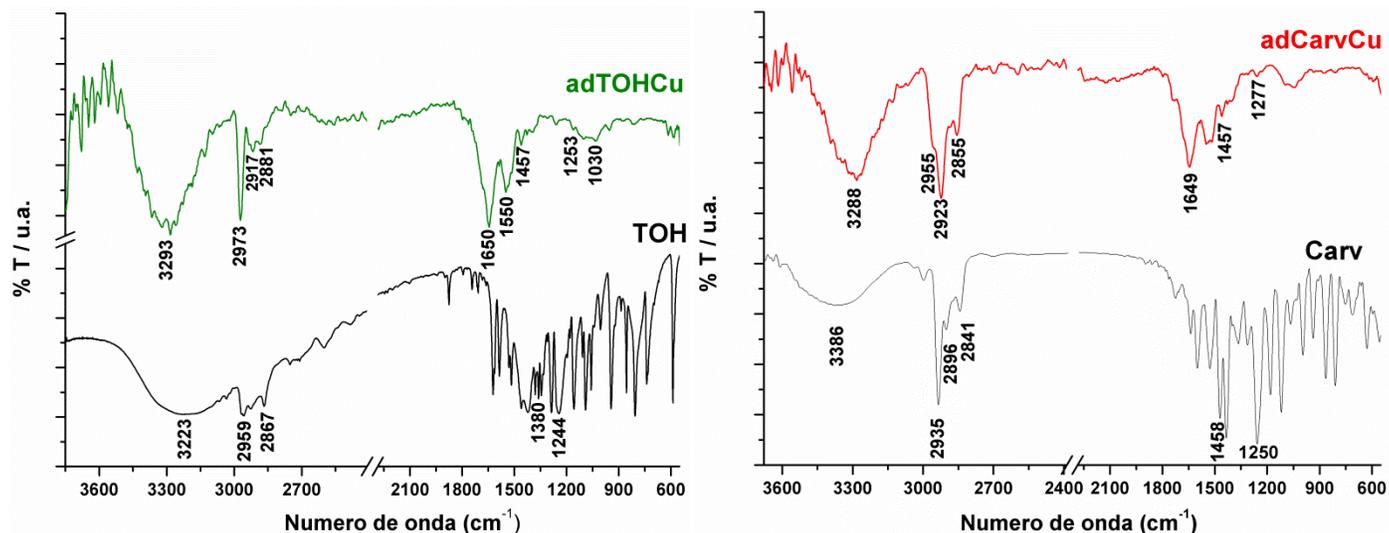


Fig. 5.6. Espectros ATR-FTIR de Carv adsorbido (adCarvCu), TOH adsorbido (adTOHCu) sobre Cu, comparados con las drogas puras.

Por otra parte, las Fig. 5.7A y B muestran el espectro XPS completo (survey) y la región correspondiente a Cu2p del control de Cu, adCarvCu y adTOHCu. En ellos se observan las bajas señales del espectro a altas energías (800-1350eV) en presencia de los FF sobre el Cu, probablemente debido a una baja capacitancia de la película adsorbida. La Tabla 5.1 muestra el porcentaje atómico superficial de C1s, O1s y Cu2p3/2 y el parámetro Auger calculado para el Cu en las muestras analizadas.

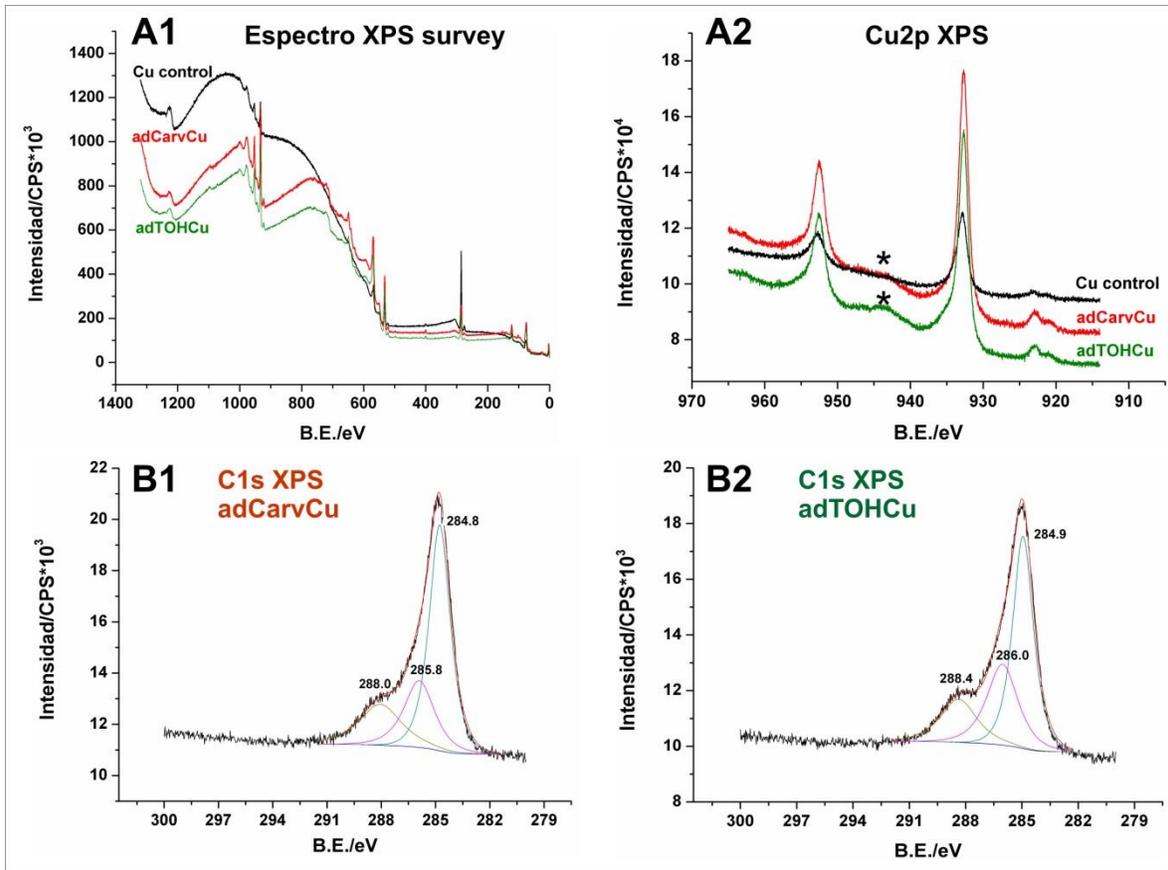


Fig. 5.7. Espectro XPS. A1) Espectro Survey del control de Cu, adCarvCu y adTOHCu. A2) Espectro Cu2p mostrando la contribución satélite “shake up” de  $\text{Cu}^{2+}$  (\*) en adCarvCu y adTOHCu. B1) Espectro C1s de adCarvCu; B2) Espectro C1s de adTOHCu.

Tabla 5.1: Composición superficial obtenida del análisis XPS.

|            | C 1s % | Cu 2p3/2 % | O 1s % | C/O | AP Cu    | O/Cu |
|------------|--------|------------|--------|-----|----------|------|
| Cu control | 80,51  | 5,04       | 13,01  | 6,2 | 1851,338 | 2,6  |
| adCarvCu   | 52,68  | 10,04      | 34,10  | 1,5 | 1850,269 | 3,4  |
| adTOHCu    | 52,39  | 9,67       | 34,77  | 1,5 | 1849,974 | 3,6  |

El parámetro Auger para el control de Cu y los tratamientos de adsorción de TOH y Carv se corresponde con el valor del Cu metálico reportado en la base de datos NIST. La Fig.

5.7A2 muestra un pico correspondiente al satélite shake up de  $\text{Cu}^{2+}$  relativamente aumentado, a energías de unión más altas que las características de  $\text{Cu}2p_{3/2}$ - $\text{Cu}2p_{1/2}$ , para ambos adCarvCu y adTOHCu. Esto indica la presencia conjunta de especies  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{1+}$ . Los espectros XPS (Tabla 5.1) evidencian una relación C/Cu mayor para el Cu control que para las drogas adsorbidas. La menor relación C/Cu en adCarvCu y adTOHCu puede explicarse por el reemplazo casi total del C adventicio original por el Carv y el TOH, indicando una fuerte interacción de los compuestos fenólicos con el sustrato. La relación C1s/O1s es similar para ambos tratamientos de adsorción y la señal de O1s de los mismos es mayor a la del control de Cu probablemente debido al depósito de moléculas oxidadas sobre la superficie de Cu. En los espectros C1s XPS (Fig. 5.7B1 y B2) de adCarvCu y adTOHCu se ajustaron tres componentes. La primera a 284,8eV (adCarvCu) y 284,9eV (adTOHCu) atribuida a uniones C-C y C-H [172,173,200,201]. La segunda a 285,8eV (adCarvCu) y 286,0eV (adTOHCu) podría asignarse a uniones C-O de fenoles (C(Ph)-O) [172,200–202]. Finalmente una tercer componente a 288,0eV (adCarvCu) y 288,4eV (adTOHCu) estaría asociada a uniones C=O de grupos carboxiquinona [172,200,202,203]. Estos datos concuerdan con los obtenidos por espectroscopía ATR-FTIR.

### 5.3.2.2. Ensayos electroquímicos de reducción de óxidos formados en adCarvCu y adTOHCu

Para estudiar el posible comportamiento inhibitorio de la corrosión del Cu por parte de los compuestos fenólicos adsorbidos, se realizaron estudios electroquímicos potenciodinámicos. Con ese propósito se sumergieron las muestras en medio de cultivo celular Ham F12 a 37°C a distintos tiempos, evaluándose luego la formación de óxido de Cu mediante barridos lineales de potencial desde el potencial a circuito abierto (PCA) en sentido catódico a 1mV/s. Las curvas registradas muestran (Fig. 5.8) la intensidad de corriente de reducción de óxido de Cu en función del potencial, obtenidas con muestras sin y con tratamientos con TOH. En la Fig. 5.8B se observa un pico de reducción de especies oxidadas sobre el Cu sin tratamiento, formadas durante la inmersión de 6 h en Ham F12. Dicho pico se hace más notorio después de 24 h de inmersión (Fig. 5.8C). Para las muestras de adTOHCu inmersas 24 h en medio Ham F12 la reducción de los compuestos superficiales formados comienza a ser visible pero con una intensidad de corriente menor que para las muestras de Cu control.

Adicionalmente, para estudiar la influencia de la presencia del TOH en el electrolito, se ensayaron las muestras tratadas con TOH (adTOHCu) que fueron sumergidas luego en soluciones de Ham F12 con y sin TOH 25 $\mu$ g/ml durante 24h (adTOHCu-24hTOH). Las muestras adTOHCu-24hTOH presentaron un registro con menor intensidad de corriente que el obtenido en ausencia de TOH en el medio (Fig. 5.8D), indicando una mayor capacidad inhibitoria cuando el TOH estaba en la solución, asegurando así la adsorción de nuevas moléculas en los sitios donde se producía desorción.

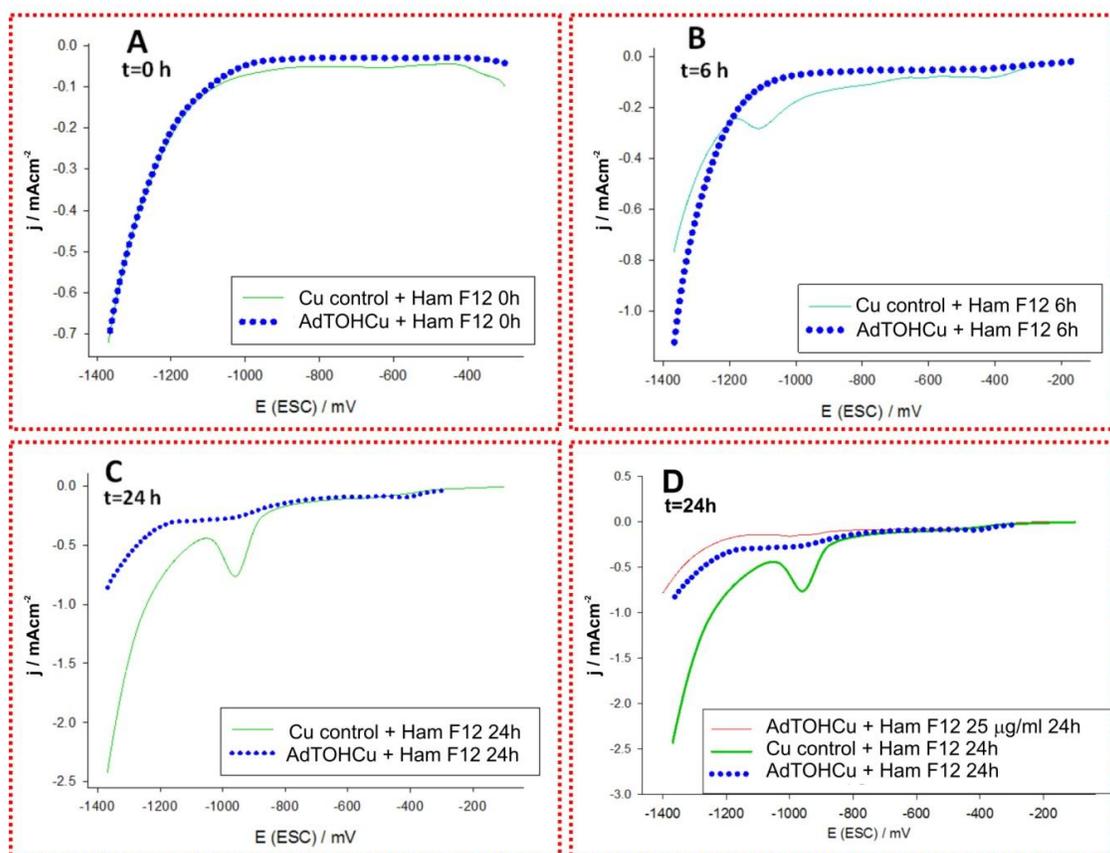


Fig. 5.8. Barridos de potencial en sentido catódico (desde PCA hasta -1400mV, 1mV/s) realizados con electrodos de Cu con y sin tratamiento de TOH adsorbido seguidos de diferentes tiempos de inmersión. Electrolito: medio Ham F12 37°C.

En la Tabla 5.2 se presentan las intensidades de corriente del pico de reducción ( $i_P$ ) de óxidos de Cu obtenidos en los tratamientos con TOH adsorbido.

Tabla 5.2: Intensidad de corriente del pico de reducción luego de los distintos tratamientos de la Fig. 5.8D.

| Tratamiento                                    | $i_P$ ( $\text{mAcm}^{-2}$ ) |
|--|------------------------------|
| Cu control                                     | -0,76                        |
| adTOHCu + Ham F12 24 h                         | -0,29                        |
| adTOHCu + Ham F12 TOH 25 $\mu\text{g/ml}$ 24 h | -0,15                        |

El análisis de la  $i_P$  (Tabla 5.2), revela un descenso importante de la densidad de corriente de reducción de óxidos para adTOHCu frente al control de Cu. Esto indica que el tratamiento de inmersión del electrodo de Cu en TOH 0,01M por 24 h disminuye marcadamente la formación de productos de corrosión sobre el mismo, en condiciones biológicas simuladas. Las muestras de adTOHCu + Ham F12 conteniendo 25 $\mu\text{g/ml}$  de TOH no evidenciaron pico de reducción de Cu, apoyando la hipótesis del reemplazo del TOH desorbido de la superficie del electrodo por el TOH presente en el electrolito. Asimismo, la corriente en la región de evolución de hidrógeno decreció notoriamente, evidenciando la presencia de adTOH en la superficie.

Experiencias similares se repitieron con Carv. En la Fig. 5.9 se muestran los barridos catódicos de electrodos con adsorción de Carv seguido de la inmersión en medio Ham F12 por 24h. A modo de comparación se graficó el registro de adTOHCu notándose un mejor efecto inhibitor en el caso del adCarvCu.

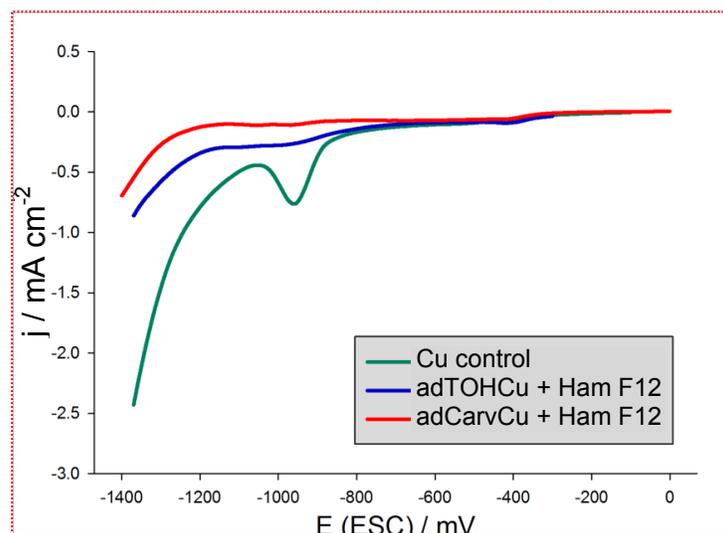


Fig. 5.9. Barridos de potencial en sentido catódico (desde PCA a -1400mV, 1mV/s) realizados con electrodos de Cu con y sin tratamiento de TOH y Carv adsorbido seguidos de 24h de inmersión. Electrolito: medio Ham F12 37°C.

Los ensayos electroquímicos de reducción de óxido de Cu muestran que el tratamiento de adsorción de TOH y Carv sobre Cu inhibe la corrosión del Cu en medio biológico Ham F12. Estos resultados concuerdan con los reportados previamente en relación con la inhibición de la formación de óxidos de Cu con adsorción de pterina y 6-mercaptopurina [68].

### 5.3.2.3. Ensayos de viabilidad celular en función de la distancia al metal

Teniendo en cuenta que la adsorción de TOH y Carv producen una disminución de la formación de óxido superficial y, considerando que dicha disminución podría mejorar la biocompatibilidad del Cu, seguidamente se estudió el efecto que producía la presencia o ausencia de las moléculas de compuestos fenólicos adsorbidos sobre la viabilidad celular.

Con el fin de evaluar la biocompatibilidad de las muestras de Cu con TOH y Carv adsorbidos, se crecieron células de la línea CHO-K1 y MC3T3-E1 por 24h en condiciones normales de cultivo y en presencia de las muestras de Cu tratadas y sin tratar. Los cultivos obtenidos fueron teñidos con naranja de acridina y examinados inmediatamente por microscopio de epifluorescencia. Se analizó el porcentaje de área cubierta por células en función de la distancia a la muestra (zona A < 10mm y zona B  $\geq$  10mm, ver esquema en Fig. 5.10), respecto al control sin disco.

Las Fig. 5.10 y 5.11 muestran los resultados de la viabilidad celular obtenidos. A pesar del efecto inhibitorio observado en las experiencias electroquímicas, las experiencias biológicas mostraron (Fig. 5.10) que en la zona aledaña a adTOHCu, adCarvCu el porcentaje de cobertura es significativamente menor al respectivo control sin metal, en los ensayos con la línea celular CHO-K1. Esto indica que las células fueron afectadas severamente por los productos de degradación tanto de las muestras de Cu control ( $25,1 \pm 2,6\%$ ) como en aquellas con TOH y Carv adsorbidos ( $19,4 \pm 4,2\%$  y  $19,4 \pm 2,5\%$ , respectivamente). Puede notarse también que a mayor distancia del material (Región B), la viabilidad celular aumenta en todos los casos ( $55,1 \pm 2,1\%$  para Cu sin tratar,  $59,5 \pm 3,3\%$  para adTOHCu y  $55,2 \pm 3,1\%$  para adCarvCu).

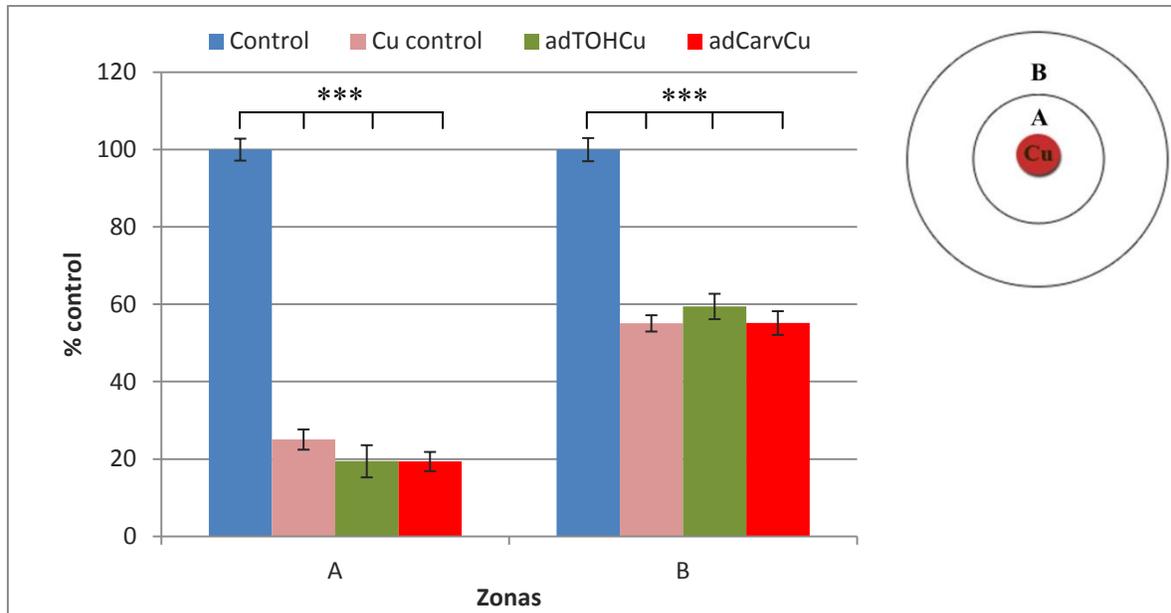


Fig.5.10. Viabilidad de células de la línea CHO-K1 luego de 24h de cultivo en presencia de Cu, adTOHCu y adCarvCu. Se distinguen dos zonas: A  $< 10\text{mm}$  y B  $\geq 10\text{mm}$  de distancia del disco metálico. Se observan diferencias significativas (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ ) entre el control de células y ambos tratamientos.

Con el objeto de investigar si el tratamiento afectaba de manera similar a las células de distintas líneas celulares, se realizaron ensayos con la línea MC3T3-E1. Los resultados obtenidos (Fig. 5.11) mostraron un menor efecto sobre la viabilidad celular luego de aplicar los tratamientos de adsorción: adCarvCu ( $51,7 \pm 4,2\%$ ,  $p \leq 0,001$ ) y adTOHCu ( $29,9 \pm 3,2\%$ ,  $p \leq 0,05$ ) en la zona cercana a la muestra (Zona A) con respecto al Cu sin tratamiento ( $24,2 \pm 3,1\%$ ). Puede notarse que en la zona más alejada del material no se observan diferencias significativas frente al control de Cu. El aumento de la viabilidad celular en los tratamientos de adCarvCu concuerda con la menor carga de óxidos de dichas muestras frente al adTOHCu, observados por las técnicas electroquímicas de la Fig. 5.9. Sin embargo, teniendo en cuenta que, en las zonas aledañas al Cu, los porcentajes de viabilidad celular son significativamente menores ( $p \leq 0,001$ ) que el control de células, es necesario generar otro tipo de recubrimiento con mayor efecto protector de la corrosión del Cu que mejore la biocompatibilidad.

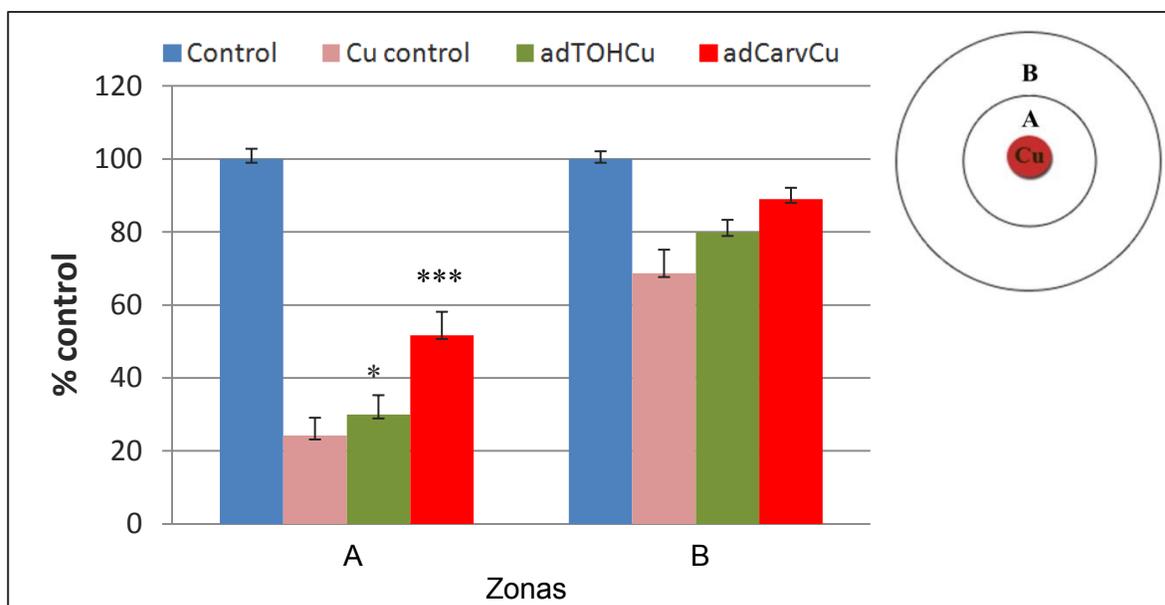


Fig. 5.11. Viabilidad de células de la línea MC3T3-E1 luego de 24h de cultivo en presencia de Cu, adTOHCu y adCarvCu. Se distinguen dos zonas: A <math><10\text{mm}</math> y B p \leq 0,001; \*,  $p \leq 0,05$ : diferencias significativas frente al Cu control.

Es importante resaltar que la respuesta celular observada en el caso de las dos líneas celulares utilizadas mostró diferencias significativas, por lo que se evidencia la importancia de considerar distintos modelos para el análisis de biocompatibilidad, debido a la diferente sensibilidad de respuesta en cada uno de ellos.

### **5.3.3. Formación de electropolímeros de carvacrol y timol sobre Cu y su impacto biológico**

Frente a la baja eficacia del tratamiento de adsorción de FF sobre el Cu, se buscaron nuevas estrategias para lograr mitigar el efecto sobre células aledañas y mejorar la biocompatibilidad. Con el propósito de formar electropolímeros de FF sobre la superficie de Cu se ensayaron distintos programas de perturbación de la interfaz electroquímica hasta encontrar la combinación adecuada. Para ello se tuvo en cuenta la información reportada sobre técnicas electroquímicas potenciodinámicas y potenciostáticas para electropolimerizar derivados de fenoles. En este capítulo se describen distintos programas de perturbación que se aplicaron con el propósito de obtener películas poliméricas tanto de la forma potenciodinámica (Sección 5.3.3.1) como potenciostática (Sección 5.3.3.2) con el

fin de poder seleccionar la más eficiente evaluando tanto la corrosión como su impacto biológico.

### **5.3.3.1. Electropolimerización potenciodinámica de carvacrol y timol sobre Cu**

En esta sección se propone estudiar, en forma comparativa, la electropolimerización potenciodinámica del Carv y TOH y su posible efecto inhibitorio sobre la corrosión del Cu. Se analizaron las características superficiales de las películas por microscopías AFM y SEM y se estudió su composición por ATR-FTIR. Posteriormente se evaluó su comportamiento inhibitorio de la corrosión mediante barridos lineales de potencial y voltametría cíclica en soluciones conteniendo cloruros. Finalmente se testeó la liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  utilizando el método colorimétrico PAN y la biocompatibilidad de las muestras tratadas a través de ensayos de viabilidad celular por tinción con naranja de acridina.

#### **5.3.3.1.A. Formación de películas poliméricas de carvacrol y timol sobre Cu**

Tal como se describió en el Capítulo 4, se utilizó un electrolito hidroalcohólico 70:30 agua/etanol. Se realizaron barridos lineales de potencial entre 0,30V a 1,00V (o hasta llegar  $30\text{mAcm}^{-2}$ ) utilizando el electrolito control (en presencia y ausencia de etanol), presentados en la Fig. 5.12. Los registros muestran, en ausencia de etanol (0,3M NaOH en agua) durante el 1º y 2º ciclos, que el incremento de la densidad de corriente ocurre a potenciales más anódicos que 0,7V, similar a lo reportado en otros trabajos [172,201], atribuibles a la oxidación del Cu. En presencia de etanol (0,3M NaOH 70/30 agua/etanol) la densidad de corriente aumenta a 0,40V. Dicho aumento puede ser asignado a la oxidación de etanol en la superficie de Cu, la cual llega a un máximo a potenciales mayores a 0,80V (no mostrado), en concordancia con otros trabajos reportados [84,169–171].

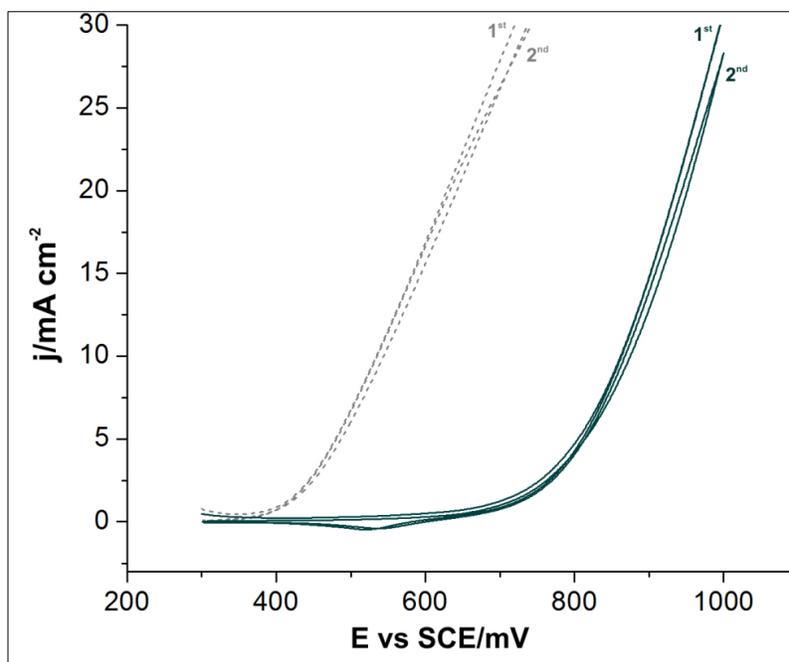


Fig. 5.12. Primer y Segundo ciclo voltamperométrico de electrodos de Cu en soluciones control: (-----) 0,3M NaOH 70/30 agua/etanol y (——) 0,3M NaOH sin etanol.

En la Fig.5.13 se observan los ciclos 1º y 2º obtenidos con el agregado de 0,1M de Carv (A) y 0,1M de TOH (B). Tal como se analizó en la sección 4.3.4.1, en presencia de Carv se distingue un pico anódico que comienza cerca de 0,30V con densidades de corriente mayores a las observadas en el control de Cu en 70:30 agua/etanol a ese mismo potencial (Fig. 5.12). Esto indica que la oxidación de Carv y del TOH sobre Cu comienza a potenciales menores que los de la oxidación de etanol. Se puede interpretar que los productos de oxidación de ambos FF quedan en la superficie del electrodo bloqueando los sitios activos. Al finalizar el tratamiento en presencia de Carv, la superficie de los electrodos queda recubierta con una película homogénea que, tal como muestran los espectros ATR-FTIR y las observaciones por microscopía óptica y SEM, que se comentarán en secciones posteriores, corresponde a una película polimérica transparente y homogénea que en adelante nombraremos polyCarv (electropolímero de Carv) (Fig. 5.14).

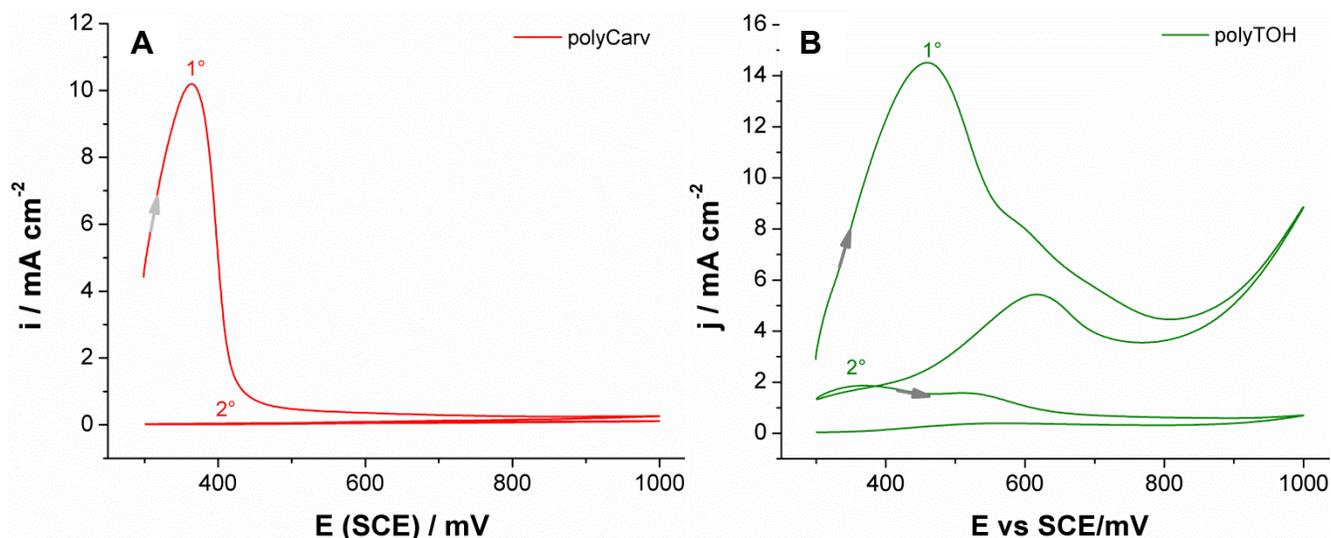
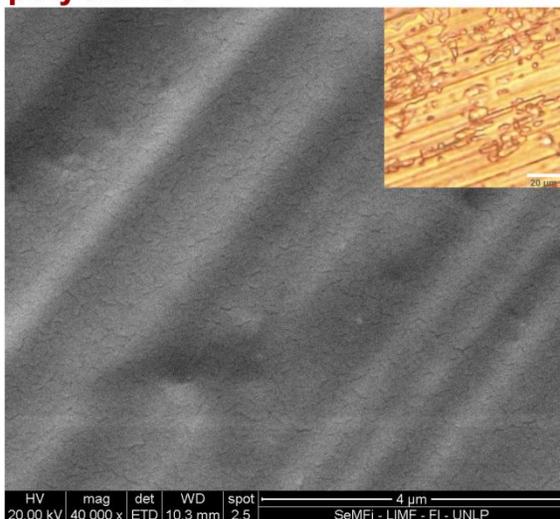


Fig. 5.13. Primer y Segundo ciclo voltamperométrico de electrodos de Cu en (A) 0,1M Carv, o (B) 0,1M TOH en 0,3M NaOH 70/30 agua/etanol. Las flechas indican sentido del barrido.

Al contrario, las observaciones por microscopías óptica y SEM muestran que la película resultante de polyTOHCu (electropolímero de TOH) posee una coloración amarronada y resulta no homogénea (Fig. 5.14) y con grietas, detectándose estructuras tridimensionales similares a las reportadas para otros polifenoles [176].

polyCarvCu



polyTOHCu

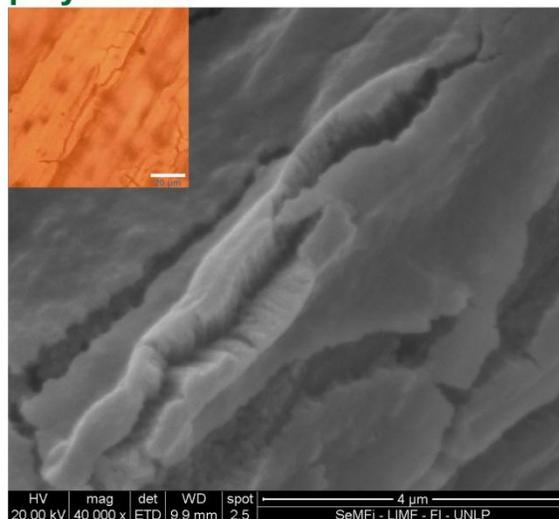


Fig. 5.14. Microscopía SEM de polyCarvCu y polyTOHCu obtenidos por voltametría cíclica luego de 39 ciclos. En los recuadros se muestran las películas observadas por microscopía óptica.

### 5.3.3.1.B. Microscopía AFM de las películas de polyCarv y polyTOH

Las imágenes de microscopía AFM (Fig. 5.15) muestran la morfología de la superficie de polyCarvCu y polyTOHCu luego de la voltametría cíclica (39 ciclos). Se observa una superficie de Cu totalmente cubierta, compacta y nano-globular. Los análisis de perfil de las imágenes de AFM evidencian glóbulos pequeños menores a 5nm de altura para el polyCarvCu, mientras que en el caso de polyTOHCu los glóbulos de aproximadamente 35nm forman una estructura tipo coliflor previamente reportadas por Martins *et al.* en polipirrol sobre hierro [204]. Los parámetros de rugosidad incluidos en la Fig.5.15 (Ra, Rq y Rmax) confirman una mayor rugosidad para polyTOHCu.

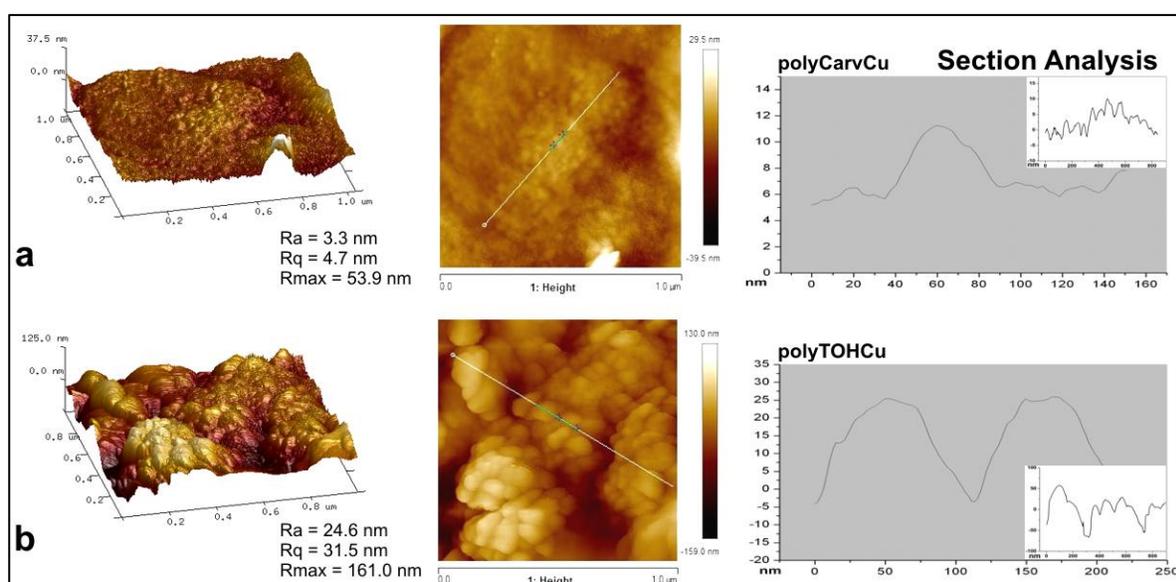


Fig. 5.15. Imágenes de microscopía AFM y parámetros de rugosidad correspondientes a polyCarvCu (a) y polyTOHCu (b). A la izquierda se observan los análisis de perfil.

### 5.3.3.1.C. Respuesta electroquímica de las películas de polyCarv y polyTOH sobre Cu en solución de cloruros

Con el objeto de investigar la estabilidad de las películas de polyCarv y polyTOH en soluciones conteniendo iones cloruro en concentraciones similares a la biológica, se realizaron estudios electroquímicos en soluciones de 0,136M KCl.

### *Registros de potencial a circuito abierto*

Se registró el potencial a circuito abierto en 0,136M KCl para el Cu control y recubierto con películas de polyCarv y polyTOH obtenidas por voltametría cíclica (Tabla 5.3). Los registros muestran una evolución similar del PCA para las superficies de Cu con una u otra película polimérica. Sin embargo, frente al control de Cu, dichos valores presentaron un corrimiento anódico de aproximadamente 70mV.

*Tabla 5.3. Potenciales a circuito abierto para polyCarv, polyTOH y el control de Cu en función del tiempo de inmersión en 0,136M KCl (5min, 80min, 200min).*

|                   | <b>PCA<sub>(5min)</sub>/mV</b> | <b>PCA<sub>(80min)</sub>/mV</b> | <b>PCA<sub>(200min)</sub>/mV</b> |
|-------------------|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| <b>polyCarv</b>   | -107,6 ± 0,1                   | -107,6 ± 30,4                   | -116,1 ± 22,9                    |
| <b>polyTOH</b>    | -112,3 ± 0,4                   | -109,1 ± 24,8                   | -111,7 ± 9,5                     |
| <b>Cu control</b> | -171,9 ± 21,1                  | -203,9 ± 6,8                    | -205,9 ± 3,2                     |

### *Curvas de polarización anódica*

Para evaluar las características inhibitorias de la corrosión del Cu por parte de las películas de polyCarv y polyTOH formadas por voltametría cíclica, también se registraron curvas de polarización anódica en soluciones 0,136M KCl desde el valor de PCA hasta 0,30V (Fig. 5.16). En los registros se puede observar que a -0,04V la corriente asciende abruptamente en el electrodo de Cu control. Para los electrodos recubiertos con la película polimérica, a potenciales mayores a 0,00V, la densidad de corriente registrada utilizando polyCarvCu fue menor que la obtenida para polyTOHCu, demostrando que en soluciones conteniendo cloruros la película de polyCarv ejerce una protección más efectiva que la de polyTOH.

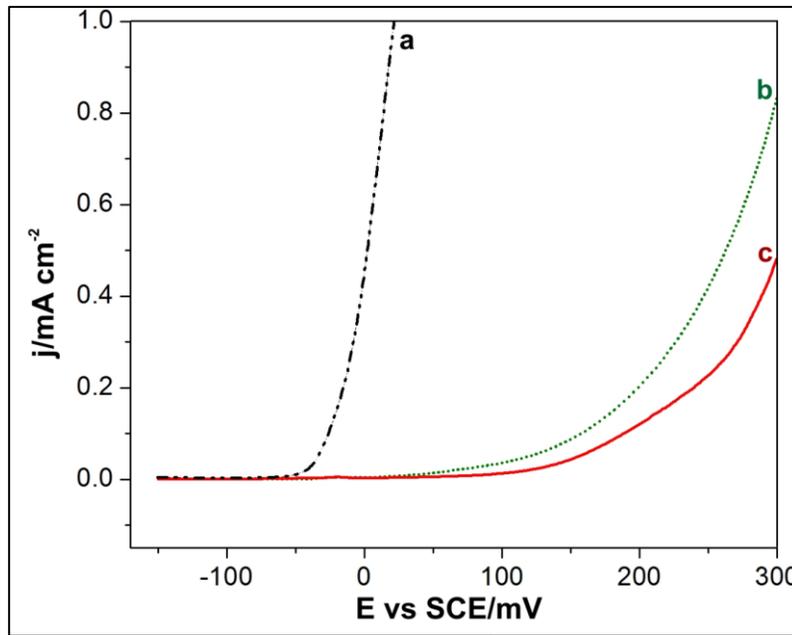


Fig. 5.16. Curvas de polarización anódica realizadas a 1mV/s en 0,136M KCl para el control de Cu (a), polyTOHCu (b) y polyCarvCu (c).

Considerando los registros de los barridos lineales en 0,136M KCl se calcularon los porcentajes de eficiencia de inhibición de la corrosión (EI%) utilizando la siguiente fórmula:

$$EI\% = \frac{i^0 - i}{i^0} \times 100$$

donde  $i^0$  es la densidad de corriente registrada para el control de Cu e  $i$ , la densidad de corriente registrada para polyCarvCu o polyTOHCu a 0,10V, 0,20V y 0,30V. Los datos se presentan en la Tabla 5.4. En presencia de películas de electropolímeros sobre Cu se obtienen altos valores de EI%: mayores a 95% para polyCarv y mayores a 89% para polyTOH a 0,30V, aumentando la eficiencia a potenciales menores (99,7% y 98,4% respectivamente para 0,10V).

Tabla 5.4. Eficiencia de inhibición de la corrosión (EI%) a 0,10V, 0,20V, 0,30V registradas para polyCarv y polyTOH.

| Electrodo | EI <sub>(0,10V)</sub> / % | EI <sub>(0,20V)</sub> / % | EI <sub>(0,30V)</sub> / % |
|-----------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| polyCarv  | 99,7 ± 0,2                | 98,6 ± 1,1                | 95,7 ± 1,5                |
| polyTOH   | 98,4 ± 0,6                | 95,7 ± 1,3                | 89,4 ± 1,8                |

### Comparación de la respuesta potenciodinámica de Cu recubierto con películas de polyCarv y polyTOH

La respuesta electroquímica de polyCarvCu y polyTOHCu fue evaluada además, mediante voltametría cíclica entre PCA y 0,07V en 0,136M KCl. En la Fig.5.17 se observa que la densidad de corriente en el primer ciclo para polyTOHCu es baja, pero a medida que se incrementa el número de ciclos se comienza a distinguir un pico a 0,025V. La morfología de la curva se vuelve similar a la del Cu sin recubrimiento indicando que la película de polyTOH es más lábil que la de polyCarv. Consecuentemente, la pérdida de protección por la película de polyTOH permite la oxidación del Cu probablemente en los sitios con cobertura deficiente. En contraste, la densidad de corriente en el caso de polyCarvCu es menor a  $1\mu\text{A}/\text{cm}^2$  (ver detalle en Fig. 5.17) confirmando una alta estabilidad y capacidad inhibitoria de la corrosión del Cu.

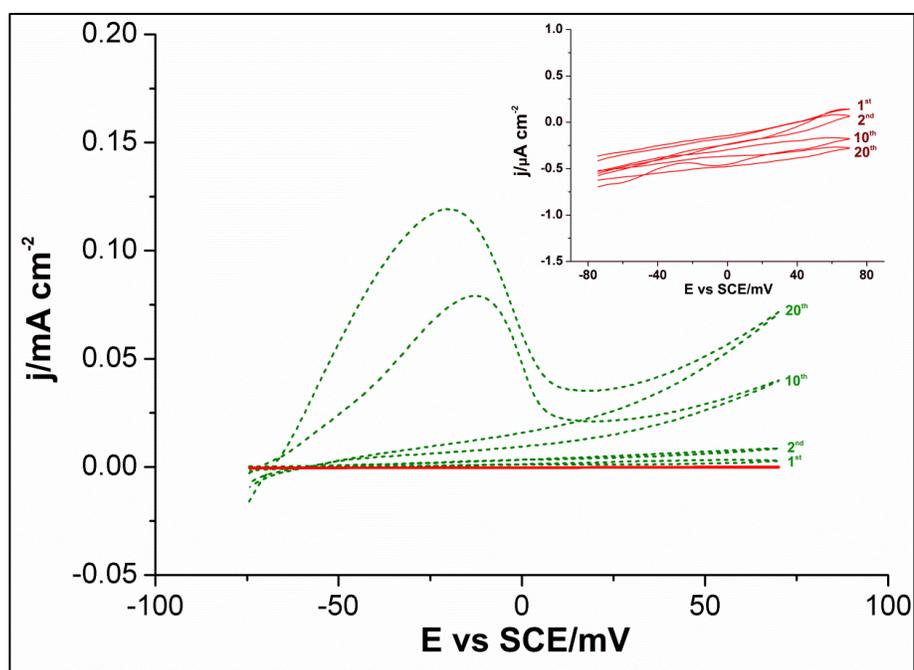


Fig. 5.17. Ciclos voltamperométricos (1°, 2°, 10° y 20°) registrados para polyCarvCu (—) y polyTOHCu (---) entre PCA y 0,07V en 0,136M KCl. En el recuadro se observa el detalle del registro de polyCarvCu.

#### 5.3.3.1.D. Medidas de liberación de iones $\text{Cu}^{2+}$

Para evaluar el desempeño de las películas como inhibitorias de la liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$ , se llevaron a cabo ensayos de inmersión de las muestras en 3ml de una solución de

0,136M KCl a 37°C por 1, 3 y 6 días. La concentración de iones  $\text{Cu}^{2+}$  en las soluciones resultantes se midieron mediante el ensayo colorimétrico de PAN, descrito en la sección 5.2.3.4. Las medidas de liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  representadas en la Fig. 5.18 están en concordancia con el comportamiento electroquímico de polyCarvCu, polyTOHCu y el control de Cu reportados en las secciones previas. Se observa que la concentración de iones  $\text{Cu}^{2+}$  aumenta con el tiempo de inmersión en KCl llegando a valores relativamente altos ( $132 \pm 30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) para el Cu sin recubrimiento al 6º día, mientras que la mejor protección es obtenida con la película de polyCarv ( $14,6 \pm 0,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Se observa, además, que los tratamientos con Carv son más efectivos que los obtenidos con TOH ( $31 \pm 3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para TOH, a igual tiempo de exposición). También pudo constatar que a mayor número de ciclos mayor es la inhibición de la corrosión del Cu ( $33 \pm 8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , para 1 ciclo y  $14,6 \pm 0,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para 39 ciclos en el caso de polyCarv después de 6 días de exposición).

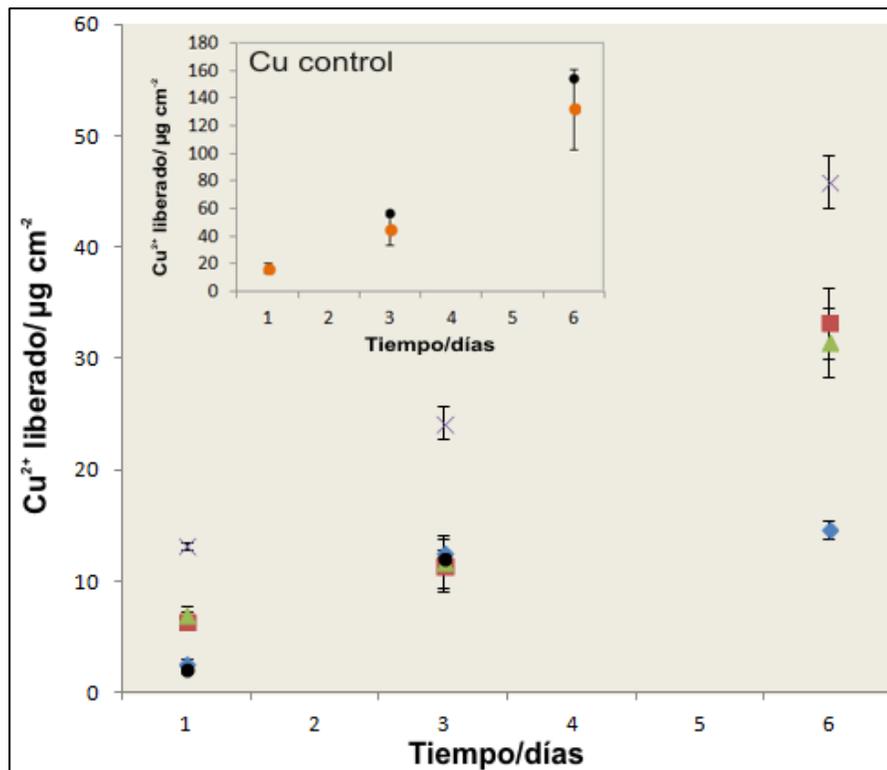


Fig. 5.18. Medidas de liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  de muestras de Cu con y sin película luego de 1, 3 y 6 días de inmersión en 0,136M KCl, obtenidas mediante ensayo colorimétrico (PAN). (♦) polyCarvCu 1 ciclo; (◆) polyCarvCu 39 ciclos; (×) polyTOHCu 1 ciclo; (▲) polyTOHCu 39 ciclos. Recuadro: Liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  del Cu control (•). Se incluyen valores obtenidos por espectroscopía de absorción atómica (\*) correspondientes al control de Cu en el gráfico principal y en el recuadro.

### 5.3.3.1.E. Espectroscopía ATR-FTIR de las películas poliméricas de polyCarv y polyTOH obtenidas sobre Cu

En la Tabla 5.5 se detallan los espectros ATR-FTIR de polyTOH y polyCarv formados sobre Cu obtenidos mediante voltametría cíclica y las asignaciones de los picos con sus correspondientes referencias bibliográficas. Tal como se analizó en la sección 4.3.5.1 se detectaron picos característicos de fenoles polisustituídos que corresponden a estados polymerizados de los FF para ambas películas, picos asignados a estructuras cetónicas y bandas correspondientes a uniones éter que denotan la oxidación de TOH y Carv durante el proceso de electropolimerización. El espectro de polyTOHCu presenta picos asignados a grupos  $-OH$ , ausente en polyCarvCu atribuibles a moléculas de  $H_2O$ , monómeros, oligómeros o quinonas confinadas en la matriz polimérica [165,179,205–208].

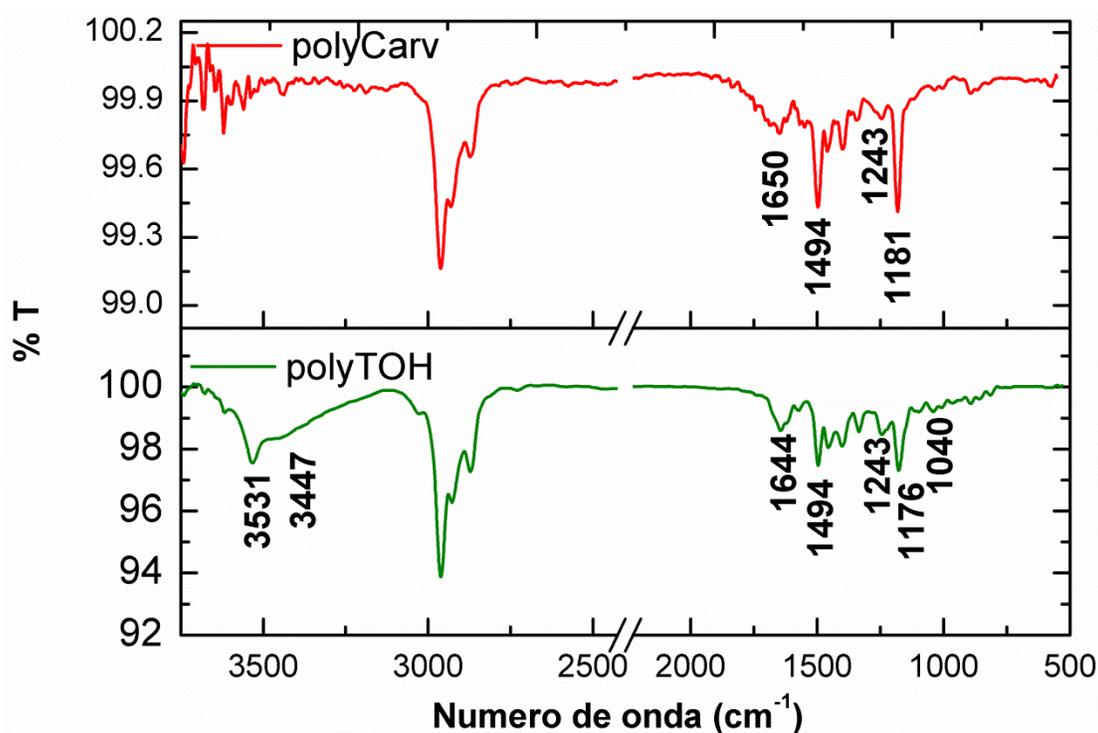


Fig. 5.19. Espectros ATR-FTIR de polyCarvCu y polyTOHCu realizados por voltametría cíclica (39 ciclos).

Tabla 5.5. Números de onda y asignaciones (según bibliografía) para espectros ATR-FTIR de polyCarvCu y polyTOHCu obtenidos por voltamperometría cíclica.

| Asignaciones  | Números de onda observados (cm <sup>-1</sup> ) |          | Números de onda de asignaciones de la literatura (cm <sup>-1</sup> ) |
|---|--|----------|--|
|   | polyTOH  | polyCarv |  |
| v -OH (sin uniones puente hidrógeno) [165,205,207-209]                | 3531   | -        | 3522 [205]; 3535 [165]; 3525 [207,209]; 3524 [208]                   |
| v -OH (con uniones puente hidrógeno) [205,207-209]; v -OH...C=O [165] | 3447   | -        | 3361 [205]; 3448-3460 [165,207,209]; 3366 [208]                      |
| v=CH de anillo fenólico polisustituido [144,159,210]                  | 3027   | -        | 3030 [144,159,210]   |
| v <sub>as</sub> -CH3 [211,212]  | 2962   | 2961     | 2962 [211]; 2966 [212]   |
| v <sub>as</sub> -CH2 [211]  | 2927   | 2930     | 2922-2940 [211]  |
| v <sub>s</sub> -CH3 [211,212]   | 2871   | 2870     | 2872 [211]; 2871 [212]   |
| -C=O sin uniones puente hidrógeno [209]                               | 1668   | -        | 1680 [209]   |
| v -C=O [75,166,168,209,213]; v -C=C- [214]                            | 1640   | 1650     | 1654 [209]; 1653 [168]; 1641 [214]; 1648 [213]; 1640-1660 [75,166]   |
| v-C=C- de anillo fenólico polisustituido [159,168,212]*               | 1616   | -        | 1612 [212]; 1610 [159,168]   |
| v -C=C- [210]   | 1573   | -        | 1575 [210]   |
| v-C=C- de anillo fenólico [159,168]                                   | -  | 1550     | 1552 [159]; 1540-1560 [168]  |
| Estiramiento de C=C en anillo aromático [211,213,215]                 | 1494   | 1497     | 1497 [211]; 1470 [215]; 1492 [213]                                   |
| v-C=C- de anillo aromático [211,215,216]                              | 1455   | 1459     | 1466 [211]; 1470 [215]; 1461 [216]                                   |
| v-C=C- en 1,2,4 anillo fenólico trisustituido [168]                   | 1401   | 1400     | 1400 [168]   |
| v <sub>s</sub> isopropilo [144]                                       | 1335   | 1343     | 1350-1380 [144]  |
| v C-O-C [167]   | 1243   | 1244     | 1247 [167]   |
| ρ=C-H de anillo fenólico [168]  | 1221   | -        | 1215 [168]   |
| v C-O-C [167,168,213,215]; v C-O-C de fenol p-sustituido [212]        | 1176   | 1180     | 1178 [212]; 1190 [168,213]; 1188 [215]; 1184 [167]                   |
| C-O-C de fenol-formaldehído alifático [159]                           | 1110   | 1119     | 1116 [159]   |
| v -C-O [159,211]  | 1040   | -        | 1058 [159]; 1046 [211]   |
| Estiramiento de C-O-C [167]   | -  | 1036     | 1036 [167]   |
| -OH alifático [159]; ρ=C-H del anillo fenólico [168]                  | 1008   | 1006     | 1000-1010 [159]; 1010 [168]  |
| Difenil cetona [168]  | 930  | -        | 925 [168]  |
| v =C-H de anillo fenólico [217]                                       | 893  | 893      | 892 [217]  |

v<sub>as</sub> = vibración de tensión asimétrica

v<sub>s</sub> = vibración de tensión simétrica

ρ = vibración en plano

\* = aromático p-sustituido [212]; v -C=C- de anillo fenólico 1,2, 4 trisustituido [168]; v -C=C- de 2,4,6 trihidroximetilfenol [159]

### 5.3.3.1.F. Análisis XPS de las películas poliméricas sobre Cu

Con el objeto de estudiar los tipos de enlaces orgánicos y las propiedades bloqueantes de la superficie metálica por parte de los recubrimientos poliméricos, se realizaron análisis XPS de las muestras de Cu con películas. Las Fig. 5.20A y B muestran el espectro XPS completo (survey) y la región correspondiente a Cu2p del control de Cu y de las películas polyCarvCu y polyTOHCu. En ellos se observan las bajas señales del survey y de Cu en presencia de dichos recubrimientos, probablemente debido a la baja capacitancia de los polímeros. La Tabla 5.6 muestra el porcentaje atómico superficial de C1s, O1s y Cu2p3/2 y el parámetro Auger calculado para el Cu en las muestras analizadas.

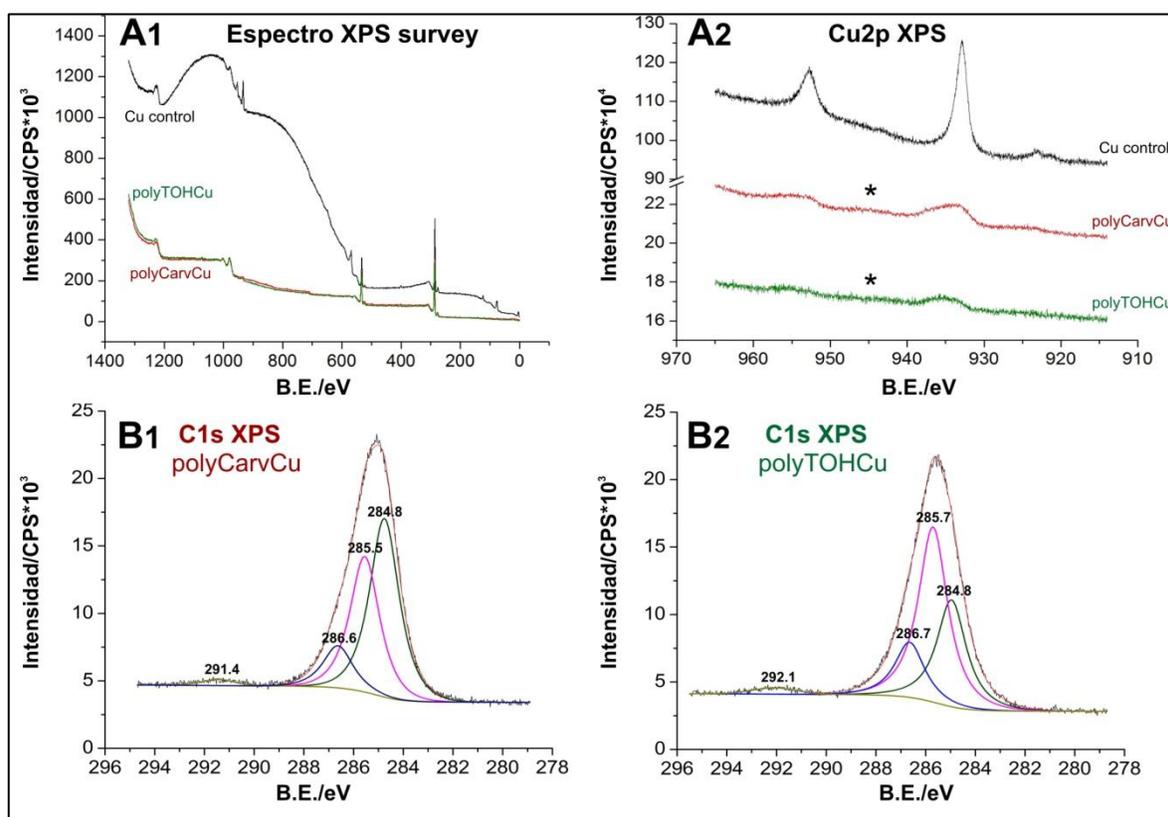


Fig. 5.20. Espectro XPS. A1) Espectro Survey del control de Cu, polyCarvCu y polyTOHCu. A2) Espectro Cu2p mostrando la contribución satélite "shake up" de Cu<sup>2+</sup> (\*) B1) Espectro C1s de polyCarvCu; B2) Espectro C1s de polyTOHCu.

Tabla 5.6. Composición superficial obtenida del análisis XPS.

|                        | <b>C 1s %</b> | <b>Cu 2p3/2 %</b> | <b>O 1s %</b> | <b>C/O</b> | <b>AP Cu</b> | <b>O/Cu</b> |
|------------------------|---------------|-------------------|---------------|------------|--------------|-------------|
| Cu control             | 80,51         | 5,04              | 13,01         | <b>6,2</b> | 1851,338     | <b>2,6</b>  |
| polyCarvCu (1 Ciclo)   | 66,16         | 0,73              | 22,58         | <b>2,9</b> | 1847,693     | <b>31,1</b> |
| polyCarvCu (5 Ciclos)  | 71,04         | 0,61              | 20,15         | <b>3,5</b> | 1847,475     | <b>33,0</b> |
| polyCarvCu (39 Ciclos) | 78,52         | 0,38              | 19,35         | <b>4,1</b> | 1846,875     | <b>51,2</b> |
| polyTOHCu (1 Ciclo)    | 69,87         | 0,90              | 16,73         | <b>4,2</b> | 1848,319     | <b>18,6</b> |
| polyTOHCu (5 Ciclos)   | 79,42         | 0,70              | 15,31         | <b>5,2</b> | 1847,606     | <b>21,7</b> |
| polyTOHCu (39 Ciclos)  | 77,90         | 0,44              | 20,29         | <b>3,8</b> | 1846,809     | <b>46,4</b> |

El parámetro Auger para el control de Cu se corresponde con el valor del Cu metálico reportado en la base de datos de la National Institute of Standards and Technology (NIST). Sin embargo, los parámetros Auger calculados decrecen a medida que aumenta el número de ciclos de VC de los electropolímeros, llegando a valores cercanos a  $\text{Cu}^{1+}$  presentes en especies de  $\text{Cu}_2\text{O}$ . La Fig.5.20A2 muestra un pico correspondiente al satélite “shake up” de  $\text{Cu}^{2+}$  relativamente aumentado, a energías de unión más altas que las características de  $\text{Cu}2p_{3/2}$ - $\text{Cu}2p_{1/2}$ , para ambos electropolímeros sobre Cu. Esto indica la presencia conjunta de especies  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{1+}$ . Las películas poliméricas obtenidas sobre Cu probablemente atenúan la mayor parte de la señal de fotoelectrones de la superficie metálica inferior. Se observó la menor intensidad de señal  $\text{Cu}2p$  en polyTOHCu pudiendo dicha atenuación de fotoelectrones estar relacionada con un espesor mayor de la película formada por TOH. Esto se debe a que la señal detectada corresponde a pocas capas atómicas del Cu.

Los porcentajes de O1s para polyCarvCu y polyTOHCu son notablemente más bajos que los encontrados en adCarv y adTOH (ver Tabla 5.1) y la relación C1s/O1s es mayor para las muestras de Cu con electropolímeros. Inicialmente la relación C/O es alta para los polímeros de TOH, sin embargo, luego de 39 ciclos la relación disminuye debido principalmente a mayor contenido de oxígeno (Tabla 5.6).

La contribución C1s fue deconvolucionada en cuatro componentes (Fig. 5.20.B1, B2): i) 284,8eV atribuido a C-C y C-H; ii) (285,5eV, 285,7eV) asociado a C(ph)-O; iii) (291,4eV, 292,1eV) debido al acoplamiento  $p \rightarrow p^*$  de estructuras aromáticas [218] para polyCarv y polyTOH, respectivamente. Considerando que la contribución (iii), (relacionado a estructuras aromáticas) es aproximadamente nula en el caso de los adCarvCu y adTOHCu, se puede inferir que las películas electropolimerizadas presentan mayor número

de moléculas de Carv y TOH en la superficie de Cu que las adsorbidas, indicando la formación de un recubrimiento más compacto sobre la superficie. Una cuarta contribución (iv) (286,8eV, 286,7eV, para polyCarv y polyTOH, respectivamente) puede ser asignada a C de grupos quinona (C=O) [172,200,219,220] en concordancia con los picos detectados por ATR-FTIR.

La evolución de la composición de polyCarvCu y polyTOHCu en función de los ciclos de VC es diferente para cada compuesto. La contribución (ii) de polyTOHCu (C(ph)-O) aumenta con el número de ciclos y dicho incremento es más notable que el observado en polyCarvCu. Finalmente, luego de 39 ciclos la contribución relativa de (ii) al pico de C1s es de 50% para polyCarvCu y de 30% para polyTOHCu. Esto puede estar asociado al modo en que cada isómero se ancla a la superficie del Cu y al grado de susceptibilidad a formar estructuras poliméricas debido al impedimento estérico, lo que conlleva a mayor oxidación y alto porcentaje de oxígeno por molécula en el caso de la película de polyTOHCu.

#### 5.3.3.1.G. Ensayos de viabilidad celular

Seguidamente se estudió la biocompatibilidad de las películas formadas mediante ensayos de viabilidad celular. En la Fig. 5.21 se compara el efecto de las películas de polyCarvCu y polyTOHCu sobre la viabilidad celular en cultivos de la línea MC3T3-E1 teñidos con naranja de acridina. Las células fueron crecidas 24 h en condiciones normales de cultivo y en presencia de las muestras de Cu tratadas y sin tratar. Los cultivos obtenidos fueron teñidos y examinados inmediatamente por microscopio de epifluorescencia.

Posteriormente se analizó el porcentaje de área cubierta por células en función de la distancia a la muestra: Zona A ( $\leq 10\text{mm}$ ), Zona B ( $\geq 10\text{mm}$  y  $\leq 18\text{mm}$ ) y Zona C ( $> 18\text{mm}$ ). Se observaron mejoras significativas de la viabilidad celular ( $p \leq 0,001$ ) en presencia de polyCarvCu en todas las zonas analizadas.

Por otra parte, el tratamiento con polyTOHCu en la zona cercana al disco metálico presenta una mejora de la viabilidad frente al Cu sin tratamiento aunque es significativamente menor al porcentaje de viabilidad del control de células, mientras que a zonas más alejadas (Zonas B y C, ver esquema en Fig. 5.21) esta mejora se incrementa acercándose a los valores del control. Estos resultados están relacionados con las medidas de liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  de ambas películas obtenidas a 39 ciclos de voltametría cíclica (Fig. 5.18), donde se observa que a 24 h de inmersión la concentración

de iones disminuye significativamente con el recubrimiento de polyTOH ( $7,0 \pm 0,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) y en mayor medida con el polyCarv ( $2,6 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) frente al control de Cu ( $17,1 \pm 3,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Nótese la mayor viabilidad obtenida en relación con el adCarvCu y adTOHCu (Fig. 5.11).

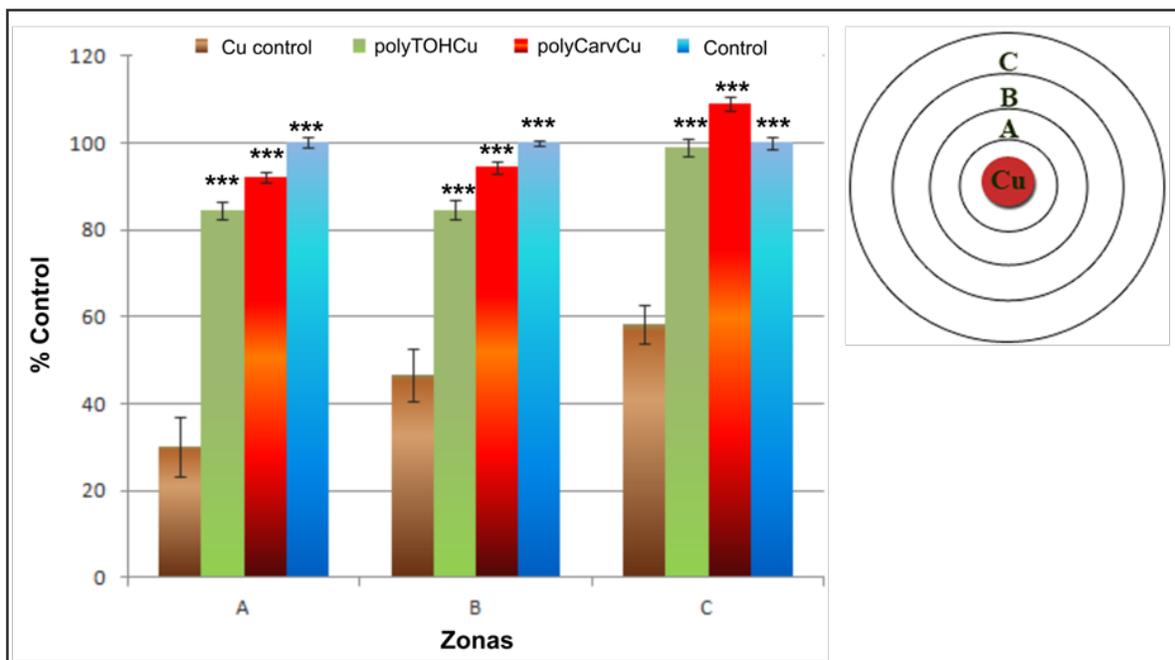


Fig. 5.21. Viabilidad celular (% del control de células) luego de 24h de exposición a: disco de Cu sin tratar, polyCarvCu, polyTOHCu y control de células. Se analizan distintas zonas ( $A \leq 10\text{mm}$ ,  $10\text{mm} \leq B \leq 18\text{mm}$  y  $C > 18\text{mm}$ ) para evaluar el porcentaje de área cubierta en función de la distancia al material. (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ ) Diferencias significativas respecto al Cu control en la región correspondiente.

### 5.3.3.2. Electropolimerización potencioestática de carvacrol y timol sobre Cu

En las secciones 4.3.4.1 y 5.3.3.1 se describieron las propiedades de las películas de polyCarv y polyTOH generadas por voltamperometría cíclica sobre superficies de Cu. Se pudo constatar que los FF fueron capaces de electropolimerizar sobre la superficie metálica, sin embargo, las características de las películas podrían ser optimizadas para mejorar la biocompatibilidad y la eficiencia en la inhibición de la corrosión del Cu. Para seleccionar la mejor condición es necesario realizar un estudio exhaustivo de lo que ocurre en las distintas regiones de potencial donde se produce la polimerización.

El objetivo de esta sección es encontrar la región de potencial de polimerización donde la biocompatibilidad del Cu se viera maximizada. Con ese propósito se investigó si dicha biocompatibilidad estaba relacionada con el potencial seleccionado para el proceso de electropolimerización. Para ello se realizaron análisis detallados de los procesos utilizando polarización potencioestática o cronoamperometrías a diversos potenciales y tiempos de aplicación. Los cambios en las características de las películas en función del tiempo fueron evaluados por microscopía AFM, medidas de liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  y estudios por espectroscopía ATR-FTIR. Posteriormente, los transitorios de corriente fueron interpretados utilizando modelos de nucleación y crecimiento y se planteó un mecanismo para interpretar las reacciones de electropolimerización. Finalmente, la biocompatibilidad de las muestras de Cu recubiertas con los diversos polímeros fue evaluada mediante estudios de proliferación celular en la vecindad de los materiales.

#### 5.3.3.2.A. Registros cronoamperométricos

Los registros cronoamperométricos se realizaron a diferentes potenciales, seleccionados de los registros potenciodinámicos realizados entre 0,30V-1,00V para Carv y TOH sobre Cu (Fig. 5.13). Los transitorios de corriente con Carv en el electrolito mostraron picos estrechos a potenciales cercanos al pico de corriente de la Fig. 5.13 (300mV-475mV) con un máximo de densidad de corriente que sobrepasa los  $10\text{mAcm}^{-2}$  luego de 1s (400mV, Fig. 5.22A). A potenciales más anódicos, la densidad de corriente decrece a valores muy bajos (unos pocos  $\mu\text{Acm}^{-2}$ ). Para los valores de potencial más catódicos ensayados (200mV y 250mV), las contribuciones de corriente resultaron de menor intensidad y sus máximos fueron registrados luego de periodos más prolongados (>3s).

Los ensayos con TOH revelaron mayores densidades de corriente que las obtenidas para Carv, con una corriente máxima de más de  $18\text{mAcm}^{-2}$  a 460mV y 550mV (Fig. 5.22B). Luego del máximo, la densidad de corriente disminuye rápidamente para el registro a 460mV pero a los demás potenciales ensayados mantiene valores altos ( $>1\text{mAcm}^{-2}$ ) durante los primeros 60 s.

Los resultados muestran que, nuevamente se observan marcadas diferencias al comparar las respuestas electroquímicas potencioestáticas del Cu en soluciones conteniendo Carv o TOH. Se observa que luego de los 20 min de aplicación del potencial (detalle en Fig. 5.22) las densidades de corriente fueron menores a  $5\mu\text{Acm}^{-2}$  para todos los potenciales

utilizados en el caso de Carv, mientras que dichos valores resultaron mayores a  $200\mu\text{Acm}^{-2}$  para TOH a 200mV, 250mV y 300mV. Esto confirma que, a diferencia de polyCarv, las películas de polyTOH son poco protectoras y consecuentemente, la posición del grupo –OH en la molécula juega un rol importante en el proceso de polimerización. Cabe recordar que ambos FF forman películas notoriamente diferentes en cuanto a su coloración: amarronada para polyTOHCu y transparente para polyCarvCu tal como se muestra en la Fig. 5.23.

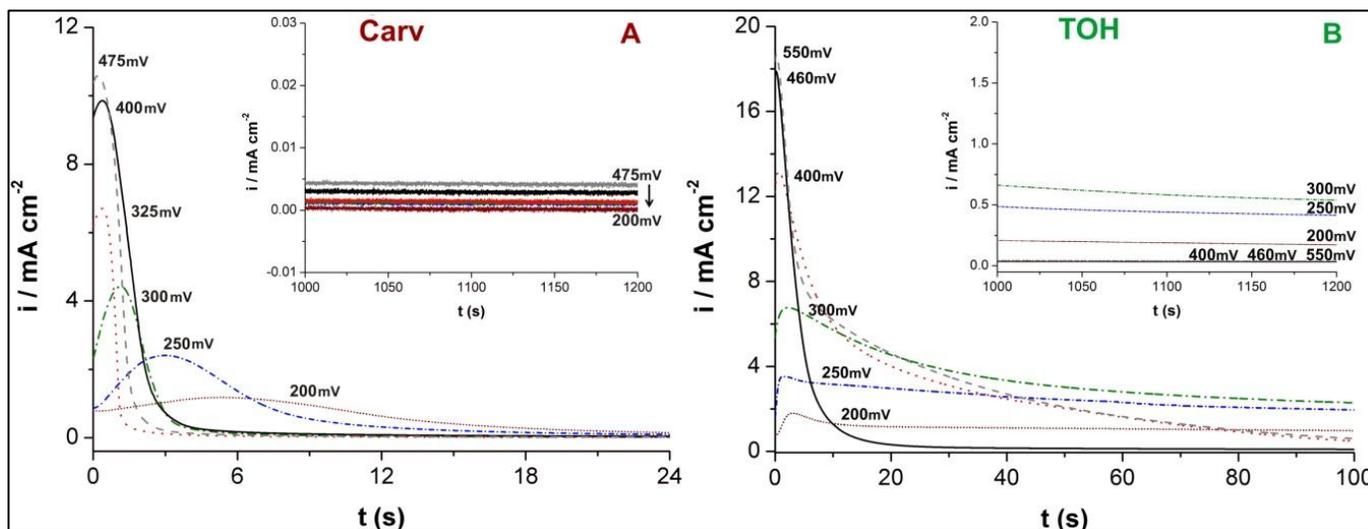


Fig. 5.22. Registros cronoamperométricos a potencial constante (de la región de potencial 200mV a 550mV vs. SCE) en electrolito conteniendo 0,3M NaOH 70/30  $\text{H}_2\text{O}$ :etanol con 0,1M Carv (A) y 0,1M TOH (B).

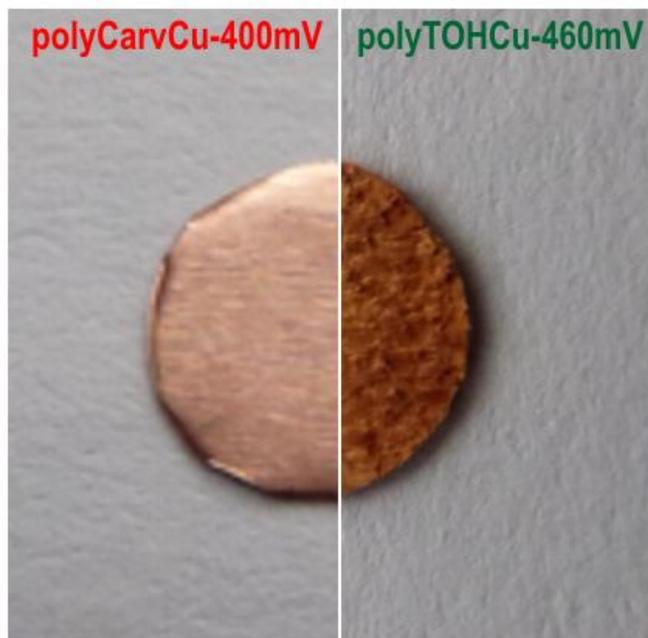


Fig. 5.23. Fotografías de las películas poliméricas de polyCarv y polyTOH sobre Cu, generadas a 400mV y 460mV respectivamente, evidenciando la diferencia de coloración y topografía.

#### 5.3.3.2.B. Espectroscopía ATR-FTIR de las películas poliméricas de fitocompuestos obtenidas sobre Cu

Con el objeto de estudiar comparativamente la composición de las películas formadas luego de tratamientos potencioestáticos, se realizaron espectroscopías ATR-FTIR de los recubrimientos formados a distintos potenciales aplicados durante diferentes períodos de tiempo. En la Fig. 5.24 se muestran los espectros obtenidos para Carv y TOH puros y para las películas generadas por cronoamperometría utilizando potenciales correspondientes al pico de oxidación respectivo (400mV para Carv y 460mV para TOH) y a un potencial menor (250mV).

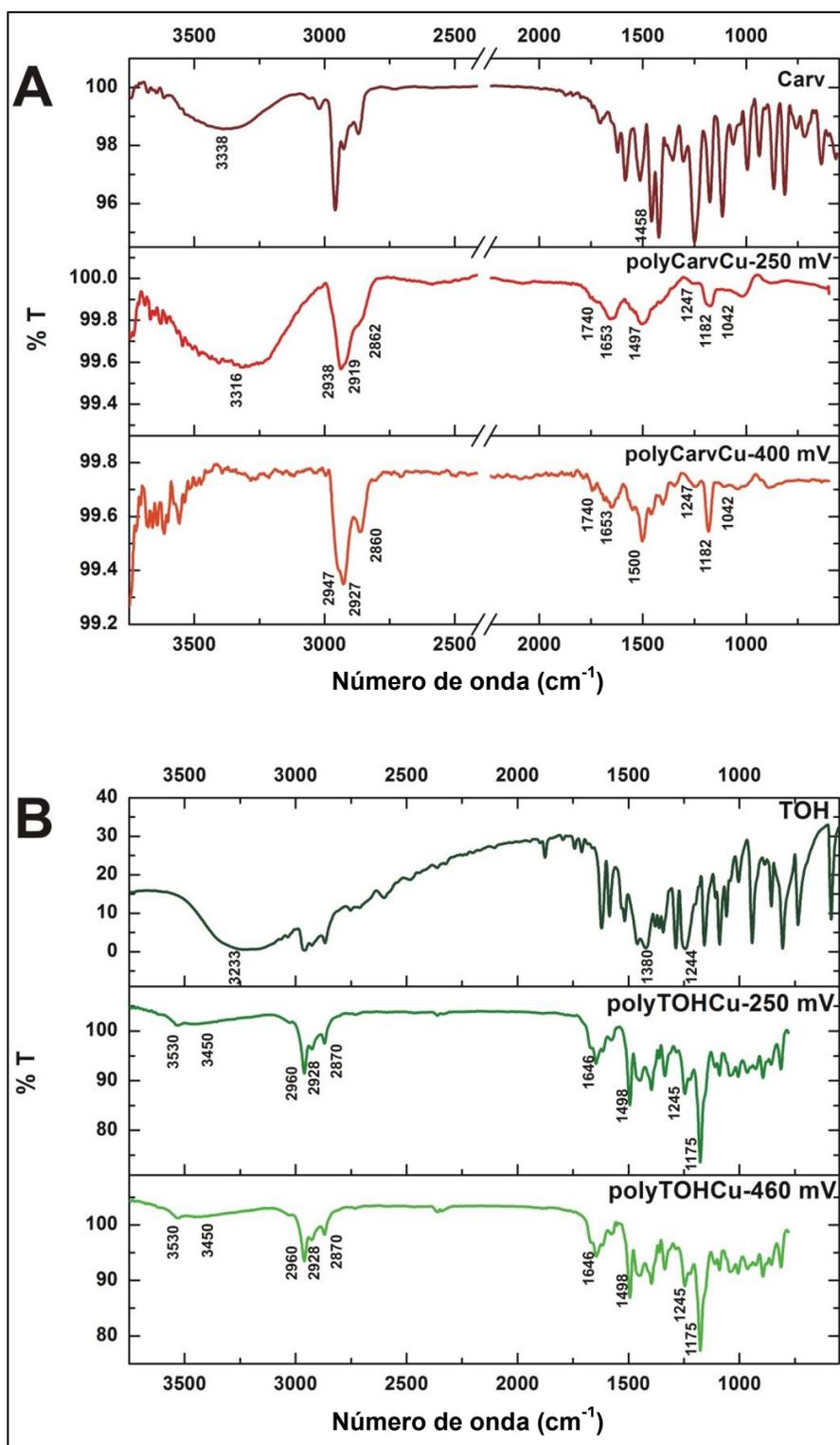


Fig. 5.24. A) Espectros ATR-FTIR de Carv puro, *polyCarvCu*-250 mV y *polyCarvCu*-400 mV, B) TOH puro, *polyTOHCu*-250 mV y *polyTOHCu*-460 mV luego de 20 min de polimerización potencioestática.

### *Contribuciones de espectros ATR-FTIR presentes en polyTOH y polyCarv*

En la Tabla 5.7 se muestran contribuciones a  $\sim 890$ ,  $1346$ ,  $1497$ ,  $2860$ ,  $2927$  y  $2947\text{cm}^{-1}$ , comunes a todos los espectros (Fig. 5.24) y atribuibles a vibraciones de tensión del anillo fenólico,  $\nu_{\text{C}=\text{H}}$ ,  $\nu_{\text{s}}$  del isopropilo,  $\nu_{\text{-C}=\text{C-}}$  del anillo fenólico 1,2,4 trisustituido, vibraciones de tensión de  $\text{C}=\text{C}$  del anillo fenólico,  $\nu_{\text{s}}$   $\text{-CH}_3$ ,  $\nu_{\text{as}}$   $\text{-CH}_2$ ,  $\nu_{\text{s}}$   $\text{-CH}_3$ , respectivamente, según la bibliografía incluida en la tabla. Adicionalmente, picos a  $1175$ ,  $1247$  y  $1653\text{cm}^{-1}$ , asignados a vibraciones de grupos conteniendo oxígeno ( $\nu_{\text{C-O-C}}$  y  $\text{C-O-C}$  de fenoles p-sustituidos;  $\nu_{\text{C-O-C}}$ ; y  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ , respectivamente) indican la oxidación de grupos  $\text{-OH}$  y la formación de dímeros y oligómeros con grupos cetona y uniones éter. Es interesante observar que señales a  $926\text{cm}^{-1}$ , asignadas a difenilcetonas y a  $1006\text{cm}^{-1}$  relacionada a grupos  $\text{-OH}$  alifáticos están presentes en todos los espectros excepto en polyCarv-250mV.

### *Contribuciones de espectros ATR-FTIR presentes exclusivamente en polyCarv*

En la Tabla 5.7 y la Fig. 5.24A se observa un pico a  $1550\text{cm}^{-1}$  para polyCarv-250 mV y polyCarv-400 mV, asignado a vibraciones  $\nu_{\text{-C}=\text{C-}}$  del anillo fenólico, el cual está ausente en los espectros de polyTOH. Las bandas a  $3316\text{cm}^{-1}$  y  $1020\text{cm}^{-1}$  (Fig. 5.24A y Tabla 5.7) coinciden con vibraciones  $\nu_{\text{OH}}$  de copolímero polifenol-formaldehído y  $\text{C-OH}$  del fenol, respectivamente y se presentan exclusivamente en polyCarv-250 mV. Una señal ancha similar centrada en  $3288\text{cm}^{-1}$  (cercano al pico de  $3316\text{cm}^{-1}$ ) fue reportada previamente para moléculas de Carv adsorbido sobre Cu (Fig. 5.6, derecha) [221], y atribuida a la absorción de polímeros según Kirsch y Coffin [222], por lo que podría inferirse que es un paso previo a la formación de las películas electropolimerizadas. Las moléculas de Carv adsorbidas se ubicarían en la interfaz metal-electrolito y formarían uniones hidrógeno a bajos potenciales (250mV). Sin embargo, en el caso de polyCarv-400 mV, polyTOH-250 mV y polyTOH-460 mV, dicho pico está ausente. Los monómeros adsorbidos serían removidos y/u organizados durante la rápida formación de polyCarv-400 mV permitiendo el desarrollo de una película altamente protectora y compacta.

### *Contribuciones de espectros ATR-FTIR presentes exclusivamente en polyTOH*

Los espectros de polyTOH-250 mV y polyTOH-400 mV evidencian algunas señales que están ausentes en las películas de polyCarv. Dos picos corresponden a vibraciones  $\nu\text{OH}$  (sin uniones puente hidrógeno,  $3530\text{cm}^{-1}$ ) y  $\nu\text{OH}$  (con uniones hidrógeno,  $3450\text{cm}^{-1}$ ) (Fig. 5.24B). El pico a  $3530\text{cm}^{-1}$ , atribuido a vibraciones de  $-\text{OH}$  libres de puente hidrógeno, se podría asociar a grupos oxhidrilos que no pueden formar dichas uniones con otras moléculas ya sean del solvente, de TOH, u otras. Podría suponerse que la posición del grupo isopropilo del TOH, ubicado en posición *orto* respecto al  $-\text{OH}$ , dificultaría la formación de dichas uniones puente hidrógeno con moléculas de solvente o con otras de TOH. Por lo tanto, el pico a  $3530\text{cm}^{-1}$  puede estar relacionado con la presencia de moléculas de TOH, dímeros u oligómeros confinados dentro de la matriz polimérica con grupos  $-\text{OH}$  incapaces de formar uniones puente hidrógeno. Otra posibilidad sería asignar la contribución a agua ocluida en la película polimérica [184,223].

Las señales a  $3028\text{cm}^{-1}$  y  $1614\text{cm}^{-1}$ , también están presentes sólo en espectros de polyTOHCu (Fig. 5.24B) y son asignadas a vibraciones  $\nu=\text{CH}$  del anillo fenólico polisustituido en el caso del pico a  $3028\text{cm}^{-1}$ , y a vibraciones del anillo aromático para-sustituido, vibraciones  $\nu-\text{C}=\text{C}-$  del anillo aromático 1,2,4 tri-sustituido y  $\nu-\text{C}=\text{C}-$  de 2,4,6 trihidroximetilfenol en el caso de la contribución a  $1614\text{cm}^{-1}$  (ver Tabla 5.7). Otros picos exclusivos de polyTOHCu están asociados a diferentes uniones entre C e H como  $\nu-\text{C}=\text{C}-$  del anillo aromático a  $1464\text{cm}^{-1}$ ,  $\rho=\text{CH}$  de anillo fenólico a  $1155\text{cm}^{-1}$  y  $\nu-\text{C}=\text{C}-$  a  $1576\text{cm}^{-1}$ . Por otro lado, según la bibliografía citada en la Tabla 5.7, las señales asignadas a uniones  $\text{C}=\text{O}$  no unido por puente hidrógeno a  $1670\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  alifático observado en fenolformaldehído a  $1110\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu-\text{C}-\text{O}$  a  $1045\text{cm}^{-1}$  y vibraciones de tensión de estructuras  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  a  $1034\text{cm}^{-1}$  son contribuciones características de la oxidación y polimerización del TOH.

Al comparar los espectros ATR-FTIR de polyCarvCu y polyTOHCu (Fig. 5.24) obtenidos mediante cronoamperometría a distintos potenciales, se pueden observar contribuciones similares en ambos polímeros. Sin embargo, las contribuciones asociadas sólo a películas de Carv o sólo a recubrimientos de TOH revelan señales distintivas que caracterizan la oxidación y polimerización de cada isómero, demostrando la importancia de la estructura molecular de los compuestos fenólicos utilizados sobre el proceso de polimerización. Por lo tanto, debido a las diferencias en la estructura molecular y el impedimento estérico, la

electrooxidación de Carv y TOH no conducen a películas poliméricas similares. Además, algunas contribuciones se observan exclusivamente en uno de los potenciales ensayados indicando el importante rol del potencial en el proceso de electropolimerización, lo que apoya la elección del proceso potencioestático frente al potenciodinámico para conseguir controlar las características de las películas. Es interesante resaltar que algunas de las contribuciones detectadas por ATR-FTIR aumentan su intensidad en función del tiempo de aplicación del potencial, tal como se verá en la sección siguiente, mientras que otras permanecen constantes, indicando que también es crucial la elección del período del tratamiento potencioestático.

Tabla 5.7. Números de onda y asignaciones (según bibliografía) para espectros ATR-FTIR de polyCarvCu y polyTOHCu obtenidos por cronoamperometría a distintos potenciales por 20 min.

| Asignaciones  | Números de onda observados (cm <sup>-1</sup> ) |        |          |        | Números de onda de asignaciones de la literatura (cm <sup>-1</sup> ) |
|---|--|--------|----------|--------|--|
|   | polyTOH  |        | polyCarv |        |  |
|   | 250 mV   | 460 mV | 250 mV   | 400 mV |  |
| v -OH (sin uniones puente hidrógeno) [165,205,207-209]              | 3530   | 3530   | -        | -      | 3522 [205]; 3535 [165]; 3525 [207,209]; 3524 [208]                   |
| v-OH (con uniones puente hidrógeno) [205,207-209]; v-OH...C=O [165] | 3450   | 3450   | -        | -      | 3361 [205]; 3448-3460 [165,207,209]; 3366 [208]                      |
| v-OH polifenol-formaldehido [159]                                   | -  | -      | 3316     | -      | Pico ancho a 3389 [159]  |
| v=CH de anillo fenólico polisustituido [144,159,210]                | 3028   | 3028   | -        | -      | 3030 [144,159,210]   |
| v <sub>as</sub> -CH3 [211,212]                                      | 2962   | 2962   | 2938     | 2947   | 2962 [211]; 2966 [212]   |
| v <sub>as</sub> -CH2 [211]  | 2928   | 2926   | 2916     | 2927   | 2922-2940 [211]  |
| v <sub>s</sub> -CH3 [211,212]                                       | 2869   | 2869   | 2862     | 2860   | 2872 [211]; 2871 [212]   |
| -C=O sin uniones puente hidrógeno [212]                             | -  | -      | 1740     | 1740   | 1749 [212]   |
| -C=O sin uniones puente hidrógeno [209]                             | 1670   | 1668   | -        | -      | 1680 [209]   |
| v-C=O [75,166,168,209,213]; v-C=C- [214]                            | 1646   | 1647   | 1653     | 1653   | 1654 [209]; 1653 [168]; 1641 [214]; 1648 [213]; 1640-1660 [75,166]   |
| v-C=C- de anillo fenólico polisustituido [159,168,212]*             | 1614   | 1614   | -        | -      | 1612 [212]; 1610 [159,168]   |
| v-C=C- [210]  | 1576   | 1576   | -        | -      | 1575 [210]   |
| v-C=C- de anillo fenólico [159,168]                                 | -  | -      | 1547     | 1550   | 1552 [159]; 1540-1560 [168]  |
| v-C=C de anillo fenólico [159,217]                                  | -  | -      | 1512     | 1511   | 1513 [159]; 1498-1514 [217]  |
| Estiramiento de C=C en anillo aromático [211,213,215]               | 1498   | 1498   | 1497     | 1500   | 1497 [211]; 1470 [215]; 1492 [213]                                   |
| v-C=C- de anillo aromático [211,215,216]                            | 1464   | 1461   | -        | 1465   | 1466 [211]; 1470 [215]; 1461 [216]                                   |
| v <sub>as</sub> isopropilo [210]                                    | 1447   | 1447   | -        | 1459   | 1430-1485 [210]  |
| v-C=C- en 1,2,4 anillo fenólico trisustituido [168]                 | 1397   | 1397   | 1413     | 1402   | 1400 [168]   |
| v <sub>as</sub> isopropilo [212]                                    | 1363   | 1362   | 1363     | 1366   | 1363 [212]   |
| v <sub>s</sub> isopropilo [167]                                     | 1337   | 1337   | 1348     | 1346   | 1350-1380 [167]  |
| v C-O-C [167]   | 1245   | 1245   | 1252     | 1247   | 1247 [167]   |
| ρ=C-H de anillo fenólico [168]                                      | 1223   | 1221   | -        | -      | 1215 [168]   |
| v C-O-C [167,168,213,215]; v C-O-C de fenol p-sustituido [212]      | 1175   | 1175   | 1182     | 1182   | 1178 [212]; 1190 [168,213]; 1188 [215]; 1184 [167]                   |
| ρ=C-H de anillo fenólico [168,213]                                  | 1155   | 1155   | -        | -      | 1155 [168]; 1160 [213]   |
| C-O-C de fenol-formaldehido alifático [159]                         | 1110   | 1110   | -        | -      | 1116 [159]   |
| v -C-O [159,211]  | 1045   | 1045   | -        | -      | 1058 [159]; 1046 [211]   |
| Estiramiento de C-O-C [167]   | 1034   | 1034   | -        | -      | 1036 [167]   |
| -C-OH de fenol [159]  | -  | -      | 1020     | -      | 1023 [159]   |
| -OH alifático [159]; ρ=C-H del anillo fenólico [168]                | 1006   | 1006   | -        | 1002   | 1000-1010 [159]; 1010 [168]  |
| Difenil cetona [168]  | 926  | 926    | -        | 929    | 925 [168]  |
| v=C-H del anillo fenólico [217]                                     | 894  | 894    | 879      | 890    | 892 [217]  |

v<sub>as</sub> = vibración de tensión asimétrica; v<sub>s</sub> = vibración de tensión simétrica; ρ = vibración en plano; \* = aromático p-sustituido [212]; v -C=C- de anillo fenólico 1,2, 4 trisustituido [168]; v -C=C- de 2,4,6 trihidroximetilfenol [159]

### *Evolución de picos ATR-FTIR en función del tiempo de aplicación del potencial*

Los espectros obtenidos para polyCarvCu y polyTOHCu a diferentes tiempos de aplicación del potencial revelaron un fuerte aumento de la señal para los picos a  $1498\text{cm}^{-1}$  (-C=C- del anillo fenólico),  $1182\text{cm}^{-1}$  y  $1245\text{cm}^{-1}$  atribuidos a uniones éter (Tabla 5.7 y Fig. 5.25). Este incremento en el número de uniones éter está relacionado con la progresión del proceso de polimerización. Adicionalmente se observaron incrementos de intensidad de picos en función del tiempo de aplicación del potencial, a  $1463\text{cm}^{-1}$  (-C=C- del anillo aromático) y  $1344\text{cm}^{-1}$  (grupo isopropilo), indicando que la correcta elección del período del transitorio de corriente es crucial. Sin embargo, los picos característicos de estructuras cetónicas ( $1740$ ,  $1653$  y  $928\text{cm}^{-1}$ ) no cambian con el tiempo. A diferencia de las uniones éter, las estructuras cetónicas no están asociadas con el progreso de la polimerización.

Los cambios en las señales del espectro de polyCarvCu en función del tiempo aplicado (Fig. 5.25A) revelan que la banda asignada a vibraciones  $\nu\text{OH}$  ( $3000\text{-}3600\text{cm}^{-1}$ ), presentes en el espectro del Carv adsorbido sobre Cu, desaparece a 1 s de potenciatización. Durante los dos primeros segundos, se pueden visualizar señales correspondientes a estructuras cetónicas ( $1740$ ,  $1648$  y  $928\text{cm}^{-1}$ ), a uniones éter ( $1455$  y  $1181\text{cm}^{-1}$ ), uniones  $\nu\text{-C=C-}$  del anillo aromático ( $1465$ ,  $1514$  y  $1542\text{cm}^{-1}$ ), picos del grupo isopropilo ( $1344$  y  $1369\text{cm}^{-1}$ ) y  $\nu\text{-CH}_2/\text{CH}_3$  ( $2854\text{-}2945\text{cm}^{-1}$ ).

Analizando los espectros de polyTOHCu a diferentes períodos de aplicación del potencial (Fig. 5.25B), el pico estrecho a  $3530\text{cm}^{-1}$  y la banda ancha a  $\sim 3443\text{cm}^{-1}$  aumentan su intensidad con el tiempo conjuntamente con los picos a  $2960\text{-}2870\text{cm}^{-1}$ , indicando cambios en la composición de la película formada probablemente debido a la acumulación de monómeros de TOH, dímeros, oligómeros y/o agua que quedan en la interfaz. Adicionalmente, se intensifican casi todos los picos de la región  $1576\text{-}1006\text{cm}^{-1}$ . Asumiendo que algunas moléculas pueden quedar confinadas dentro de la película polimérica o en las grietas detectadas por microscopía AFM (Fig. 5.26), puede decirse que el contenido de esas moléculas aumenta con el tiempo de aplicación de potencial. La compleja estructura de la película de polyTOHCu está relacionada con la alta densidad de corriente de oxidación observada durante los transitorios de polyTOH comparado con polyCarv.

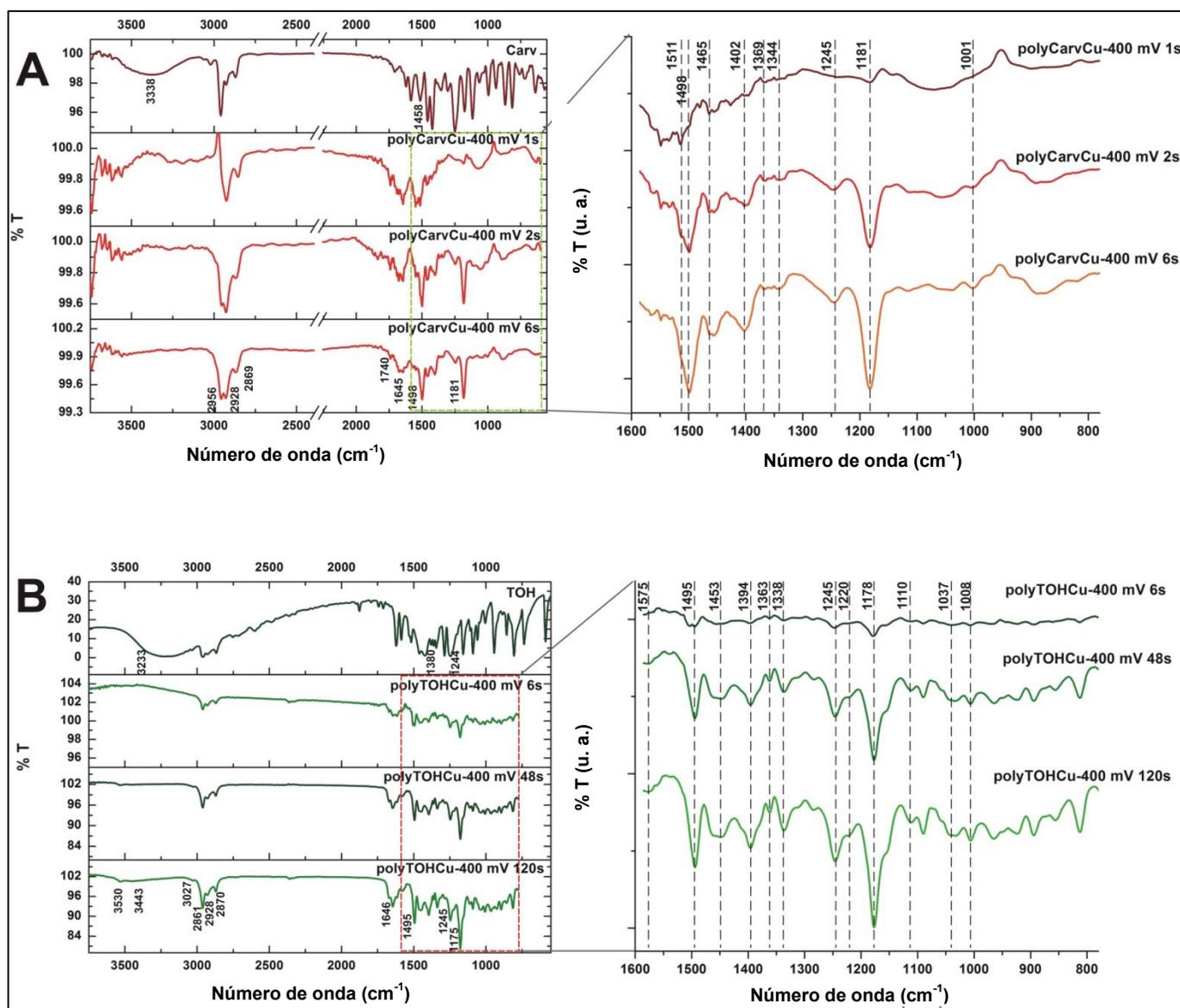


Fig. 5.25. Espectros ATR-FTIR obtenidos luego de la polarización a 400mV a diferentes períodos (1 s, 2 s y 6 s) para Carv (A), y (6 s, 48 s y 120 s) para TOH (B).

### 5.3.3.2.C. Microscopía AFM de las películas de polyCarv y polyTOH

El análisis de microscopía AFM provee información importante sobre la rugosidad y el espesor de las películas poliméricas y del tamaño de los glóbulos formados sobre la superficie de Cu. En la Fig. 5.26 puede observarse que la estructura de polyTOHCu obtenida aplicando 400mV por 2 min es compleja y presenta grietas.

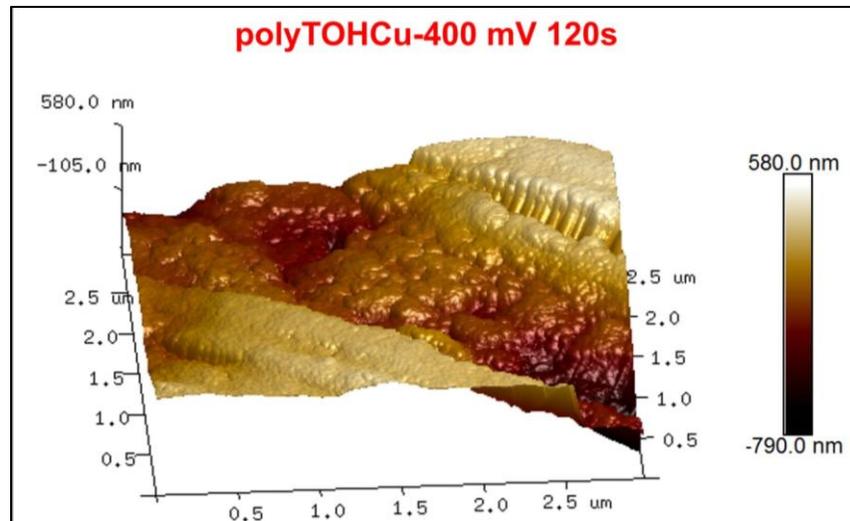


Fig. 5.26. Imagen de microscopía AFM de polyTOH obtenida por cronoamperometría a 400mV luego de 120 s.

La Fig. 5.27 muestra la comparación de las superficies de las películas obtenidas por cronoamperometría al potencial del pico de oxidación (400mV) y a potenciales menores (250mV) para Carv durante 20 min.

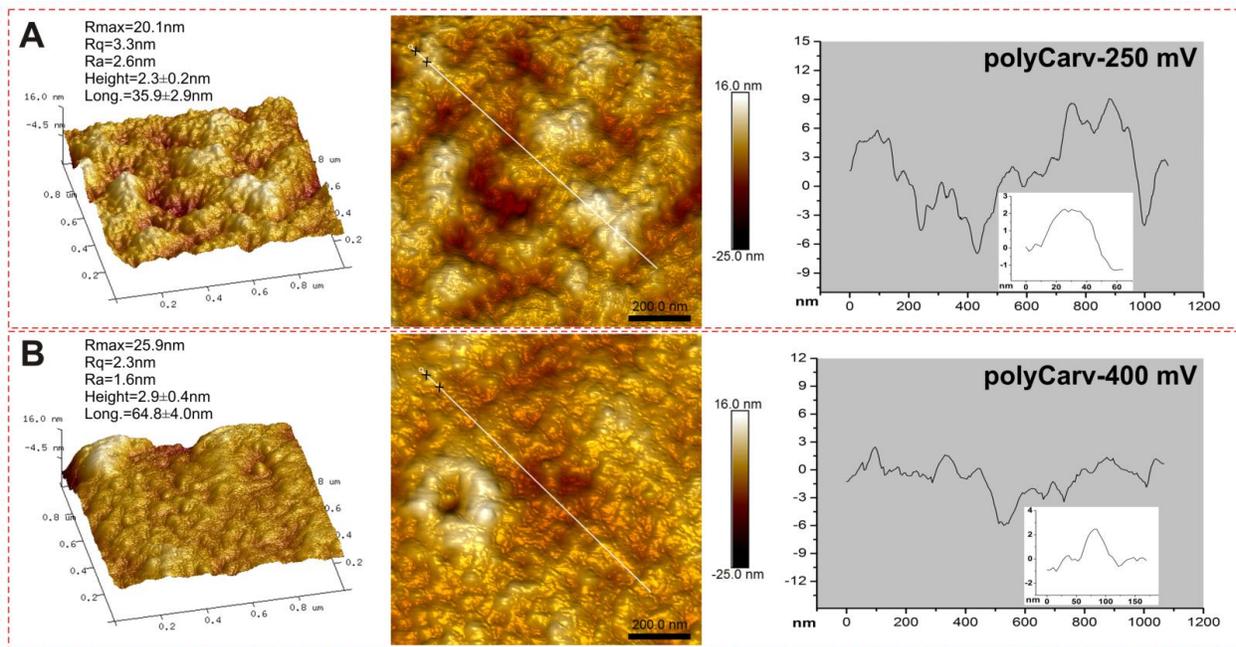


Fig. 5.27. Imágenes de microscopía AFM de películas de polyCarv obtenidas por cronoamperometría a 250mV (A) y 400mV (B) durante 20 min. Se muestran los análisis de perfil correspondientes a las líneas de perfil blancas en la imagen 2D. Los recuadros corresponden a detalles del perfil entre las cruces negras. La magnificación del eje z es 5 veces mayor que las del gráfico de polyTOH (Fig.5.28).

Las películas de polyCarv obtenidas a 250mV y 400mV (Fig. 5.27) presentan una superficie lisa con menor rugosidad y glóbulos más pequeños en polyCarv-400 mV ( $R_a = 1,6\text{nm}$  y  $R_q = 2,3\text{nm}$ ) frente a polyCarv-250 mV ( $R_a = 2,6\text{nm}$  y  $R_q = 3,3\text{nm}$ ). Por otro lado, las películas de polyTOH revelaron valores de rugosidad más altos ( $R_a = 4,1\text{nm}$  para 250mV,  $R_a = 8,4\text{nm}$  para 460mV) (Fig. 5.28).

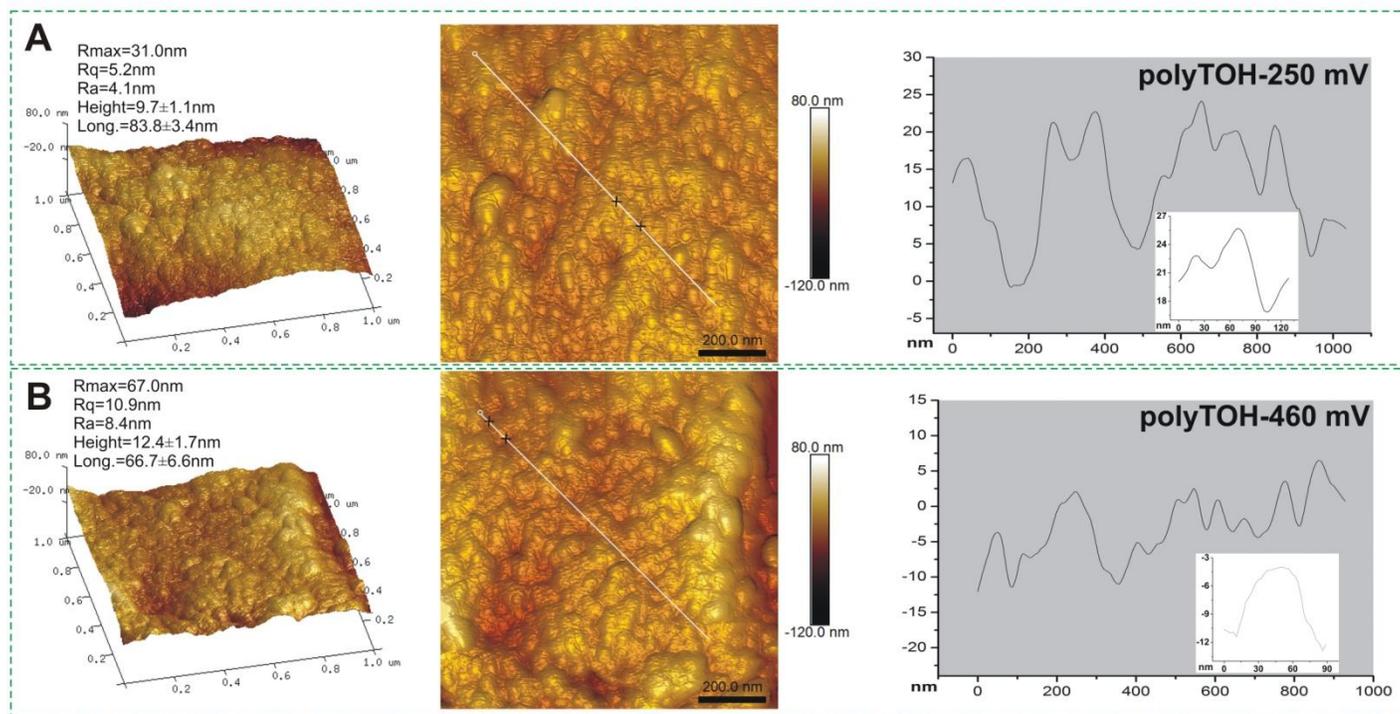
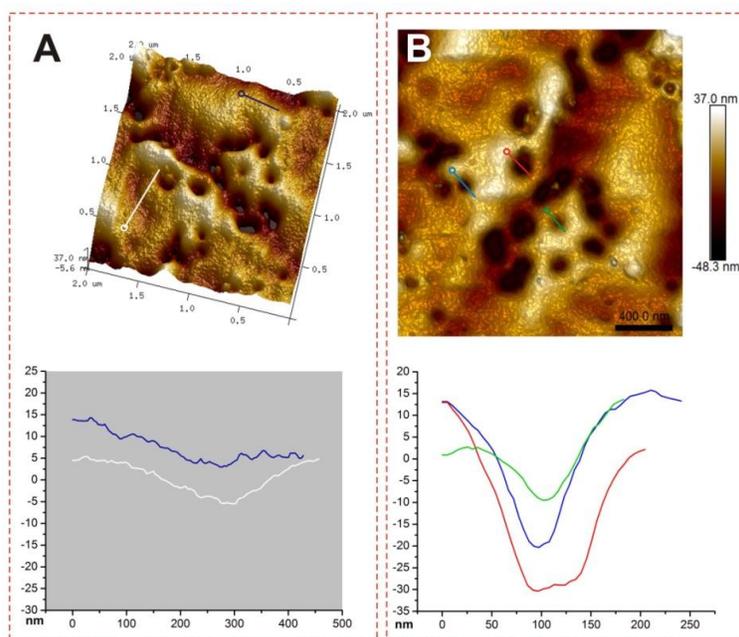


Fig. 5.28. Imágenes de microscopía AFM de películas de polyTOH obtenidas por cronoamperometría a 250mV (A) y 460mV (B) durante 20 min. Se muestran los análisis correspondientes a las líneas de perfil blancas en imagen 2D. Los recuadros corresponden a detalles del perfil entre las cruces negras.

### *Influencia del tiempo de electropolimerización*

Es interesante destacar que la película de polyCarv luego de 1 s de aplicación del potencial, presenta nanoporos de distinta profundidad (Fig. 5.29) cuyos diámetros parecen disminuir con el tiempo de la cronoamperometría y se observaron menor cantidad de poros luego de períodos más largos hasta llegar a una película lisa (Fig. 5.27).



*Fig. 5.29. Arriba: Imagen de microscopía AFM de polyCarv-400mV obtenida luego de 1 s de aplicación del potencial. Abajo: Análisis de perfil correspondientes a las líneas coloreadas trazadas en imágenes de arriba. A) Análisis de zonas de Cu recubiertas con polímero y B) análisis en detalle de la zona con poros.*

El análisis de las diferentes etapas de la electroformación de la película de polyTOH (Fig. 5.30) reveló que luego de 6 s de aplicación del potencial, la superficie del metal queda cubierta por estructuras globulares muy grandes ( $89,4 \pm 4,5$  nm de diámetro) formando un film polimérico con  $R_a = 10,1$  nm y  $R_q = 12,8$  nm. Luego de 48 s la rugosidad aumenta drásticamente ( $R_a = 17,2$  nm y  $R_q = 21,7$  nm) debido a la acumulación de nuevas estructuras globulares sobre las anteriores. La película toma mayor espesor luego de 120 s con pocos cambios en los valores de rugosidad pero, a 20 min de potenciación, se vuelve más compacta (Fig. 5.30). Las películas de polyTOH no son uniformes y se pueden distinguir regiones de diferentes espesores (Fig. 5.26 y 5.28) como fue descrito previamente para otros polifenoles [176]. Estos resultados confirman la importancia de la correcta elección del tiempo de polimerización potenciostática para optimizar las características de las películas a obtener.

Asimismo se observa que la evolución en el tiempo de la formación de las películas poliméricas a partir de estos dos isómeros fenólicos, Carv y TOH, es muy distinta, lo que confirma el impacto de la estructura molecular en el proceso de polimerización.

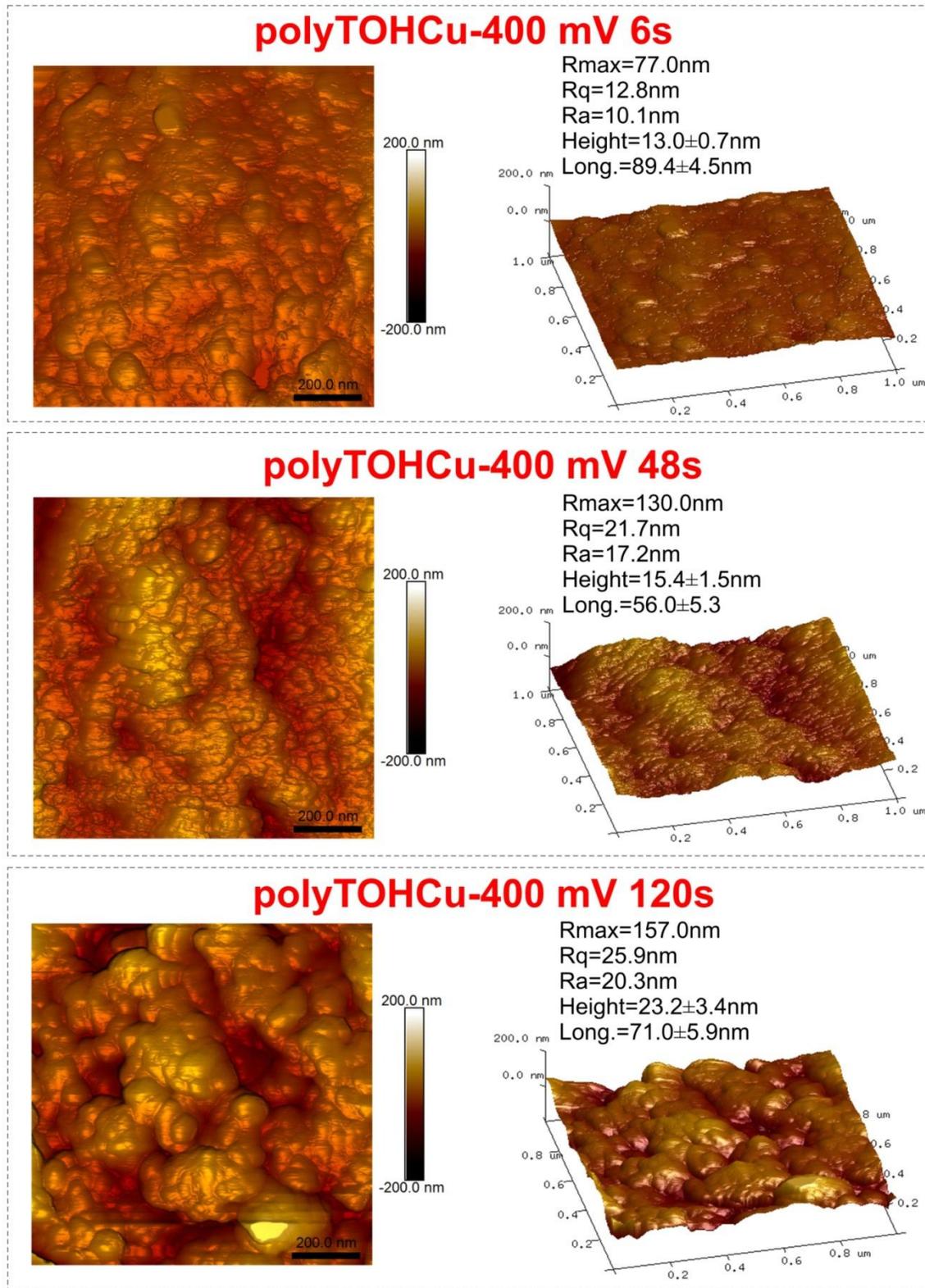


Fig. 5.30. Imágenes de microscopía AFM de polyTOH-400 mV obtenido luego de distintos tiempos de potenciatización: 6 s, 48 s y 120 s.

### 5.3.3.2.D. Liberación de iones $\text{Cu}^{2+}$ en presencia y ausencia de películas poliméricas

Las medidas de liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  de los discos de Cu con y sin tratamiento de electropolimerización potencioestática, inmersos en 0,136M KCl se muestran en la Tabla 5.8. Luego de 6 días de inmersión, el contenido de Cu en la solución de cloruros liberado por muestras de Cu sin tratamiento llegó a valores de  $130 \pm 30 \mu\text{gcm}^{-2}$  mientras que el mejor efecto protector contra la corrosión fue logrado por polyCarvCu (luego de 20 min a 400mV) con  $4,7 \pm 1,5 \mu\text{gcm}^{-2}$ . La concentración de iones  $\text{Cu}^{2+}$  liberados por polyTOHCu ( $23,8 \pm 4,0 \mu\text{gcm}^{-2}$  a 400mV) resultó cinco veces mayor a los obtenidos para polyCarvCu, en concordancia con las altas densidades de corriente observados en los resultados electroquímicos. Estos datos también demuestran una mejor *performance* obtenida por técnicas potencioestáticas frente a técnicas potenciodinámicas (Tabla 5.8), observándose una liberación de iones de  $14,6 \pm 0,9 \mu\text{gcm}^{-2}$  y  $31,5 \pm 3,0 \mu\text{gcm}^{-2}$  por polyCarvCu y polyTOHCu a 39 ciclos respectivamente, frente a  $4,7 \pm 1,5 \mu\text{gcm}^{-2}$  (polyCarvCu-400 mV) y  $20,3 \pm 5,0 \mu\text{gcm}^{-2}$  (polyTOHCu-460 mV) obtenidos de las muestras con recubrimientos formados aplicando el potencial del pico de oxidación constante correspondiente. Adicionalmente se observa un mejor efecto protector de la corrosión con las películas obtenidas potencioestáticamente al potencial del pico de oxidación de los monómeros.

Tabla 5.8. Liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  luego de 6 días de inmersión (0,136M KCl) de discos de Cu con y sin tratamiento potencioestático y potenciodinámico.

| Carv                                |  | TOH              |  |
|-------------------------------------|--|------------------|--|
| Tratamiento                         | $[\text{Cu}^{2+}] (\mu\text{g cm}^{-2})$ | Tratamiento      | $[\text{Cu}^{2+}] (\mu\text{g cm}^{-2})$ |
| <b>Tratamiento potencioestático</b> |  |                  |  |
| <b>200 mV</b>                       | $8,5 \pm 2,0$                            |                  |  |
| <b>250 mV</b>                       | $5,1 \pm 0,5$                            | <b>250 mV</b>    | $39,8 \pm 5,5$                           |
| <b>400 mV</b>                       | $4,7 \pm 1,5$                            | <b>400 mV</b>    | $23,8 \pm 4,0$                           |
|                                     |  | <b>460 mV</b>    | $20,4 \pm 5,0$                           |
|                                     |  | <b>550 mV</b>    | $23,0 \pm 0,1$                           |
| <b>Tratamiento potenciodinámico</b> |  |                  |  |
| <b>1 ciclo</b>                      | $33,2 \pm 8,0$                           | <b>1 ciclo</b>   | $45,9 \pm 2,5$                           |
| <b>39 ciclos</b>                    | $14,6 \pm 0,9$                           | <b>39 ciclos</b> | $31,5 \pm 3,0$                           |
| <b>Cu sin tratamiento</b>           |  |                  |  |
| <b>Sin tratamiento</b>              | $130 \pm 30$                             |                  |  |

### 5.3.3.2.E. Mecanismo de formación de polyTOH y polyCarv utilizando modelos de nucleación y crecimiento

Tomando en cuenta los resultados de los análisis electroquímicos y de estructura superficial se consideró que los modelos de nucleación y crecimiento podrían ser utilizados para interpretar los mecanismos involucrados en la formación de las películas poliméricas. Se tomó como base el modelo de Garfias-García *et al.* [224] y las ecuaciones reportadas previamente [225]. Estos autores aplicaron en su modelo la teoría de Bewick, Fleischmann y Thrisk para analizar los transitorios de corriente del pirrol [225–227].

Como puede observarse en la Fig. 5.22, los transitorios de corriente obtenidos para polyCarvCu-400mV y polyTOHCu-460mV mostraron que el tiempo necesario para llegar a un estado estacionario es mayor y con densidades de corriente más altas en el caso del TOH, variación probablemente asociada a diferentes mecanismos de crecimiento para ambas películas. Por lo tanto, la respuesta electroquímica depende de la selección del potencial aplicado y del monómero utilizado (Carv o TOH). Las simulaciones de los transitorios de corriente de Carv, a potenciales entre 0,30V y 0,50V, involucran reacciones heterogéneas en la interfaz solución-electrodo [157] llevando a un crecimiento en 2D. A potenciales cercanos a 400mV los monómeros y oligómeros adsorbidos pueden ensamblarse rápidamente en una capa ordenada resultando en una película de polyCarv transparente, muy compacta y altamente protectora (Fig. 5.31) que impide oxidaciones subsiguientes.

En el caso de TOH, algunas moléculas pueden formar dímeros y oligómeros que reaccionarían posteriormente con moléculas adsorbidas formando agregados o quedarían en la interfaz generando una película no homogénea como se observa en imágenes de AFM (Fig. 5.28 y Fig. 5.30). Los distintos mecanismos de crecimiento de polyCarv y polyTOH estarían relacionados con la estructura molecular de los isómeros. Debido a dicha estructura, la formación de una película ordenada puede estar dificultada por el impedimento estérico que posee el grupo –OH en el TOH. Por ello se observan altos valores de rugosidad para polyTOH por AFM (Fig. 5.28) y estructuras tipo coliflor [204]. La estructura abierta de la película de polyTOH podría permitir el transporte de cargas eléctricas necesarias para oxidar nuevas especies solubles (monómeros, dímeros y oligómeros). Esta hipótesis es consistente con el modelo de crecimiento 3D sugerido para las simulaciones de los transitorios de corriente de TOH (Fig. 5.31).

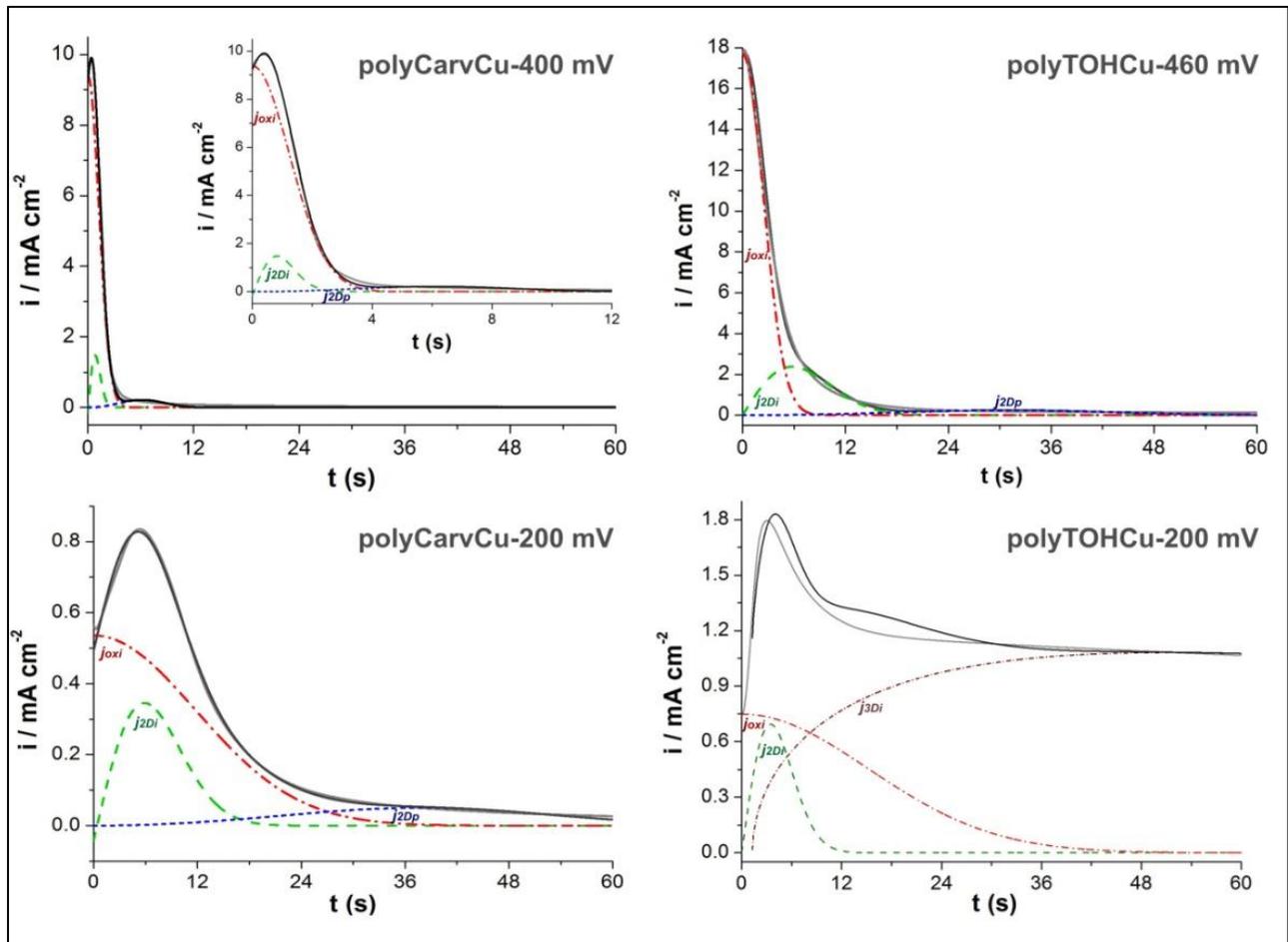


Fig. 5.31. Registros cronoamperométricos obtenidos durante la electropolimerización de Carv y TOH (—). Transitorios de corriente simulados a partir de los datos experimentales utilizando Eq. (1a y 1b) (---).  $J_{oxi}(t)$ ,  $J_{2Di}(t)$ ,  $J_{2Dp}(t)$  y  $J_{3Di}(t)$ : contribuciones individuales de corriente.

Por lo tanto, para el caso de Carv 200mV, 400mV y TOH 460mV se propone que la densidad de corriente total del proceso en el electrodo ( $J_{tot}(t)$ ) viene dada por la suma de tres contribuciones según la Eq. (1):

$$J_{tot}(t) = J_{oxi}(t) + J_{2Di}(t) + J_{2Dp}(t) \quad [1a]$$

Donde las distintas contribuciones pueden asociarse a diversos procesos:

$J_{oxi}(t)$ = relacionado con la oxidación del compuesto fenólico sobre la superficie para formar monómeros oxidados y diferentes dímeros y oligómeros que se adsorben en la superficie.

$J2Di(t)$ = relacionado con la nucleación instantánea bidimensional de las moléculas y oligómeros adsorbidos.

$J2Dp(t)$ = asignado a nucleación progresiva bidimensional de especies fenólicas.

Considerando que la presencia y caracterización de películas adsorbidas ha sido demostrada en la sección 5.3.2 y asumiendo un proceso de adsorción-desorción del tipo Langmuir que ocurre luego de un tiempo de inducción  $tin_1$ , Joxi toma la siguiente forma [224]:

$$Joxi(t) = J^{\circ} (1-\theta), \text{ con } \theta = 1 - \exp(-k_2(t-tin_1)^2) \quad [2]$$

Que lleva a

$$Joxi(t) = k_1 \exp(-k_2(t-tin_1)^2) \quad [224,228] \quad [3]$$

Donde  $t$  indica el tiempo y  $tin_1$ ,  $k_1$  son constantes.

En las ecuaciones [2 y 3]  $k_1$ ,  $k_2$  y  $tin_1$  son parámetros dependientes de varias propiedades físicas [229,230] que fueron determinados mediante las simulaciones.  $Joxi(t)$  es la contribución principal para las películas de polyCarv y polyTOH formadas por cronoamperometría a un potencial cercano al pico de oxidación (400mV y 460mV, respectivamente). La contribución  $J2Di(t)$ , relacionada con la nucleación de monómeros y oligómeros adsorbidos se puede describir como:

$$J2Di(t) = k_3 (t-tin_2) \exp(-k_4 (t-tin_2)^2) \quad [224,231] \quad [4]$$

Ésta contribución muestra un máximo cercano al total del transitorio de corriente (Fig. 5.31).

La tercera contribución,  $J2Dp(t)$  (para polyCarvCu-400mV, polyCarvCu-400mV, polyTOHCu-460mV) corresponde a una menor intensidad que las otras y depende del tiempo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$J2Dp(t) = k_5 ((t-tin_3)^2) \exp(-k_6 (t-tin_3)^3) \quad [5]$$

En la Fig. 5.31 se representan los datos experimentales y las simulaciones realizadas utilizando las contribuciones  $Joxi$ ,  $J2Di$  y  $J2Dp$  para polyCarvCu-400mV, polyCarvCu-200mV y polyTOHCu-460mV.

En el caso de polyTOH a potenciales menores a 460mV (Fig. 5.31, polyTOHCu-200mV) fue necesario considerar la adición de la componente  $J3Di(t)$  que corresponde a la nucleación instantánea tridimensional de acuerdo a la ecuación [1b].

$$J_{\text{tot}}(t) = J_{\text{oxi}}(t) + J_{2\text{Di}}(t) + J_{3\text{Di}}(t) \quad [1b]$$

$J_{3\text{Di}}(t)$  es la principal contribución observada en polyTOH-200mV luego de los primeros 20 s de aplicación del potencial, y está definida como:

$$J_{3\text{Di}}(t) = k_7/(t-t_{in_4})^{1/2} (1-\exp(-k_8(t-t_{in_4}))) \quad [229,232] \quad [6]$$

Es interesante destacar que la contribución  $J_{3\text{Di}}(t)$  está ausente en el resto de las simulaciones y puede deberse a las características heterogéneas de la película de polyTOH con estructuras 3D formadas a potenciales menores a 460mV (Fig. 5.31). A éstos potenciales, la densidad de corriente se mantiene alta y decrece lentamente luego de los primeros 10 s (Fig. 5.22 y Fig. 5.31). Así, esta película heterogénea tridimensional resulta menos protectora que el polyCarv. Una simulación similar con contribuciones  $J_{2\text{Di}}(t)$  y  $J_{3\text{Di}}(t)$  fue reportada para electropolimerización de pirrol sobre oro en presencia de hexafluoratos [228].

La simulación resultó útil para interpretar procesos que justifican la elección del isómero más adecuado (Carv) y las mejores condiciones (400mV, >30s) para obtener componentes 2D con el máximo de intensidad por un corto periodo de tiempo para garantizar buenas características protectoras de las películas sobre Cu.

#### 5.3.3.2.F. Análisis comparativo de las características de las películas obtenidas

En vista de las medidas de liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  y las imágenes de microscopía AFM, las películas de polyCarvCu y polyTOHCu cubren la superficie inhibiendo la corrosión con distintos grados de protección. La oxidación de Cu parece llevarse a cabo en los sitios con poros y grietas. Estos sitios localizados contribuyen a incrementar la densidad de corriente total, siendo de mayor magnitud para polyTOH que para polyCarv.

Considerando los espectros ATR-FTIR que revelaron la presencia de grupos -OH y los bajos valores de corriente registrados para polyCarv-250mV, es posible inferir que a bajos potenciales (<300mV) las moléculas de Carv se adsorben a la superficie del Cu, pero sólo algunas moléculas son oxidadas y quedan adheridas a la superficie. A potenciales altos ( $\geq 400\text{mV}$ ) las moléculas podrían ordenarse inicialmente con el grupo -OH hacia el metal [233] y el anillo aromático orientado hacia la solución. En un segundo paso las moléculas de Carv podrían reorientarse paralelas a la superficie del electrodo [234,235]. Debido a la

inestabilidad del radical en posición *para* y *orto* la polimerización ocurriría en esas posiciones. En concordancia, se ha reportado que la presencia y la posición del sustituyente en el anillo fenólico frecuentemente determina la tasa de electropolimerización, los intermediarios radicalarios fenólicos, los productos de reacción y cómo se adsorberán en la superficie [233]. Algunas posiciones favorecen a la oxidación y polimerización llevando a la formación de una película compacta que rápidamente bloquea la superficie del metal e impide la oxidación y corrosión del mismo con el consecuente descenso abrupto de la densidad de corriente, como en el caso de la película de polyCarv.

En el caso de la polimerización de TOH, debido a la presencia del sustituyente –OH cerca del grupo isopropilo, la formación de una capa adsorbida ordenada resultaría más complicada que en el caso del Carv, provocando una polimerización no homogénea. Al analizar los resultados de AFM, ATR-FTIR y los transitorios de corriente se puede inferir que los altos valores de corriente registrados luego de los primeros 10 s probablemente estén relacionados con la oxidación de TOH que genera dímeros y oligómeros que luego precipitan incorporándose en la película polimérica previamente formada. Así se logra formar una película no homogénea tridimensional con una estructura abierta o porosa. Los registros potencioestáticos y las imágenes de AFM muestran que a 460mV se obtienen estructuras compactas con las condiciones apropiadas para lograr una película más ordenada y protectora que a otros potenciales. A diferencia de Carv, la polimerización de TOH a potenciales distintos a 460mV involucra altos valores de corriente que permanecen elevados luego de los 10 s (Fig. 5.22). Por lo tanto, en esta estructura heterogénea la oxidación estaría favorecida observándose altas intensidades de absorbancia de picos correspondientes a uniones éter y grupos quinona en los espectros ATR-FTIR. Considerando la alta liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  de polyTOHCu en solución 0,136M KCl luego de 6 días de inmersión, la tasa de oxidación del Cu significativamente mayor en las zonas menos protegidas de la película heterogénea de polyTOHCu, frente a polyCarvCu, está de acuerdo con los resultados anteriores.

#### 5.3.3.2.G. Ensayos biológicos: ensayo clonogénico

Con el fin de testear la biocompatibilidad de las muestras de Cu recubiertas con los electropolímeros, se realizaron ensayos de 6 días con células de la línea MC3T3-E1 en condiciones normales de cultivo en presencia de las muestras de Cu tratadas y sin tratar.

Las colonias obtenidas fueron teñidas con naranja de acridina y examinadas inmediatamente por microscopio de epifluorescencia. Se analizaron el número y el diámetro de las colonias formadas en función de la distancia a la muestra: Zona A (cerca del disco,  $\leq 18$  mm) y Zona B (lejána del disco,  $> 18$  mm).

En la Fig. 5.32 se observan el número y el diámetro de las colonias formadas luego de 6 días de contacto con las muestras, normalizadas al control de células. En este ensayo se evidenciaron diferencias significativas ( $p \leq 0,001$ ) tanto en el número como en el diámetro de las colonias formadas en presencia de Cu tratado respecto a sus respectivos controles. Los resultados revelaron un drástico descenso ( $> 99\%$ ) en el número de colonias de células MC3T3-E1 con respecto al control en caso de Cu sin tratamiento, confirmando un elevado efecto citotóxico de los productos de degradación de dicho metal. Un menor efecto citotóxico se observó para el caso de polyTOHCu, revelando una reducción cercana a un 30% en el número de colonias (polyTOHCu-460mV) y a 44% (polyTOHCu-250mV) con respecto al control de células (sin disco metálico). Una mejor *performance* se observó en el caso del polyCarvCu, con una mínima variación con respecto al control de células para polyCarvCu-400mV ( $\sim 96\%$ ) mientras que polyCarvCu-250mV presentó valores cercanos a 82%. Los valores de citotoxicidad observados están relacionados con la disminución de iones Cu liberados por el  $\text{Cu}^0$  en presencia de dichos tratamientos (ver Tabla 5.8).

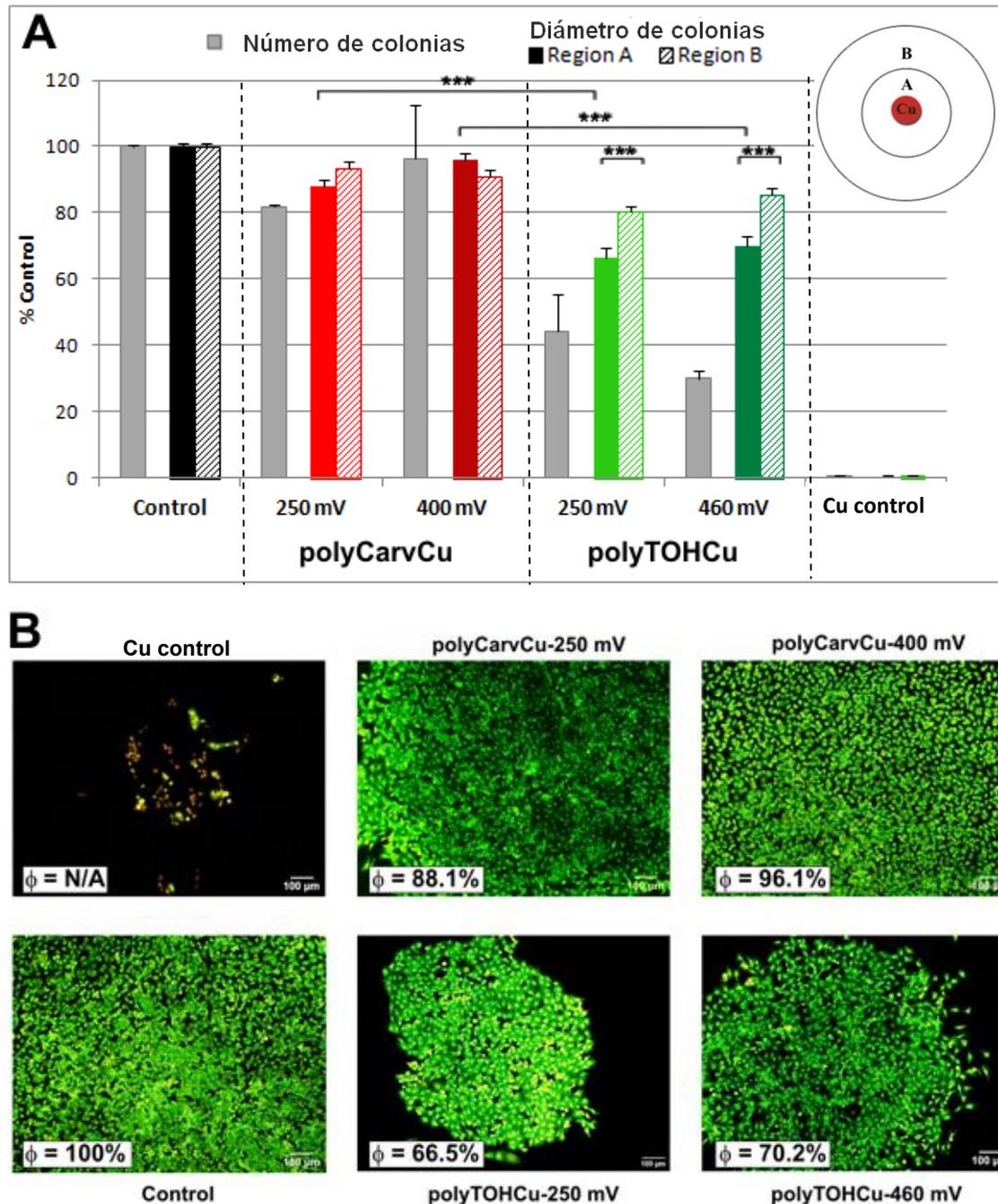


Fig. 5.32. **A)** Número promedio de colonias de células MC3T3-E1 formadas en ausencia (control) y en presencia de películas (polyCarvCu y polyTOHCu) (Barra gris). Diámetro promedio de colonias (% del diámetro promedio de colonias en cada tratamiento respecto al control sobre n=60) formadas en la región A ( $\leq 18\text{mm}$ , barras coloreadas llenas) y B ( $> 18\text{mm}$ , barras coloreadas a rayas) en ausencia (control) y en presencia de polyCarvCu (250mV y 400mV), polyTOHCu (250mV y 460mV) y Cu sin tratar (barra marrón) luego de 6 días de exposición. \*\*\* diferencias significativas,  $p \leq 0,001$ . **B)** Fotomicrografías de colonias para el control de células, Cu sin tratar y Cu con tratamientos. Magnificación 100X.

El análisis del diámetro de las colonias formadas en el caso de los tratamientos con TOH reveló un efecto citotóxico diferencial dependiente de la distancia al material. Las colonias formadas en la región B (>18mm) en presencia de polyTOHCu muestran mayor diámetro ( $p \leq 0,001$ ) que las que se forman en la región A ( $\leq 18\text{mm}$ ), en ambos tratamientos (250mV y 460mV) (Fig. 5.32A). Por otro lado, el estudio comparativo entre ambos FF, mostró diferencias significativas entre polyCarvCu-400mV y polyTOHCu-460mV (potenciales de pico de oxidación) y entre polyCarvCu-250mV y polyTOHCu-250mV, evidenciando que los tratamientos con Carv son más eficientes y llevan a una condición más biocompatible que los tratamientos con TOH. En la región A, cercana al disco metálico, donde la concentración de Cu es más alta [236], las colonias formadas en presencia de polyTOHCu resultaron significativamente más pequeñas ( $p \leq 0,001$ ) que las formadas en presencia de polyCarvCu (Fig. 5.32A y B). No se observaron diferencias significativas entre el control de células y el tratamiento con polyCarvCu-400mV mientras que para polyCarvCu-250mV la variación fue mínima aunque significativa ( $p \leq 0,001$ ). Por lo tanto, el tratamiento con Carv a 400mV posee la condición más favorable con alto poder protector, evidenciado por la baja liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  y una formación de colonias similar a la del control de células tanto en número como en diámetro, luego de 6 días de incubación.

### 5.3.3.3. Mecanismo de polimerización propuesto

El mecanismo propuesto para interpretar los complejos procesos de oxidación de Carv y TOH fue adaptado de los trabajos reportados por Garfias-García *et al.* [224] y Bao *et al.* [179] para polipirrol y polifenol, respectivamente, e involucran las reacciones detalladas a continuación. En un principio, y según los espectros ATR-FTIR de las Fig. 5.6, 5.19 y 5.24, las moléculas se adsorben en la superficie del metal (ecuación (7)). La contribución a  $3300\text{cm}^{-1}$ , ausente en el control de Cu sin TOH o Carv, está asociada con la adsorción de los compuestos fenólicos. Estos monómeros adsorbidos pueden ser oxidados y formar dímeros adsorbidos en uno o dos pasos (ecuaciones (8) a (10)):

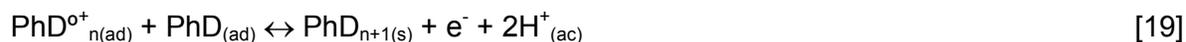




donde PhD corresponde a Carv o TOH. La electrooxidación da paso a la formación de estructuras quinónicas y polímeros con uniones éter detectadas por ATR-FTIR. Alternativamente, los dímeros pueden perder un protón al estar en solución, formándose aniones  $\text{PhD}_{2(\text{ad})}^-$ , según la ecuación (10a). Por otro lado, durante la polimerización, el dímero puede perder un electrón como demuestra la ecuación (10b) [179]. Los dímeros pueden generarse por uniones -C-C- y -C-O-. Algunos de ellos podrían no contener uniones éter y provocarían la acumulación de hidroxilos en la estructura del polímero [179]. Según los espectros ATR-FTIR este tipo de dímeros se encontraría más frecuentemente durante la electropolimerización de TOH. Adicionalmente se forman dímeros catiónicos que quedan en la interfaz (no adheridos al metal) o vuelven a la solución:



Así, oxidaciones sucesivas transforman dímeros en oligómeros que vuelven a la solución (ecuaciones (14)-(17)) cerca de la superficie metálica o quedan adsorbidos con la posibilidad de formar agregados en la superficie (ecuaciones (18)-(19)).



En las ecuaciones (11)-(17),  $\text{PhD}_{(\text{ac})}$  representa monómeros en solución, cerca del metal.  $\text{PhD}_{(\text{ac})}^{\text{o}+}$ , un radical catiónico formado por oxidación del monómero  $\text{PhD}_{(\text{ac})}$ ;  $\text{PhD}_{2(\text{ac})}$  son dímeros en solución;  $\text{PhD}_{n(\text{ac})}$  y  $\text{PhD}_{j(\text{ac})}$  representan diferentes oligómeros en la solución cerca del metal o entre zonas abiertas, siendo  $\text{PhD}_{j+n(\text{s})}$  un oligómero insoluble. Estos procesos son más comunes en la formación del polyTOHCu y conducen a estructuras heterogéneas.

El proceso de electrooxidación (ecuaciones (18)-(20)) para el caso del Carv conduce a la formación de una película 2D que bloquea la superficie del metal. En la ecuación (18)  $\text{PhD}^+_{n(\text{ac})}$  es un radical oligómero catiónico adsorbido, resultado de la oxidación del oligómero  $\text{PhD}_{n(\text{ad})}$  que, siguiendo el proceso de oxidación, puede generar  $\text{PhD}_{n+1(\text{s})}$  (ecuación (19)) o  $\text{PhD}_{m+1(\text{s})}$  (ecuación (20)). En la molécula de TOH el grupo oxhidrilo se ubica en la posición *orto* con respecto al grupo isopropilo, lo que dificulta el crecimiento ordenado y en 2D de la película debido al impedimento estérico del OH para polimerizar. Se han reportado crecimientos de películas de polifenoles en forma de “glóbulos” (de alrededor de 50nm) que se proyectan paralelamente a la superficie del sustrato metálico con una menor proporción de crecimiento lineal del polímero en forma de “barras” [228]. Las imágenes de microscopía SEM y AFM (Fig. 5.14, 5.15 y 5.27), en concordancia con los modelos de nucleación de crecimiento que se reportaron en la sección previa, muestran que las películas de polyCarv obtenidas por procesos potenciodinámicos y potencioestáticos crecerían principalmente en 2D con estructuras globulares pequeñas, generando una película bien compacta. Contrariamente a lo observado en polyCarv, la polimerización de TOH resulta en estructuras globulares más grandes que junto al crecimiento en forma de barras verticales a la superficie genera estructuras tipo “coliflor”. Considerando los espectros ATR-FTIR (Fig. 5.19 y 5.24), la película de polyTOH presentaría más grupos OH sin reaccionar en las superficies de las estructuras tipo coliflor y tipo barra. Esta forma de crecimiento también conlleva a la formación de quebraduras o “cracks” (Fig. 5.14 y 5.26), observadas también por Chmielewski *et al.* en polifenoles [228], lo que disminuye su efecto inhibitor de la corrosión del Cu. Por lo tanto, la estructura “abierta” de la película de TOH permite el transporte de iones  $\text{Cl}^-$  que, de acuerdo con las medidas de liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$ , favorecen el proceso de corrosión del metal.

#### **5.3.3.4. Estudio comparativo de la electropolimerización de Carv y TOH combinados y aceites esenciales de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare***

Con el propósito de analizar el comportamiento electroquímico de TOH y Carv en aceites esenciales de *T. vulgaris* y *O. vulgare*, se estudiaron los espectros electroquímicos y los productos generados durante la copolimerización electroquímica de TOH y Carv sobre superficies de Cu. Los registros voltamperométricos obtenidos para una relación

TOH/Carv=1/2 (0,1M Carv + 0,05M TOH) y TOH/Carv=1/4 (0,2M Carv + 0,05M TOH) se observan en la Fig. 5.33.

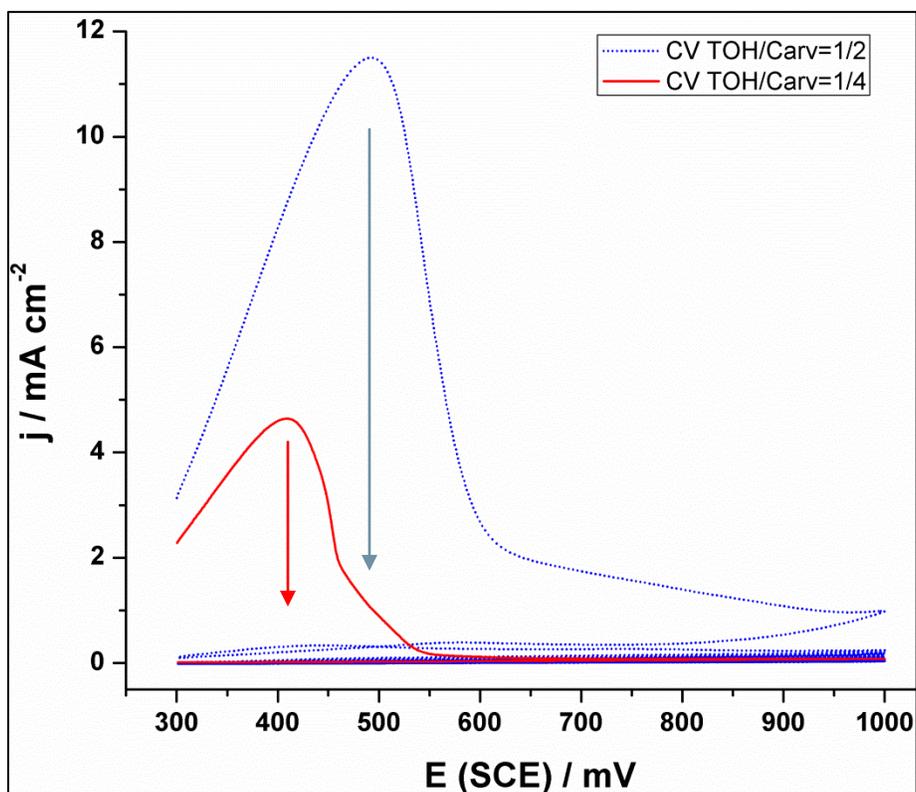


Fig. 5.33. Registros voltamperométricos de Cu en electrolito conteniendo combinaciones de TOH/Carv en relación 1 a 2 (azul) y 1 a 4 (roja). Las flechas indican la disminución de densidad de corriente de los picos de oxidación correspondientes a través de los ciclos.

Tal como se describió previamente en la sección 4.3.1.5, para la electropolimerización de la mezcla de ambos monómeros sobre superficie de Pt, en los registros potenciodinámicos correspondientes al Cu (Fig. 5.33) se observó una superposición de los picos de oxidación de TOH y de Carv (0,40V y 0,46V en Cu, respectivamente) en un rango de potencial entre 0,30V y 0,75V (Fig. 5.13). A menor concentración de Carv (relación TOH/Carv=1/2), el registro del primer ciclo muestra una densidad de corriente de aproximadamente  $1\text{mAcm}^{-2}$  luego del pico de oxidación y un pico en sentido catódico a  $\sim 0,60\text{V}$  de  $\sim 0,62\text{mAcm}^{-2}$ , similar al voltograma obtenido para el 0,1M TOH puro y para el aceite esencial de *O. vulgare* (ver Fig. 5.13 y 4.23, respectivamente). Sin embargo, durante el registro de TOH/Carv=1/4, la densidad de corriente luego del pico de oxidación

( $1-2\text{mAcm}^{-2}$ ) es menor a la obtenida para el monómero  $0,1\text{M TOH}$  puro ( $\sim 10\text{mAcm}^{-2}$ ) y para el aceite esencial de *O. vulgare* ( $\sim 16\text{mAcm}^{-2}$ ), indicando una eficiente inactivación de la superficie de Cu por el Carv a potenciales iniciales. Asimismo se observó un mayor descenso de la densidad de corriente al finalizar la voltametría, resultando en promedio  $45\mu\text{Acm}^{-2}$  (frente a  $110\mu\text{Acm}^{-2}$  encontrado para  $0,1\text{M TOH}$  puro). Por otro lado, el registro potenciodinámico utilizando la combinación  $\text{TOH/Carv}=1/4$  presentó una evolución similar a la voltametría obtenida para Carv  $0,1\text{M}$  puro sobre Cu (Fig. 5.13): una drástica disminución de la densidad de corriente luego del pico de oxidación en el primer ciclo y una corriente final de  $9\mu\text{Acm}^{-2}$  en el ciclo  $39^\circ$ .

Teniendo en cuenta los resultados previos se seleccionaron tres potenciales ( $0,40\text{V}$ ,  $0,46\text{V}$  y  $0,50\text{V}$ ) para realizar los transitorios de corriente con  $\text{TOH/Carv}=1/2$  (Fig. 5.34). Como se observa en los gráficos, la evolución de los transitorios de corriente de la mezcla aplicando el potencial del pico de Carv puro ( $0,40\text{V}$ ) y del pico de TOH puro ( $0,46\text{V}$ ) resultaron similares, como así también la realizada a  $0,50\text{V}$ .

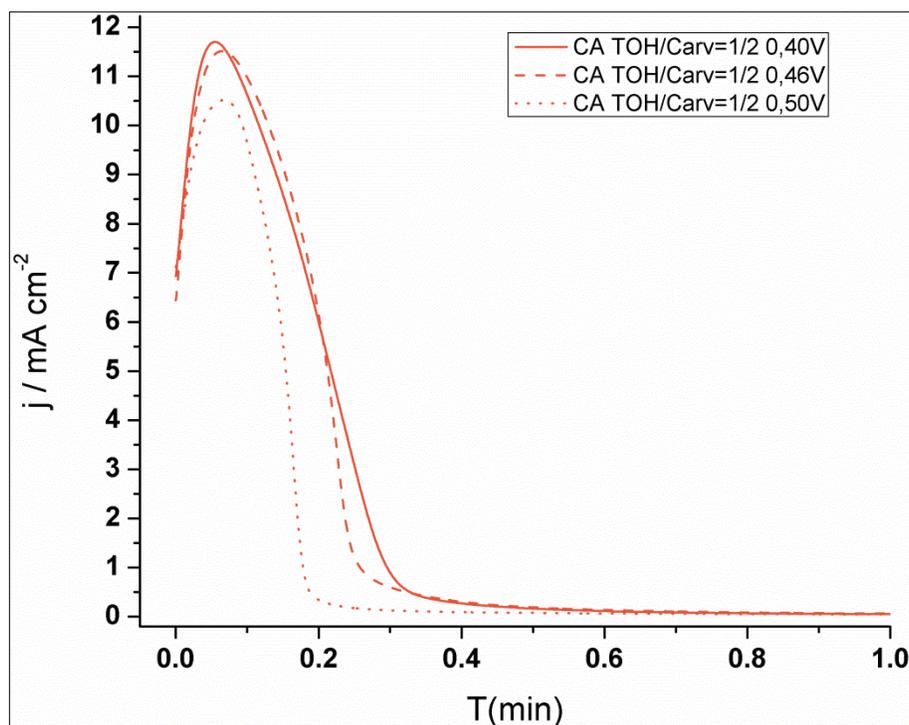


Fig. 5.34. Registro inicial de transitorios de corriente a  $0,40\text{V}$ ,  $0,46\text{V}$  y  $0,50\text{V}$  registrados en superficies de Cu en electrolito conteniendo  $\text{TOH/Carv}=1/2$ .

Al comparar los transitorios de corriente realizados a  $\sim 0,40V$  de TOH, Carv, la combinación TOH/Carv=1/2 y los aceites esenciales de *T. vulgaris* y *O. vulgare* (Fig. 5.35), se pudo inferir que la respuesta electroquímica tanto de TOH/Carv=1/2 como del aceite esencial de orégano, son una combinación entre la contribución de los picos de oxidación de TOH y Carv, con un pico de oxidación a los 3 s (frente a 0,4 s y a 0,6 s del pico de Carv y TOH, respectivamente) seguido de una rápida disminución de la densidad de corriente como la registrada para el Carv. Por otro lado, la evolución del registro obtenido en presencia de aceite esencial de *T. vulgaris* resultó similar a la observada para el Carv mostrando un pico de oxidación estrecho y una drástica disminución de la densidad de corriente a partir de los 0,6 s de aplicación del potencial.

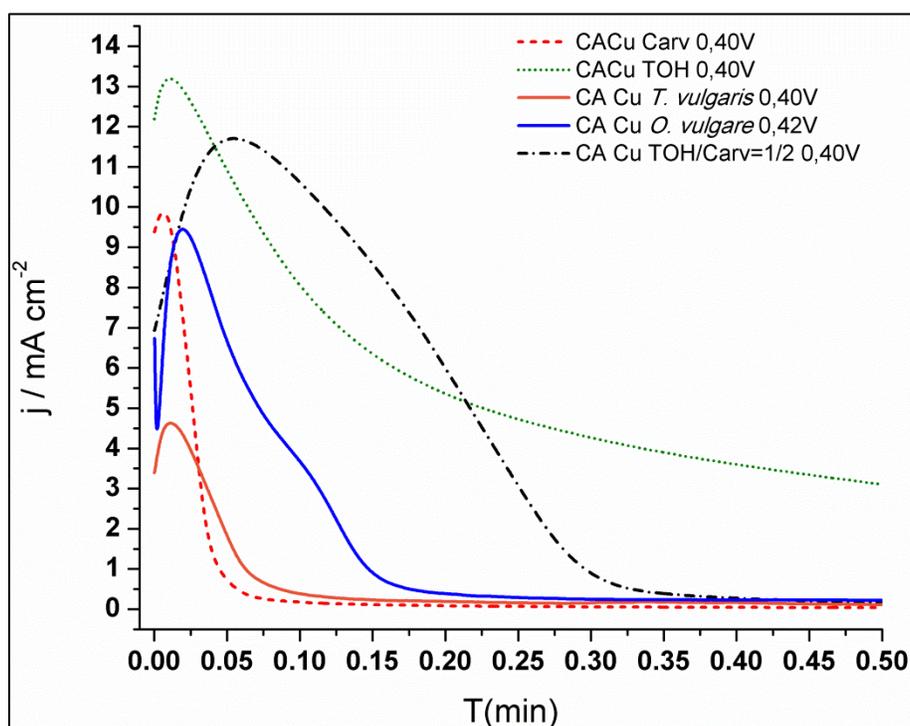


Fig. 5.35. Comparación de registros cronoamperométricos realizados a  $\sim 0,40V$  para TOH, Carv, TOH/Carv=1/2, aceites esenciales de *T. vulgaris* y *O. vulgare*.

Los productos generados por voltametría cíclica y cronoamperometría a 0,40V, 0,46V y 0,50V sobre Cu en presencia de TOH y Carv combinados en relación 1 a 2 se analizaron por ATR-FTIR (Fig. 5.36). Como se observa en la figura, los espectros de los polímeros obtenidos son similares al del polyCarvCu (ver Fig. 5.24): ausencia de banda de vibración

de  $-\text{OH}$  (entre  $3500$  y  $3000\text{cm}^{-1}$ ), presencia de picos a  $2962$ ,  $2926$  y  $2868\text{cm}^{-1}$  correspondientes a vibraciones  $\nu_{\text{as}}-\text{CH}_3$ ,  $\nu_{\text{as}}-\text{CH}_2$  y  $\nu_{\text{s}}-\text{CH}_3$  de sustituyentes del anillo fenólico [144,158], se observan contribuciones asignadas al grupo isopropilo a  $1450$  y  $1338\text{cm}^{-1}$  [158], señales atribuibles a vibraciones del anillo fenólico a  $1493$ ,  $1404$ ,  $1008$ ,  $891$ ,  $865$  y  $817\text{cm}^{-1}$  [158], bandas correspondientes a uniones éter en  $1247$ ,  $1182$ ,  $1115$  y  $1046\text{cm}^{-1}$  y un pico a  $1674\text{cm}^{-1}$  asignado a grupos  $-\text{C}=\text{O}$  sin uniones puente hidrógeno [144,158]. En base a las señales de ATR-FTIR de los productos depositados sobre Cu luego de ambos tratamientos electroquímicos, se pudo inferir que las películas electropoliméricas generadas presentan uniones éter, sin grupos oxhidrilos, similar a lo reportado para polyCarvCu (Fig. 5.24). Teniendo en cuenta el espectro ATR-FTIR del polyTOHCu (Fig. 5.24) los picos característicos presentes a  $3531$  y  $3447\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a grupos  $-\text{OH}$  sin uniones puente hidrógeno, no se observan en los espectros obtenidos con la combinación de TOH y Carv, indicando posiblemente que durante el proceso de electropolimerización interviene mayoritariamente el Carv con un potencial de oxidación más catódico que el del TOH ( $0,40\text{V}$  frente a  $0,46\text{V}$ , respectivamente).

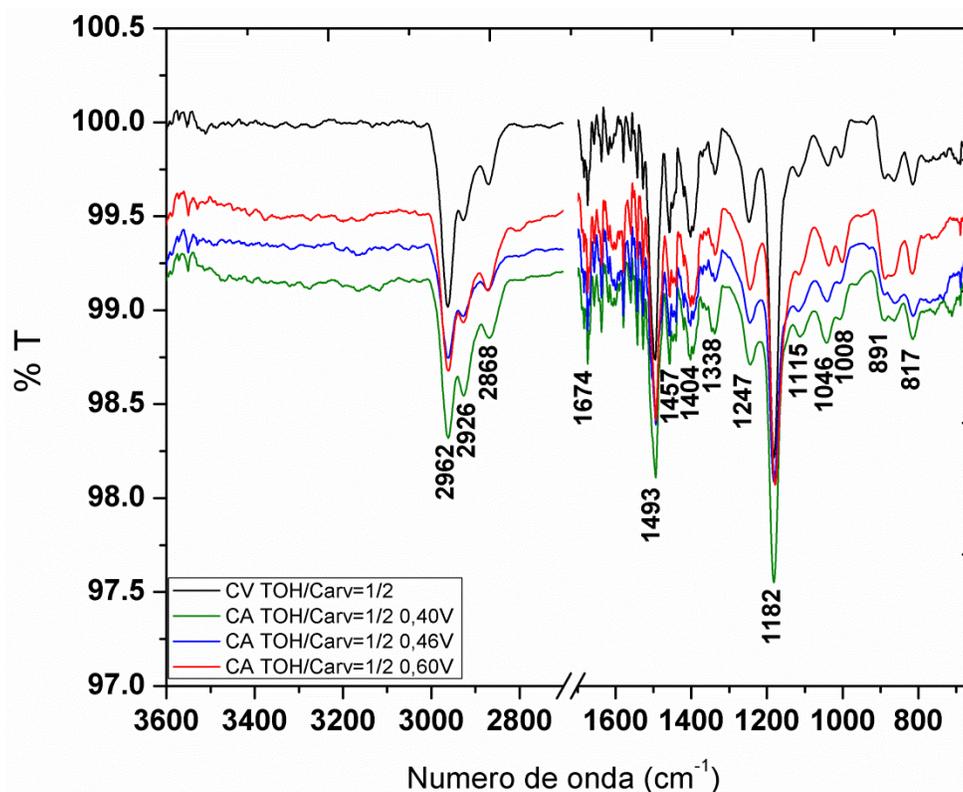


Fig. 5.36. Espectros ATR-FTIR de productos generados por electropolimerización de Carv/TOH 1 a 2. CV: voltametría cíclica; CA: cronoamperometría a distintos potenciales.

Los tratamientos con la mezcla TOH/Carv=1/2 y 1/4 evidenciaron registros cronoamperométricos y potenciodinámicos similares a los observados para el polyCarvCu, generando un bloqueo del electrodo de Cu como consecuencia de la electropolimerización de uno o ambos compuestos. Al analizar los espectros ATR-FTIR obtenidos al finalizar los tratamientos con las mezclas de TOH/Carv=1/2, se observó que los electropolímeros obtenidos presentaban estructuras muy similares a la de polyCarvCu y a la del polímero generado utilizando los aceites esenciales de *T. vulgaris* y *O. vulgare*. A partir de los resultados de las mezclas TOH/Carv se pudo inferir qué componente era esencial para la polimerización de los aceites esenciales.

Los datos obtenidos indicarían que en presencia de combinaciones de TOH y Carv, tanto en la relación 1 a 2 y 1 a 4 como en los aceites esenciales, el Carv, con menor potencial de oxidación que el TOH desempeña un rol fundamental en la electropolimerización. De acuerdo a ello mediante el análisis voltamperométrico, sería posible seleccionar las distintas variedades de plantas que podrían ser utilizados en tratamientos de inhibición de la corrosión de acuerdo a su composición.

#### **5.3.3.5. Comportamiento de polyCarvCu-400mV en fluido uterino**

En esta sección se tomó en consideración al recubrimiento de mejor efecto inhibitorio de la corrosión del Cu y de mayor biocompatibilidad, como es el caso de polyCarvCu-400mV, para evaluar su comportamiento en fluido uterino simulando las condiciones de inserción de un DIU en la cavidad uterina. Los efectos locales adversos de los DIUs en el endometrio, ya mencionados en el Capítulo 1, como procesos inflamatorios y cambios picnóticos en células endometriales, dependen del *burst release* y del área de contacto entre el dispositivo y el endometrio. Se ha reportado que la mayor tasa de corrosión de dichos dispositivos se presenta durante los tres primeros días de inmersión en fluido uterino simulado, seguido de una drástica reducción de la disolución del Cu a días posteriores, confirmando que el efecto de *burst release* ocurre principalmente durante la primera semana de inserción [237,238]. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la efectividad de los DIUs como anticonceptivos está garantizada con concentraciones de 2µg/día de iones Cu liberados [239].

Para evaluar el comportamiento del recubrimiento de polyCarvCu-400mV en condiciones de inserción se emplearon barridos lineales de potencial y medidas de liberación de iones

$\text{Cu}^{2+}$  en una solución de fluido uterino simulado a  $37^\circ\text{C}$ . En las curvas de Tafel (Fig. 5.37) se puede observar un corrimiento del potencial de corrosión del Cu de  $108\pm 5\text{mV}$  en presencia de la película de polyCarvCu-400mV. Además, se evidenció una disminución de la densidad de corriente de la rama anódica (potenciales mayores al potencial de corrosión de ambas muestras) y un descenso de la corriente de corrosión ( $10\pm 1\mu\text{A}/\text{cm}^2$  para el control de Cu y  $4\pm 1\mu\text{A}/\text{cm}^2$  para polyCarvCu).

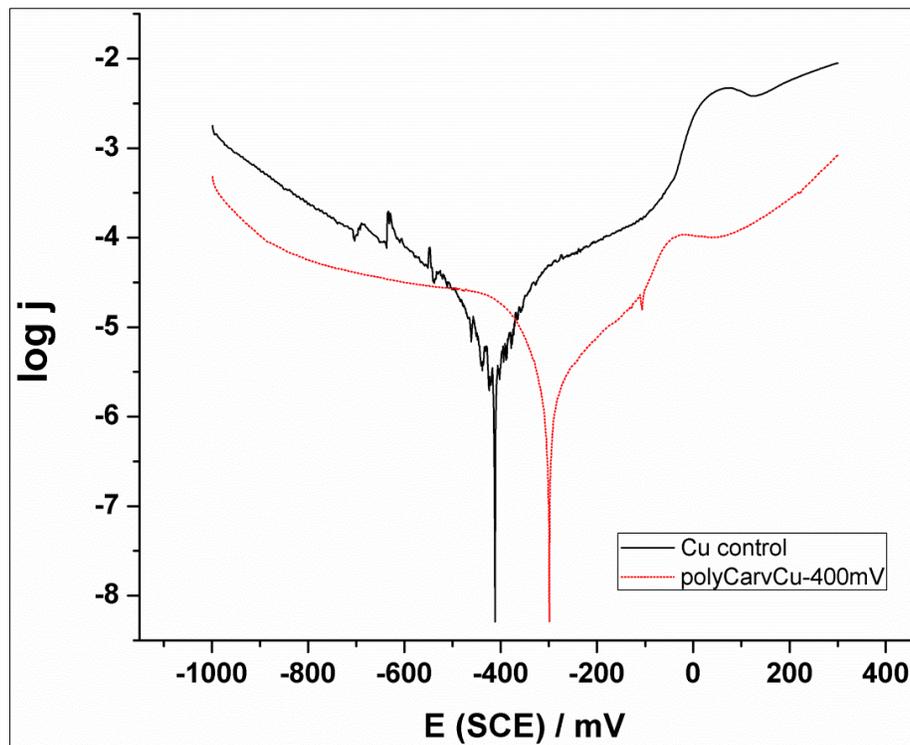


Fig. 5.37. Curvas de Tafel obtenidas con Cu sin tratamiento y polyCarvCu-400mV a  $1\text{mVs}^{-1}$  en fluido uterino simulado.

Para evaluar el desempeño de las películas como reductoras de la liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$ , se llevaron a cabo ensayos de inmersión de las muestras en 3ml de fluido uterino simulado a  $37^\circ\text{C}$  por 3 y 15 días. La concentración de iones  $\text{Cu}^{2+}$  en las soluciones resultantes se midieron mediante el ensayo colorimétrico de PAN. Se observa en la Fig. 5.38 que la concentración de iones  $\text{Cu}^{2+}$  liberados de las muestras de Cu recubiertas con polyCarv-400mV a los 3 días de inmersión ( $7,4\pm 2,6\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) fue menor a la del Cu control ( $125,8\pm 23,4\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). A los 15 días de inmersión el recubrimiento de polyCarv logró

mantener su actividad inhibitoria de la corrosión llegando a una concentración de iones  $\text{Cu}^{2+}$  acumulada de  $15,0 \pm 4,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  frente a  $216,7 \pm 35,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  registrados para el Cu sin recubrimiento ( $p \leq 0,01$ ).

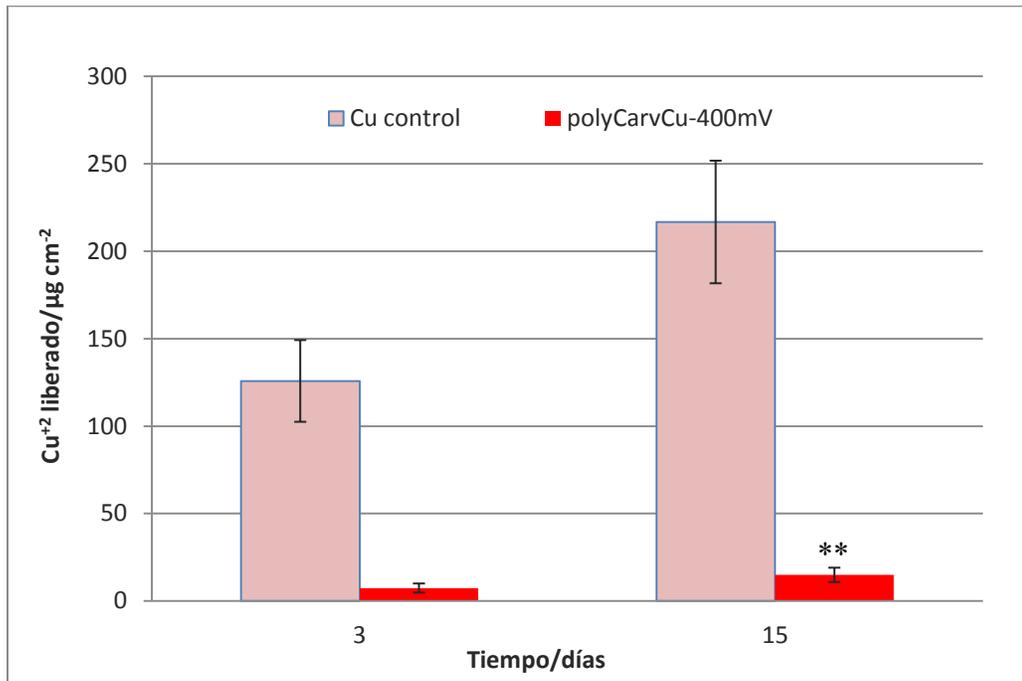


Fig. 5.38. Medidas de liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  de muestras de Cu con y sin película luego de 3 y 15 días de inmersión en 3ml de fluido uterino simulado, obtenidas mediante ensayo colorimétrico (PAN). \*\* diferencias significativas ( $p \leq 0,01$ ) frente al respectivo control de Cu sin tratamiento.

Los valores de liberación de iones registrados para el control de Cu coinciden con los trabajos de Gao *et al.* y Cao *et al.* [237,238], evidenciando el efecto de *burst release* durante la primera semana de inmersión en fluido uterino simulado. De acuerdo a los datos obtenidos para las muestras de polyCarvCu-400mV y considerando una superficie de DIU convencional (entre 2 y  $4\text{cm}^2$ ) [15], la liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  resultó de 4,6-9,2 $\mu\text{g}/\text{día}$  durante los primeros tres días y de 2,0-4,0 $\mu\text{g}/\text{día}$  los siguientes, asegurando así un efecto anticonceptivo del DIU con recubrimiento polimérico. Esto reduciría los efectos secundarios que sufren las portadoras de DIU.

#### 5.4. CONCLUSIONES

Durante el desarrollo de este capítulo se han propuesto distintas formas de utilizar FF para inhibir los daños ambientales y de la salud humana que produce la liberación de iones Cu. Considerando las propiedades antioxidantes de estos compuestos reportadas en la literatura, se estudió primeramente el posible impacto del TOH y Carv, como protectores frente al daño celular inducido por productos de degradación del Cu. Los resultados, sin embargo, no evidenciaron acción protectora de los FF en sistemas *in vitro* de cultivos de la línea CHO-K1 expuestos a extractos con distintas concentraciones de iones Cu<sup>2+</sup> provenientes de la disolución del metal.

Posteriormente, se evaluó la adsorción de TOH y Carv sobre Cu y se pudo concluir que mediante la película adsorbida es posible lograr reducir la formación de óxidos de Cu en la superficie del metal. La caracterización superficial de los compuestos fenólicos adsorbidos mostró una buena interacción molécula-superficie (XPS) y una posterior oxidación a estructuras cetónicas de algunos monómeros, conservando en otros el grupo oxhidrilo (ATR-FTIR). Pudo comprobarse además, que las muestras de adTOHCu en presencia de TOH en la solución de inmersión poseen mejores características inhibitorias de la corrosión del Cu que en ausencia del monómero en el medio. La presencia de TOH en el medio corrosivo potenció el efecto inhibitor de la corrosión metálica, por lo que dichos compuestos podrían ser utilizados como inhibidores biocompatibles agregados a la solución.

La biocompatibilidad de las muestras de adCarvCu y adTOHCu fue testada en dos líneas celulares observándose mejoras significativas en la viabilidad de células MC3T3-E1 en contacto con adCarvCu y un menor efecto con tratamientos de adTOHCu. Los resultados de biocompatibilidad mostraron un menor efecto tóxico que el metal sin tratar. Sin embargo, los estudios realizados utilizando células de la línea CHO-K1 no mostraron diferencias frente al Cu control, limitando la posible aplicación de este tratamiento para dispositivos *in vivo*. Estos resultados también revelaron la necesidad de emplear más de una línea celular en los ensayos para constatar la citocompatibilidad.

Finalmente y en base a los resultados del Capítulo 4 se pudo optimizar, mediante un programa electroquímico de perturbación adecuado, la electropolimerización de TOH y Carv sobre superficies de Cu ya sea utilizando técnicas potenciodinámicas como potencioestáticas. Mediante diferentes técnicas de análisis (ATR-FTIR, XPS, AFM, SEM, liberación de iones Cu<sup>2+</sup>, barridos lineales de potencial) se pudo observar una influencia

importante de la reactividad, impedimento estérico, estabilidad radicalaria e interacción molécula-sustrato de cada isómero, así como también del potencial aplicado y del tiempo de polimerización, resultando en características superficiales y propiedades protectoras diferentes de las películas formadas. Se pudo inferir mediante espectroscopía XPS que las películas electropolimerizadas presentan un mayor número de moléculas de Carv y TOH que las adsorbidas indicando la formación de películas de mayor espesor y más compactas sobre la superficie de Cu. Pudo comprobarse también que, tanto durante los ciclos potenciostáticos como durante los ensayos potenciodinámicos, ambos derivados fenólicos se oxidan sobre el Cu, bloqueando en distinto grado la superficie del metal. Adicionalmente se pudo seguir mediante espectroscopía ATR-FTIR el proceso de polimerización a través del tiempo. Se pudo constatar que los picos correspondientes al anillo aromático, al isopropilo y a uniones éter incrementan su intensidad en función del tiempo de aplicación del potencial, mientras que las señales atribuidas a cetonas no varían su intensidad y no estarían asociadas al progreso de la polimerización. La eficiencia de inhibición de la corrosión del Cu mediante las películas poliméricas resultó en mayor grado y duración que en los FF adsorbidos como se observa en los registros electroquímicos y las medidas de liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$ , ambas realizadas en 0,136M KCl. La disminución de la liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  en presencia de películas poliméricas fue evidenciada también en forma indirecta por los ensayos de viabilidad celular a 24h y 6 días, que mostraron mayor biocompatibilidad.

Las películas de polyCarv, tanto las formadas por voltamperometría cíclica como por cronoamperometría, resultaron transparentes y mostraron alta protección contra la corrosión del Cu, mientras que las películas de polyTOH presentaron coloración amarillada y brindaron menor protección a la corrosión del metal. Mediante observaciones nanoscópicas empleando AFM se pudo constatar que los recubrimientos de polyTOH presentaron mayor rugosidad y están formados por glóbulos más grandes que los de polyCarv y éstos llevan a la formación de estructuras tipo coliflor o barras que crecen perpendiculares a la superficie del Cu, donde se generan quebraduras y poros del polímero (observadas por SEM y AFM) que facilitarían el acceso de más moléculas fenólicas y de iones agresivos a los sitios activos de la superficie metálica, favoreciendo así la oxidación del Cu y de los monómeros y oligómeros de TOH y dando lugar a una estructura heterogénea. Así, la liberación de los iones  $\text{Cu}^{2+}$  por polyTOHCu en solución de cloruros es marcadamente mayor que la observada para polyCarvCu. Estos resultados

dan cuenta de la influencia de la estructura molecular en el proceso de polimerización de dichos isómeros.

Los resultados remarcan la importancia del estudio detallado de la evolución del proceso de electropolimerización potenciostática utilizando compuestos fenólicos como paso previo a la selección de un aceite esencial para su utilización como inhibidores de corrosión ecocompatibles, debido al alto impacto de la estructura molecular, el potencial aplicado y el tiempo de polarización en las características de las películas poliméricas resultantes. Se concluyó que las películas poliméricas involucran la formación de uniones éter que aumentan con el tiempo y son más homogéneas, más protectoras y menos rugosas en el caso de polyCarvCu. Pudo comprobarse también la importancia de comparar distintas técnicas diseñadas utilizando diversos parámetros (número de ciclos, potencial, tiempo de potenciastización) para optimizar las características de la película formada.

Los ensayos electroquímicos, microscopía AFM, espectroscopía ATR-FTIR y medidas de liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  revelaron que el tratamiento de electropolimerización potenciostática es más efectivo que el potenciodinámico, pudiendo constatarse además, que el proceso involucrado en la polimerización de Carv y TOH es diferente. La oxidación de Carv y TOH que ocurre durante el proceso potenciostático precede a la formación de dímeros, oligómeros y polímeros, los cuales se generan de manera progresiva a mayor velocidad en el caso de Carv. A medida que aumenta el tiempo de aplicación del potencial, las películas poliméricas se van homogeneizando y volviéndose más compactas, como se observa por AFM, indicando la importancia del tiempo en el proceso potenciostático. Además, la elección de potenciales correspondientes al pico de oxidación del monómero permite obtener películas más lisas, homogéneas y compactas, que las obtenidas a otros potenciales para un mismo monómero. Se pudo demostrar también que se logra un mejor efecto protector de la corrosión con las películas obtenidas potenciostáticamente al potencial del pico de oxidación de los monómeros, frente a las generadas por voltametría cíclica. Entre las distintas películas generadas, se destacó al polyCarvCu-400mV como el mejor tratamiento de inhibición de la corrosión del Cu y de mayor biocompatibilidad.

La simulación de los transitorios de corriente potenciostáticos utilizando el modelo nucleación y crecimiento permitió interpretar las diferentes contribuciones que incluyen el proceso de electroadsorción y el crecimiento 2D instantáneo y progresivo en el caso de

polyCarv, mientras que en el caso de la película de polyTOH se adiciona un componente de nucleación 3D, justificando las características heterogéneas del recubrimiento.

Al analizar comparativamente los registros electroquímicos de las combinaciones TOH/Carv y los aceites esenciales de *T. vulgaris* y *O. vulgare*, así también como los espectros ATR-FTIR obtenidos luego de los tratamientos, se pudo concluir que el Carv desempeña un rol fundamental en la electropolimerización de ambas mezclas, generando recubrimientos con espectros ATR-FTIR muy similares al polyCarvCu. De acuerdo a ello se podrían seleccionar las distintas variedades de plantas que podrían resultar útiles de acuerdo a la composición de su aceite esencial, logrando una aplicación sin procesamiento de purificación de los FF, lo cual es una importante ventaja para la química “verde”.

Considerando lo expuesto anteriormente, la adsorción de TOH y Carv a partir de la adición de los compuestos a los fluidos en contacto con el Cu y la electroformación de polyCarv y polyTOH como películas inhibidoras de la corrosión del Cu surgen como alternativas naturales sustentables. Particularmente la electropolimerización de Carv a partir de aceites es una alternativa costo-efectiva, dado que el precio de los aceites esenciales es similar al de los inhibidores orgánicos pero la cantidad a utilizar es mucho menor, debido a que se utiliza para generar los recubrimientos y no hay liberación del mismo al ambiente. En consecuencia, se reduce la inversión en tratamientos de remoción en las aguas residuales tanto del inhibidor como de los iones liberados. Se añade a esto la buena biocompatibilidad de los recubrimientos y el bajo valor del impacto ambiental potencial y de huella de carbono de su producción, lo que demuestra su bajo daño a sistemas biológicos.

Con respecto a su aplicación en el campo de la medicina, la electropolimerización de Carv surge como un excelente método para mejorar la biocompatibilidad de los DIUs controlando la liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  e impidiendo efectos indeseados del *burst release* [15,68].

# **MATERIALES METÁLICOS CON ALTA VELOCIDAD DE DEGRADACIÓN.**

**Desarrollo de estrategias para controlar la degradación de Mg y aleaciones y para inhibir la adhesión bacteriana**

## **Capítulo 6**

## Capítulo 6- Materiales metálicos con alta velocidad de degradación. *Desarrollo de estrategias para controlar la degradación de Mg y aleaciones y para inhibir la adhesión bacteriana*

### 6.1. INTRODUCCIÓN

El Mg y sus aleaciones, tal como se anticipó en secciones previas, se han propuesto como implantes temporales ortopédicos y cardiovasculares dado sus propiedades mecánicas similares a las del tejido óseo, comparado con materiales metálicos convencionales utilizados en aplicaciones ortopédicas [19,28,39]. Se sabe además que su alta velocidad de degradación induce efectos dañinos al tejido de las zonas aledañas al implante, relacionadas con el incremento de pH, liberación de H<sub>2</sub> y disminución de las propiedades mecánicas del metal [19,27–30]. Por este motivo es necesario diseñar estrategias que conduzcan a la reducción de los efectos indeseables de este BMB.

Si bien, tal como se detalló en la sección 1.1.1.3, varios autores han atribuido propiedades antimicrobianas al Mg y sus aleaciones, se han reportado estudios donde implantes subcutáneos de Mg fueron inoculados con un cultivo de *S. aureus* en un modelo de ratón y, desafiando las expectativas, se detectó la formación de biofilms resistentes al tratamiento sistémico con antibióticos [93,94]. Asimismo, recientemente se ha evidenciado [240] que, en ensayos *in vivo*, la aleación AZ91 no es capaz de mantener sus propiedades antibacterianas durante el período de implantación en el húmero en un modelo de rata, incluso luego de evidenciar propiedades antibiofilm en ensayos *in vitro* [29]. Se ha sugerido que el cambio significativo de pH a valores alcalinos no se observaría en sistemas buffer *in vivo* eliminando las propiedades antimicrobianas exhibidas en ensayos *in vitro*.

Por lo tanto, debe tenerse en cuenta que tanto los sistemas buffer biológicos como los tratamientos de inhibición de la corrosión, además de mejorar el control de la corrosión y reducir los efectos dañinos a las células aledañas al implante, podrían aumentar la susceptibilidad de formación de biofilm. Consecuentemente el proceso es complejo y hay varias cuestiones a considerar en la interfaz metal/fluido biológico. Por un lado, la alcalinización del medio y la formación de burbujas de hidrógeno, asociadas a los procesos de corrosión localizada, alteran la composición local del medio favoreciendo el efecto antibiofilm [241]. Por otro lado, la precipitación de productos de corrosión como

fosfatos y carbonatos pueden reducir la tasa de degradación y alterar la composición superficial. El control de la corrosión implica reducir la formación de fosfatos y carbonatos así como la liberación de hidrógeno y la alcalinización del medio, por lo que el efecto antibiofilm podría desaparecer. Así, el desafío clave es desarrollar tratamientos capaces de controlar la corrosión de Mg y sus aleaciones (para preservar las propiedades mecánicas del implante durante la regeneración del tejido) manteniendo propiedades antimicrobianas. Siguiendo el análisis del problema, deben responderse algunas preguntas para lograr la estrategia adecuada para mejorar la *performance* del Mg y sus aleaciones: i) ¿Las bacterias se distribuyen homogéneamente sobre la superficie del metal o en sitios preferenciales?; ii) ¿Puede un recubrimiento reducir tanto la tasa de corrosión como la adhesión bacteriana?

Tal como se detalló en la sección 1.1.3 los FF han generado cierta atención debido a su habilidad para generar recubrimientos en diferentes materiales [52,242–249]. Algunos polifenoles son capaces de formar recubrimientos multifuncionales, antioxidantes y antimicrobianos, clasificados como “efecto antimicrobiano en superficie”, a diferencia de los agentes antibacterianos disueltos en la solución biológica que llegan por difusión a la superficie [158,242].

En este capítulo los estudios se focalizaron en tres aspectos: generar electropolímeros sobre superficies de Mg, AZ31 y ZEK100 a partir de FF ; estudiar el efecto de las películas poliméricas sobre la corrosión de dichos biomateriales y, a partir de la selección de la combinación biomaterial-película con mejor eficiencia en el control de la corrosión metálica, evaluar su propiedad antiadherente bacteriana y la distribución de las mismas frente al metal sin recubrimiento.

## **6.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.2.1. Materiales**

Se utilizaron TOH, Carv y ácido trans-ferúlico (Sigma, St. Louis, MO, USA) como FF . Todos los reactivos empleados en los ensayos son de grado analítico y se empleó agua ultrapura para las soluciones.

Los biomateriales metálicos biodegradables utilizados consistieron en: barras de aleación de Mg AZ31 (Magnesium Elektron, Manchester, Inglaterra) en forma de lámina enrollada templadas a 345°C, cuya composición fue: 3,10±0,16 at% Al; 0,312±0,029 at% Zn;

0,078±0,019 at% Mn; con balance de Mg; barras de aleación de Mg ZEK-100 (Magnesium Elektron, Manchester, Inglaterra) cuya composición fue: 0,96 wt.% zinc, 0,21 wt.% zirconio, 0,3 wt.% tierras raras; y barra de Mg extrudado (99,8% de pureza, Magnesium Elektron, Manchester, Inglaterra).

## **6.2.2. Ensayos fisicoquímicos (superficiales y electroquímicos)**

### **6.2.2.1. Ensayos electroquímicos**

#### **6.2.2.1.A. Formación de películas electropolimerizadas sobre Mg y aleaciones**

Se utilizó un potenciostato-galvanostato Teq-03 para realizar las técnicas electroquímicas de modificación superficial de Mg, ZEK100 y AZ31. La electropolimerización se llevó a cabo mediante voltametría cíclica en una celda electroquímica con electrodo de lámina de platino como contraelectrodo y electrodo de calomel saturado como electrodo de referencia, al cual se refieren los potenciales en el texto. Como electrodos de trabajo se utilizaron electrodos de Mg, ZEK100 y AZ31 (9mm de diámetro) embutidos en polioximetileno dejando un área expuesta de 0,636cm<sup>2</sup>. Los electrodos de trabajo fueron pulidos gradualmente con lijas al agua desde 400 a 2500, enjuagados con agua ultrapura y secados con nitrógeno. Por otro lado, se utilizaron muestras de 9 mm de diámetro y 2mm de espesor para los ensayos biológicos posteriores.

La electropolimerización de TOH, Carv o ácido trans-ferúlico sobre AZ31 (obteniéndose polyTOH-AZ31, polyCarv-AZ31 y polyFerulico-AZ31, respectivamente) y sobre ZEK100 (obteniéndose polyTOH-ZEK100, polyCarv-ZEK100 y polyFerulico-ZEK100, respectivamente) se realizó por método potenciodinámico modificando los procedimientos reportados en literatura [81,250,251] para generar películas protectoras sobre Mg y aleaciones que permitieran la electroformación de los polímeros sobre la superficie. Se aplicó la técnica de voltametría cíclica entre -0,50V y 1,50V con una velocidad de barrido de 50mVs<sup>-1</sup> y un total de 5 ciclos en un electrolito 0,1M de FF en solución agua/etanol (70:30) con 0,5M salicilato de sodio. En el caso particular de la electropolimerización sobre Mg, la voltamperometría se realizó entre 0,30 y 1,00V, a una velocidad de barrido de 50mVs<sup>-1</sup> y con un total de 10 ciclos, en un electrolito conteniendo TOH o Carv obteniéndose polyTOHMg y polyCarvMg, respectivamente. Cada test fue realizado al menos por triplicado para evaluar la reproducibilidad.

### 6.2.2.1.B. Ensayos electroquímicos de corrosión

Se evaluó el posible comportamiento inhibitorio de la corrosión mediante barridos lineales de potencial y registros de potencial a circuito abierto (PCA) en: 1) MCC a 37°C; 2) caldo nutritivo (Britania, Argentina) a 33 °C. Los barridos lineales de potencial se realizaron con una velocidad de barrido de  $1\text{mVs}^{-1}$  entre -1,80V y 1,10V o hasta  $2,00\text{mAcm}^{-2}$ .

### **6.2.2.2. Análisis superficial por ATR-FTIR, SEM y EDS**

Los espectros de ATR-FTIR de las películas poliméricas sobre las superficies metálicas se realizaron inmediatamente luego de la electropolimerización en un espectrómetro ThermoNicolet Nexus (MIRacle ATR, Pike technologies) con un detector DTGS, una resolución de  $4\text{cm}^{-1}$  y un total de 16 scans.

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) fueron tomadas utilizando un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 200 a 20kV con un detector ETD en modo de detección de electrones secundarios. Las muestras de AZ31y polyTOH-AZ31 luego de 2h de adhesión bacteriana fueron enjuagadas como se describió anteriormente. Posteriormente se fijaron las bacterias adheridas con glutaraldehído al 2% en PBS por 2h a 4°C, y se deshidrataron con una serie de soluciones de etanol a 4°C seguido de secado por punto crítico y un posterior metalizado con una capa fina de oro. El “mapeo” de elementos EDS se realizó a alto voltaje (20kV) y se analizaron los espectros obtenidos.

### **6.2.2.3. Medidas de liberación de iones $\text{Mg}^{2+}$**

Para las medidas de liberación de iones  $\text{Mg}^{2+}$ , las muestras de AZ31 y polyTOH-AZ31 fueron incubadas en 10ml de caldo nutritivo a 33°C durante 14 días. Luego del tratamiento, los sobrenadantes (caldo nutritivo con iones  $\text{Mg}^{2+}$  liberados) fueron transferidos a tubos cónicos y refrigerados a -20°C. Se extrajeron pequeñas alícuotas para medir los iones  $\text{Mg}^{2+}$  por el kit Mg-calmagita (BioSystems S.A. Barcelona, España) [252]. Los iones  $\text{Mg}^{2+}$  de las muestras reaccionan con el reactivo calmagita en medio alcalino formando un complejo coloreado que fue medido por espectrofotometría a 520nm en un equipo Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Japón). Para el cálculo de la concentración de iones  $\text{Mg}^{2+}$  se realizaron curvas de calibración con caldo nutritivo y  $\text{MgSO}_4$  a diferentes concentraciones. Se realizó el análisis estadístico por el test de Student.

### **6.2.3. Ensayos biológicos**

#### **6.2.3.1. Ensayos de viabilidad celular sobre la superficie**

Para el ensayo de viabilidad a 24h se utilizaron células preosteoblásticas de la línea MC3T3-E1. Las células fueron crecidas en condiciones normales de cultivo sobre las muestras de AZ31 y polyTOH-AZ31 en placas 6 pocillos conteniendo 5ml de medio DMEM (MCC). Luego de 24h de incubación, las superficies obtenidas fueron teñidas con naranja de acridina y examinadas inmediatamente por microscopía de epifluorescencia. Se analizó el porcentaje de área cubierta por células sobre las muestras con y sin tratamiento superficial. Se llevaron a cabo más de tres ensayos independientes para asegurar la reproducibilidad. Los análisis estadísticos para las comparaciones entre múltiples tratamientos se realizaron mediante ANOVA de un factor y el test de Bonferroni.

#### **6.2.3.2. Ensayos microbiológicos**

Los cultivos de *S. aureus* ATCC 25923 se realizaron en 100ml de caldo nutritivo durante 10h a 35°C con agitación a 250 rpm. A la suspensión de bacterias se le añadió caldo nutritivo fresco para conseguir una concentración de bacterias de  $1 \times 10^6$  bacterias/ml y ésta fue utilizada en los ensayos siguientes. Las muestras de AZ31 y polyTOH-AZ31 fueron montadas en placas de 6 pocillos y se sembraron 9ml de la suspensión bacteriana a cada sustrato para cultivarlas a 33°C por 2 h y permitir la adhesión bacteriana. Los sustratos con bacterias adheridas fueron removidos y enjuagados en agua bidestilada estéril para eliminar las bacterias no adheridas a las muestras. Las bacterias adheridas irreversiblemente al sustrato se desprendieron en 1ml de agua bidestilada estéril, mediante sonicación por 15 min [95]. El número de bacterias en la suspensión sonicada fue determinado por diluciones seriadas seguidas de un cultivo bacteriano en agar nutritivo. Se realizaron réplicas experimentales hasta obtener un n=10 por cada condición. Adicionalmente, la adhesión bacteriana se observó por microscopía de epifluorescencia mediante tinción con naranja de acridina. Se realizó un análisis estadístico por test de student.

### **6.2.3.3. Tratamiento mixto de bacterias sésiles utilizando películas poliméricas y un antibiótico**

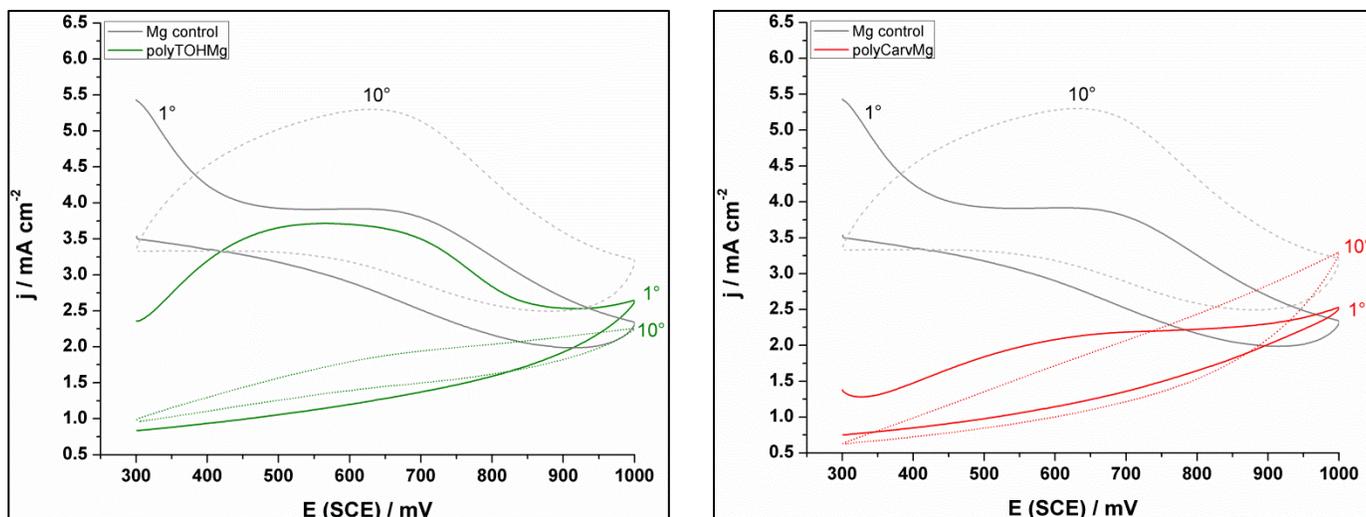
Los ensayos de viabilidad con levofloxacina de *S. aureus* sésiles se realizaron como se describió previamente en Miñán 2016 [90]. Brevemente, la concentración mínima inhibitoria (MIC) de levofloxacina para *S. aureus* planctónicas se determinó siguiendo los lineamientos de Clinical & Laboratory Standards Institute [105]. Seguido a esto, la actividad antimicrobiana de levofloxacina frente a bacterias sésiles adheridas a AZ31 y polyTOH-AZ31 fue analizada a 0,5XMIC (0,25µg/ml) durante 20 h a 37°C. Finalmente, los sustratos se enjuagaron y se realizó el conteo de bacterias adheridas como se mencionó en la sección 6.2.3.2. Se analizaron los resultados estadísticamente utilizando el test no paramétrico Kolmogorov-Smirnov.

## **6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.3.1. Electroformación de polímeros de timol y carvacrol sobre Mg**

#### **6.3.1.1. Registros potencidinámicos**

En un principio se utilizó Mg puro para evaluar la posibilidad de la generación de películas electropoliméricas que pudieran reducir la tasa de corrosión metálica. Para ello se llevó a cabo la electropolimerización por voltamperometría cíclica (entre 0,30 y 1,00V, 50mVs<sup>-1</sup>, 10 ciclos) en una solución hidroalcohólica 0,5M de salicilato de sodio conteniendo 0,1M de TOH o Carv, obteniendo así superficies homogéneas y transparentes sobre la superficie del metal.



*Fig. 6.1. 1° y 10° ciclos voltamperométricos realizados a  $50\text{mVs}^{-1}$  con electrodos de Mg en agua/etanol (70:30) con 0,5M salicilato de sodio conteniendo 0,1M TOH (verde) o Carv (rojo) y en mismo electrolito sin fitocompuesto (gris).*

Como se observa en la Fig. 6.1, el registro potenciodinámico de Mg en electrolito sin FF presenta, como se reportó previamente para aleaciones de Mg [86,250,251,253], una región entre 0,30 y 1,00V correspondiente a la formación de la película de salicilato de Mg seguido de un descenso de la densidad de corriente luego de los 0,70V [251,253]. La adición de TOH o Carv al electrolito genera una disminución de la densidad de corriente en todo el registro, observándose en el primer ciclo una región de oxidación que correspondería a la oxidación de TOH o Carv dentro del mismo rango de potencial donde ocurre la formación del salicilato de Mg. En los ciclos sucesivos no se observan las contribuciones de los picos de oxidación de los FF aunque la densidad de corriente es relativamente alta como se reportó para el pirrol sobre AZ91 y AZ31 en un electrolito similar conteniendo salicilato de sodio [81,86,251].

### **6.3.1.2. Respuesta electroquímica de las películas de polyCarv y polyTOH sobre Mg en medio biológico DMEM**

Se realizaron ensayos electroquímicos de corrosión del Mg recubierto con las películas utilizando medio de cultivo celular DMEM a  $37^\circ\text{C}$  como electrolito. Los ensayos consistieron en barridos lineales de potencial entre -1,80V a -0,80V a  $1\text{mVs}^{-1}$ , y registro de

potencial a circuito abierto durante 3 h. Los barridos lineales de potencial de las muestras de Mg recubiertas con polyTOH no mostraron un corrimiento del potencial de picado significativo ni disminución de la densidad de corriente frente al registro del Mg control (Fig. 6.2). La película de polyCarvMg genera un aumento de la densidad de corriente del registro y un potencial de picado más catódico que el del control de Mg.

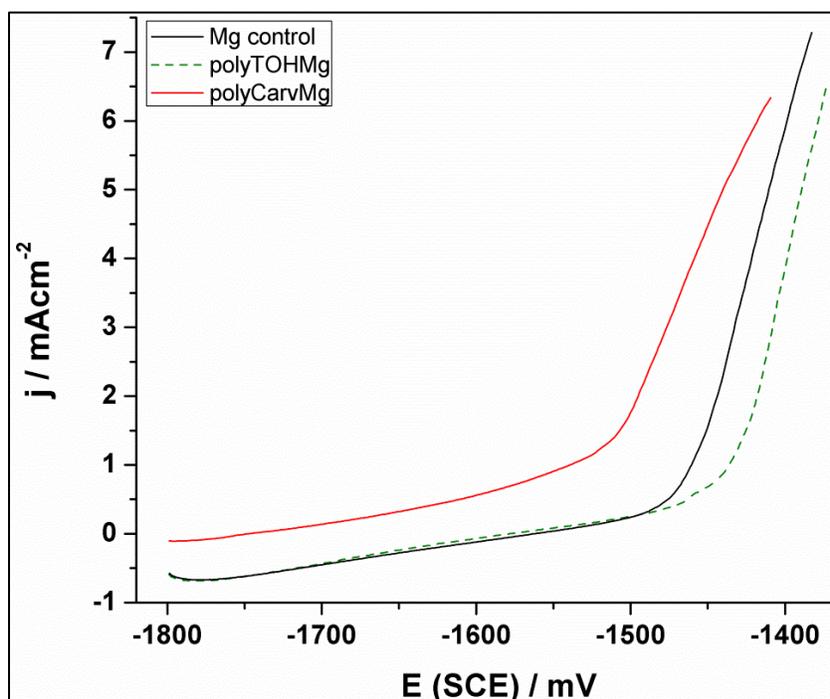


Fig. 6.2. Curvas de polarización anódica realizadas a  $1\text{mVs}^{-1}$  para Mg con las distintas películas en DMEM a  $37^\circ\text{C}$ .

En el registro de potencial a circuito abierto (PCA) en medio de cultivo a  $37^\circ\text{C}$  (Fig. 6.3) se observa que el Mg control y el polyCarvMg pierden la pasividad a tiempos cortos de inmersión (antes de los 20 min, se distingue una caída del PCA y posteriormente la evolución irregular del registro) indicando la baja capacidad inhibitoria de la corrosión que poseen el  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  y la película de polyCarv. La efectividad de la película de polyTOH sobre Mg es mayor a la del polyCarv, logrando un retraso en la ruptura de la pasividad del Mg que llega hasta los 100 min.

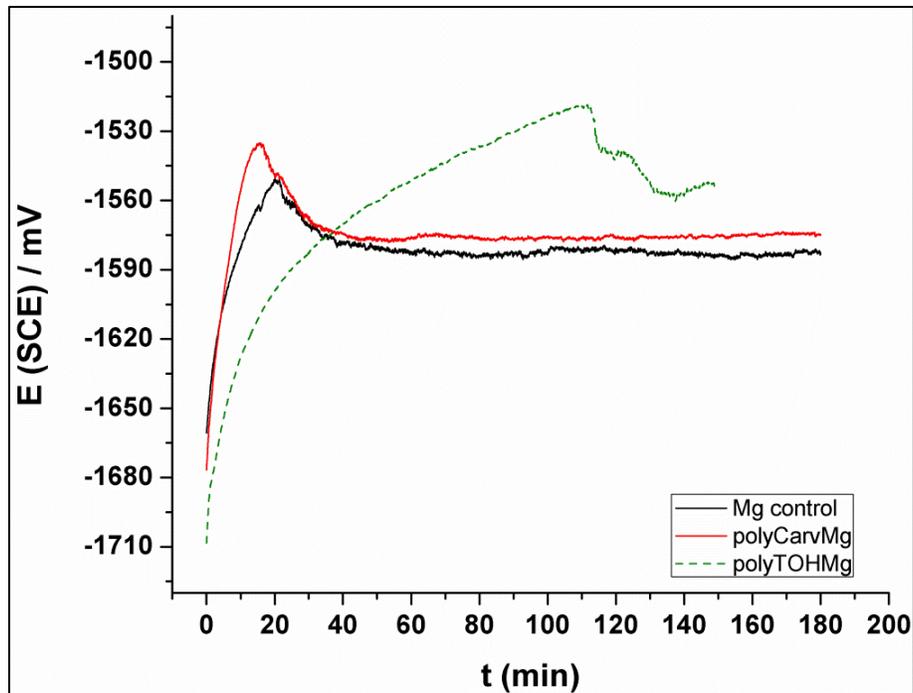


Fig. 6.3. Registro de PCA en DMEM a 37°C durante 3h para Mg con y sin recubrimientos.

Las superficies resultantes de la inmersión por 3 h en medio de cultivo se observaron mediante microscopía óptica con objetivo metalográfico (Fig. 6.4). En ellas se destaca la severa corrosión del material evidenciando que las películas de FF no poseen efecto inhibitorio de la corrosión del Mg en las condiciones experimentales ensayadas.

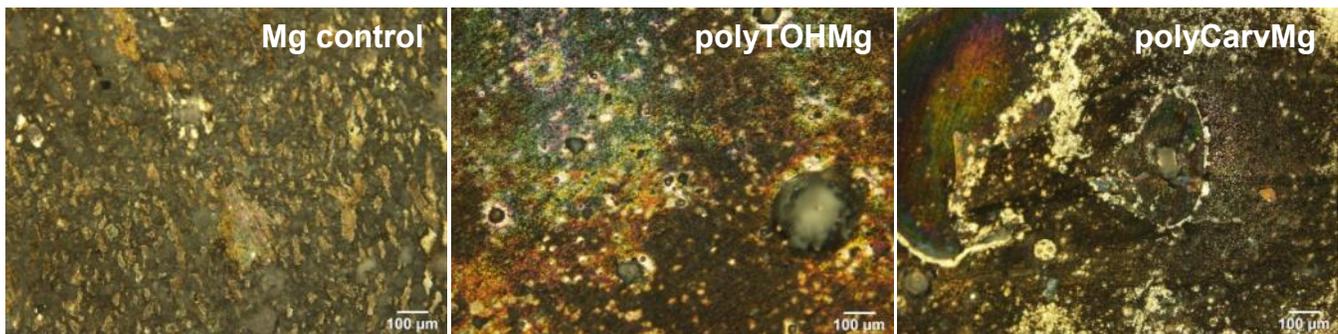


Fig. 6.4. Fotomicrografía de Mg control, polyTOHMg y polyCarvMg luego de 3 h de inmersión en medio de cultivo celular DMEM a 37°C.

En base a los resultados obtenidos se pudo concluir que, en las condiciones electroquímicas empleadas, el TOH y el Carv generan una película sobre la superficie del Mg, pero dado que los ensayos de evaluación de la inhibición de la corrosión mostraron comportamientos electroquímicos propios de metales activos, se procedió a evaluar el efecto de las películas poliméricas sobre aleaciones de Mg con menor tasa de degradación: AZ31 y ZEK100.

### **6.3.2. Electroformación de polímeros de timol, carvacrol y ácido trans-ferúlico sobre AZ31**

Considerando la capacidad del TOH y el Carv en formar películas poliméricas sobre Mg en un electrolito conteniendo salicilato de sodio, y que las aleaciones base Mg poseen menor tasa de corrosión que el Mg puro, se propuso estudiar la electropolimerización de TOH, Carv y ácido trans-ferúlico sobre AZ31 a fin de obtener una condición película-biomaterial con control de la corrosión y efecto antiadherente bacteriano. Para ello se llevaron a cabo registros potenciodinámicos, ensayos electroquímicos de corrosión en caldo nutritivo y medio de cultivo DMEM, caracterizaciones superficiales por espectroscopía ATR-FTIR y, en el caso particular de la mejor condición seleccionada, se realizaron análisis por microscopía SEM, espectroscopía EDS, técnicas colorimétricas de medición de iones  $Mg^{2+}$  liberados, enumeración y observación microscópica de bacterias adheridas a los sustratos.

#### **6.3.2.1. Registros potenciodinámicos**

La Fig. 6.5 muestra los sucesivos ciclos potenciodinámicos entre -0,50V y 1,50V de electrodos de AZ31 inmersos en 0,1M de FF en agua/etanol (70:30) con 0,5M salicilato de sodio. En ausencia de FF se observa durante el barrido anódico un pico amplio de densidad de corriente con un máximo cercano a 0,40V. A potenciales mayores, la densidad de corriente disminuye de  $6,80\text{mAcm}^{-2}$  a  $2,00\text{mAcm}^{-2}$  permaneciendo baja durante el barrido en sentido catódico, debido a la formación de la película pasiva de salicilato de Mg [251,253]. En presencia de TOH y Carv en el electrolito, la densidad de corriente total del espectro disminuye y se pueden distinguir dos picos de corriente durante el barrido anódico (uno cercano a 0,75V y otro a 1,25V en ambos registros).

Durante los ciclos sucesivos se observan menores densidades de corriente ( $3\text{mAcm}^{-2}$ ) que las registradas durante el primer ciclo.

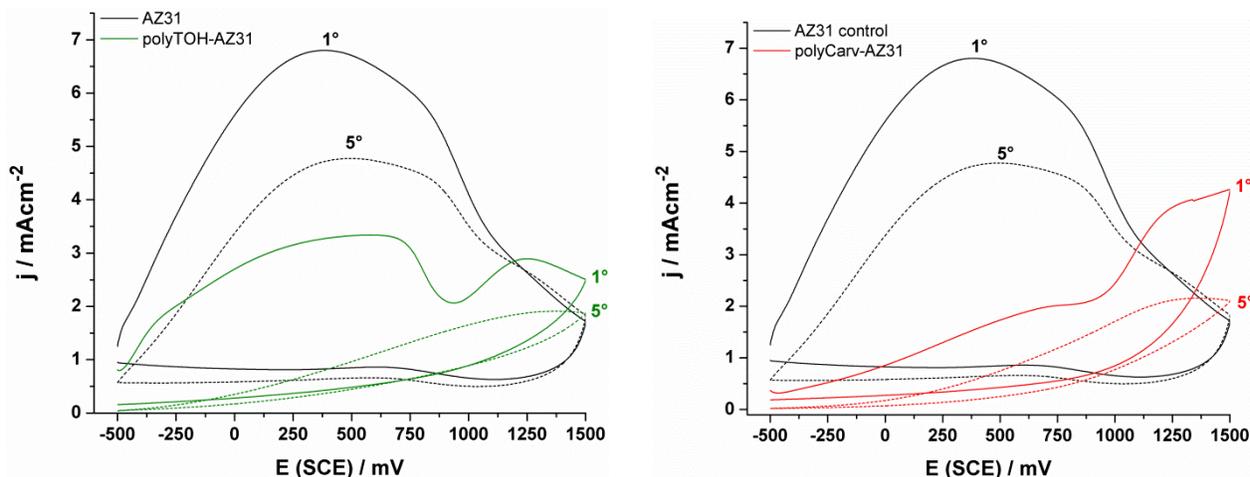


Fig. 6.5. 1° y 5° ciclos voltamperométricos realizados a  $50\text{mVs}^{-1}$  con electrodos de AZ31 en agua/etanol (70:30) con 0,5M salicilato de sodio conteniendo 0,1M TOH (verde, izquierda) o Carv (rojo, derecha) y en mismo electrolito sin fitocompuesto (negro).

En la Fig.6.6 se muestran registros potenciodinámicos correspondientes a AZ31 en presencia de ácido trans-ferúlico en el electrolito, observándose un pico de corriente anódico presente sólo en el primer ciclo a potenciales cercanos a 0,35V (ver ampliación en Fig. 6.6 derecha) seguido de un aumento de la densidad de corriente hasta llegar a 1,50V y un descenso de la densidad de corriente durante el barrido en sentido catódico que continúa en los siguientes ciclos ( $24\mu\text{Acm}^{-2}$  al finalizar el último ciclo). La superficie resultante se muestra transparente y brillante.

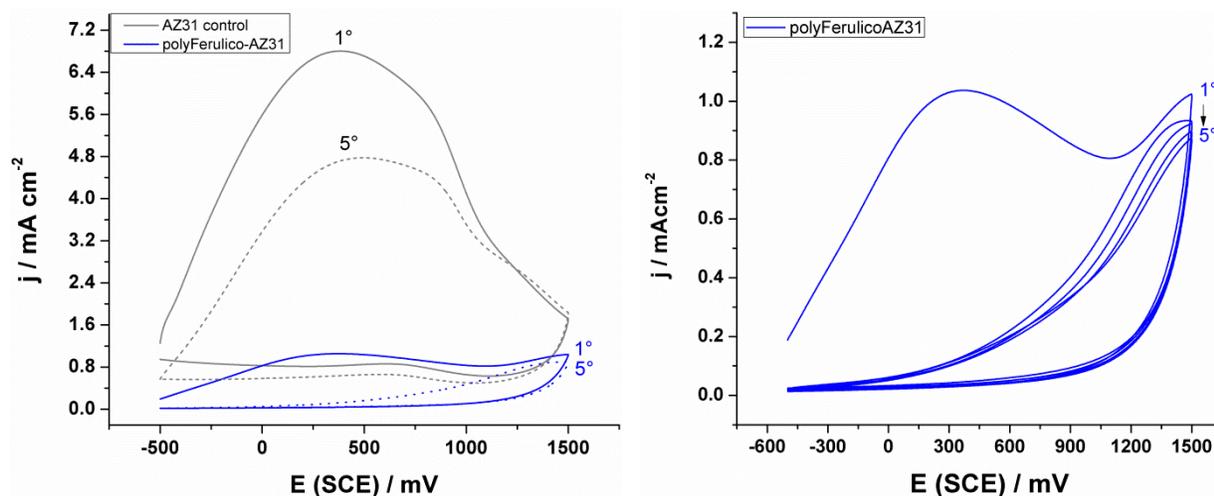


Fig. 6.6. 1° y 5° ciclos voltamperométricos realizados a  $50\text{mVs}^{-1}$  con electrodos de AZ31 en agua/etanol (70:30) con 0,5M salicilato de sodio conteniendo 0,1M ácido trans-ferúlico (azul) y en mismo electrolito sin fitocompuesto (negro). A la derecha se muestra el registro con el fitocompuesto a mayor magnificación.

### 6.3.2.2. Espectros ATR-FTIR de electropolímeros sobre AZ31

Se estudió la estructura de los polímeros generados sobre AZ31 mediante espectroscopía ATR-FTIR. El espectro de polyTOH-AZ31 (Fig. 6.7) muestra señales adicionales a  $1494$ ,  $1452$  y  $1176\text{cm}^{-1}$  que son características de fenoles polisustituídos y dan indicios del estado polimerizado de la película. Las uniones éter, también correspondientes principalmente a la banda de  $1176\text{cm}^{-1}$ , denotan oxidación de TOH durante la polimerización [157]. Se observa una contribución particular conocida como  $\nu$ -OH libre de puentes hidrógeno (tanto entre monómeros como con moléculas de agua) [177,178,180] a  $3528\text{cm}^{-1}$  descrita en capítulos anteriores. Algunos autores atribuyen esta señal a agua ocluida entre la matriz polimérica [178,184].

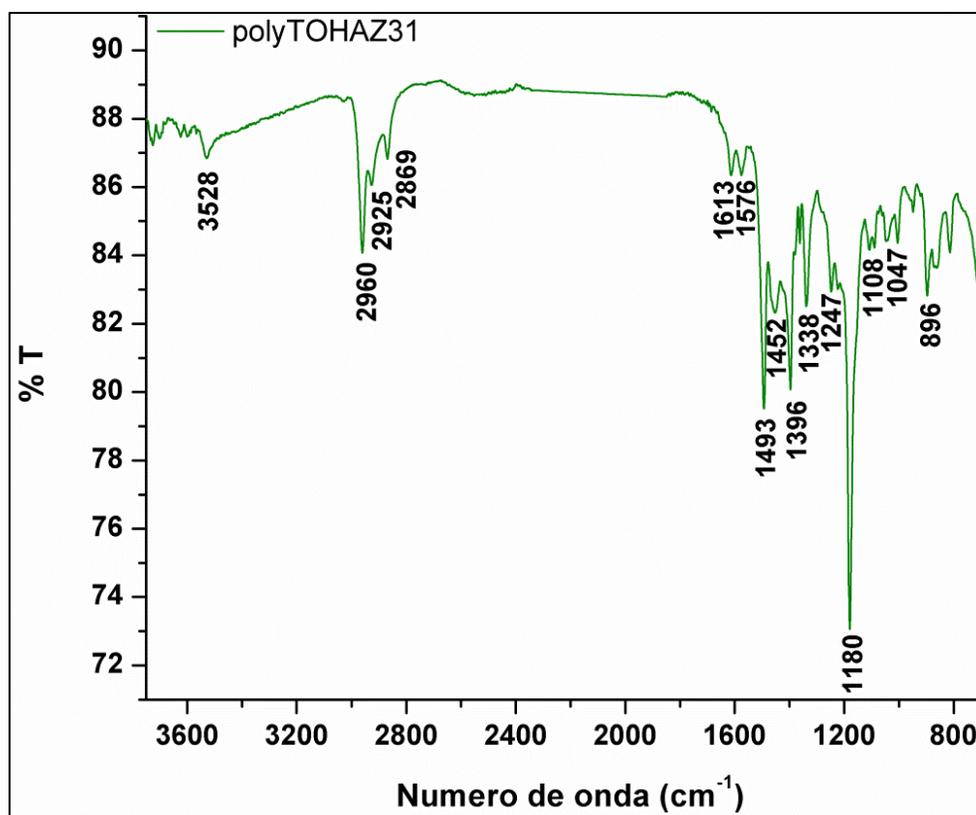


Fig. 6.7. Espectro ATR-FTIR de polyTOH-AZ31.

En el espectro de polyCarv-AZ31 (Fig. 6.8) pueden observarse picos a 3024, 1490, 1398, 1341, 1010, 865, 818, 713 y 674cm<sup>-1</sup>, atribuidos a vibraciones del anillo fenólico y señales a 1235 y 1178cm<sup>-1</sup> correspondientes a uniones -C-O de grupos éter. Se observan contribuciones a 2959 y 2877cm<sup>-1</sup> asignadas a vibraciones  $\nu_{as}$ -CH<sub>3</sub> y  $\nu_s$ -CH<sub>3</sub>, respectivamente. Adicionalmente se encontraron bandas atribuidas al grupo isopropilo en 1453 y 1440cm<sup>-1</sup>. En base a estos resultados se pudo concluir que la estructura polimérica de polyCarv-AZ31 no presenta grupos -OH (por la ausencia de bandas entre 3500 y 3000cm<sup>-1</sup>) y las uniones entre monómeros se llevarían a cabo por uniones éter.

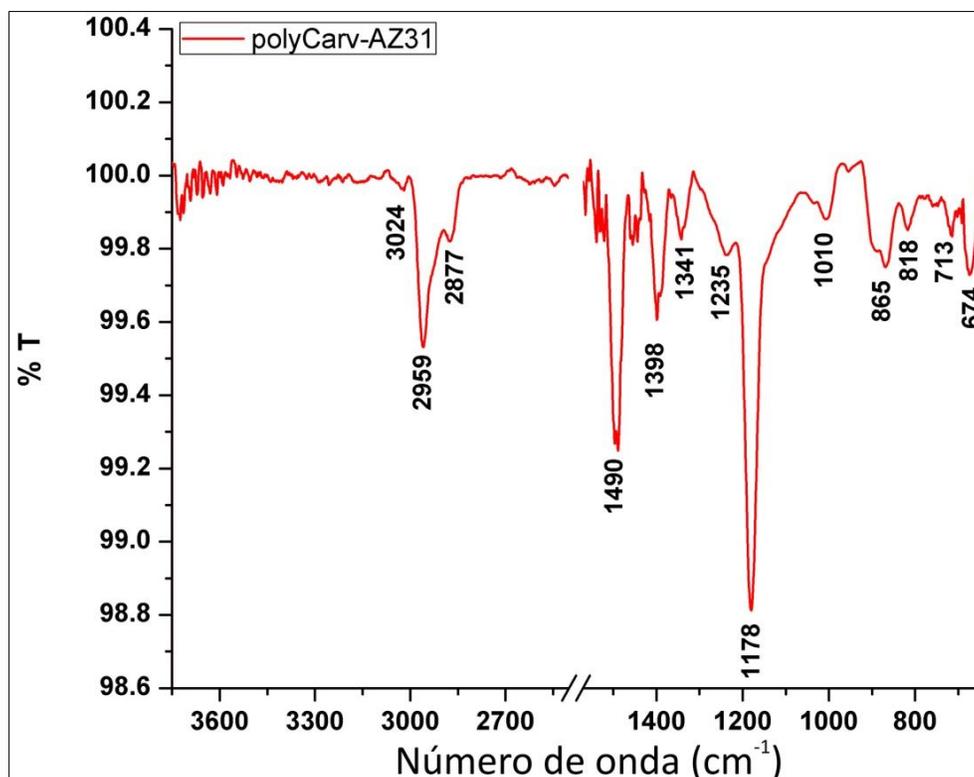


Fig. 6.8. Espectro ATR-FTIR de polyCarv-AZ31.

El espectro ATR-FTIR de polyFerulico-AZ31 (Fig. 6.9) presenta un pico a  $3730\text{cm}^{-1}$ , correspondiente a vibraciones del grupo  $-\text{OH}$  sin uniones puente hidrógeno, con una contribución ancha entre  $3730$  y  $3479\text{cm}^{-1}$ , atribuible a vibraciones  $\nu_{\text{OH}}$ , picos a  $2961$ ,  $2923$  y  $2877\text{cm}^{-1}$  asignadas a  $\nu_{\text{as}}-\text{CH}_3$ ,  $\nu_{\text{as}}-\text{CH}_2$  y  $\nu_{\text{s}}-\text{CH}_3$  respectivamente [158]. Adicionalmente se observan bandas a  $1504$ ,  $1403$ ,  $1013$ ,  $958$  y  $862\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a vibraciones del anillo aromático, y picos a  $1220$  y  $1180\text{cm}^{-1}$  asociados a uniones  $-\text{C}-\text{O}$  [158,159]. Como conclusión, la estructura del polímero de polyFerulico-AZ31 presentaría uniones éter entre los monómeros y grupos  $-\text{OH}$  o agua recludos en la matriz polimérica incapaces de formar uniones puente hidrógeno [158].

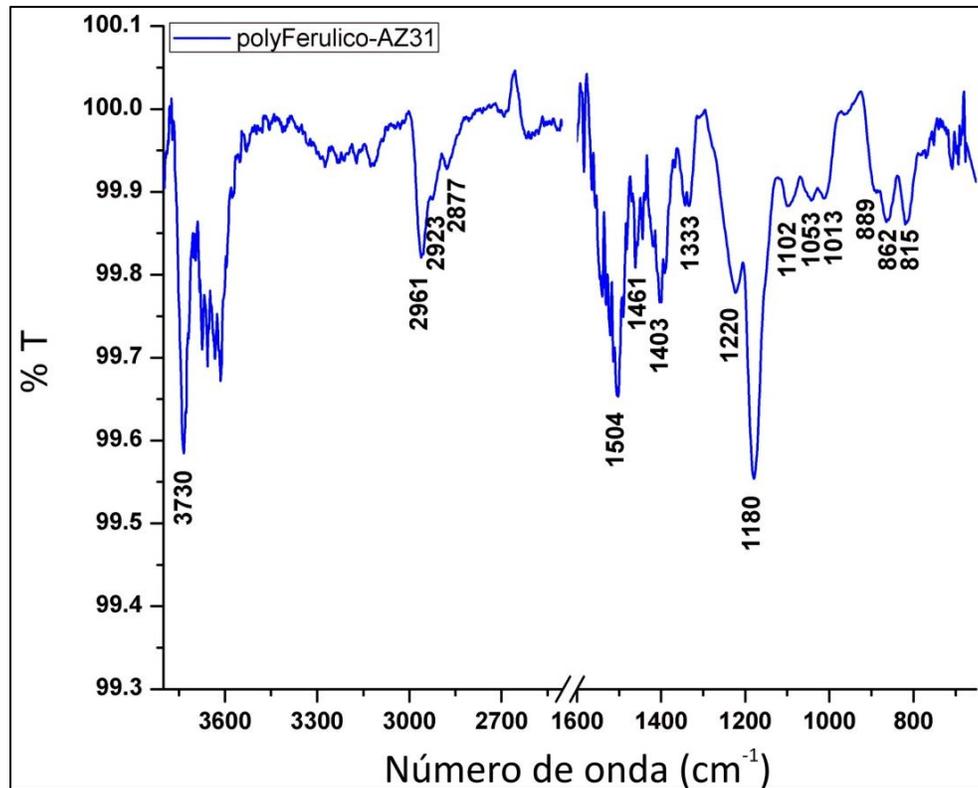


Fig. 6.9. Espectro ATR-FTIR de polyFerulico-AZ31.

### 6.3.2.3. Ensayos de corrosión en medio biológico DMEM

Para evaluar la corrosión en los materiales con recubrimientos se realizaron curvas de polarización de polyTOH-AZ31, polyCarv-AZ31 y polyFerulico-AZ31 en medio de cultivo DMEM a 37°C, con una velocidad de barrido de 1mVs<sup>-1</sup> entre -1,80V y 1,10V o hasta 2,00mAcm<sup>-2</sup>.

En los ensayos electroquímicos de corrosión utilizando DMEM se observó (Fig. 6.10, izquierda) que el polyTOH presenta un mayor efecto pasivante de la aleación, con un potencial de picado más anódico que el observado para AZ31 control (-1469±9mV para AZ31 control y -1432±23mV para polyTOH-AZ31). Asimismo, en la Fig. 6.10, derecha se observó un descenso de la densidad de corriente de la rama anódica, una menor corriente de corrosión (22±2μAcm<sup>-2</sup> para AZ31 y 3±1μAcm<sup>-2</sup> para polyTOH-AZ31), un potencial de corrosión más anódico (-1654±21mV para AZ31 y -1577±14mV para polyTOH-AZ31), disminuyendo la tasa de corrosión de AZ31. Los registros realizados para el polyFerulico-AZ31 evidenciaron un potencial de picado de -1382±28mV, aproximadamente 90mV más

anódico que el observado para el control de AZ31, un descenso de la corriente de corrosión llegando a valores de  $15,33 \pm 1,90 \mu\text{Acm}^{-2}$  y un corrimiento anódico del potencial de corrosión de aproximadamente 70mV frente al control de AZ31. A diferencia del comportamiento de polyTOH-AZ31 y polyFerulico-AZ31, la película de polyCarv provoca un corrimiento en el potencial de corrosión hacia valores catódicos y sólo se observa un corrimiento anódico del potencial de picado de aproximadamente 70mV.

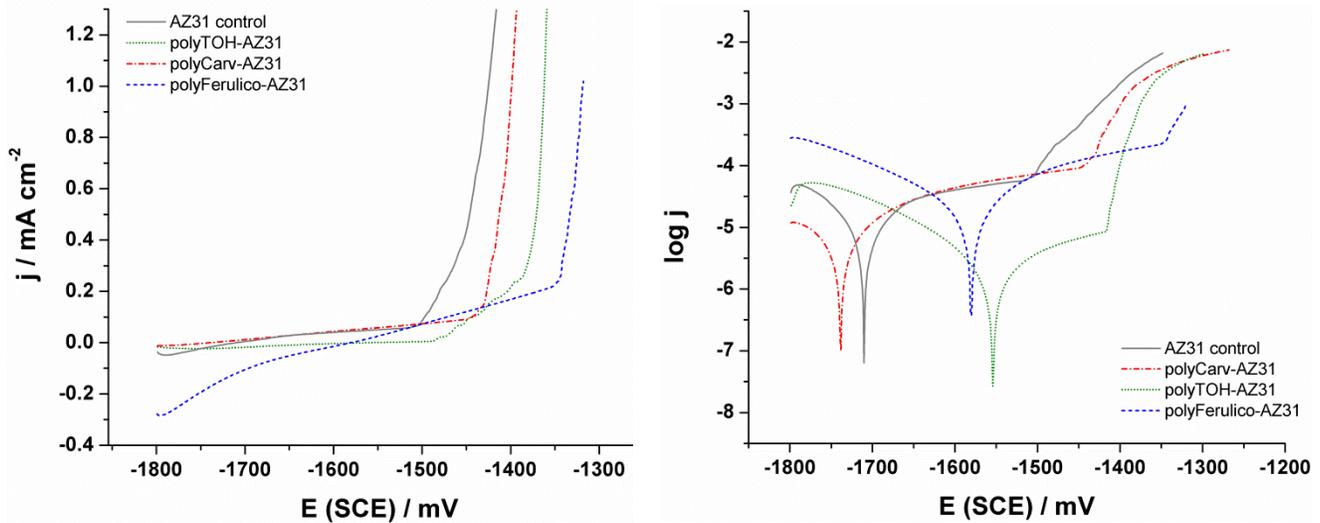


Fig. 6.10. Curvas de polarización anódica (izquierda) y curvas de Tafel (derecha) realizadas a  $1\text{mVs}^{-1}$  en medio de cultivo DMEM a  $37^\circ\text{C}$  para las muestras de AZ31 con y sin recubrimientos.

Adicionalmente se realizaron registros de potencial a circuito abierto (PCA) en DMEM a  $37^\circ\text{C}$  para los electrodos de AZ31 con recubrimiento. El registro de PCA se mantuvo estable durante 3 h para la aleación con los distintos recubrimientos, mientras que el AZ31 sin tratar después de aproximadamente 170 min sufrió una drástica caída de potencial que daría cuenta del ataque localizado (Fig. 6.11).

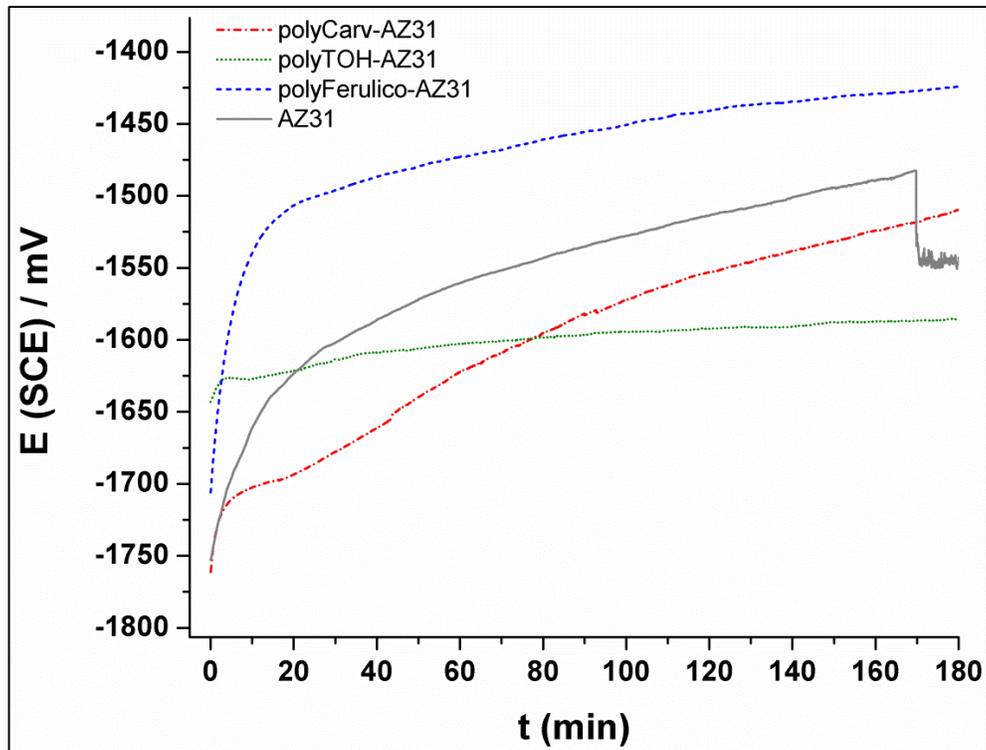


Fig. 6.11. Registro de potencial a circuito abierto realizado en medio DMEM a 37°C para las muestras de AZ31 con y sin recubrimientos.

Considerando los datos obtenidos de los barridos lineales de potencial y los registros de potencial a circuito abierto en medio DMEM, puede concluirse que la película de polyTOH-AZ31 posee mejores propiedades inhibitorias de la corrosión de la aleación AZ31 que los recubrimientos de polyFerulico y polyCarv. Se ha constatado que el polyTOH-AZ31 presenta un corrimiento anódico del potencial de corrosión y de picado, y una disminución de la corriente de la rama anódica y de la corriente de corrosión en un orden de magnitud frente al control de AZ31. El comportamiento del polyFerulico mostró un corrimiento del potencial de corrosión y de picado, pero no se vieron modificadas la corriente de la rama anódica y la corriente de corrosión. A diferencia de los tratamientos con ácido transferulico y con TOH, el polyCarv-AZ31 presenta sólo un corrimiento anódico del potencial de corrosión, lo cual indica que no logra un efecto significativo en el control de la corrosión de AZ31. En conclusión, el polyTOH-AZ31 fue la condición de recubrimiento seleccionada para proseguir con el estudio de adhesión y distribución superficial bacteriana y de corrosión en caldo nutritivo bacteriano.

#### **6.3.2.4. Distribución específica de bacterias sobre AZ31. Protección de la corrosión e inhibición de la adhesión bacteriana por una película polimérica de timol**

Uno de los objetivos de esta sección del trabajo de Tesis fue analizar la distribución de bacterias durante la degradación de AZ31 y de polyTOH-AZ31 y detectar posibles sitios preferenciales para su adherencia según la composición superficial. Con el fin de evaluar la distribución de bacterias adheridas según la composición superficial se realizaron caracterizaciones superficiales de las áreas cubiertas y descubiertas de bacterias así como ensayos de corrosión en caldo nutritivo a 33°C. Tomando en cuenta las propiedades deseables (control de la corrosión y efecto antiadherente bacteriano) de implantes biodegradables, se presenta el diseño de un recubrimiento multifuncional de polyTOH (electropolímero de TOH).

##### **6.3.2.4.A. Análisis de la corrosión de AZ31 por SEM y EDS**

Las muestras de AZ31 sin recubrimiento fueron inmersas en un cultivo de *S. aureus* por 2h a 33°C para lograr la adherencia de las bacterias a la superficie metálica. Los discos metálicos se enjuagaron para desprender las bacterias no adheridas, luego se fijaron con glutaraldehído 2%, se deshidrataron en diluciones seriadas de etanol seguido de secado por punto crítico y metalizado para observarlas mediante microscopía SEM. Las imágenes de microscopía SEM se muestran en la Fig. 6.12 donde se observa un fuerte ataque localizado en la superficie de AZ31 sin recubrimiento electropolimérico y la presencia de productos de corrosión en forma de ampollas circulares así como una película de productos de corrosión que, por efecto de la deshidratación se encuentra agrietada. Estos resultados son similares a los reportados en trabajos previos, en ausencia de bacterias [254,255]. En la Fig. 6.12 se incluye el análisis EDS de la superficie en 3 zonas indicadas en la imagen SEM como 1, 2 y 3.

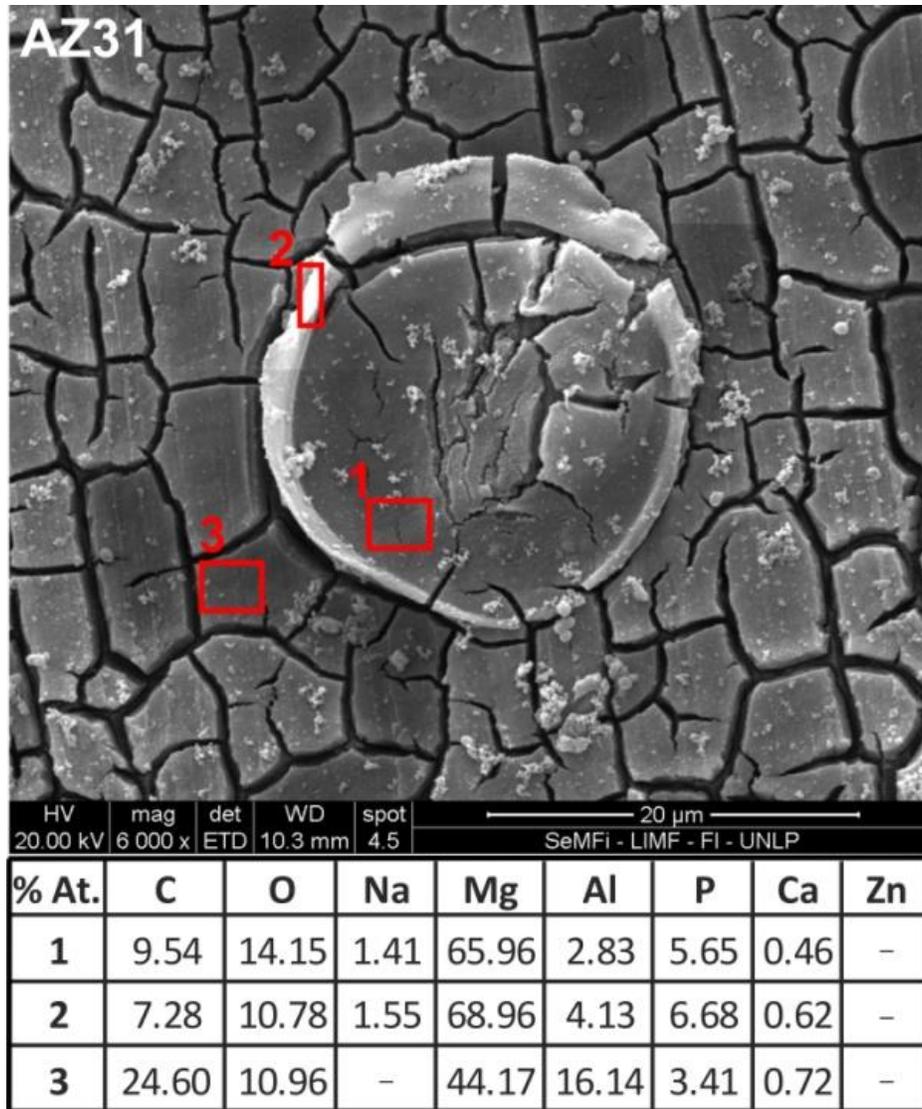


Fig. 6.12. Imagen SEM (arriba) y análisis EDS (abajo) de diferentes regiones (1, 2 y 3) de la muestra de AZ31 luego de la inmersión en cultivo de *S. aureus*. Los productos de corrosión forman una ampolla. (-) indica no detectable.

En la Fig. 6.13 se muestra la imagen SEM y los “mapeos” de elementos en zonas de AZ31 (sin recubrimiento) de mayor área que la presentada en la Fig. 6.12. Puede observarse la presencia de regiones donde la señal de Mg es muy baja (zonas negras) con alto contenido de oxígeno. Estas zonas oscuras corresponden a las ampollas y depósitos de productos de corrosión con bajo % de Mg. Para investigar dichas zonas, se incluyeron los análisis de los spots 1, 2 y 3 en la Fig. 6.12 (ver tabla en Fig. 6.12). Estas regiones presentaron una señal más alta de O, P, C y Al que el resto de la superficie.

Consecuentemente, los depósitos y las ampollas, especialmente en la zona 3, contendrían una alta relación Al/Mg (en forma de hidróxidos, fosfatos y carbonatos). Esto concuerda con publicaciones previas donde atribuyen depósitos similares a la formación de hidróxido de Mg seguido de la precipitación de fosfatos y carbonatos debido al incremento local de pH y a la baja solubilidad de estas sales con bajo porcentaje atómico de Mg [19,254,256,257].

Se ha reportado que la difusión de CO<sub>2</sub> hacia la superficie provoca la formación de carbonatos sobre la misma [257]. Algunos autores sugieren que este proceso puede estar relacionado con la alta porosidad del film de hidróxidos/óxidos formados en la capa de pasivante de materiales base Mg, facilitando la difusión de CO<sub>2</sub>. La adsorción y precipitación de material orgánico no debe descartarse cuando se tiene en cuenta la señal de C. La señal de Al muestra una alta relación Al/Mg comparado con la composición de la aleación, demostrando la existencia de un proceso de dealado en los sitios de corrosión que lleva a la formación de hidróxidos, carbonatos y fosfatos de aluminio. Se detectó adicionalmente un bajo contenido de Ca y Na, probablemente asociado a la precipitación de carbonatos de Ca desde el caldo nutritivo. En las rajaduras observadas en la superficie no se detectaron señales de P y C, indicando ausencia de fosfatos y carbonatos en dichas zonas.

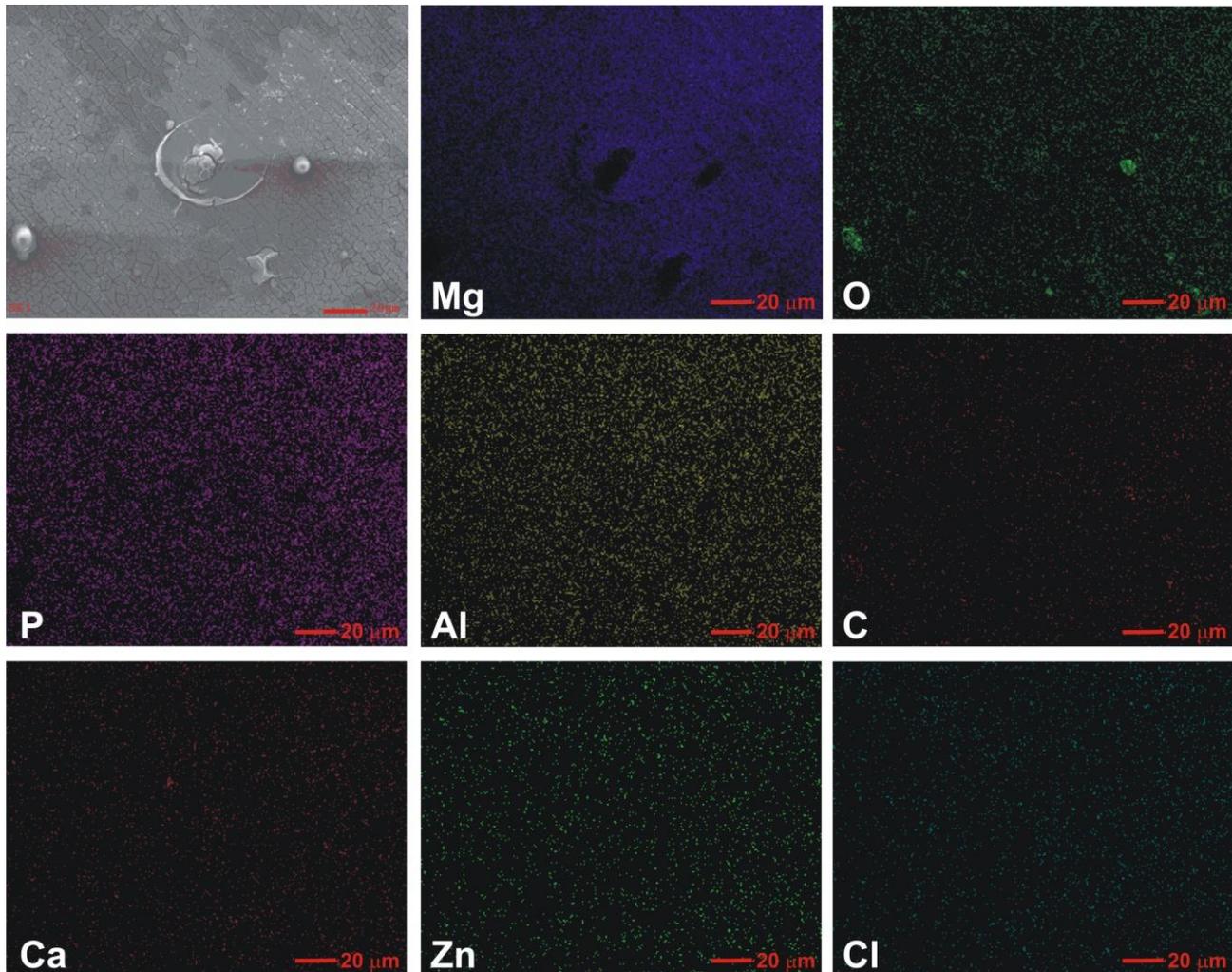


Fig. 6.13. "Mapeo" de elementos en AZ31 sin recubrimiento luego de 2 h de inmersión en cultivo de *S. aureus*.

#### 6.3.2.4.B. Distribución de bacterias adheridas sobre AZ31 sin recubrimiento durante la degradación

Paralelamente se prepararon muestras de AZ31 control con bacterias adheridas para observar la distribución de las bacterias por microscopía de epifluorescencia mediante tinción con naranja de acridina. Las imágenes mostradas en las Fig. 6.14A y 6.14B revelan ampollas y pits de corrosión, en concordancia con las imágenes de SEM pero, luego de la tinción con naranja de acridina puede detectarse una distribución no uniforme de las bacterias adheridas sobre la superficie de AZ31. Las bacterias adheridas se encontraron preferentemente sobre los productos de corrosión donde, además de Mg, Al,

se detectó la presencia de señales de P, C, O y Ca por EDS (Fig. 6.15). Podemos inferir que los centros de corrosión activos con liberación de burbujas de hidrógeno (observadas a simple vista), asociadas con cambios locales de pH no son sustratos adecuados para la adherencia bacteriana. Los depósitos de productos de corrosión parecen ser más biocompatibles para la adhesión de dichos microorganismos (Fig. 6.14C), frente a las zonas sin corroer.

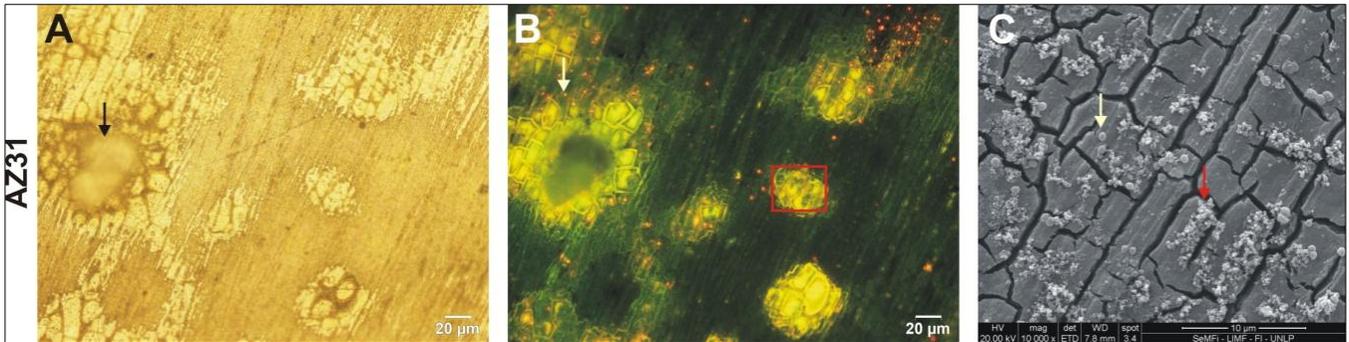


Fig. 6.14. A) y B) Imágenes de microscopía óptica mostrando sitios donde ocurre la adhesión bacteriana (en coloración naranja por la tinción con naranja de acridina), las flechas indican pit de corrosión (flecha negra) y bacterias adheridas (flecha blanca); C) imagen SEM mostrando la presencia de bacterias (flecha blanca) sobre los productos de corrosión de AZ31 y materia orgánica precipitada (flecha roja).

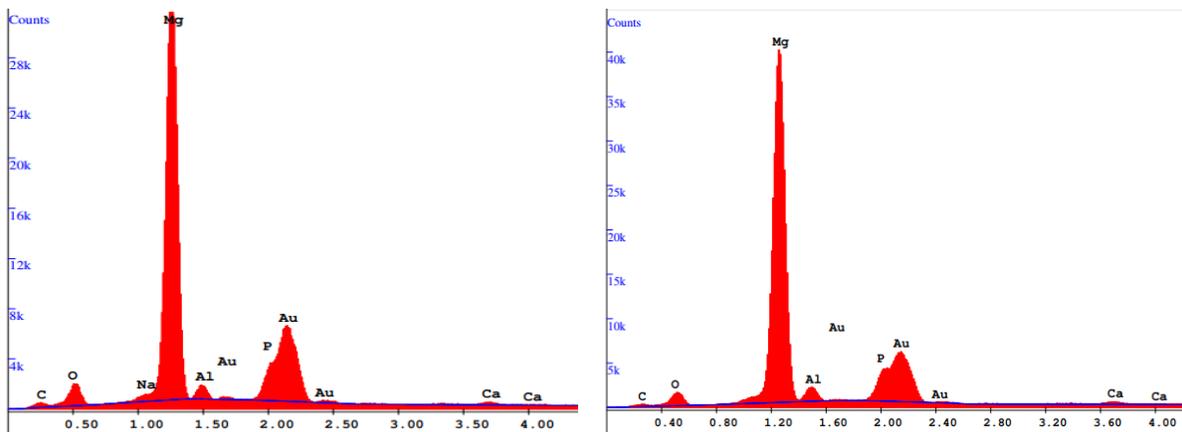


Fig. 6.15. Análisis EDS de dos zonas con alta densidad de bacterias adheridas sobre los productos de corrosión relacionadas con la Fig. 5.3B y C.

#### 6.3.2.4.C. Estudios de corrosión y caracterización de productos de corrosión formados sobre polyTOH-AZ31

Con el objeto de estudiar las características protectoras de la película polimérica de polyTOH en el medio biológico empleado en los cultivos bacterianos, se realizaron barridos lineales de potencial en caldo nutritivo a 33°C, cuyos resultados se observan en las Fig. 6.16A y B. Allí puede observarse que durante el barrido anódico desde -1,80V hasta -0,80V la densidad de corriente se mantiene baja hasta -1,30V donde comienza a incrementarse rápidamente en el caso de polyTOH-AZ31 mientras que para AZ31 sin recubrimiento los valores de corriente registrados son más altos y evolucionan en forma lineal. Las curvas de Tafel muestran que el potencial de corrosión se corre a potenciales más negativos (-1,67±0,01V para el control de AZ31 y -1,72±0,01V (vs SCE) para polyTOH-AZ31). Este comportamiento puede atribuirse a la formación del film de Mg(OH)<sub>2</sub> inmediatamente posterior a la inmersión en el electrolito utilizado para la electropolimerización [245]. Sin embargo, se registra una baja corriente de corrosión para polyTOH-AZ31 (6,74±2,61mAcm<sup>-2</sup> para polyTOH-AZ31 y 96,90±7,65mAcm<sup>-2</sup> para el control de AZ31) con una rama anódica un orden de magnitud menor que lo observado para el control de AZ31. Luego de la polarización anódica se observa corrosión localizada en las muestras con y sin recubrimiento. El control de AZ31 presenta un fuerte ataque de corrosión con grandes áreas de ataque localizado (Fig. 6.16C). La superficie de polyTOH-AZ31 se observa con brillo debido a la presencia del recubrimiento polimérico transparente con pocos sitios pequeños de corrosión localizada (zonas negras en Fig. 6.16C, inferior). Se detectó una corrosión filiforme con filamentos casi rectos y paralelos en la punta de los cuales se presume la evolución de gas hidrógeno [258]. Se observó además que dicha corrosión filiforme tendía a seguir las marcas del pulido del material. En el caso de polyTOH-AZ31 las áreas de ataque del material por la corrosión fueron significativamente más pequeñas que para AZ31 control (Fig. 6.16C). Consecuentemente, tanto los ensayos electroquímicos en caldo nutritivo como los realizados en medio DMEM demostraron que el recubrimiento con polyTOH mejora la resistencia a la corrosión de AZ31 manteniendo un proceso de degradación moderado necesario para sostener la biodegradabilidad de estos materiales. Además, la corrosión localizada que se observa parece comenzar por debajo de la película polimérica donde el electrolito podría penetrar y entrar en contacto con zonas heterogéneas ricas en Mg comenzando así la corrosión del metal [255] y permitiendo la formación de burbujas de hidrógeno que presionarían desde abajo del recubrimiento hasta romperlo, como puede verse en la Fig. 6.16C.

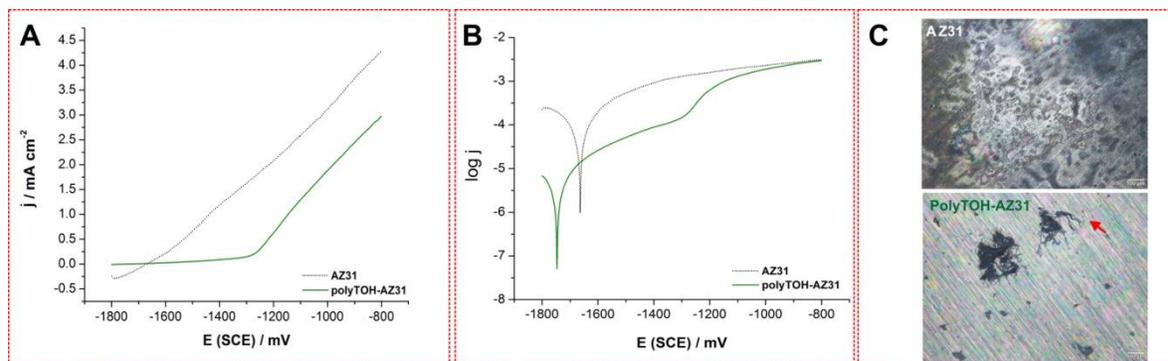


Fig. 6.16. A) Curvas de polarización anódica y B) curvas de Tafel obtenidas con AZ31 sin tratamiento y de polyTOH-AZ31 a  $1\text{mVs}^{-1}$  en caldo nutritivo. C) Imágenes de microscopía óptica luego de los ensayos de polarización mostrados en (A): arriba: AZ31 control presentando un fuerte ataque por corrosión en toda la superficie; abajo: corrosión filiforme (flecha) generada en sitios localizados de polyTOH-AZ31.

#### 6.3.2.4.D. Liberación de iones $\text{Mg}^{2+}$ de polyTOH-AZ31 y AZ31 en caldo nutritivo

Con el fin de evaluar la disminución en la liberación de iones  $\text{Mg}^{2+}$  por parte del recubrimiento de polyTOH sobre AZ31, se realizaron ensayos de inmersión de las muestras tratadas y sin tratar en caldo nutritivo a  $33^\circ\text{C}$  por 14 días. La concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  en las soluciones resultantes de 1, 2, 3, 7 y 14 días se determinó mediante el kit colorimétrico Calmagita. La Fig. 6.17 muestra que la liberación de iones Mg de polyTOH-AZ31 disminuye con respecto a AZ31 sin recubrimiento. Luego de 3 días de inmersión en caldo nutritivo, la liberación de iones Mg para polyTOH-AZ31 es aproximadamente la mitad de la observada para AZ31 ( $p \leq 0,01$ ), demostrando las características protectoras de la película polimérica para reducir la velocidad de degradación, con lo que se podría suponer que se incrementaría el tiempo en el que se mantendría la estabilidad mecánica del implante mientras el tejido se regenera.

Tomando en cuenta los datos reportados en la literatura, puede concluirse que los datos correspondientes a la liberación de iones  $\text{Mg}^{2+}$  presentan una alta dispersión pero es claro que la concentración de iones liberados es dependiente de la solución electrolítica empleada [254,259]. Los ensayos realizados en soluciones inorgánicas como solución de Hank o fluido biológico simulado [260,261] muestran que la tasa de degradación durante los primeros tres días es alta. Sin embargo, los ensayos realizados con soluciones

conteniendo sustancias orgánicas (como las previamente descritas), incluyendo proteínas [259,262,263] evidencian que durante los primeros 2-3 días, la adsorción de material orgánico disminuye la tasa de corrosión. Esto concuerda con estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo [254]. Después de los primeros días, tiene lugar la corrosión localizada y la tasa de corrosión se incrementa durante los días subsiguientes (3-7 días). Luego de este período de inmersión, los resultados revelan que la tasa de degradación es estabilizada debido a la formación de una capa de productos de corrosión, en concordancia con trabajos previos [259,260].

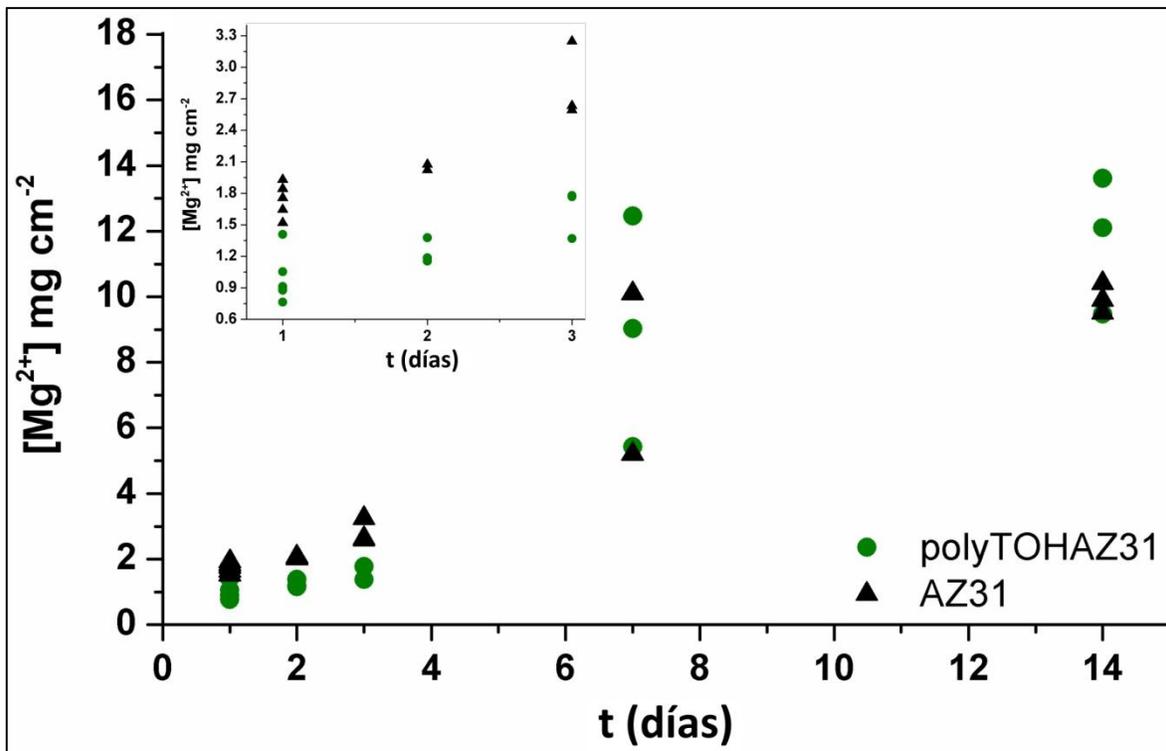


Fig. 6.17. Liberación de iones Mg desde la aleación AZ31 sin (▲) y con recubrimiento de polyTOH (●) inmersa en caldo nutritivo. El recuadro muestra el detalle de 1, 2 y 3 días de liberación. Se observan diferencias significativas entre los tratamientos a 1 y 2 días ( $p \leq 0,001$ ) y a 3 días ( $p \leq 0,01$ ). No se observan diferencias significativas a 7 y 14 días.

#### 6.3.2.4.E. Análisis EDS de las zonas corroídas en polyTOH-AZ31

Las muestras de polyTOH-AZ31 luego de 2 h de colonización bacteriana fueron observadas por microscopía SEM y espectroscopía EDS como se explicó en 6.3.2.4.A para AZ31 sin recubrimiento. La Fig. 6.18A y B muestran que el proceso de corrosión en polyTOH-AZ31 es menos intenso que el observado para AZ31 sin recubrimiento y está restringido a regiones mucho más pequeñas, como se pudo observar también en la Fig. 6.16C. El análisis EDS de las distintas zonas corroídas y sus cercanías (ver tablas de la Fig. 6.18A y B) evidencia que el P está ausente en zonas sin corrosión y por dentro de las quebraduras observadas, mientras que sí está presente en los productos de corrosión alrededor del pit junto con altos porcentajes de oxígeno. Los resultados de los análisis de áreas sin corrosión (Fig. 6.18A) muestran la presencia de Mg, O, Al y C. Sin embargo, se encontró un menor contenido de O y Al (tabla en la Fig. 6.18A) en la zona sin corroer con respecto al control sin recubrimiento (Fig. 6.12). Por otro lado, no se observan señales de P sobre la superficie cubierta con película mientras que dicho valor fue cercano a 6%At. en AZ31 sin recubrimiento (Fig. 6.12). Al analizar la zona de la ampolla y sus alrededores se encontró una relación Al/Mg más elevada que la composición de la aleación AZ31 (tabla de la Fig. 6.18B). El porcentaje de C en el centro de la ampolla es muy elevado y está acompañado de señales de Ca y Zn por lo que puede inferirse la presencia de carbonatos. Las relaciones Al/Mg y C/Mg disminuyen en función de la distancia del pit de corrosión. También se observaron altos porcentajes de P alrededor del pit, probablemente debido al cambio local de pH y a la posterior precipitación de fosfatos, pero en el resto de la superficie no se encontró señal de P. La capa de productos de corrosión cubierta de polyTOH-AZ31 es de aproximadamente 1,3-1,4 $\mu$ m de espesor, como se observa en la Fig. 6.18C. Se puede distinguir allí la película nanoestructurada granular de polyTOH por sobre los productos de corrosión. Podríamos inferir la presencia de hidróxidos, probablemente debido al proceso de deshidratación observado en la Fig. 6.18B, donde el área cubierta por los productos de corrosión en el centro de la ampolla es ligeramente menor, aunque de forma idéntica, que el borde del espacio sin cobertura.

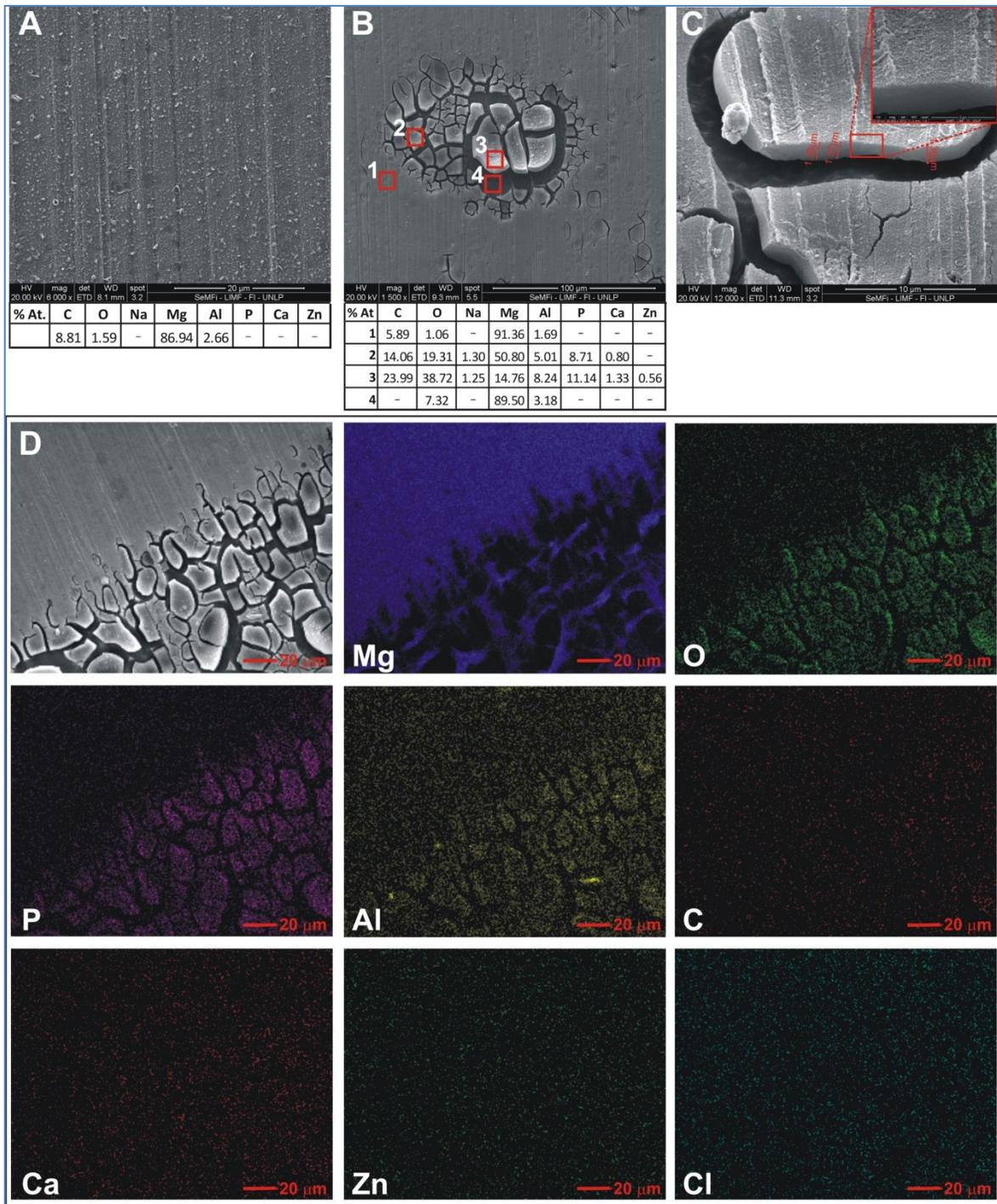


Fig. 6.18. A) Imagen SEM de superficie sin corroer de polyTOH-AZ31 incluyendo debajo la tabla correspondiente al análisis de EDS; B) Corrosión localizada mostrando un pit de corrosión y el análisis EDS debajo, los elementos no detectables se indican con (-); C) Detalle de los productos de corrosión cubiertos por polyTOH-AZ31 mostrados en Fig. B; D) Imagen SEM de una región corroída similar y “mapeo” de elementos indicados en las Fig. (Mg, O, P, Al, C, Ca, Zn, Cl).

#### 6.3.2.4.F. Distribución y conteo de bacterias adheridas a polyTOH-AZ31

La adhesión de bacterias en polyTOH-AZ31 se pudo observar por microscopía de epifluorescencia mediante tinción con naranja de acridina donde se evidenció también una preferencia de la adhesión microbiana en los productos de corrosión de polyTOH-AZ31. Sin embargo, se detectaron sólo unos pocos pits pequeños.

Se encontró una baja adhesión de bacterias alrededor de la zona de corrosión (pit en Fig. 6.19A). El número de bacterias adheridas a polyTOH-AZ31 reveló una adhesión 30 veces menor a lo observado en AZ31 sin recubrimiento ( $p \leq 0,001$ ), confirmando la propiedad antiadherente bacteriana de polyTOH-AZ31 (Fig. 6.19D).

La adhesión bacteriana en AZ31 sin recubrimiento fue 4 veces menor ( $p \leq 0,001$ ) que la observada en sustratos de titanio. Sin embargo, el mejor comportamiento antiadherente bacteriano se observó en polyTOH-AZ31 (200 veces menor que lo observado en titanio ( $p \leq 0,001$ )).

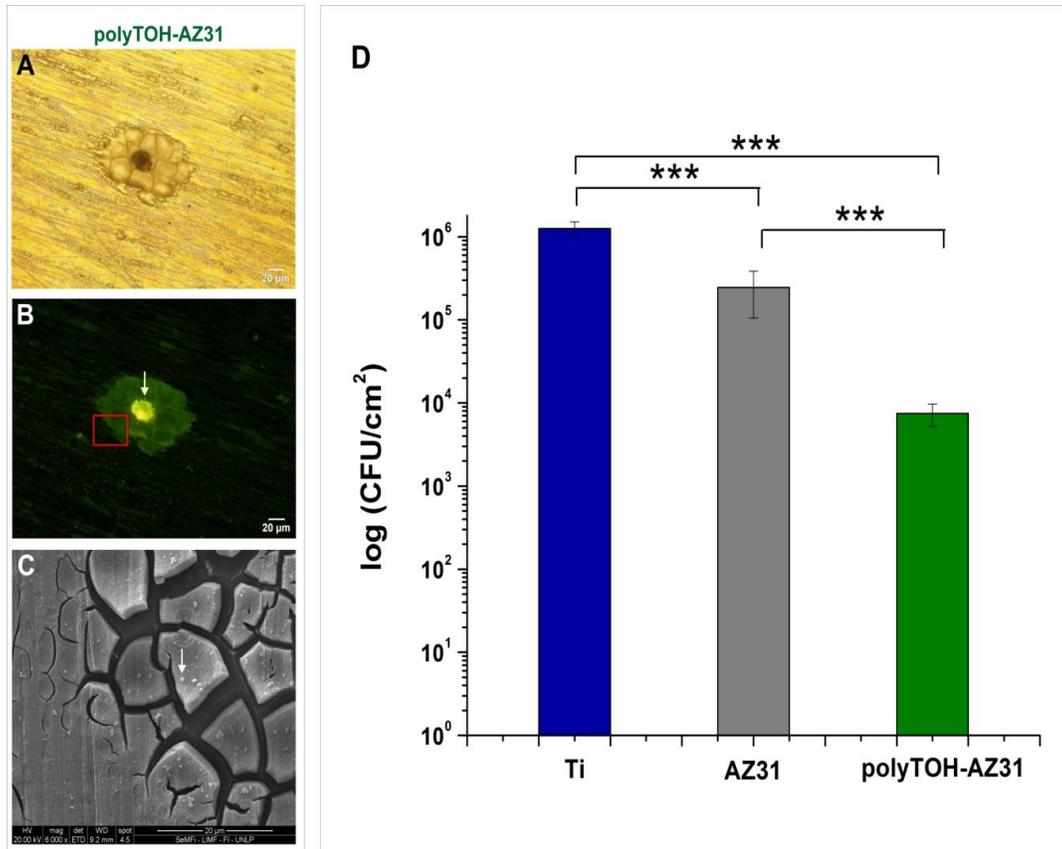
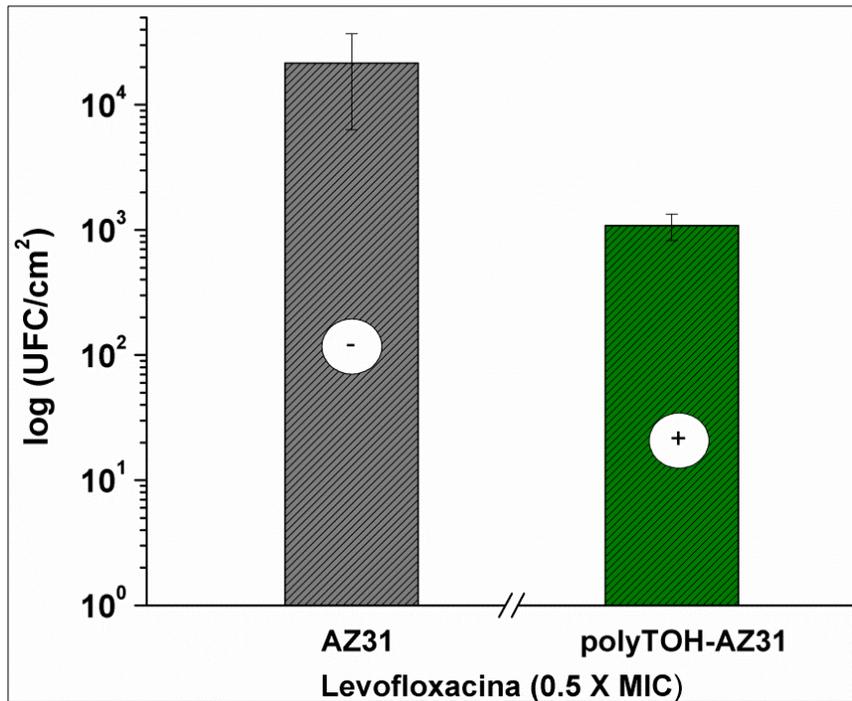


Fig. 6.19. A) Imagen de microscopía óptica, B) de epifluorescencia y C) imagen SEM de polyTOH-AZ31 luego de la exposición de 2 h al cultivo bacteriano. A) Pit con productos de corrosión, B) bacterias teñidas con naranja de acridina (flecha) sobre los productos de corrosión y C) imagen SEM de los productos de corrosión correspondientes al recuadro en rojo de la Fig. B, mostrando bacterias adheridas (flecha blanca). D) Enumeración de *S. aureus* adheridas sobre superficies de Ti, AZ31 y polyTOH-AZ31 luego de 2 h de colonización. Resultados expresados como valor medio y error estándar. \*\*\* $p \leq 0,001$ .

#### 6.3.2.4.G. Tratamiento con antibiótico de las bacterias adheridas sobre AZ31 y polyTOH-AZ31

En esta sección es importante mencionar que esta investigación sigue la línea de artículos previos publicados por nuestro grupo de trabajo [90] donde se muestra que una estrategia eficiente para evitar el desarrollo de biofilms bacterianos es inhibir la adhesión inicial de bacterias, impidiendo la formación de agregados microbianos bidimensionales durante las primeras horas. La película de polyTOH sería una estrategia simple para obtener

inicialmente una superficie inhibitoria para la adhesión de bacterias y promover la eficiencia del tratamiento con antibióticos, cuya acción se ve facilitada cuando las bacterias están aisladas o en acúmulos pequeños. Para demostrar esto se aplicaron tratamientos con levofloxacina a los biofilms tempranos (formados en 2 h) crecidos en AZ31 y polyTOH-AZ31 revelándose una acción más efectiva del antibiótico en el caso de polyTOH-AZ31 (Fig. 6.20). Utilizándose una concentración de antibiótico correspondiente a la mitad de la MIC pudieron observarse dos efectos: el número de bacterias adheridas se reduce un orden de magnitud frente a AZ31 y adicionalmente el crecimiento de bacterias planctónicas se ve drásticamente reducido incluso a la mínima concentración ensayada (0,5 x MIC). Esta inhibición no se observa en el caso de AZ31 sin recubrimiento donde las bacterias que se desprenden del sustrato logran crecer en el caldo nutritivo.



*Fig. 6.20. Efecto del antibiótico levofloxacina en la viabilidad de células adheridas en AZ31 y polyTOH-AZ31. En las columnas se indica la inhibición del crecimiento de bacterias planctónicas: (+) indica que existe inhibición del crecimiento y (-) indica que no existe inhibición de crecimiento. Resultados expresados como valor medio y error estándar.*

#### 6.3.2.4.H. Ensayo de viabilidad celular sobre polyTOH-AZ31

Con el fin de evaluar la biocompatibilidad de las muestras de polyTOH-AZ31, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular sobre los materiales utilizando células de la línea preosteoblástica MC3T3-E1. Para ello se sembraron células sobre las muestras de AZ31, polyTOH-AZ31 y vidrio como control de crecimiento. Se incubaron a 37°C con humedad controlada y atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h y luego se observaron por microscopía de epifluorescencia mediante tinción con naranja de acridina con el propósito de estimar la viabilidad como el porcentaje de área cubierta por células en la superficie.

En la Fig. 6.21 se observa el porcentaje de área cubierta por células relativo al control de crecimiento sobre vidrio, donde se evidenció una disminución significativa ( $p \leq 0,01$ ) de la viabilidad para las muestras de polyTOH-AZ31 ( $65,3 \pm 4,9\%$ ) frente al control de células ( $100,0 \pm 6,6\%$ ). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre la viabilidad celular sobre la superficie de la aleación sin recubrimiento ( $81,7 \pm 7,8\%$ ) y polyTOH-AZ31. Estos resultados indican que las muestras con y sin tratamiento de polyTOH presentan biocompatibilidad similar. Se puede observar en la Fig. 6.22 las fotomicrográficas de las superficies con las células adheridas luego de 24h de incubación.

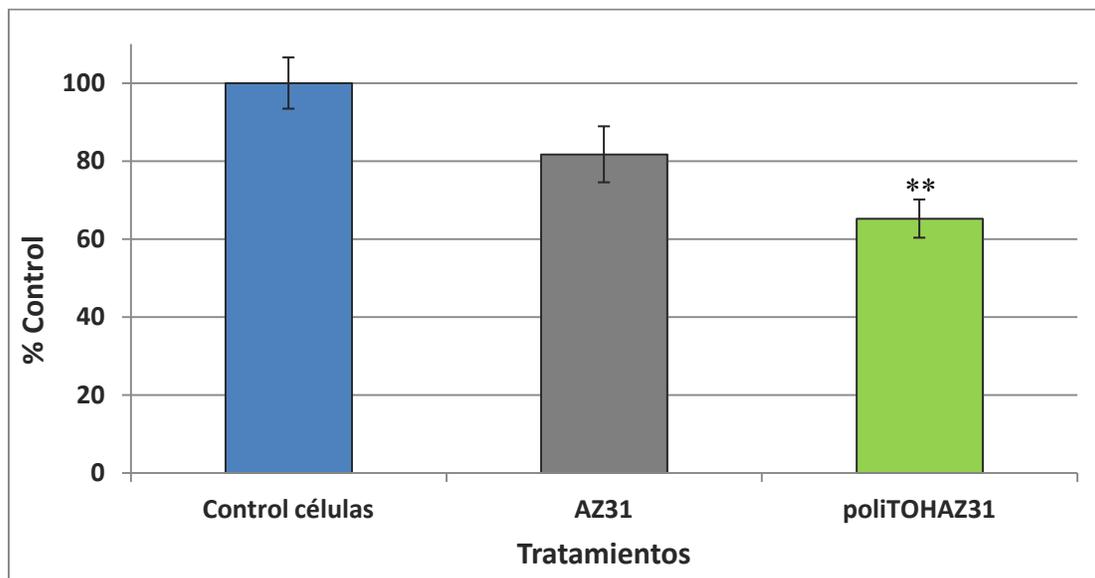


Fig. 6.21. Viabilidad celular (% del control de células) luego de 24h sobre muestras de AZ31 y polyTOH-AZ31 a 24 h. (\*\*,  $p < 0,01$ ) diferencias significativas respecto al control de células.

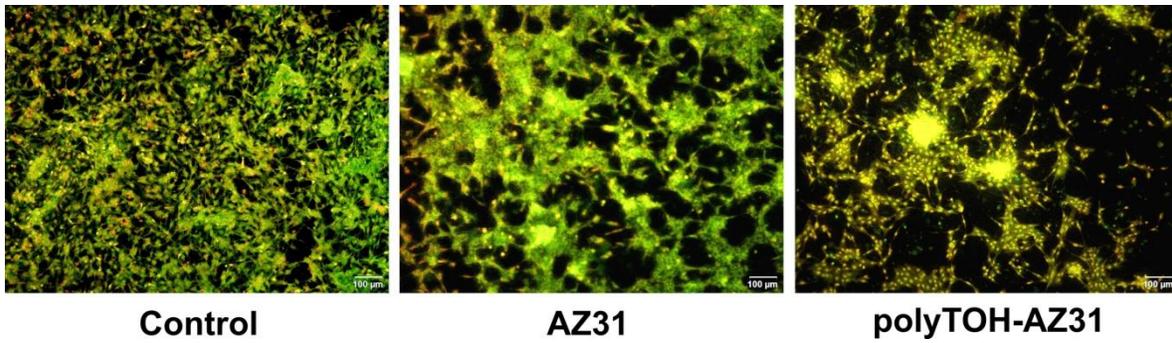


Fig. 6.22. Fotomicrografías de las células crecidas sobre vidrio (control), AZ31 y polyTOH-AZ31 luego de 24 h. Magnificación 100X.

#### 6.3.2.4.1. Interacciones de las bacterias con los productos de corrosión formados sobre AZ31 y polyTOH-AZ31

La inhibición de la formación de biofilms en la superficie del implante es esencial para prevenir fallas del implante e impedir la proliferación de bacterias persistentes luego del tratamiento con antibióticos. En los últimos años el foco de los trabajos de investigación se centró en el desarrollo de superficies de implantes capaces de disminuir la adhesión bacteriana.

Reportes recientes de ensayos *in vitro* indican como potencial ventaja que los biomateriales base Mg podrían proveer un efecto antibacteriano. Sin embargo, éste es un tema controversial que requiere mayor discusión [29,93,264–267]. Según nuestro conocimiento no existen informes previos sobre el estudio de la distribución de bacterias asociadas con la aleación AZ31 durante su degradación, que es importante para contribuir a la elucidación de los procesos complejos que ocurren en la interfaz metal degradable / medio biológico, la cual muestra cambios continuos.

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que la distribución de bacterias adheridas a la superficie de AZ31 no es uniforme y que existen sitios preferenciales para dicha adhesión, mientras que otras zonas son evitadas. Por lo tanto, es necesario diseñar una estrategia apropiada para mejorar la *performance* de las aleaciones de Mg, reduciendo la formación de productos de corrosión e inhibiendo la adhesión bacteriana.

La información sobre el proceso de corrosión debe analizarse en detalle para interpretar los resultados de la distribución de bacterias. La corrosión de Mg genera la formación de hidróxido de Mg, el cual presenta una baja solubilidad en medios acuosos [19]. El anión

cloruro, uno de los iones más abundantes en medios biológicos, es muy agresivo e induce la ruptura del film débilmente protector de  $Mg(OH)_n$  llevando a una corrosión localizada [268,269]. El proceso de corrosión incrementa localmente el pH debido a la formación de burbujas de  $H_2$ . La baja solubilidad de las sales de fosfato, carbonato de magnesio ( $K_{ps}=1 \times 10^{-15}$  y  $1,4 \times 10^{-24}$ , respectivamente) y fosfato de calcio ( $K_{ps}=1,3 \times 10^{-32}$ ) en medio alcalino explica que, en presencia de  $HPO_4^{2-}/PO_4^{3-}$ ,  $HCO_3^-/CO_3^{2-}$  ocurre la precipitación de fosfatos y carbonatos a altos valores de pH [1,36]. Esto justifica que en AZ31 sin recubrimiento, cerca de los sitios de corrosión activa, se encontraran depósitos conteniendo P y C (Fig. 6.12). Estos sitios son preferenciales para la adhesión de las bacterias. También se adsorben proteínas en la superficie metálica (Fig. 6.14C) [270–273] y se desnaturalizan a causa del cambio de pH en las cercanías de los sitios activos de corrosión [254,274]. Puede observarse que, mientras se produce la degradación de AZ31, la superficie pierde su brillo y se torna rugosa por la corrosión localizada y los grandes depósitos de los productos de corrosión.

Los experimentos *in vitro* muestran que los sitios de corrosión activa (donde el Mg tiene mayor señal de EDS) son eludidos por las bacterias, lo cual puede deberse a la formación de burbujas de hidrógeno y los altos valores de pH. A su vez, las zonas pasivas son elegidas para el anclaje de las bacterias, preferentemente aquellas zonas con alto contenido de fósforo/carbono + oxígeno.

Por otro lado, se observa una alta tasa de corrosión en AZ31 sin tratamiento (Fig. 6.16) y alta liberación de iones  $Mg^{2+}$  (Fig. 6.17). La tasa de degradación debe disminuirse para prevenir la formación de productos de corrosión. Sin embargo debe considerarse que si se logra reducir la degradación y alcalinización del medio en la interfaz, asociadas al proceso de corrosión, aumentará la tasa de proliferación bacteriana.

Los recubrimientos poliméricos generados sobre diversos metales en general muestran alta resistencia a la corrosión [221], sin embargo no es común estudiar dicho efecto sobre la inhibición de la adhesión bacteriana. Los ensayos de corrosión evidenciaron que la película de polyTOH-AZ31 tiene una acción protectora de la corrosión de AZ31, reduciendo la velocidad de corrosión pero sin impedir totalmente la degradación, tal como se requiere en el caso de un material biodegradable (Fig. 6.16 y 6.17). Se detectaron bajas tasas de corrosión y ataques localizados con menor número y tamaño de pits detectados por SEM, EDS y microscopía óptica para polyTOH-AZ31, justificando un efecto de reducción de la corrosión (Fig. 6.16, Fig. 6.17 y Fig. 6.18). La disminución de la

tasa de corrosión a aproximadamente la mitad comparado con AZ31 sin recubrimiento, sería apropiada para un implante biodegradable (Fig. 6.17). La corrosión filiforme encontrada en AZ31 indica una alta resistencia del recubrimiento de productos de corrosión (principalmente  $Mg(OH)_n$ ) (Fig. 6.16) [258]. En estudios *in vivo* podría conseguirse la reducción de acumulación de gas hidrógeno y una menor respuesta inflamatoria.

Si bien diversos compuestos fenólicos han sido reportados como inhibidores de la adhesión y proliferación bacteriana y también como antioxidantes [62,275,276]. En este trabajo se presenta una estrategia de electropolimerización de un compuesto fenólico que provee un efecto multifuncional ya que, además de la reducción de la corrosión, logra la inhibición de la adhesión bacteriana (200 veces menor al titanio y 30 veces menor a AZ31 sin recubrimiento). Se demostró que las bacterias se confinan en los pits de corrosión, que son pocos y reducidos en tamaño en el polyTOH-AZ31. Este efecto antiadherente bacteriano es similar o incluso superior del observado para otras biomateriales metálicos [44,90,93,95,240,277].

Diversos estudios relacionados a la supervivencia de *S. aureus* sobre aleaciones de Mg han concluido que dicha bacteria es resistente a la respuesta inmune y a tratamientos sistémicos con antibióticos [93,94]. Esta resistencia podría ser atribuida parcialmente, en caso de biofilms maduros, a la acción protectora de la matriz polimérica extracelular. En este contexto, la película de polyTOH surge como una estrategia efectiva para inhibir la proliferación bacteriana aumentando la acción de los antibióticos. Todo esto es posible porque la película de polyTOH inhibe la adhesión bacteriana, la proliferación y la formación de matriz polimérica extracelular, y el hecho de tener bacterias sésiles aisladas las hace más susceptibles a la acción de agentes antimicrobianos, según trabajos previos [90]. De esta manera, utilizando una concentración de antibiótico que sea la mitad de la concentración mínima inhibitoria para bacterias planctónicas ( $0,5 \times MIC$ ) es posible lograr una reducción de un orden de bacterias adheridas frente al control de la aleación y, adicionalmente reducir drásticamente el número de bacterias planctónicas. Esto representa una ventaja extra ya que la acción antimicrobiana puede ser garantizada en regiones donde la concentración de antibiótico sea menor que el promedio sistémico. Además, se previene la generación de bacterias persistidoras. Cabe aclarar que no se observó inhibición de crecimiento utilizando  $0,5 \times MIC$  en las superficies de AZ31 sin tratamiento, donde las bacterias desprendidas del sustrato permanecieron con buena

viabilidad y proliferando en el medio de cultivo, lo que demuestra la efectividad del tratamiento.

#### 6.3.2.4.J. Conclusiones de efectos encontrados en AZ31 y polyTOHAZ31

La *performance* de los implantes biodegradables base Mg deben perfeccionarse en dos importantes aspectos: la tasa de degradación y la adhesión bacteriana. La tasa de corrosión de los metales biodegradables debe controlarse para mantener su integridad mecánica hasta la reparación total del tejido. Sin embargo, dado que la alcalinización del medio causada por la corrosión está asociada al efecto inhibitorio de la adhesión bacteriana en materiales base Mg, el control de la corrosión podría generar la pérdida de las propiedades antimicrobianas. En esta sección del trabajo se presentó una estrategia basada en el uso de un compuesto fenólico natural que al polimerizarse sobre la superficie tiene capacidad de inhibir la adhesión bacteriana y controlar la tasa de degradación.

Para estudiar el desempeño de la película polimérica de TOH sobre AZ31 se analizaron la composición superficial de las muestras, el proceso de corrosión y los productos generados así como la adhesión bacteriana. Los resultados confirman que el número de bacterias adheridas a AZ31 fue menor a las adheridas sobre titanio y evidenciaron que la distribución de las bacterias adheridas sobre AZ31 es dependiente del proceso de corrosión y de la composición superficial. Los sitios activos de corrosión son evitados por las bacterias dado los altos valores de pH localizado y la formación de burbujas de hidrógeno. Por el contrario, los sitios pasivos donde también se depositan fosfatos y carbonatos son lugares preferenciales para la adhesión bacteriana.

Consecuentemente, para mejorar las características de la aleación AZ31 se propuso su recubrimiento con una película de polyTOH, aumentando la resistencia a la corrosión e inhibiendo la adhesión bacteriana. Los resultados mostraron que esta película opera como un film multifuncional que mejora las propiedades superficiales de AZ31 potenciando la resistencia a la corrosión y creando un efecto antiadherente. Así, la adhesión de bacterias sobre polyTOH-AZ31 es confinada a pequeñas regiones aisladas y resulta de dos órdenes de magnitud menor a lo observado para superficies de titanio y 30 veces menor que AZ31 sin recubrimiento. Además, la película de polyTOH muestra una ventaja adicional: la eficiencia de antibióticos es potenciada en el caso de polyTOH-AZ31 y la

inhibición del crecimiento de bacterias planctónicas se logra con la mitad de la concentración mínima inhibitoria del antibiótico. Con respecto a la mejora de la resistencia a la corrosión, los resultados mostraron que la liberación de iones Mg se reduce a aproximadamente la mitad durante los primeros días críticos luego de la implantación.

Por otro lado, el estudio de biocompatibilidad realizado con células preosteoblásticas sobre la aleación con y sin tratamiento evidenció que la viabilidad celular de ambas superficies no se ve modificada significativamente, comparando los resultados obtenidos para polyTOH-AZ31 frente a los de AZ31.

### **6.3.3. Electropolimerización de timol y carvacrol sobre ZEK100**

A continuación de los ensayos con AZ31 y considerando que la adición de tierras raras a la aleación podría mejorar el comportamiento de materiales base Mg, se siguieron los estudios de electropolimerización de FF sobre la aleación ZEK100 cuya composición es: 0,96 wt.% zinc, 0,21 wt.% zirconio, 0,3 wt.% tierras raras. Ésta aleación de base Mg ha sido propuesta como biomaterial para regeneración ósea debido a su baja tasa de degradación frente al Mg puro, buenas propiedades mecánicas y biocompatibilidad [278,279]. En este caso se ensayaron únicamente la capacidad inhibitoria de la corrosión por parte de las películas poliméricas ya que se mostró que la adhesión bacteriana está asociada a la formación de productos de corrosión conteniendo fosfatos y carbonatos comunes a ambas aleaciones (AZ31 y ZEK100).

#### **6.3.3.1. Registros potenciodinámicos**

Los siguientes tratamientos de electropolimerización de FF sobre ZEK100 se llevaron a cabo en un electrolito hidroalcohólico (70/30 H<sub>2</sub>O:etanol) conteniendo 0,5M de salicilato de sodio y 0,1M de fitocompuesto. Los registros potenciodinámicos en el nuevo electrolito conteniendo Carv, TOH o ácido trans-ferúlico, además del control de ZEK100 (sin FF ) se presentan en las Fig. 6.23, 6.24 y 6.25.

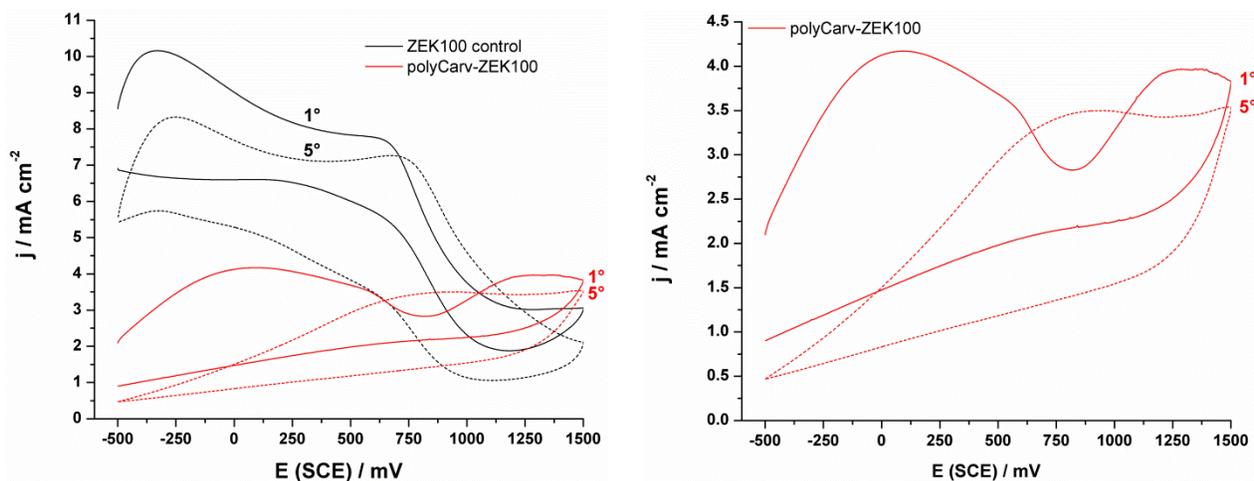


Fig. 6.23. 1° y 5° ciclos voltamperométricos realizados a  $50\text{mVs}^{-1}$  con electrodos de ZEK100 en agua/etanol (70:30) con 0,5M salicilato de sodio conteniendo 0,1M Carv. A la derecha se muestra el registro con el fitocompuesto a mayor magnificación.

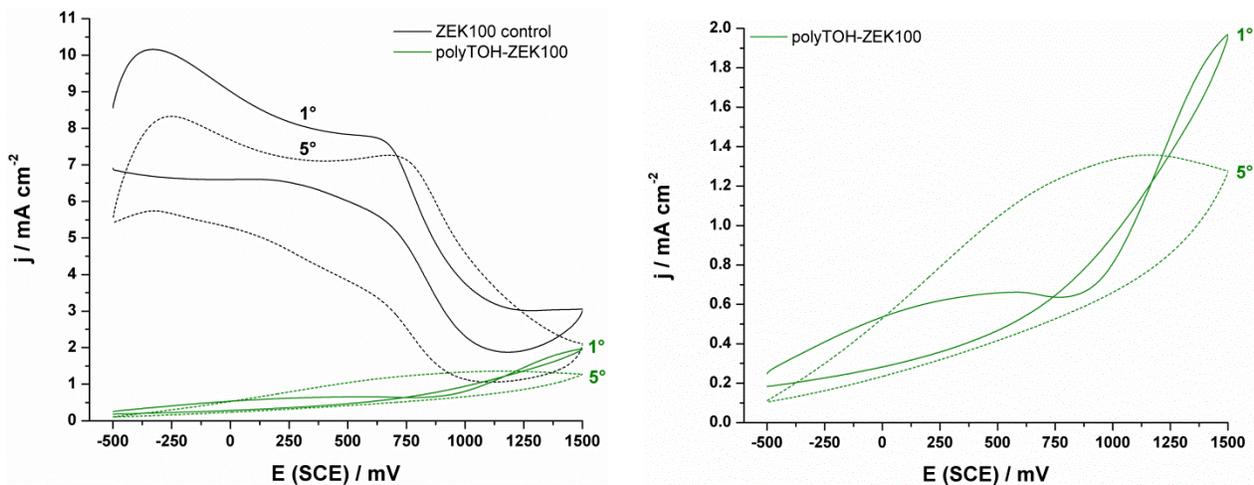


Fig. 6.24. 1° y 5° ciclos voltamperométricos realizados a  $50\text{mVs}^{-1}$  con electrodos de ZEK100 en agua/etanol (70:30) con 0,5M salicilato de sodio conteniendo 0,1M TOH. A la derecha se muestra el registro con el fitocompuesto a mayor magnificación.

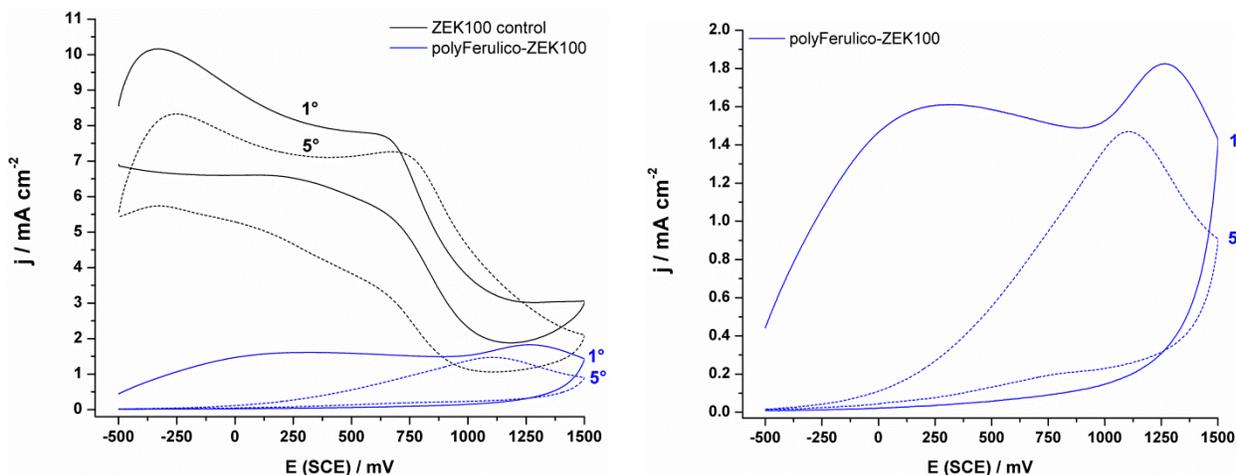


Fig. 6.25. 1° y 5° ciclos voltamperométricos realizados a  $50\text{mVs}^{-1}$  con electrodos de ZEK100 en agua/etanol (70:30) con 0,5M salicilato de sodio conteniendo 0,1M ácido trans-ferúlico. A la derecha se muestra el registro con el fitocompuesto a mayor magnificación.

El registro potenciodinámico de ZEK100 en electrolito sin fitocompuestos presenta una región de formación de salicilato de sodio aproximadamente a 0,75V, cercano al reportado previamente para Mg y AZ31 [86,251]. El efecto del salicilato es lograr la pasivación de materiales a base de Mg formando un film de salicilato de Mg a potenciales anódicos, reduciendo la disolución del metal, esto se observa por la disminución de la densidad de corriente luego de los 0,70V [251,253].

En presencia de Carv en el electrolito (Fig. 6.23 derecha), el registro muestra un pico de densidad de corriente entre -0,50 y 0,75V que correspondería a la formación de una película de salicilato de sodio, seguido de un descenso de la corriente y un segundo pico a 1,30V que podría corresponder a la oxidación del Carv. A partir del tercer ciclo, la densidad de corriente en la región -0,50 a 0,75V disminuye y se distingue la presencia de otra zona de oxidación entre 0,50 y 1,50V, incluyendo la región de oxidación del Carv. La densidad de corriente del registro disminuye con los ciclos, indicando la pasivación de la superficie de la aleación en un proceso irreversible por la formación de polyCarvZEK100.

El registro potenciodinámico de ZEK100 en presencia de TOH (Fig. 6.24 derecha) muestra en el primer ciclo la evolución de un pico de densidad de corriente entre -0,50 y 0,75V, de menor intensidad de la observada para el caso de polyCarvZEK100. A potenciales más anódicos se observa un incremento de la densidad de corriente entre

0,90 y 1,50V, que correspondería a la oxidación del TOH. A partir del tercer ciclo, y similar a lo observado para el Carv, la densidad de corriente de la región de potencial entre -0,50 y 0,75V se vuelve despreciable, y sólo se distingue un pico ancho de oxidación a 0,11V, cercano al potencial probable de oxidación de TOH en el primer ciclo.

La voltametría de ZEK100 en un electrolito conteniendo ácido trans-ferúlico (Fig. 6.25 derecha) presenta una región de potencial de alta densidad de corriente entre -0,50 y 0,85V visible sólo en el primer ciclo, similar a lo observado para TOH y Carv. Se observa un pico a 0,13V probablemente debido a la oxidación del ácido trans-ferúlico y una drástica disminución de la densidad de corriente en el barrido catódico (del orden de los  $50\mu\text{Acm}^{-2}$ ). En los ciclos sucesivos sólo es visible el pico de oxidación del FF el cual va disminuyendo de potencial con el correr de los ciclos.

### 6.3.3.2. Ensayos de corrosión en medio biológico DMEM

Los tratamientos realizados sobre ZEK100 se analizaron mediante barridos lineales de potencial en medio de cultivo celular DMEM a 37°C para estudiar su comportamiento inhibitorio de la corrosión de la aleación. Las curvas de Tafel se observan en la Fig. 6.26, donde se muestra que las muestras recubiertas con películas presentan un potencial de corrosión más catódico que el control de ZEK100 (siendo de  $-1735\pm 3\text{mV}$  para el polyferúlicoZEK100,  $-1,590\pm 1\text{mV}$  para polyCarvZEK100 y  $-1596\pm 1\text{mV}$  para el polyTOHZEK100), la corriente de corrosión del polyferulicoZEK100 es de 1,5 órdenes mayor que el control ( $88\pm 28\mu\text{Acm}^{-2}$ ), mientras que para polyCarvZEK100 y polyTOHZEK100 no se ve modificada significativamente ( $9\pm 1\mu\text{Acm}^{-2}$  para polyCarvZEK100 y  $4\pm 1\mu\text{Acm}^{-2}$  para polyTOHZEK100) frente a  $3\pm 1\mu\text{Acm}^{-2}$  para ZEK100 control. Sin embargo, al analizar el potencial de picado de las muestras de ZEK100 recubiertas con las películas electropoliméricas se observó un corrimiento anódico en el potencial siendo de  $-1388\pm 15\text{mV}$  para polyFerulicoZEK100,  $-1449\pm 1\text{mV}$  para polyCarvZEK100 y  $1462\pm 9\text{mV}$  para polyTOHZEK100 frente a  $-1536\pm 2\text{mV}$  del AZ31 control.

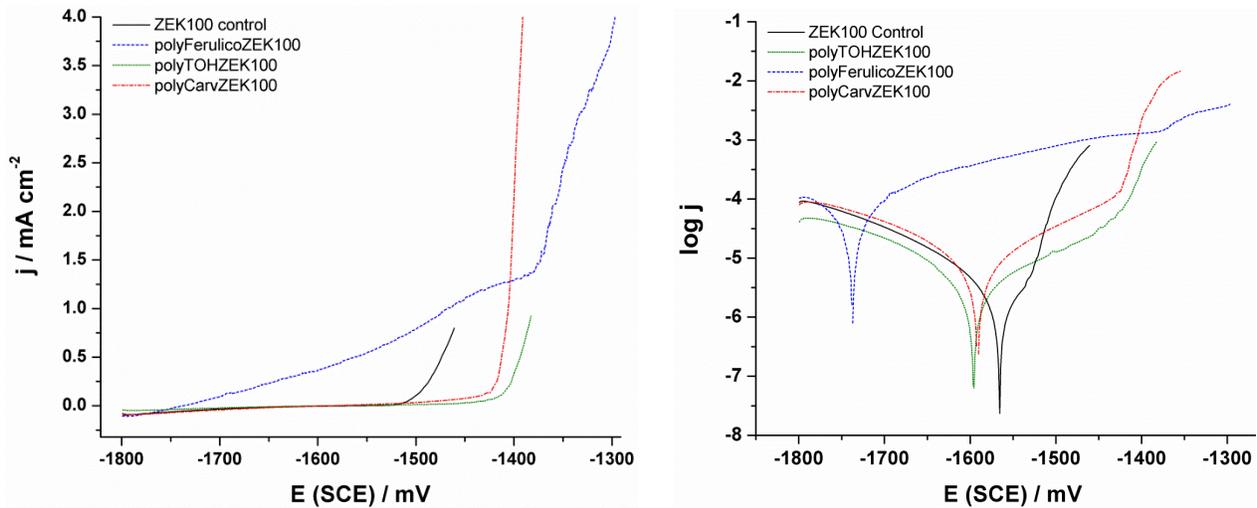


Fig. 6.26: Curvas de polarización anódica (izquierda) y curvas de Tafel (derecha) realizadas a  $1\text{mVs}^{-1}$  en medio de cultivo DMEM a  $37^\circ\text{C}$  para las muestras de ZEK100 con y sin recubrimientos.

Adicionalmente se realizaron registros de potencial a circuito abierto en medio de cultivo DMEM a  $37^\circ\text{C}$  (Fig. 6.27). El potencial a circuito abierto de polyTOHZEK100 se mantiene estable durante las tres horas de inmersión. Sin embargo el polyCarvZEK100 y el polyFerulicoZEK100 muestran una ruptura de la pasividad a los 2 min y entre los 75-120 min de inmersión, respectivamente.

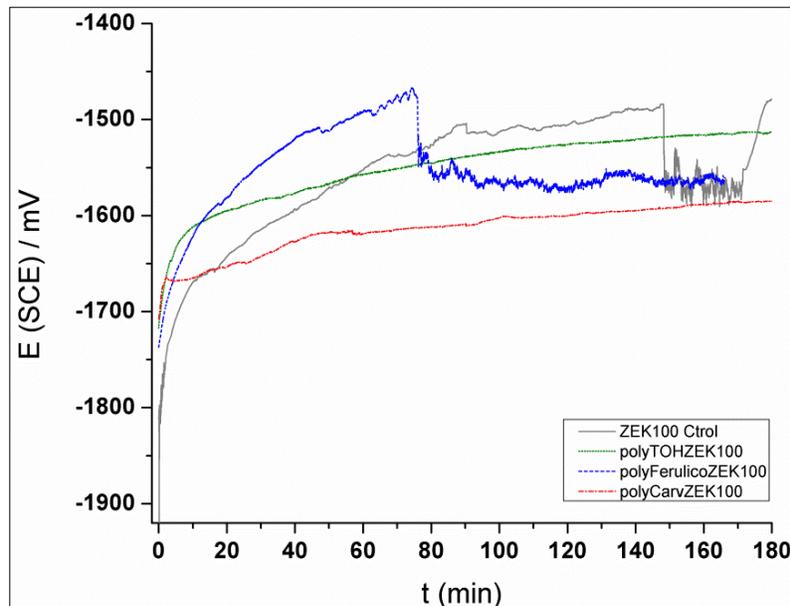


Fig. 6.27: Registro de potencial a circuito abierto realizado en medio DMEM a  $37^\circ\text{C}$  para las muestras de ZEK100 con y sin recubrimientos.

En conclusión, los recubrimientos con polyTOH sobre ZEK100 tienen un mayor efecto inhibitorio de la corrosión de la aleación en medio de cultivo DMEM a 37°C, dado que logran un corrimiento del potencial del picado y mantienen el potencial a circuito abierto estable. Por otro lado, el recubrimiento de polyFerulico sobre ZEK100, a pesar de generar un corrimiento significativo del potencial de picado hacia valores más anódicos, posee una mayor densidad de corriente en todo el barrido y alta corriente de corrosión, un potencial de corrosión más catódico que la aleación sin recubrimiento, además de la ruptura de la pasividad a tiempos cortos de inmersión en medio biológico. Asimismo, el polyCarv sobre ZEK100 no genera una inhibición de la corrosión de la aleación evidenciado por una evolución irregular del potencial a circuito abierto a partir de los 2 min de inmersión.

Al igual que en el caso de la aleación AZ31, la película de polyTOH resultó ser la de mejor *performance* y cabe inferir que tendría propiedades antiadherentes bacterianas.

#### **6.4. CONCLUSIONES**

Considerando las combinaciones película-biomaterial analizadas en este capítulo, se pudo concluir que, mediante tratamientos adecuados, los fitocompuestos utilizados logran electropolimerizarse sobre Mg y sus aleaciones. Si bien las películas electropoliméricas de TOH y Carv generadas sobre Mg puro no logran reducir la tasa de corrosión del metal en medio biológico DMEM, las mismas fueron efectivas en el caso de las aleaciones que de hecho se consideran con propiedades más promisorias..

La inhibición de la corrosión de AZ31 resultó ser más eficiente con la película de polyTOH, seguido de polyFerulico y por último polyCarv, según los resultados de los barridos lineales de potencial y registros de potencial a circuito abierto en medio DMEM. Mediante el estudio por microscopía SEM y el análisis elemental, pudo comprobarse que el proceso de degradación de la aleación AZ31 en caldo nutritivo involucra precipitados de fosfatos y carbonatos. Dichos precipitados presentaron alta afinidad para la adhesión de *S. aureus* que se confinaba en dichos sitios.

Las caracterizaciones posteriores de polyTOH-AZ31, seleccionada como la mejor condición película-biomaterial, evidenciaron un comportamiento multifuncional, logrando controlar la corrosión de la aleación que promueve la precipitación de fosfatos y carbonatos y así reducir la adhesión bacteriana 30 veces frente al control de AZ31 y 200 veces menor que el Ti. Los resultados de microscopía SEM y análisis elemental mediante

EDS de polyTOH-AZ31 luego de 2h de incubación con *S. aureus*, mostraron una distribución heterogénea de la adherencia bacteriana dada preponderantemente en zonas con depósitos de productos de corrosión del metal, evitando los sitios donde la película de polyTOH permanecía inalterada.

Pudo demostrarse además que el efecto antiadherente bacteriano de polyTOH-AZ31 aumentaría la eficiencia de antibióticos sistémicos en el postoperatorio, tal como se observó en los ensayos con levofloxacina. Adicionalmente, el recubrimiento presentó una biocompatibilidad similar a la aleación control.

Por otro lado, las modificaciones superficiales realizadas sobre la aleación ZEK100 revelaron un mejor control de la corrosión del metal por parte del recubrimiento de polyTOH, al igual que en el caso de la aleación AZ31, frente a los tratamientos de polyCarvZEK100 y polyFerulicoZEK100 en medio biológico DMEM. Podría inferirse entonces que el polyTOH-ZEK100 presentaría un comportamiento antiadherente bacteriano similar al encontrado para polyTOH-AZ31.

**Conclusiones generales**

**Capítulo 7**

## Capítulo 7- Conclusiones generales

### 7.1. Conclusiones generales

A través de los diversos estudios realizados sobre la interacción de fitocompuestos con materiales metálicos biodegradables pudo demostrarse el alto potencial de los compuestos fenólicos naturales para generar modificaciones ecocompatibles, bioactivas y biocompatibles sobre superficies de materiales metálicos para aplicaciones en biomedicina y en la industria.

Frente a las interesantes propiedades de los compuestos fenólicos reportadas en la literatura para algunos sistemas se realizaron en primera instancia ensayos con el fin de descartar la toxicidad de los mismos. Posteriormente se evaluaron los posibles efectos antioxidantes de dichos compuestos y sus capacidades de control de la corrosión, ya sea adsorbidos o polimerizados sobre la superficie y, finalmente, la posible actividad antibacteriana. Estos estudios se realizaron tanto para metales de baja velocidad de degradación como Cu y Pt, como para otros de alta velocidad de degradación como Mg y aleaciones. De dichas investigaciones se obtuvieron las conclusiones siguientes.

#### Ensayos de evaluación de la toxicidad y propiedades protectoras de la viabilidad celular

A partir de los ensayos de toxicidad realizados con los fitocompuestos en células de la línea CHO-K1 se pudo concluir que tanto los monoterpenos fenólicos (Carv, TOH), como los ácidos fenólicos (trans-ferúlico y gálico) y los aceites esenciales de tomillo y orégano son biocompatibles en un amplio rango de concentraciones. En consecuencia, dichos compuestos pueden considerarse prometedores para su utilización en modificaciones superficiales de materiales metálicos, dadas sus potenciales propiedades benéficas.

Pese a las prometedoras propiedades antioxidantes reportadas en la literatura para TOH y Carv, dos compuestos fenólicos isómeros estructurales, los resultados no evidenciaron mejora de la viabilidad celular frente al daño inducido por iones y micro-nanopartículas que contenían Cu, obtenidos a partir de la inmersión del metal en soluciones biológicas.

### Interacciones de los fitocompuestos fenólicos con metales de baja velocidad de degradación

Debido a la simplicidad del procedimiento, se evaluó primeramente la corrosión del Cu en presencia de Carv o TOH adsorbido sobre la superficie de Cu y se pudo constatar la inhibición de la formación de óxidos luego de la inmersión en medio biológico por parte de ambos fitocompuestos previamente adsorbidos sobre el metal. Se demostró que la protección se incrementaba cuando el fitocompuesto era agregado al medio corrosivo a una concentración no citotóxica que permitía disminuir la desorción del compuesto. La reducción de la formación de óxidos de Cu sobre la superficie en presencia de Carv y TOH adsorbidos resultó apreciable para ambos tratamientos (con una mayor eficiencia observada para adCarvCu) y condujo a un aumento significativo de la viabilidad celular en función de la distancia al metal, respecto al control de cobre sin tratar. Sin embargo, los estudios evidenciaron una disminución significativa de la biocompatibilidad frente al control de crecimiento celular (en ausencia de metal), por lo que se constató la necesidad de obtener una cobertura más protectora y biocompatible para su aplicación en medios biológicos.

La optimización de distintos programas de perturbación permitió lograr la electropolimerización de varios fitocompuestos sobre superficies de metales de baja velocidad de degradación como son Cu y Pt.

En base a los estudios electroquímicos y de espectroscopia ATR-FTIR realizados en superficies de Cu y Pt tratadas mediante perturbaciones electroquímicas en soluciones con fitocompuestos, se demostró que existen diferencias en la respuesta electroquímica y en la composición de los productos poliméricos generados que dependen de la naturaleza del FF. En particular, en el caso de Carv y TOH, isómeros fenólicos, los resultados demostraron la influencia de la estructura molecular en los mecanismos de electropolimerización. Por otra parte, la evaluación electroquímica potenciodinámica sobre Pt y Cu de los ácidos fenólicos gálico y trans-ferúlico mostró una alta actividad de los FF sobre dichas superficies que estaría asociada a la deprotonación y la pérdida de un segundo electrón del grupo carboxilo, seguido de la continua oxidación de los monómeros en las capas externas del polímero y posterior liberación de los productos oxidados a la solución. Los espectros ATR-FTIR de los productos generados sobre Cu con los ácidos fenólicos indican la formación de uniones éter y éster en el caso del ácido trans-ferúlico y uniones C-C entre anillos aromáticos en el caso del ácido gálico dando

lugar a una polimerización heterogénea y discontinua. Debido a las propiedades no satisfactorias de dichas películas estos sistemas no fueron seleccionados para continuar los estudios sobre inhibición de la corrosión sobre Cu.

Por el contrario, la respuesta potenciodinámica sobre Cu y Pt de TOH y Carv así como de los aceites *T. vulgaris*, *O. vulgare* de los cuales son componentes, mostró el bloqueo de ambas superficies metálicas a través de los ciclos voltamperométricos que conducía la formación de polímeros mediante uniones éter entre compuestos fenólicos. Posteriormente, por medio de técnicas cronoamperométricas utilizando dichos compuestos y aplicando el potencial correspondiente al primer pico de oxidación obtenido mediante voltametría cíclica, se pudieron obtener películas poliméricas más protectoras, observando una drástica disminución de la densidad de corriente a tiempos cortos de tratamiento. Los espectros ATR-FTIR de las estructuras de los electropolímeros generados sobre Pt y Cu presentaron generalmente picos correspondientes a uniones éter que estarían asociadas a la formación de los polímeros. Los ensayos para evaluar la susceptibilidad a la corrosión metálica por parte de los tratamientos realizados permitieron constatar la capacidad inhibitoria de la corrosión de las películas formadas a partir del Carv y el TOH.

Los electropolímeros polyTOHCu y polyCarvCu mostraron asimismo una importante reducción de liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  al medio conteniendo cloruros y una mejora de la biocompatibilidad del Cu observada a través de ensayos de viabilidad celular. Los análisis comparativos realizados por microscopía óptica, AFM y SEM evidenciaron características más homogéneas y superficies menos rugosas para el polyCarvCu que le otorgarían al recubrimiento una mayor eficiencia inhibitoria de la corrosión del Cu y consecuentemente una mayor biocompatibilidad frente al polyTOHCu. Cabe destacar que estas coberturas tienen un impacto benéfico para el medio ambiente dado que reducen la liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  liberados por dichos metales sin aportar residuos tóxicos en los ambientes acuosos ya sea durante su generación o su uso.

Durante la optimización del programa de perturbación electroquímico para lograr la polimerización de los FF pudo comprobarse que la selección del potencial de electropolimerización potenciostática y del período de aplicación es crucial para la obtención de una mejor condición biocompatible. Se observó que, al realizar los transitorios de corriente aplicando el potencial correspondiente al pico de oxidación de ambos compuestos, se obtiene un bloqueo eficiente de la superficie del Cu con una evolución del registro similar para TOH y Carv. Por el contrario, al aplicar potenciales

menores al potencial del pico de oxidación se obtienen recubrimientos con mayor rugosidad para el polyCarvCu y glóbulos de mayor espesor para el polyTOHCu, lo que conduce a una menor eficiencia inhibitoria de la corrosión metálica. Paralelamente, los estudios de ATR-FTIR mostraron el cambio de composición de la película con el potencial aplicado y con el tiempo, con un incremento de la contribución de uniones éter así como la formación de dímeros y oligómeros. En el caso del polyTOH dichos dímeros y oligómeros podrían estar confinados en la matriz polimérica con grupos -OH incapaces de formar puentes de hidrógeno. El análisis por microscopía AFM de la formación de las películas obtenidas mediante cronoamperometría en el potencial del pico voltamperométrico (polyTOHCu-400mV) en función del tiempo evidenció el cubrimiento sucesivo de la superficie que se optimizaba luego de 20 min. En concordancia para esas condiciones se obtuvo la mejor citocompatibilidad, analizada a través del número y diámetro de colonias de células preosteoblásticas. Se pudo comprobar además, que diferentes líneas celulares responden de formas distintas a la presencia de iones Cu, revelando la necesidad de realizar estudios de biocompatibilidad utilizando distintas líneas celulares. El estudio comparativo reveló que los recubrimientos de polyCarvCu generados a distintos potenciales presentaron mayor eficiencia inhibitoria de la corrosión y mayor biocompatibilidad frente a todos los recubrimientos obtenidos con TOH, reduciendo el impacto sobre el medio biológico.

Las diferencias observadas entre los resultados obtenidos con TOH y Carv permitieron constatar la importante influencia sobre el proceso de adsorción y polimerización de la estructura molecular que conlleva cierta estabilidad radicalaria, impedimento estérico e interacción molécula/sustrato que dependen de la naturaleza del isómero (Carv o TOH).

La interpretación de la respuesta cronoamperométrica a través de modelos de nucleación y crecimiento permitió inferir que, en el caso del polyCarv, existirían distintas contribuciones relacionadas con la electroadsorción del FF, el crecimiento instantáneo de la película polimérica en dos dimensiones (2D) y el crecimiento progresivo de la misma. En el caso del polyTOH también existiría un aporte por parte del crecimiento 3D que explicaría las características más heterogéneas de dicha película.

En base a los resultados descritos se seleccionó la película de polyCarvCu-400mV por su mayor efecto inhibitorio de la corrosión del Cu, mayor biocompatibilidad, estructura compacta y transparencia y se evaluó su desempeño como recubrimiento de DIUs. Los resultados evidenciaron propiedades protectoras del Cu en fluido uterino simulado,

manteniendo una liberación controlada de iones y asegurando el efecto anticonceptivo del DIU.

Al analizar comparativamente los registros electroquímicos sobre Cu en presencia de combinaciones de TOH/Carv y los aceites esenciales de *T. vulgaris* y *O. vulgare*, así como también los espectros ATR-FTIR obtenidos luego de los tratamientos, se pudo concluir que el Carv desempeña un rol fundamental en la electropolimerización de las mezclas de monómeros y aceites esenciales, generando recubrimientos con espectros ATR-FTIR muy similares al polyCarvCu.

De relevancia, tanto desde el punto de vista fundamental como aplicado, es la demostración de la importancia del estudio de la evolución en el tiempo del proceso de electropolimerización para distintos potenciales en cuanto al cambio de los productos formados así como en la modificación de la estructura espacial de la película formada, que varían con el tiempo y con el potencial, que permite lograr la selección de las condiciones que conducen a una película polimérica óptima a partir de la mejor combinación metal/FF/tratamiento. De acuerdo a ello, sería posible elegir mediante los registros voltamperométricos las distintas variedades de plantas que podrían resultar útiles de acuerdo a la composición de su aceite esencial, logrando una aplicación directa del aceite, sin procesamiento de purificación de los fitocompuestos, lo cual es una importante ventaja en el contexto de la Química Verde y constituye una estrategia innovadora (EIE).

### *Interacciones de los fitocompuestos fenólicos con metales de alta velocidad de degradación*

En el caso de los metales de alta velocidad de degradación como Mg y aleaciones se pudieron formar sobre ellos películas poliméricas de FF a través de programas de perturbación y medios electrolíticos acordes a las características activas de dichos metales. Se logró electropolimerizar TOH y el Carv sobre dichas superficies utilizando salicilato de sodio en el electrolito. Los electropolímeros de polyTOH y polyCarv formados sobre Mg puro, de muy alta velocidad de degradación, no mostraron inhibición de la corrosión del metal en medio biológico. Sin embargo, fue posible formar electropolímeros de polyTOH sobre la aleación AZ31 que permitieron controlar la corrosión reduciendo la liberación de iones  $Mg^{2+}$  en medio biológico. El análisis por ATR-FTIR de la película de polyTOH-AZ31 mostró la presencia de uniones éter entre monómeros y grupos oxhidrilos

o moléculas de H<sub>2</sub>O recludas en la matriz polimérica, en forma similar a lo encontrado en el recubrimiento de polyTOHCu. Adicionalmente, los estudios de viabilidad celular sobre el biomaterial con tratamiento evidenciaron una biocompatibilidad similar a la del control de AZ31 propuesto como material implantable.

También se evaluó la posibilidad de realizar el recubrimiento en otras aleaciones de Mg como la ZEK100. Se pudo demostrar que es posible electropolimerizar TOH, Carv y ácido trans-ferúlico mediante técnicas potenciodinámicas, resultando el polyTOH como la película con mejores propiedades de inhibición de la corrosión.

Finalmente se investigó la posibilidad de inhibición de la adhesión de bacterias por parte del recubrimiento de polyTOH sobre AZ31. Las imágenes de microscopía SEM y la espectroscopía EDS revelaron que dicho recubrimiento reduce la precipitación de fosfatos y carbonatos sobre la superficie de la misma. Pudo constatar que dichas zonas son preferenciales para la adhesión bacteriana en el control sin cobertura, por lo que la presencia de la película polimérica permitió reducir significativamente (30 veces frente al control de la aleación) la colonización de *S. aureus* sobre el biomaterial. Estos resultados son de suma importancia tanto desde el punto de vista fundamental como aplicado, ya que mostraron que la distribución de las bacterias adheridas dependía fuertemente de la composición superficial del sustrato. Asimismo, cabe destacar, que la reducción de la adhesión bacteriana, logrando la disminución del tamaño de los acúmulos, permitió aumentar la eficiencia de antibióticos de uso sistémico tales como la levofloxacina, utilizados durante en tratamiento luego de la implantación.

Los resultados del presente trabajo permitieron lograr un avance en el conocimiento del complejo problema relacionado con la interfaz biomaterial metálico degradable/medio biológico que condujeron a generar modificaciones ecocompatibles, bioactivas y biocompatibles sobre superficies de metales empleados en biomedicina y en la industria estableciendo las bases para la realización de nuevos estudios aplicables a otros compuestos naturales y distintos materiales.

# Referencias bibliográficas

- [1] H. Tian, Y.F. Cheng, W. Li, B. Hou, Triazolyl-acylhydrazone derivatives as novel inhibitors for copper corrosion in chloride solutions, *Corros. Sci.* 100 (2015) 341–352. doi:10.1016/j.corsci.2015.08.022.
- [2] G. Kear, B.D. Barker, F.C. Walsh, Electrochemical corrosion of unalloyed copper in chloride media--a critical review, *Corros. Sci.* 46 (2004) 109–135. doi:10.1016/S0010-938X(02)00257-3.
- [3] M. Shahid, Corrosion protection with eco-friendly inhibitors, *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* 2 (2011) 1–6. doi:10.1088/2043-6262/2/4/043001.
- [4] R.A. Wuana, F.E. Okieimen, Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks, and best available strategies for remediation, *Heavy Met. Contam. Water Soil Anal. Assessment, Remediat. Strateg.* 2011 (2014) 1–50. doi:10.1201/b16566.
- [5] A. Purnama, H. Hermawan, J. Couet, D. Mantovani, Assessing the biocompatibility of degradable metallic materials: State-of-the-art and focus on the potential of genetic regulation, *Acta Biomater.* 6 (2010) 1800–1807. doi:10.1016/j.actbio.2010.02.027.
- [6] S. Zhu, N. Huang, L. Xu, Y. Zhang, H. Liu, H. Sun, et al., Biocompatibility of pure iron: In vitro assessment of degradation kinetics and cytotoxicity on endothelial cells, *Mater. Sci. Eng. C* 29 (2009) 1589–1592. doi:10.1016/j.msec.2008.12.019.
- [7] P.B. Tchounwou, C.G. Yedjou, A.K. Patlolla, D.J. Sutton, Heavy Metal Toxicity and the Environment, in: A. Luch (Ed.), *Mol. Clin. Environ. Toxicol., Experienci*, Springer, Basel, 2012: pp. 133–164. doi:10.1007/978-3-7643-8340-4.
- [8] J.R. Peralta-Videa, L. Zhao, M.L. Lopez-Moreno, G. de la Rosa, J. Hong, J.L. Gardea-Torresdey, Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008-2010, *J. Hazard. Mater.* 186 (2011) 1–15. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.11.020.
- [9] P.C. Nagajyoti, K.D. Lee, T.V.M. Sreekanth, Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review, *Environ. Chem. Lett.* 8 (2010) 199–216. doi:10.1007/s10311-010-0297-8.
- [10] V.I. Lushchak, Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals, *Aquat. Toxicol.* 101 (2011) 13–30. doi:10.1016/j.aquatox.2010.10.006.
- [11] P.B. Raja, M.G. Sethuraman, Natural products as corrosion inhibitor for metals in corrosive media — A review, *Mater. Lett.* 62 (2008) 113–116. doi:10.1016/j.matlet.2007.04.079.
- [12] B. Ratner, D., A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons, *Biomaterials Science. An introduction to materials in medicine*, Third edit, Academic Press. Elsevier, Canada, 2013.
- [13] G. Duffo, *Materiales y materias primas - Biomateriales*, in: *Mater. y Mater. Primas*, Ministerio, 2011: pp. 7–11. doi:789. C1229ACE.
- [14] J.P. Wu, S. Pickle, Extended use of the intrauterine device: A literature review and recommendations for clinical practice, *Contraception.* 89 (2014) 495–503. doi:10.1016/j.contraception.2014.02.011.
- [15] F. Alvarez, P.L. Schilardi, M.A. Fernández Lorenzo, Reduction of the “burst release” of copper ions from copper-based intrauterine devices by organic inhibitors, *Contraception.* 85 (2012) 91–98. doi:10.1016/j.contraception.2011.05.011.
- [16] M. Moravej, D. Mantovani, Biodegradable metals for cardiovascular stent application: Interests and new opportunities, *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 4250–4270. doi:10.3390/ijms12074250.
- [17] D.M. Vasconcelos, S.G. Santos, M. Lamghari, M.A. Barbosa, The two faces of metal ions: From implants rejection to tissue repair/regeneration., *Biomaterials.* 84 (2016) 262–75. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.01.046.
- [18] L. Ren, K. Yang, *Antibacterial design for metal implants*, Elsevier Ltd, 2016. doi:10.1016/B978-0-08-101289-5.00008-1.
- [19] Y.F. Zheng, X.N. Gu, F. Witte, Biodegradable metals, *Mater. Sci. Eng. R Reports.* 77 (2014) 1–34. doi:10.1016/j.mser.2014.01.001.
- [20] M. Moravej, D. Mantovani, Biodegradable metals for cardiovascular stent application: Interests and new opportunities, *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 4250–4270. doi:10.3390/ijms12074250.
- [21] R. Willumeit, J. Fischer, F. Feyerabend, N. Hort, U. Bismayer, S. Heidrich, et al., Chemical surface alteration of biodegradable magnesium exposed to corrosion media, *Acta Biomater.* 7 (2011) 2704–2715. doi:10.1016/j.actbio.2011.03.004.
- [22] H. Wang, Z. Shi, In vitro biodegradation behavior of magnesium and magnesium alloy, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 98 B (2011) 203–209. doi:10.1002/jbm.b.31769.
- [23] M. Ahamed, M.A. Siddiqui, M.J. Akhtar, I. Ahmad, A.B. Pant, H.A. Alhadlaq, Genotoxic potential of copper oxide

- nanoparticles in human lung epithelial cells., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396 (2010) 578–83. doi:10.1016/j.bbrc.2010.04.156.
- [24] M.P. Ling, W.C. Lin, C.C. Liu, Y.S. Huang, M.J. Chueh, T.S. Shih, Risk management strategy to increase the safety of workers in the nanomaterials industry, *J. Hazard. Mater.* 229–230 (2012) 83–93. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.05.073.
- [25] M. Mahmoudi, I. Lynch, M.R. Ejtehadi, M.P. Monopoli, F.B. Bombelli, S. Laurent, Protein-nanoparticle interactions: Opportunities and challenges, *Chem. Rev.* 111 (2011) 5610–5637. doi:10.1021/cr100440g.
- [26] E.A. Fairbairn, A.A. Keller, L. Mädler, D. Zhou, S. Pokhrel, G.N. Cherr, Metal oxide nanomaterials in seawater: Linking physicochemical characteristics with biological response in sea urchin development, *J. Hazard. Mater.* 192 (2011) 1565–1571. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.06.080.
- [27] W.D. Müller, M.L. Nascimento, M. Zeddies, M. Córscico, L.M. Gassa, M.A.F.L. de Mele, Magnesium and its alloys as degradable biomaterials. Corrosion studies using potentiodynamic and EIS electrochemical techniques, *Mater. Res.* 10 (2007).
- [28] F. Witte, The history of biodegradable magnesium implants: A review, *Acta Biomater.* 6 (2010) 1680–1692. doi:10.1016/j.actbio.2010.02.028.
- [29] M.I. Rahim, A. Babbar, S. Lienenklaus, M.C. Pils, M. Rohde, Degradable magnesium implant-associated infections by bacterial biofilms induce robust localized and systemic inflammatory reactions in a mouse model, *Biomed. Mater.* 12 (2017). doi:10.1088/1748-605X/aa7667.
- [30] A.F. Cipriano, J. Lin, A. Lin, A. Sallee, B. Le, M.C. Cortez Alcaraz, et al., Degradation of Bioresorbable Mg–4Zn–1Sr Intramedullary Pins and Associated Biological Responses in Vitro and in Vivo, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 9 (2017) 44332–44355. doi:10.1021/acsami.7b15975.
- [31] J. Pourahmad, M.R. Eskandari, B. Daraei, A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Thallium (I) and Thallium (III), *Environ. Toxicol.* 25 (2010) 456–467. doi:10.1002/tox.20590.
- [32] M. Valko, H. Morris, M. Cronin, Metals, Toxicity and Oxidative Stress, *Curr. Med. Chem.* 12 (2005) 1161–1208. doi:10.2174/0929867053764635.
- [33] L.M. Gaetke, C.K. Chow, Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients, *Toxicology.* 189 (2003) 147–163. doi:10.1016/S0300-483X(03)00159-8.
- [34] Y.C. Pan, Y. Wen, R. Zhang, Y.Y. Wang, Z.R. Zhang, H.F. Yang, Electrochemical and SERS spectroscopic investigations of 4-methyl-4H-1,2,4-triazole-3-thiol monolayers self-assembled on copper surface, *Appl. Surf. Sci.* 258 (2012) 3956–3961. doi:10.1016/j.apsusc.2011.12.070.
- [35] Sudheer, M.A. Quraishi, Electrochemical and theoretical investigation of triazole derivatives on corrosion inhibition behavior of copper in hydrochloric acid medium, *Corros. Sci.* 70 (2013) 161–169. doi:10.1016/j.corsci.2013.01.025.
- [36] S.M. Milić, M.M. Antonijević, Some aspects of copper corrosion in presence of benzotriazole and chloride ions, *Corros. Sci.* 51 (2009) 28–34. doi:10.1016/j.corsci.2008.10.007.
- [37] Z. Khiati, A.A. Othman, M. Sanchez-Moreno, M.C. Bernard, S. Joiret, E.M.M. Sutter, et al., Corrosion inhibition of copper in neutral chloride media by a novel derivative of 1,2,4-triazole, *Corros. Sci.* 53 (2011) 3092–3099. doi:10.1016/j.corsci.2011.05.042.
- [38] M.M. Antonijević, M.B. Petrovic, Copper corrosion inhibitors. A review, *Int. J. Electrochem. Sci.* 3 (2008) 1–28. doi:10.1016/j.ijengsci.2004.12.001.
- [39] M.P. Staiger, A.M. Pietak, J. Huadmai, G. Dias, Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review, *Biomaterials.* 27 (2006) 1728–1734. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.10.003.
- [40] F. Witte, V. Kaese, H. Haferkamp, E. Switzer, A. Meyer-Lindenberg, C.J. Wirth, et al., In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response, *Biomaterials.* 26 (2005) 3557–3563. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.09.049.
- [41] A. Atrens, M. Liu, N.I. Zainal Abidin, Corrosion mechanism applicable to biodegradable magnesium implants, *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.* 176 (2011) 1609–1636. doi:10.1016/j.mseb.2010.12.017.
- [42] M. Carboneras, C. Iglesias, B.T. Pérez-Maceda, J. a. Del Valle, M.C. García-Alonso, M. a. Alobera, et al., Comportamiento frente a la corrosión y biocompatibilidad *in vitro/in vivo* de la aleación AZ31 modificada superficialmente, *Rev. Metal.* 47 (2011) 212–223. doi:10.3989/revmetalm.1065.
- [43] D.A. Robinson, R.W. Griffith, D. Shechtman, R.B. Evans, M.G. Conzemius, In vitro antibacterial properties of magnesium metal against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, *Acta Biomater.* 6 (2010) 1869–1877. doi:10.1016/j.actbio.2009.10.007.
- [44] S. Zaatreh, D. Haffner, M. Strauss, T. Dauben, C. Zamponi, W. Mittelmeier, et al., Thin magnesium layer confirmed as an antibacterial and biocompatible implant coating in a co-culture model, *Mol. Med. Rep.* 15 (2017) 1624–1630. doi:10.3892/mmr.2017.6218.
- [45] S. Zaatreh, D. Haffner, M. Strauß, K. Wegner, M. Warkentin, C. Lurtz, et al., Fast corroding, thin magnesium

- coating displays antibacterial effects and low cytotoxicity, *Biofouling*. 33 (2017) 294–305. doi:10.1080/08927014.2017.1303832.
- [46] H.S. Ryu, S.-H. Hong, Corrosion Resistance and Antibacterial Properties of Ag-Containing MAO Coatings on AZ31 Magnesium Alloy Formed by Microarc Oxidation, *J. Electrochem. Soc.* 157 (2010) C131–C136. doi:10.1149/1.3301829.
- [47] M.D. Pereda, C. Alonso, M. Gamero, J.A. Del Valle, M. Fernández Lorenzo de Mele, Comparative study of fluoride conversion coatings formed on biodegradable powder metallurgy Mg: The effect of chlorides at physiological level, *Mater. Sci. Eng. C*. 31 (2011). doi:10.1016/j.msec.2011.01.010.
- [48] C.A. Grillo, F. Alvarez, M.A. Fernández Lorenzo, Biological effects of magnesium particles degradation on UMR-106 cell line: influence of fluoride treatments, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 88 (2011) 471–6. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.07.035.
- [49] M.D. Pereda, C. Alonso, L. Burgos-Asperilla, J.A. Del Valle, O.A. Ruano, P. Perez, et al., Corrosion inhibition of powder metallurgy Mg by fluoride treatments, *Acta Biomater.* 6 (2010) 1772–1782. doi:10.1016/j.actbio.2009.11.004.
- [50] C. Alonso, J.A. Del Valle, M. Gamero, M. Fernández Lorenzo De Mele, Do phosphate ions affect the biodegradation rate of fluoride-treated Mg?, *Mater. Lett.* 68 (2012). doi:10.1016/j.matlet.2011.10.048.
- [51] C. Janning, E. Willbold, C. Vogt, J. Nellesen, A. Meyer-lindenber, H. Windhagen, Magnesium hydroxide temporarily enhancing osteoblast activity and decreasing the osteoclast number in peri-implant bone remodelling, *Acta Biomater.* 6 (2010) 1861–1868. doi:10.1016/j.actbio.2009.12.037.
- [52] P. Tian, D. Xu, X. Liu, Mussel-inspired functionalization of PEO/PCL composite coating on a biodegradable AZ31 magnesium alloy, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 141 (2016) 327–337. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.02.004.
- [53] M. Cheng, Y. Qiao, Q. Wang, H. Qin, X. Zhang, X. Liu, Dual ions implantation of zirconium and nitrogen into magnesium alloys for enhanced corrosion resistance, antimicrobial activity and biocompatibility, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 148 (2016) 200–210. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.08.056.
- [54] E. Willbold, X. Gu, D. Albert, K. Kalla, K. Bobe, M. Brauneis, et al., Effect of the addition of low rare earth elements (lanthanum, neodymium, cerium) on the biodegradation and biocompatibility of magnesium, *Acta Biomater.* 11 (2015) 554–562. doi:10.1016/j.actbio.2014.09.041.
- [55] F. Witte, F. Feyerabend, P. Maier, J. Fischer, M. Störmer, C. Blawert, et al., Biodegradable magnesium-hydroxyapatite metal matrix composites, *Biomaterials*. 28 (2007) 2163–2174. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.12.027.
- [56] C.A. Grillo, F. Alvarez, M.A.F.L. De Mele, Cellular response to rare earth mixtures (La and Gd) as components of degradable Mg alloys for medical applications, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 117 (2014) 312–321. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.02.030.
- [57] E. Trigo, E.V. Morales, L. Grassi, J. Losada, J.P. Dellisanti, M.R. Murmis, et al., Bioeconomía argentina. Visión desde Agroindustria, Ministerio de Agroindustria, Presidencia de la Nación Argentina, Buenos Aires, 2014.
- [58] M. Wierny, A. Coremberg, R. Costa, E. Trigo, M. Regúnaga, Medición de la Bioeconomía. Cuantificación del caso argentino, Bolsa de C, Bolsa de Cereales, Ciudad Autónoma de Buenos Aires :, 2016.
- [59] G.E. Gutman, P.J. Lavarello, Biotecnología Industrial en Argentina. Estrategias empresariales frente al nuevo paradigma, 2014.
- [60] P. Anastas, N. Eghbali, Green chemistry: Principles and practice, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 301–312. doi:10.1039/b918763b.
- [61] H.C. Erythropel, J.B. Zimmerman, T.M. De Winter, L. Petitjean, F. Melnikov, C.H. Lam, et al., The Green ChemisTREE: 20 years after taking root with the 12 principles, *Green Chem.* 20 (2018) 1929–1961. doi:10.1039/c8gc00482j.
- [62] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, Biological effects of essential oils - A review, *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008) 446–475. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106.
- [63] B. Lima, S. López, L. Luna, M.B. Agüero, L. Aragón, A. Tapia, et al., Essential Oils of Medicinal Plants from the Central Andes of Argentina: Chemical Composition, and Antifungal, Antibacterial, and Insect-Repellent Activities, *Chem. Biodivers.* 8 (2011) 924–936.
- [64] K.R. Riella, R.R. Marinho, J.S. Santos, R.N. Pereira-Filho, J.C. Cardoso, R.L.C. Albuquerque-Junior, et al., Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents., *J. Ethnopharmacol.* 143 (2012) 656–63. doi:10.1016/j.jep.2012.07.028.
- [65] E. Khamis, N. Alandis, Herbs as New Type of Green Inhibitors For Acidic Corrosion of Steel, *Materwiss. Werksttech.* 554 (2002) 550–554. doi:10.1002/1521-4052(200209)33.
- [66] A.S. Fouda, K. Shalabi, A.A. Idress, Thymus Vulgarise Extract as Nontoxic Corrosion Inhibitor for Copper and  $\alpha$ -Brass in 1 M HNO<sub>3</sub> Solutions, *Int. J. Electrochem. Sci.* 9 (2014) 5126–5154.
- [67] A.Y. El-Etre, M. Abdallah, Z.E. El-Tantawy, Corrosion inhibition of some metals using lawsonia extract, *Corros.*

- Sci. 47 (2005) 385–395. doi:10.1016/j.corsci.2004.06.006.
- [68] F. Alvarez, C.A. Grillo, P. Schilardi, A. Rubert, G. Benítez, C. Lorente, et al., Decrease in cytotoxicity of copper-based intrauterine devices (IUD) pretreated with 6-mercaptopurine and pterin as biocompatible corrosion inhibitors, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 5 (2013) 249–255. doi:10.1021/am3025307.
- [69] Y.M. Abdallah, H.M. Hassan, K. Shalabi, A.S. Fouda, Effects of *Arctostaphylos uva-ursi* Extract as Green Corrosion Inhibitor for Cu10Ni Alloy in 1 M HNO<sub>3</sub>, *Int. J. Electrochem. Sci.* 9 (2014) 5073–5091.
- [70] A.M. Abdel-Gaber, E. Khamis, H. Abo-ElDahab, S. Adeel, Inhibition of aluminium corrosion in alkaline solutions using natural compound, *Mater. Chem. Phys.* 109 (2008) 297–305. doi:10.1016/j.matchemphys.2007.11.038.
- [71] K.P. Anthony, S.A. Deolu-Sobogun, M.A. Saleh, Comprehensive assessment of antioxidant activity of essential oils, *J. Food Sci.* 77 (2012) 839–843. doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02795.x.
- [72] M. Hazzit, A. Baaliouamer, M.L. Faleiro, M.G. Miguel, Composition of the essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 6314–6321. doi:10.1021/jf0606104.
- [73] H. Satooka, I. Kubo, Effects of thymol on B16-F10 melanoma cells., *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 2746–52. doi:10.1021/jf204525b.
- [74] A. Ozkan, A. Erdogan, A Comparative Study of the Antioxidant/Prooxidant Effects of Carvacrol and Thymol at Various Concentrations on Membrane and DNA of Parental and Drug Resistant H1299 Cells, *Nat. Prod. Commun.* 7 (2012) 1557–1560.
- [75] M. Ferreira, H. Varela, R.M. Torresi, G. Tremiliosi-Filho, Electrode passivation caused by polymerization of different phenolic compounds, *Electrochim. Acta.* 52 (2006) 434–442. doi:10.1016/j.electacta.2006.05.025.
- [76] A. Sánchez, O. Martínez-Mora, E. Martínez-Benavidez, J. Hernández, Z. Domínguez, M. Salas-Reyes, Electrochemical behaviour of new dimeric esters and amides derived from caffeic acid in dimethylsulfoxide, *Org. Biomol. Chem.* 12 (2014) 5981–5989. doi:10.1039/c4ob00823e.
- [77] Z. Ezerskis, Z. Jusys, Electropolymerization of chlorinated phenols on a Pt electrode in alkaline solution Part I : A cyclic voltammetry study, *J. Appl. Electrochem.* (2001) 1117–1124.
- [78] S.M. Sayyah, A.B. Khalil, R.E. Azooz, F. Mohame, Electropolymerization of Some Ortho-Substituted Phenol Derivatives on Pt-Electrode from Aqueous Acidic Solution; Kinetics, Mechanism, Electrochemical Studies and Characterization of the Polymer Obtained, in: *Electropolymerization*, InTech, 2011. doi:10.5772/34357.
- [79] H. Nady, M.M. El-Rabiei, G.M.A. El-Hafez, Electrochemical oxidation behavior of some hazardous phenolic compounds in acidic solution, *Egypt. J. Pet.* (2016) 669–678. doi:10.1016/j.ejpe.2016.10.009.
- [80] S.M. Sayyah, S.S. Abd-Elrehim, R.E. Azooz, F. Mohamed, Electrochemical study of the copolymer formation between o-chlorophenol and o-hydroxyphenol, *J. Korean Chem. Soc.* 58 (2014) 289–296. doi:10.5012/jkcs.2014.58.3.289.
- [81] M.C. Turhan, M. Weiser, H. Jha, S. Virtanen, Optimization of electrochemical polymerization parameters of polypyrrole on Mg-Al alloy (AZ91D) electrodes and corrosion performance, *Electrochim. Acta.* 56 (2011) 5347–5354. doi:10.1016/j.electacta.2011.03.120.
- [82] K. Cysewska, M. Gazda, P. Jasiński, Influence of electropolymerization temperature on corrosion, morphological and electrical properties of PPy doped with salicylate on iron, *Surf. Coatings Technol.* 328 (2017) 248–255. doi:10.1016/j.surfcoat.2017.08.055.
- [83] G. Mengoli, M.M. Musiani, An Overview of Phenol Electropolymerization for Metal Protection, *J. Electrochem. Soc.* 134 (1987) 643C–652C. doi:10.1149/1.2100379.
- [84] A. Guenbour, A. Kacemi, A. Benbachir, L. Aries, Electropolymerization of 2-aminophenol. Electrochemical and spectroscopic studies, *Prog. Org. Coatings.* 38 (2000) 121–126. doi:10.1016/S0300-9440(00)00085-0.
- [85] A. Guenbour, A. Kacemi, A. Benbachir, Corrosion protection of copper by polyaminophenol films, *Prog. Org. Coatings.* 39 (2000) 151–155. doi:10.1016/S0300-9440(00)00141-7.
- [86] A. Srinivasan, P. Ranjani, N. Rajendran, Electrochemical polymerization of pyrrole over AZ31 Mg alloy for biomedical applications, *Electrochim. Acta.* 88 (2013) 310–321. doi:10.1016/j.electacta.2012.10.087.
- [87] Montana State University, Center for Biofilm Engineering, (n.d.). <http://www.biofilm.montana.edu/>.
- [88] Montana State University, Center for Biofilm Engineering, (n.d.).
- [89] D. Campoccia, L. Montanaro, C.R. Arciola, A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces, *Biomaterials.* 34 (2013) 8533–8554. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.07.089.
- [90] A. Miñán, P.L. Schilardi, M.A. Fernández Lorenzo, The importance of 2D aggregates on the antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* sessile bacteria, *Mater. Sci. Eng. C.* 61 (2016) 199–206. doi:10.1016/j.msec.2015.12.034.
- [91] R. Tsaryk, K. Peters, S. Barth, R.E. Unger, D. Scharnweber, C.J. Kirkpatrick, The role of oxidative stress in pro-inflammatory activation of human endothelial cells on Ti6Al4V alloy, *Biomaterials.* 34 (2013) 8075–8085. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.07.030.

- [92] J. Sun, Y. Zhu, L. Meng, P. Chen, T. Shi, X. Liu, et al., Electrophoretic deposition of colloidal particles on Mg with cytocompatibility, antibacterial performance, and corrosion resistance, *Acta Biomater.* 45 (2016) 387–398. doi:10.1016/j.actbio.2016.09.007.
- [93] M.I. Rahim, R. Eifler, B. Rais, P.P. Mueller, Alkalization is responsible for antibacterial effects of corroding magnesium, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 103 (2015) 3526–3532. doi:10.1002/jbm.a.35503.
- [94] O. Charyeva, J. Neilands, G. Svensäter, A. Wennerberg, Bacterial Biofilm Formation on Resorbing Magnesium Implants, *Open J. Med. Microbiol.* 05 (2015) 1–11. doi:10.4236/ojmm.2015.51001.
- [95] C. Díaz, A. Miñán, P.L. Schilardi, M.A. Fernández Lorenzo, Synergistic antimicrobial effect against early biofilm formation: Micropatterned surface plus antibiotic treatment, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 40 (2012) 221–226. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.05.012.
- [96] M. Salwiczek, Y. Qu, J. Gardiner, R.A. Strugnell, T. Lithgow, K.M. McLean, et al., Emerging rules for effective antimicrobial coatings, *Trends Biotechnol.* 32 (2014) 82–90. doi:10.1016/j.tibtech.2013.09.008.
- [97] S. Lower, *Chemistry LibreTexts: 24.8. Electrochemical Corrosion*, (n.d.). [https://chem.libretexts.org/Textbook\\_Maps/General\\_Chemistry/Book%3A\\_Chem1\\_\(Lower\)/16%3A\\_Electrochemistry/24.08%3A\\_Electrochemical\\_Corrosion](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/General_Chemistry/Book%3A_Chem1_(Lower)/16%3A_Electrochemistry/24.08%3A_Electrochemical_Corrosion).
- [98] D.A. Jones, *Principles and prevention of corrosion*, Prentice Hall Inc., 1996.
- [99] G.E. Badea, a Caraban, M. Sebesan, S. Dzitac, P. Cret, a Setel, Polarisation Measurements Used for Corrosion Rates Determination, *J. Sustenabke Energy.* 1 (2010) 1–4.
- [100] Y. Matsushita, A. Nakamura, D. Aoki, S. Yagami, Bio-based Polymer from Ferulic Acid by Electropolymerization, *BioResources.* 11 (2016) 9789–9802.
- [101] J.L.N. Xavier, E. Ortega, J.Z. Ferreira, a. M. Bernardes, V. Pérez-Herranz, An electrochemical study of phenol oxidation in acidic medium, *Int. J. Electrochem. Sci.* 6 (2011) 622–636.
- [102] K. Boekelheide, R. Brent, G. Charnley, V.G. Cheung, S.G. Jr, Toxicity testing in the 21st Century: A vision and a strategy, *J Toxicol Env. Heal. B Crit Rev.* 13 (2010) 51–138. doi:10.1080/10937404.2010.483176.
- [103] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- [104] N.A.P. Franken, H.M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, C. van Bree, Clonogenic assay of cells in vitro., *Nat. Protoc.* 1 (2006) 2315–9. doi:10.1038/nprot.2006.339.
- [105] C. and L.S. Institute, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Fifth Informational Supplement*, Wayne, P. A., 2015.
- [106] J.M. Andrews, Determination of minimum inhibitory concentrations, *J. Antimicrob. Chemother.* 48 (2001) 5–16. doi:https://doi.org/10.1093/jac/dkf083.
- [107] A. Simchi, E. Tamjid, F. Pishbin, A.R. Boccaccini, Recent progress in inorganic and composite coatings with bactericidal capability for orthopaedic applications, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 7 (2011) 22–39. doi:10.1016/j.nano.2010.10.005.
- [108] A. Marchese, C.R. Arciola, E. Coppo, R. Barbieri, D. Barreca, S. Chebaibi, et al., The natural plant compound carvacrol as an antimicrobial and anti-biofilm agent: mechanisms, synergies and bio-inspired anti-infective materials, *Biofouling.* 0 (2018) 1–27. doi:10.1080/08927014.2018.1480756.
- [109] Y. Chen, C. Chen, Corilagin prevents tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress injury in cultured N9 murine microglia cells, *Neurochem. Int.* 59 (2011) 290–296. doi:10.1016/j.neuint.2011.05.020.
- [110] L. Siroli, F. Patrignani, F. Gardini, R. Lanciotti, Effects of sub-lethal concentrations of thyme and oregano essential oils, carvacrol, thymol, citral and trans-2-hexenal on membrane fatty acid composition and volatile molecule profile of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*, *Food Chem.* 182 (2015) 185–192. doi:10.1016/j.foodchem.2015.02.136.
- [111] L.H. Wang, M.S. Wang, X.A. Zeng, Z.H. Zhang, D.M. Gong, Y.B. Huang, Membrane Destruction and DNA Binding of *Staphylococcus aureus* Cells Induced by Carvacrol and Its Combined Effect with a Pulsed Electric Field, *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) 6355–6363. doi:10.1021/acs.jafc.6b02507.
- [112] E. Horvathova, V. Turcaniova, D. Slamenova, Comparative study of DNA-damaging and DNA-protective effects of selected components of essential plant oils in human leukemic cells K562, *Neoplasma.* 54 (2007) 478–483.
- [113] A. Marchese, I.E. Orhan, M. Daglia, R. Barbieri, A. Di Lorenzo, S.F. Nabavi, et al., Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature, *Food Chem.* 210 (2016) 402–414. doi:10.1016/j.foodchem.2016.04.111.
- [114] N. V. Yanishlieva, E.M. Marinova, M.H. Gordon, V.G. Raneva, Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems, *Food Chem.* 64 (1999) 59–66. doi:10.1016/S0308-8146(98)00086-7.
- [115] M. Ezzat Abd El-Hack, M. Alagawany, M. Ragab Farag, R. Tiwari, K. Karthik, K. Dhama, et al., Beneficial impacts of thymol essential oil on health and production of animals, fish and poultry: a review, *J. Essent. Oil Res.* 28 (2016) 365–382. doi:10.1080/10412905.2016.1153002.

- [116] J. Mastelić, I. Jerković, I. Blažević, M. Poljak-Blaži, S. Borović, I. Ivančić-Baće, et al., Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 3989–3996. doi:10.1021/jf073272v.
- [117] U. Undeğer, a Başaran, G.H. Degen, N. Başaran, Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol., *Food Chem. Toxicol.* 47 (2009) 2037–43. doi:10.1016/j.fct.2009.05.020.
- [118] Y.-S. Kim, J.-W. Hwang, S.-H. Kang, E.-H. Kim, Y.-J. Jeon, J.-H. Jeong, et al., Thymol from *Thymus quinquecostatus* Celak. protects against tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in Chang cells., *J. Nat. Med.* 68 (2014) 154–62. doi:10.1007/s11418-013-0786-8.
- [119] P.R. Archana, B. Nageshwar Rao, M. Ballal, B.S. Satish Rao, Thymol, a naturally occurring monocyclic dietary phenolic compound protects Chinese hamster lung fibroblasts from radiation-induced cytotoxicity, *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 680 (2009) 70–77. doi:10.1016/j.mrgentox.2009.09.010.
- [120] S. Aydin, A.A. Başaran, N. Başaran, The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C, *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 581 (2005) 43–53. doi:10.1016/j.mrgentox.2004.10.017.
- [121] N. Kumar, V. Pruthi, Potential applications of ferulic acid from natural sources, *Biotechnol. Reports.* 4 (2014) 86–93. doi:10.1016/j.btre.2014.09.002.
- [122] S. Ou, K.C. Kwok, Ferulic acid: Pharmaceutical functions, preparation and applications in foods, *J. Sci. Food Agric.* 84 (2004) 1261–1269. doi:10.1002/jsfa.1873.
- [123] M. Srinivasan, A.R. Sudheer, V.P. Menon, Recent Advances in Indian Herbal Drug Research Guest Editor: Thomas Paul Asir Devasagayam Ferulic Acid: Therapeutic Potential Through Its Antioxidant Property, *J. Clin. Biochem. Nutr.* 40 (2007) 92–100. doi:10.3164/jcfn.40.92.
- [124] A. Borges, M.J. Saavedra, M. Simões, The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria, *Biofouling.* 28 (2012) 755–767. doi:10.1080/08927014.2012.706751.
- [125] J. Kanski, M. Akseanova, A. Stoyanova, D.A. Butterfield, Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure-activity studies, *J. Nutr. Biochem.* 13 (2002) 273–281. doi:10.1016/S0955-2863(01)00215-7.
- [126] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, L. Jiménez, Polyphenols : food sources and bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (2004) 727–747.
- [127] S. Choubey, L.R. Varughese, V. Kumar, V. Beniwal, Medicinal importance of gallic acid and its ester derivatives: a patent review., *Pharm. Pat. Anal.* 4 (2015) 305–15. doi:10.4155/ppa.15.14.
- [128] K.K. Sohi, N. Mittal, M.K. Hundal, K.L. Khanduja, Gallic acid, an antioxidant, exhibits antiapoptotic potential in human lymphocytes: a Bcl-2 independent mechanism, *J Nutr Sci Vitaminol.* 49 (2003) 221–227.
- [129] Z. Lu, G. Nie, P.S. Belton, H. Tang, B. Zhao, Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives, *Neurochem. Int.* 48 (2006) 263–274. doi:10.1016/j.neuint.2005.10.010.
- [130] S. Umadevi, V. Gopi, S.P. Simna, A. Parthasarathy, S.M.J. Yousuf, V. Elangovan, Studies on the cardio protective role of gallic acid against age-induced cell proliferation and oxidative stress in H9C2 (2-1) cells, *Cardiovasc. Toxicol.* 12 (2012) 304–311. doi:10.1007/s12012-012-9170-2.
- [131] V. Vijaya Padma, P. Sowmya, T. Arun Felix, R. Baskaran, P. Poornima, Protective effect of gallic acid against lindane induced toxicity in experimental rats, *Food Chem. Toxicol.* 49 (2011) 991–998. doi:10.1016/j.fct.2011.01.005.
- [132] A. a El-Nekeety, S.R. Mohamed, A.S. Hathout, N.S. Hassan, S.E. Aly, M. a Abdel-Wahhab, Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats., *Toxicol.* 57 (2011) 984–91. doi:10.1016/j.toxicol.2011.03.021.
- [133] A.L. Dawidowicz, E. Rado, D. Wianowska, M. Mardarowicz, J. Gawdzik, Application of PLE for the determination of essential oil components from *Thymus vulgaris* L., *Talanta.* 76 (2008) 878–84. doi:10.1016/j.talanta.2008.04.050.
- [134] S. Burt, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review., *Int. J. Food Microbiol.* 94 (2004) 223–53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
- [135] H. Miladi, R. Ben Slama, D. Mili, S. Zouari, A. Bakhrouf, E. Ammar, Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens, *Nat. Sci.* 05 (2013) 729–739. doi:10.4236/ns.2013.56090.
- [136] H. Miladi, R. Ben Slama, D. Mili, S. Zouari, A. Bakhrouf, E. Ammar, Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens, *Nat. Sci.* 05 (2013) 729–739.

- doi:10.4236/ns.2013.56090.
- [137] V.R. Lombardi, I. Carrera, R. Cacabelos, In Vitro Screening for Cytotoxic Activity of Herbal Extracts, Evidence-Based Complement. Altern. Med. 2017 (2017) 8. doi:<https://doi.org/10.1155/2017/2675631>.
- [138] A. Puškárová, M. Bučková, L. Kraková, D. Pangallo, K. Kozics, The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells, Sci. Rep. 7 (2017) 1–11. doi:10.1038/s41598-017-08673-9.
- [139] J.S. Dambolena, M.P. Zunino, E.I. Lucini, R. Olmedo, E. Banchio, P.J. Bima, et al., Total phenolic content, radical scavenging properties, and essential oil composition of Origanum species from different populations, J. Agric. Food Chem. 58 (2010) 1115–1120. doi:10.1021/jf903203n.
- [140] P.E. Pensel, M.A. Maggiore, L.B. Gende, M.J. Eguaras, M.G. Denegri, M.C. Elissondo, Efficacy of Essential Oils of Thymus vulgaris and Origanum vulgare on Echinococcus granulosus, Interdiscip. Perspect. Infect. Dis. 1–12 (2014).
- [141] L. Mugnaini, S. Nardoni, L. Pistelli, M. Leonardi, L. Giuliotti, M.N. Benvenuti, et al., A herbal antifungal formulation of Thymus serpyllum, Origanum vulgare and Rosmarinus officinalis for treating ovine dermatophytosis due to Trichophyton mentagrophytes, Mycoses. 56 (2013) 333–337. doi:10.1111/myc.12034.
- [142] B. Bayramoglu, S. Sahin, G. Sumnu, Solvent-free microwave extraction of essential oil from oregano, J. Food Eng. 88 (2008) 535–540. doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.03.015.
- [143] R.I. Geran, N.H. Greenberg, M.M. MacDonald, A.M. Schumacher, B.J. Abbott, Protocols for screening chemical agents and natural product against animal tumors and other biological systems (third edition), 1972.
- [144] Sadtler Research Laboratories, W.W. Simons, The Sadtler handbook of infrared spectra, W.W. Simons, Heyden and Son, Philadelphia, 1978.
- [145] L.O. Smith Jr., S.J. Cristol, Sustitución aromática electrofílica, in: Química Orgánica, Reverté, 1972: pp. 350–384.
- [146] A. Michelitsch, A. Rittmannsberger, A. H??fner, U. R??ckert, W. Likussar, Determination of isopropylmethylphenols in black seed oil by differential pulse voltammetry, Phytochem. Anal. 15 (2004) 320–324. doi:10.1002/pca.785.
- [147] M. Salas-Reyes, J. Hernández, Z. Domínguez, F.J. González, P.D. Astudillo, R.E. Navarro, et al., Electrochemical oxidation of caffeic and ferulic acid derivatives in aprotic medium, J. Braz. Chem. Soc. 22 (2011) 693–701. doi:10.1590/S0103-50532011000400012.
- [148] W.-C. Chen, T.-C. Wen, A. Gopalan, Electrochemical and Spectroelectrochemical Evidences for Copolymer Formation Between 2-Aminodiphenylamine and Aniline, J. Electrochem. Soc. 148 (2001) E427. doi:10.1149/1.1405519.
- [149] D.M. Stanković, Sensitive voltammetric determination of thymol in essential oil of Carum copticum seeds using boron-doped diamond electrode, Anal. Biochem. 486 (2015) 1–4. doi:10.1016/j.ab.2015.06.026.
- [150] P.A. Kilmartin, C.F. Hsu, Characterisation of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry, Food Chem. 82 (2003) 501–512. doi:10.1016/S0308-8146(03)00066-9.
- [151] J. Moncada, J.A. Tamayo, C.A. Cardona, Techno-economic and environmental assessment of essential oil extraction from Oregano (Origanum vulgare) and Rosemary (Rosmarinus officinalis) in Colombia, J. Clean. Prod. 112 (2016) 172–181. doi:10.1016/j.jclepro.2015.09.067.
- [152] A.C.S. Valderrama, G.C. Rojas De, Traceability of Active Compounds of Essential Oils in Antimicrobial Food Packaging Using a Chemometric Method by ATR-FTIR, Am. J. Anal. Chem. 08 (2017) 726–741. doi:10.4236/ajac.2017.811053.
- [153] Z. Ežerskis, Z. Jusys, Electropolymerization of chlorinated phenols on a Pt electrode in alkaline solution. Part IV: A gas chromatography mass spectrometry study, J. Appl. Electrochem. 32 (2002) 543–550. doi:10.1023/A:1016548627078.
- [154] Z. Ežerskis, Z. Jusys, Electropolymerization of chlorinated phenols on a Pt electrode in alkaline solution Part III: A Fourier transformed infrared spectroscopy study, J. Appl. Electrochem. 32 (2002) 755–762. doi:10.1023/A:1020116528984.
- [155] S. Andreescu, D. Andreescu, O. a. Sadik, A new electrocatalytic mechanism for the oxidation of phenols at platinum electrodes, Electrochem. Commun. 5 (2003) 681–688. doi:10.1016/S1388-2481(03)00166-8.
- [156] H. Schulz, R. Quilitzsch, H. Krüger, Rapid evaluation and quantitative analysis of thyme, origano and chamomile essential oils by ATR-IR and NIR spectroscopy, J. Mol. Struct. 661–662 (2003) 299–306. doi:10.1016/S0022-2860(03)00517-9.
- [157] M. Bertuola, D. Pissinis, A. Rubert, E. Prieto, M.A. Fernández Lorenzo, Impact of molecular structure of two natural phenolic isomers on the protective characteristics of electropolymerized nanolayers formed on copper, Electrochim. Acta. 215 (2016) 289–297. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2016.08.100>.
- [158] M. Bertuola, C.A. Grillo, D.E. Pissinis, E.D. Prieto, M. Fernández Lorenzo de Mele, Is the biocompatibility of

- copper with polymerized natural coating dependent on the potential selected for the electropolymerization process?, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 159 (2017) 673–683. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.08.029.
- [159] I. Poljanšek, M. Krajnc, Characterization of phenol-formaldehyde prepolymer resins by in line FT-IR spectroscopy, *Acta Chim. Slov.* 52 (2005) 238–244.
- [160] J. Wang, Y. Cao, B. Sun, C. Wang, Characterisation of inclusion complex of trans-ferulic acid and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, *Food Chem.* 124 (2011) 1069–1075. doi:10.1016/j.foodchem.2010.07.080.
- [161] S. Mathew, T.E. Abraham, Physico-chemical characterization of starch ferulates of different degrees of substitution, *Food Chem.* 105 (2007) 579–589. doi:10.1016/j.foodchem.2007.04.032.
- [162] E. Giannakopoulos, M. Drosos, Y. Deligiannakis, A humic-acid-like polycondensate produced with no use of catalyst, *J. Colloid Interface Sci.* 336 (2009) 59–66. doi:10.1016/j.jcis.2009.03.037.
- [163] W. Wang, Q. Chen, C. Jiang, D. Yang, X. Liu, S. Xu, One-step synthesis of biocompatible gold nanoparticles using gallic acid in the presence of poly-(N-vinyl-2-pyrrolidone), *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 301 (2007) 73–79. doi:10.1016/j.colsurfa.2006.12.037.
- [164] I.Y. Tóth, M. Szekeres, R. Turcu, S. Sáringuer, E. Illés, D. Nesztor, et al., Mechanism of in situ surface polymerization of gallic acid in an environmental-inspired preparation of carboxylated core-shell magnetite nanoparticles, *Langmuir*. 30 (2014) 15451–15461. doi:10.1021/la5038102.
- [165] L. Guo, H. Sato, T. Hashimoto, Y. Ozaki, FTIR study on hydrogen-bonding interactions in biodegradable polymer blends of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(4-vinylphenol), *Macromolecules*. 43 (2010) 3897–3902. doi:10.1021/ma100307m.
- [166] M. Gattrell, D.W. Kirk, A Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study of the Passive Film Produced During Aqueous Acidic Phenol Electro- Oxidation, *J Electrochem Soc.* 139 (1992) 2736–2744. doi:10.1149/1.2068972.
- [167] G. Nikolic, S. Zlatkovic, M. Cakic, S. Cakic, C. Lacnjevac, Z. Rajic, Fast fourier transform IR characterization of epoxy GY systems crosslinked with aliphatic and cycloaliphatic EH polyamine adducts, *Sensors*. 10 (2010) 684–696. doi:10.3390/s100100684.
- [168] A.G. Al Lafi, FTIR spectroscopic analysis of ion irradiated poly (ether ether ketone), *Polym. Degrad. Stab.* 105 (2014) 122–133.
- [169] M.R. Othman, J. Salimon, Analysis of Ethanol Using Copper and Nickel Sheet, *Malaysian J. Anal. Sci.* 11 (2007) 379–387.
- [170] W. Novakowski, M. Bertotti, T.R.L.C. Paixão, Use of copper and gold electrodes as sensitive elements for fabrication of an electronic tongue: Discrimination of wines and whiskies, *Microchem. J.* 99 (2011) 145–151. doi:10.1016/j.microc.2011.04.012.
- [171] T.R.L.C. Paixão, D. Corbo, M. Bertotti, Amperometric determination of ethanol in beverages at copper electrodes in alkaline medium, *Anal. Chim. Acta.* 472 (2002) 123–131. doi:10.1016/S0003-2670(02)00942-X.
- [172] P. Krawczyk, J.M. Skowroński, Multiple anodic regeneration of exfoliated graphite electrodes spent in the process of phenol electrooxidation, *J. Solid State Electrochem.* 18 (2014) 917–928. doi:10.1007/s10008-013-2335-5.
- [173] S. Sundaram, S.K. Annamalai, Selective immobilization of hydroquinone on carbon nanotube modified electrode via phenol electro-oxidation method and its hydrazine electro-catalysis and *Escherichia coli* antibacterial activity, *Electrochim. Acta.* 62 (2012) 207–217. doi:10.1016/j.electacta.2011.12.044.
- [174] X. Yang, J. Kirsch, J. Fergus, A. Simonian, Modeling analysis of electrode fouling during electrolysis of phenolic compounds, *Electrochim. Acta.* 94 (2013) 259–268. doi:10.1016/j.electacta.2013.01.019.
- [175] Y. Zhang, Q. Li, H. Cui, J. Zhai, Removal of phenols from the aqueous solutions based on their electrochemical polymerization on the polyaniline electrode, *Electrochim. Acta.* 55 (2010) 7219–7224. doi:10.1016/j.electacta.2010.07.002.
- [176] J. Wang, M. Jiang, F. Lu, Electrochemical quartz crystal microbalance investigation of surface fouling due to phenol oxidation, *J. Electroanal. Chem.* 444 (1998) 127–132.
- [177] M. Gattrell, D.W. Kirk, A Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study of the Passive Film Produced during Aqueous Acidic Phenol Electro-oxidation, *J. Electrochem. Soc.* 139 (1992) 2736–2744.
- [178] A. Ciszewski, G. Milczarek, Preparation and general properties of chemically modified electrodes based on electro synthesized thin polymeric films derived from eugenol, *Electroanalysis*. 13 (2001) 860–867.
- [179] L. Bao, R. Xiong, G. Wei, Electrochemical polymerization of phenol on 304 stainless steel anodes and subsequent coating structure analysis, *Electrochim. Acta.* 55 (2010) 4030–4038. doi:10.1016/j.electacta.2010.02.052.
- [180] I.S. Al-Sheibany, Qualitative and Quantitative Evaluation of some Organic Compounds in Iraqi Thyme, *Natl. J. Chem.* 19 (2005) 366–379.
- [181] M. Božič, S. Gorgieva, V. Kokol, Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acids for modulating antioxidant and antimicrobial properties, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 2388–2398.

- doi:10.1016/j.carbpol.2011.11.006.
- [182] K. Rajavel, R. Gomathi, S. Manian, R.T. Rajendra Kumar, Characterization of tannic acid- and gallic acid-functionalized single- and multiwalled carbon nanotubes and an in vitro evaluation of their antioxidant properties, *J. Taibah Univ. Med. Sci.* 11 (2016) 469–477. doi:10.1016/j.jtumed.2016.07.006.
- [183] T. Hall, Specialty Metals Make Sophisticated Medical Devices Possible, *Med. Des. Briefs.* (2013). <http://www.medicaldesignbriefs.com/component/content/article/mdb/features/17206>.
- [184] I. Vopálenská, Z. Palková, L. Váchová, Z. Palková, New biosensor for detection of copper ions in water based on immobilized genetically modified yeast cells, *Biosens. Bioelectron.* 72 (2015) 160–167. doi:10.1016/j.bios.2015.05.006.
- [185] G. Kear, B.D. Barker, F.C. Walsh, Electrochemical corrosion of unalloyed copper in chloride media—a critical review, *Corros. Sci.* 46 (2004) 109–135. doi:10.1016/S0010-938X(02)00257-3.
- [186] A. Käkinen, O. Bondarenko, A. Ivask, A. Kahru, The effect of composition of different ecotoxicological test media on free and bioavailable copper from CuSO<sub>4</sub> and CuO nanoparticles: comparative evidence from a Cu-selective electrode and a Cu-biosensor, *Sensors (Basel)*. 11 (2011) 10502–10521. doi:10.3390/s111110502.
- [187] G. Moretti, F. Guidi, G. Grion, Tryptamine as a green iron corrosion inhibitor in 0.5 M deaerated sulphuric acid, *Corros. Sci.* 46 (2004) 387–403. doi:10.1016/S0010-938X(03)00150-1.
- [188] E.E. Oguzie, A.I. Onuchukwu, P.C. Okafor, E.E. Ebenso, Corrosion inhibition and adsorption behaviour of *Ocimum basilicum* extract on aluminium, *Pigment Resin Technol.* 35 (2006) 63–70. doi:10.1108/03699420610652340.
- [189] S. Umoren, Z.M. Gasem, I.B. Obot, Natural products for material protection: Inhibition of mild steel corrosion by date palm seed extracts in acidic media, *Ind. Eng. Chem. Res.* 52 (2013) 14855–14865. doi:10.1021/ie401737u.
- [190] L.J. Aljinović, V. Gotovac, Adsorption and corrosion inhibition properties of thymol, *J. Appl. Electrochem.* 15 (1985) 767–770. doi:10.1007/BF00620573.
- [191] M. Perdicakis, S. Geoffroy, N. Grosselin, J. Bessie, J. Bessière, Application of the scanning reference electrode technique to evidence the corrosion of a natural conducting mineral: Pyrite. Inhibiting role of thymol, *Electrochim. Acta.* 47 (2001) 211–216. doi:10.1016/S0013-4686(01)00553-9.
- [192] M. a. Ameer, a. M. Fekry, Corrosion inhibition of mild steel by natural product compound, *Prog. Org. Coatings.* 71 (2011) 343–349. doi:10.1016/j.porgcoat.2011.04.001.
- [193] G. Bereket, B. Duran, Anticorrosive properties of electrosynthesized poly(m-aminophenol) on copper from aqueous phenylphosphonic acid solution, *Prog. Org. Coatings.* 64 (2009) 57–66. doi:10.1016/j.porgcoat.2008.07.013.
- [194] I. Çakmakci, B. Duran, G. Bereket, Influence of electrochemically prepared poly(pyrrole-co-N-methyl pyrrole) and poly(pyrrole)/poly(N-methyl pyrrole) composites on corrosion behavior of copper in acidic medium, *Prog. Org. Coatings.* 76 (2013) 70–77. doi:10.1016/j.porgcoat.2012.08.015.
- [195] M.J. Ahmed, M. Saifuddin, T. Jannat, S.C. Bhattacharjee, A Rapid Spectrophotometric Method for the Determination of Copper in Real, Environmental, Biological and Soil Samples Using 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol, *Green Chem.* 4 (2010) 1–12.
- [196] C.A. Grillo, M.A. Reigosa, M.A. Fernández Lorenzo, Effects of copper ions released from metallic copper on CHO-K1 cells., *Mutat. Res.* 672 (2009) 45–50. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.09.012.
- [197] C.A. Grillo, M.A. Reigosa, M.A. Fernández Lorenzo, Does over-exposure to copper ions released from metallic copper induce cytotoxic and genotoxic effects on mammalian cells?, *Contraception.* 81 (2010) 343–9. doi:10.1016/j.contraception.2009.12.003.
- [198] H.M. Ali, A. Abo-Shady, H.A. Sharaf Eldeen, H.A. Soror, W.G. Shousha, O.A. Abdel-Barry, et al., Structural features, kinetics and SAR study of radical scavenging and antioxidant activities of phenolic and anilinic compounds, *Chem. Cent. J.* 7 (2013) 1–9. doi:10.1186/1752-153X-7-53.
- [199] M.Y. Bhat, M.Z. Gul, N. Khan, I.A. Qureshi, I.A. Ghazi, Cytoprotective Activity and Anti-inflammatory Properties of *Artemisia nilagirica* (Clarke) Extracts-A Study with Macrophages, *J. Biol. Act. Prod. from Nat.* 7 (2017) 228–244. doi:10.1080/22311866.2017.1334588.
- [200] J.L. Solomon, R.J. Madix, J. Stöhr, Orientation and absolute coverage of benzene, aniline, and phenol on Ag(110) determined by NEXAFS and XPS, *Surf. Sci.* 255 (1991) 12–30. doi:10.1016/0039-6028(91)90008-G.
- [201] H. Ihm, J.M. White, Stepwise dissociation of thermally activated phenol on Pt(111), *J. Phys. Chem. B.* 104 (2000) 6202–6211. doi:10.1021/jp0005423.
- [202] Z.R. Yue, W. Jiang, L. Wang, S. Gardner, C.U. Pittman Jr., Surface properties of electrochemically oxidized carbon fibers, *Carbon N. Y.* 37 (1999) 1797–1807. doi:10.1016/S0008-6223(99)00048-2.
- [203] M. Gattrell, D.W. Kirk, A Study of Electrode Passivation during Aqueous Phenol Electrolysis, *J. Electrochem. Soc.* 140 (1993) 903. doi:10.1149/1.2056225.
- [204] J.I. Martins, M. Bazzaoui, T.C. Reis, S.C. Costa, M.C. Nunes, L. Martins, et al., The effect of pH on the pyrrole

- electropolymerization on iron in malate aqueous solutions, *Prog. Org. Coatings*. 65 (2009) 62–70. doi:10.1016/j.porgcoat.2008.09.011.
- [205] H. Bourara, S. Hadjout, Z. Benabdelghani, A. Etxeberria, Miscibility and hydrogen bonding in blends of poly(4-vinylphenol)/Poly(vinyl methyl ketone), *Polymers (Basel)*. 6 (2014) 2752–2763. doi:10.3390/polym6112752.
- [206] S. Kuo, S. Chan, F. Chang, Miscibility enhancement on the immiscible binary blend of poly (vinyl acetate) and poly (vinyl pyrrolidone) with bisphenol A, *Polymer (Guildf)*. 43 (2002) 3653–3660.
- [207] S.W. Kuo, Hydrogen-bonding in polymer blends, *J. Polym. Res.* 15 (2008) 459–486. doi:10.1007/s10965-008-9192-4.
- [208] Y.J. Kim, K. Shibata, H. Uyama, S. Kobayashi, Synthesis of ultrahigh molecular weight phenolic polymers by enzymatic polymerization in the presence of amphiphilic triblock copolymer in water, *Polymer (Guildf)*. 49 (2008) 4791–4795. doi:10.1016/j.polymer.2008.08.065.
- [209] S. Kuo, S. Chan, F. Chang, Miscibility enhancement on the immiscible binary blend of poly ( vinyl acetate ) and poly ( vinyl pyrrolidone ) with bisphenol A, *Polymer (Guildf)*. 43 (2002) 1–8.
- [210] G. Socrates, *Infrared and Raman characteristic group frequencies*, 2004. doi:10.1002/jrs.1238.
- [211] R.M. Silverstein, F.X. Webster, D.J. Kiemle, *Silverstein - Spectrometric Identification of Organic Compounds 7th ed.pdf*, Seventh ed, State University of New York, College of Environmental Science and Forestry, 2005.
- [212] B. Fei, C. Chen, S. Peng, X. Zhao, X. Wang, L. Dong, FTIR study of poly(propylene carbonate)/bisphenol A blends, *Polym. Int.* 53 (2004) 2092–2098. doi:10.1002/pi.1633.
- [213] H.X. Nguyen, H. Ishida, Molecular analysis of the melting behaviour of poly(aryl ether ether ketone), *Polymer (Guildf)*. 27 (1986) 1400–1405.
- [214] D. Fischer, K. Sahre, M. Abdelrhim, B. Voit, V.B. Sadhu, J. Pionteck, et al., Process monitoring of polymers by in-line ATR-IR, NIR and Raman spectroscopy and ultrasonic measurements, *Comptes Rendus Chim.* 9 (2006) 1419–1424. doi:10.1016/j.crci.2006.06.006.
- [215] M.-C. Pham, F. Adami, J. Dubois, An In Situ Multiple Internal Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy Investigation of the Electropolymerization Mechanism of Substituted Phenols on Iron Electrodes, *J. Electrochem. Soc.* 134 (1987) 2166–2169.
- [216] H.J. Salavagione, J. Arias-Pardilla, J.L. Vázquez, M.C. Miras, E. Morallón, C. Barbero, Spectroelectrochemical study of the oxidation of diaminophenols on platinum electrodes in acidic medium, *Electrochim. Acta.* 50 (2005) 5414–5422. doi:10.1016/j.electacta.2005.03.022.
- [217] O. Abbas, C. Rebufa, N. Dupuy, J. Kister, FTIR-Multivariate curve resolution monitoring of photo-Fenton degradation of phenolic aqueous solutions. Comparison with HPLC as a reference method, *Talanta*. 77 (2008) 200–209. doi:10.1016/j.talanta.2008.06.008.
- [218] D. Briggs, *Surface analysis of polymers by XPS and static SIMS*, Cambridge University Press, Cambridge, 1998. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [219] Z.R. Yue, W. Jiang, L. Wang, S.D. Gardner, C.U.P. Jr, Surface characterization of electrochemically oxidized carbon fibers, *37 (1999) 1785–1796*.
- [220] M. Gattrell, D.W. Kirk, A Study of Electrode Passivation during Aqueous Phenol Electrolysis, *J. Electrochem. Soc.* 140 (1993) 903–911. doi:10.1149/1.2056225.
- [221] M. Bertuola, C.A. Grillo, M.A. Fernández Lorenzo, Reduction of copper ions release by a novel ecofriendly electropolymerized nanolayer obtained from a natural compound ( carvacrol ), *J. Hazard. Mater.* 313 (2016) 262–271. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.086.
- [222] J.L. Kirsch, D.R. Coffin, Infrared and Nuclear Magnetic Resonance Studies of Hydrogen Bonding in Aliphatic Alcohol Systems, *J. Phys. Chem.* 80 (1976) 2448–2451.
- [223] D.A. Shifler, Understanding material interactions in marine environments to promote extended structural life, *Corros. Sci.* 47 (2005) 2335–2352. doi:10.1016/j.corsci.2004.09.027.
- [224] E. Garfias-García, M. Romero-Romo, M.T. Ramírez-Silva, J. Morales, M. Palomar-Pardavé, Mechanism and kinetics of the electrochemical formation of polypyrrole under forced convection conditions, *J. Electroanal. Chem.* 613 (2008) 67–79. doi:10.1016/j.jelechem.2007.10.013.
- [225] A. Bewick, B. Thomas, Optical and electrochemical studies of the under- potential deposition of metals Part III. Lead deposition on silver single crystals, *J. Electroanal. Chem.* 84 (1977) 127–140.
- [226] A. Bewick, B. Thomas, Optical and electrochemical studies of the under-potential deposition of metals. Part II. Phase transitions and two-dimensional nucleation, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 85 (1977) 329–337. doi:10.1016/S0022-0728(77)80235-0.
- [227] A. Bewick, M. Fleischmann, H.R. Thirsk, Kinetics of the electrocrystallization of thin films of calomel, *Trans. Faraday Soc.* 58 (1962) 2200. doi:10.1039/TF9625802200.
- [228] M. Chmielewski, M. Grzeszczuk, J. Kalenik, A. Kpas-Suwara, Evaluation of the potential dependence of 2D-3D growth rates and structures of polypyrrole films in aqueous solutions of hexafluorates, *J. Electroanal. Chem.* 647

- (2010) 169–180. doi:10.1016/j.jelechem.2010.06.006.
- [229] M.H. Hölzle, U. Retter, D.M. Kolb, The kinetics of structural changes in Cu adlayers on Au(111), *J. Electroanal. Chem.* 371 (1994) 101–109. doi:10.1016/0022-0728(93)03235-H.
- [230] L.H.H. Mendoza-Huizar, J. Robles, M. Palomar-Pardavé, Nucleation and growth of cobalt onto different substrates Part I. Underpotential deposition onto a gold electrode, *J. Electroanal. Chem.* 521 (2002) 95–106. doi:10.1016/S0022-0728(02)00659-9.
- [231] M.G. Figueroa, M.A. Fernandez Lorenzo, R.C. Salvarezza, A.J. Arvia, Electrochemical behavior of copper in potassium thiocyanate solution-II. Analysis of potentiostatic current transients, *Electrochim. Acta.* 32 (1987) 231–238.
- [232] B. Scharifker, G. Hills, Theoretical and experimental studies of multiple nucleation, *Electrochim. Acta.* 28 (1983) 879–889. doi:10.1016/0013-4686(83)85163-9.
- [233] R.F. Teófilo, R. Kiralji, H.J. Ceragioli, A.C. Peterlevitz, V. Baranauskas, L.T. Kubota, et al., QSPR Study of Passivation by Phenolic Compounds at Platinum and Boron-Doped Diamond Electrodes, *J. Electrochem. Soc.* 155 (2008) D640. doi:10.1149/1.2953588.
- [234] M.P. Soriaga, A.T. Hubbard, Determination of the orientation of adsorbed molecules at solid-liquid interfaces by thin-layer electrochemistry: aromatic compounds at platinum electrodes, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 2735–2742. doi:10.1021/ja00374a008.
- [235] R.S. Neves, A.J. Motheo, F.M.S. Silva Fernandes, R.P.S. Fartaria, Monte Carlo simulation of the adsorption of phenol on gold electrodes. A simple model, *J. Braz. Chem. Soc.* 15 (2004) 224–231.
- [236] M.D. Pereda, M. Reigosa, M.A. Fernández Lorenzo, Relationship between radial diffusion of copper ions released from a metal disk and cytotoxic effects. Comparison with results obtained using extracts., *Bioelectrochemistry.* 72 (2008) 94–101. doi:10.1016/j.bioelechem.2007.11.008.
- [237] B. Cao, T. Xi, Y. Zheng, Release behavior of cupric ions for TCu380A and TCu220C IUDs, *Biomed. Mater.* 3 (2008). doi:10.1088/1748-6041/3/4/044114.
- [238] J. Gao, Y. Li, J. Liu, X. Gu, Releasing of Cupric Ion of Three types of Copper-bearing Intrauterine Contraceptive Device in Simulated Uterine Fluid, *J. Reprod. Contracept.* 18 (2007) 33–39. doi:10.1016/S1001-7844(07)60005-4.
- [239] L. Jinying, L. Ying, G. Xuan, G. Yanli, L. Jianping, Investigation of the release behavior of cupric ion for three types of Cu-IUDs and indomethacin for medicated Cu-IUD in simulated uterine fluid, *Contraception.* 77 (2008) 299–302. doi:10.1016/j.contraception.2007.12.005.
- [240] E.K. Brooks, R. Ahn, M.E. Tobias, L.A. Hansen, N.R. Luke-Marshall, L. Wild, et al., Magnesium alloy AZ91 exhibits antimicrobial properties in vitro but not in vivo, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* (2017) 1–7. doi:10.1002/jbm.b.33839.
- [241] L.S. Albert, D.G. Brown, Variation in bacterial ATP concentration during rapid changes in extracellular pH and implications for the activity of attached bacteria, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 132 (2015) 111–116. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.05.020.
- [242] C. Dhand, S. Harini, M. Venkatesh, N. Dwivedi, A. Ng, S. Liu, et al., Multifunctional Polyphenols- and Catecholamines-Based Self-Defensive Films for Health Care Applications, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 8 (2016) 1220–1232. doi:10.1021/acsami.5b09633.
- [243] H.T.T. Phan, T. Yoda, B. Chahal, M. Morita, M. Takagi, M.C. Vestergaard, Structure-dependent interactions of polyphenols with a biomimetic membrane system, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1838 (2014) 2670–2677. doi:10.1016/j.bbamem.2014.07.001.
- [244] H. Ejima, J.J. Richardson, F. Caruso, Metal-phenolic networks as a versatile platform to engineer nanomaterials and biointerfaces, *Nano Today.* 12 (2017) 136–148. doi:10.1016/j.nantod.2016.12.012.
- [245] L. Cui, J. Xu, N. Lu, R. Zeng, Y. Zou, S. Li, et al., In vitro corrosion resistance and antibacterial properties of layer-by-layer assembled chitosan/poly-L-glutamic acid coating on AZ31 magnesium alloys, *Trans. Nonferrous Met. Soc. China.* 27 (2017) 1081–1086. doi:10.1016/S1003-6326(17)60126-2.
- [246] H. Lee, S.M. Dellatore, W.M. Miller, P.B. Messersmith, Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings, *Science (80-. )*. 318 (2007) 426–430. doi:10.1126/science.1147241.
- [247] S.M. Kang, N.S. Hwang, J. Yeom, S.Y. Park, P.B. Messersmith, I.S. Choi, et al., One-step multipurpose surface functionalization by adhesive catecholamine, *Adv. Funct. Mater.* 22 (2012) 2949–2955. doi:10.1002/adfm.201200177.
- [248] D.G. Barrett, T.S. Sileika, P.B. Messersmith, Molecular diversity in phenolic and polyphenolic precursors of tannin-inspired nanocoatings, *Chem. Commun.* 50 (2014) 7265–7268. doi:10.1039/C4CC02961E.
- [249] B. Wang, L. Zhao, W. Zhu, L. Fang, F. Ren, Mussel-inspired nano-multilayered coating on magnesium alloys for enhanced corrosion resistance and antibacterial property, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 157 (2017) 432–439. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.06.013.

- [250] M.C. Turhan, M. Weiser, M.S. Killian, B. Leitner, S. Virtanen, Electrochemical polymerization and characterization of polypyrrole on Mg-Al alloy (AZ91D), *Synth. Met.* 161 (2011) 360–364. doi:10.1016/j.synthmet.2010.11.048.
- [251] M. Hatami, M. Saremi, R. Naderi, Improvement in the protective performance and adhesion of polypyrrole coating on AZ31 Mg alloys, *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.* 25 (2015) 478–485. doi:10.1016/j.pnsc.2015.10.001.
- [252] U.P.S. Chauhan, B.C.R.A.Y. Sarkar, Use of Calmagite for the Determination of Traces Magnesium in Biological Materials, *Anal. Biochem.* 32 (1969) 70–80.
- [253] F. Singer, D. Rückle, M.S. Killian, M.C. Turhan, S. Virtanen, Electropolymerization and Characterization of Poly-N-methylpyrrole Coatings on AZ91D Magnesium Alloy, *Int. J. Electrochem. Sci.* 8 (2013) 11924–11932.
- [254] W.D. Mueller, M. Fernández Lorenzo de Mele, M.L. Nascimento, M. Zeddies, Degradation of magnesium and its alloys: Dependence on the composition of the synthetic biological media, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 90 (2009) 487–495. doi:10.1002/jbm.a.32106.
- [255] M. Alvarez-Lopez, M.D. Pereda, J.A. Del Valle, M.A. Fernandez-Lorenzo, M.C. Garcia-Alonso, O.A. Ruano, et al., Corrosion behaviour of AZ31 magnesium alloy with different grain sizes in simulated biological fluids, *Acta Biomater.* 6 (2010) 1763–1771. doi:10.1016/j.actbio.2009.04.041.
- [256] L. Xu, E. Zhang, D. Yin, S. Zeng, K. Yang, In vitro corrosion behaviour of Mg alloys in a phosphate buffered solution for bone implant application, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19 (2008) 1017–1025. doi:10.1007/s10856-007-3219-y.
- [257] L. Wang, T. Shinohara, B.P. Zhang, XPS study of the surface chemistry on AZ31 and AZ91 magnesium alloys in dilute NaCl solution, *Appl. Surf. Sci.* 256 (2010) 5807–5812. doi:10.1016/j.apsusc.2010.02.058.
- [258] O. Lunder, J.E. Lein, S.M. Hesjevik, T.K. Aune, K. Nişancioğlu, Corrosion morphologies on magnesium alloy AZ 91, *Mater. Corros.* 45 (1994) 331–340. doi:10.1002/maco.19940450603.
- [259] Y. Xin, T. Hu, P.K. Chu, In vitro studies of biomedical magnesium alloys in a simulated physiological environment: A review, *Acta Biomater.* 7 (2011) 1452–1459. doi:10.1016/j.actbio.2010.12.004.
- [260] W. Yu, H. Zhao, Z. Ding, Z. Zhang, B. Sun, J. Shen, et al., In vitro and in vivo evaluation of MgF<sub>2</sub>coated AZ31 magnesium alloy porous scaffolds for bone regeneration, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 149 (2017) 330–340. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.10.037.
- [261] X. Gu, Y. Zheng, Y. Cheng, S. Zhong, T. Xi, In vitro corrosion and biocompatibility of binary magnesium alloys, *Biomaterials.* 30 (2009) 484–498. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.10.021.
- [262] N. Zhao, D. Zhu, Collagen self-assembly on orthopedic magnesium biomaterials surface and subsequent bone cell attachment, *PLoS One.* 9 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0110420.
- [263] S. Hiromoto, M. Inoue, T. Taguchi, M. Yamane, N. Ohtsu, In vitro and in vivo biocompatibility and corrosion behaviour of a bioabsorbable magnesium alloy coated with octacalcium phosphate and hydroxyapatite, *Acta Biomater.* 11 (2015) 520–530. doi:10.1016/j.actbio.2014.09.026.
- [264] Y. Li, G. Liu, Z. Zhai, L. Liu, H. Li, K. Yang, et al., Antibacterial properties of magnesium in vitro and in an in vivo model of implant-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection, *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (2014) 7586–7591. doi:10.1128/AAC.03936-14.
- [265] R. Ma, Y.X. Lai, L. Li, H.L. Tan, J.L. Wang, Y. Li, et al., Bacterial inhibition potential of 3D rapid-prototyped magnesium-based porous composite scaffolds - An in vitro efficacy study, *Sci. Rep.* 5 (2015) 1–14. doi:10.1038/srep13775.
- [266] A. Nostro, L. Cellini, M. Di Giulio, M. D'Arrigo, A. Marino, A.R. Blanco, et al., Effect of alkaline pH on staphylococcal biofilm formation, *Apmis.* 120 (2012) 733–742. doi:10.1111/j.1600-0463.2012.02900.x.
- [267] H. Qin, Y. Zhao, M. Cheng, Q. Wang, Q. Wang, J. Wang, et al., Anti-biofilm properties of magnesium metal *via* alkaline pH, *RSC Adv.* 5 (2015) 21434–21444. doi:10.1039/C5RA00027K.
- [268] R.W. Revie, H.H. Uhlig, *Corrosion and corrosion control*, Fourth Ed, John Wiley & Sons, INC., Publication, Hoboken New Jersey, 2008.
- [269] R. Ambat, N.N. Aung, W. Zhou, Studies on the influence of chloride ion and pH on the corrosion and electrochemical behaviour of AZ91D magnesium alloy, *J. Appl. Electrochem.* 30 (2000) 865–874. doi:10.1016/j.matdes.2004.02.002.
- [270] A. Yamamoto, S. Hiromoto, Effect of inorganic salts, amino acids and proteins on the degradation of pure magnesium in vitro, *Mater. Sci. Eng. C.* 29 (2009) 1559–1568. doi:10.1016/j.msec.2008.12.015.
- [271] R. Willumeit, J. Fischer, F. Feyerabend, N. Hort, U. Bismayer, S. Heidrich, et al., Chemical surface alteration of biodegradable magnesium exposed to corrosion media, *Acta Biomater.* 7 (2011) 2704–2715. doi:10.1016/j.actbio.2011.03.004.
- [272] R. Rettig, S. Virtanen, Time-dependent electrochemical characterization of the corrosion of a magnesium rare-earth alloy in simulated body fluids, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 85 (2008) 167–175. doi:10.1002/jbm.a.31550.

- [273] C. Liu, Y. Xin, X. Tian, P.K. Chu, Degradation susceptibility of surgical magnesium alloy in artificial biological fluid containing albumin, *J. Mater. Res.* 22 (2007) 1806–1814. doi:10.1557/jmr.2007.0241.
- [274] R.C. Salvarezza, M. Fernandez Lorenzo, H.H. Videla, F.R. Goñi, Electrochemical behavior of aluminum in human plasma, *J. Biomed. Mater. Res.* 19 (1985) 1073–1084.
- [275] A. Nostro, R. Scaffaro, M. D'Arrigo, L. Botta, A. Filocamo, A. Marino, et al., Study on carvacrol and cinnamaldehyde polymeric films: Mechanical properties, release kinetics and antibacterial and antibiofilm activities, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96 (2012) 1029–1038. doi:10.1007/s00253-012-4091-3.
- [276] M. Llana-Ruiz-Cabello, D. Gutiérrez-Praena, S. Pichardo, F.J. Moreno, J.M. Bermúdez, S. Aucejo, et al., Cytotoxicity and morphological effects induced by carvacrol and thymol on the human cell line Caco-2, *Food Chem. Toxicol.* 64 (2014) 281–290. doi:10.1016/j.fct.2013.12.005.
- [277] C.Y. Flores, C. Diaz, A. Rubert, G.A. Benítez, M.S. Moreno, M.A. Fernández Lorenzo de Mele, et al., Spontaneous adsorption of silver nanoparticles on Ti/TiO<sub>2</sub> surfaces. Antibacterial effect on *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Colloid Interface Sci.* 350 (2010) 402–408. doi:10.1016/j.jcis.2010.06.052.
- [278] D. Dziuba, A. Meyer-Lindenberg, J.M. Seitz, H. Waizy, N. Angrisani, J. Reifenrath, Long-term in vivo degradation behaviour and biocompatibility of the magnesium alloy ZEK100 for use as a biodegradable bone implant, *Acta Biomater.* 9 (2013) 8548–8560. doi:10.1016/j.actbio.2012.08.028.
- [279] A. Weizbauer, C. Modrejewski, S. Behrens, H. Klein, P. Helmecke, J.M. Seitz, et al., Comparative in vitro study and biomechanical testing of two different magnesium alloys, *J. Biomater. Appl.* 28 (2014) 1264–1273. doi:10.1177/0885328213506758.
- [280] K. Lee, Protective effect of saponins derived from roots of *Platycodon grandiflorum* on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity, *Toxicol. Lett.* 147 (2004) 271–282. doi:10.1016/j.toxlet.2003.12.002.

# Apéndice

## A.1. Estudio de la capacidad antioxidante de los fitocompuestos frente a sustancias oxidantes

Con el fin de completar los ensayos de actividad antioxidante de TOH y Carv, se realizaron ensayos de viabilidad celular en células de la línea CHO-K1 utilizando como compuestos oxidantes soluciones conteniendo  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$  y tBHP (tert butil hidroperóxido).

La sal de hierro,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , se disolvió en HCl 0,1M en baño maría a  $40^\circ\text{C}$  por 5 min logrando una concentración final de 60mM de  $\text{FeCl}_3$ . Para realizar las soluciones de la sal de  $\text{Fe}^{3+}$  en medio Ham F12, previamente se llevó a pH= 8,5 al medio con el agregado de bicarbonato de sodio, logrando una solución límpida de  $\text{Fe}^{3+}$  en medio de cultivo. Los resultados de los ensayos con distintas dosis de  $\text{Fe}^{3+}$  y TOH combinados se muestran en la Fig. A.1.

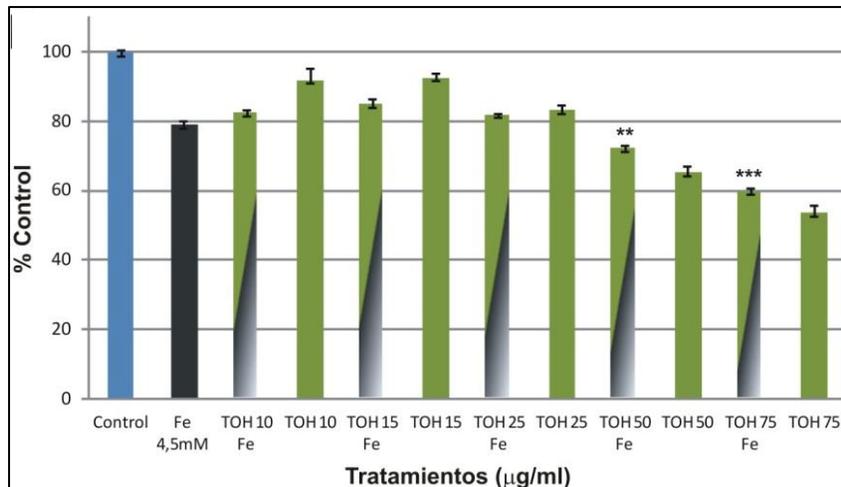


Fig. A.1. Efecto de la exposición combinada de sales de  $\text{Fe}^{3+}$  (4,5mM) con distintas concentraciones de TOH en células CHO-K1, evaluado mediante MTT luego de 24h de exposición.

Se observaron mejoras significativas entre el control de Fe (3mM y 4,5mM) y los ensayos combinados con TOH 50 y 75mg/ml (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ ), pero la viabilidad de dichos

tratamientos es mucho menor que el control de células. Al no observar mejoras con el agregado de TOH combinado con el agente oxidante  $\text{Fe}^{3+}$ , se concluye que en las condiciones experimentales utilizadas el TOH no presenta actividad protectora de la viabilidad celular frente al daño inducido por iones  $\text{Fe}^{3+}$ .

En base a los resultados reportados por Chen *et al.* [109] y Lee *et al.* [280], fitocompuestos como la corilagina y la saponina poseen actividad antioxidante frente al tBHP en modelos de líneas celulares de hepatocitos y de microglia. El tBHP es un generador de ROS muy utilizado en sistemas de estudio de nuevos antioxidantes. Se realizaron ensayos combinados de tBHP con distintas concentraciones de TOH y con acondicionamiento de TOH por 4h, los cuales se estudiaron mediante el ensayo de MTT.

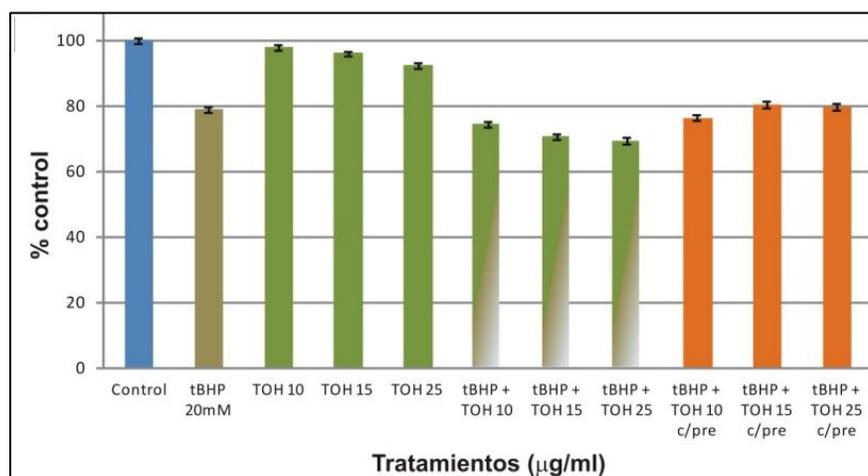
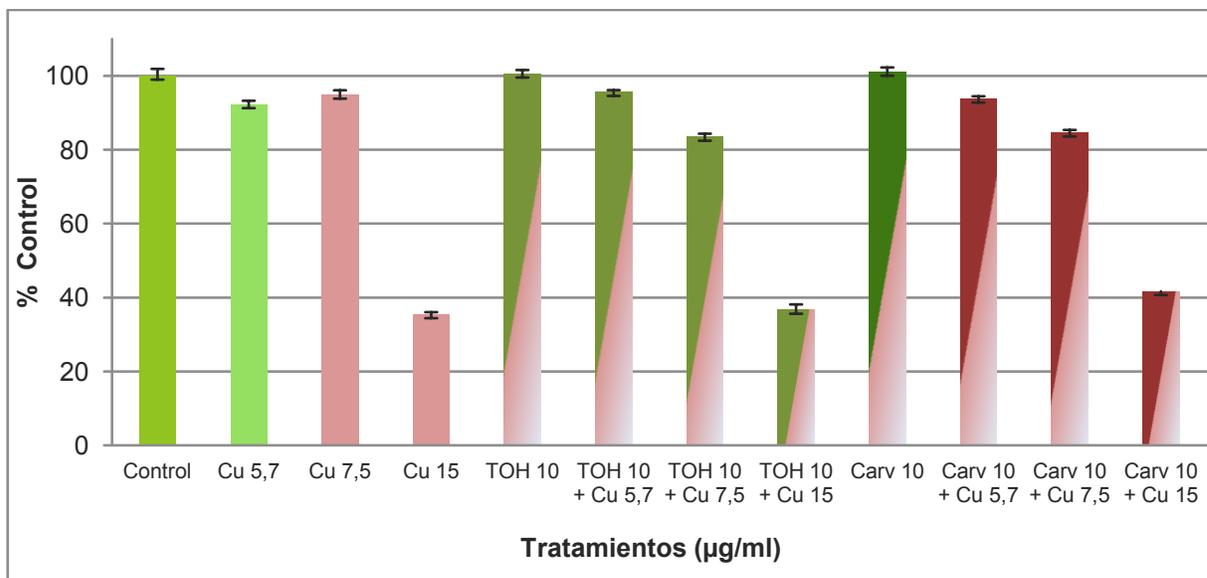


Fig. A.2. Efecto de la exposición combinada de tBHP (20mM) con distintas concentraciones de TOH en células CHO-K1, evaluado mediante MTT luego de 24h de exposición.

Los tratamientos de TOH no evidenciaron actividad protectora de la viabilidad celular frente al daño inducido por el tBHP (Fig. A.2).

Por otro lado, se realizaron ensayos en cultivos celulares con sales de  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  en combinación con TOH y Carv con el fin de compararlos con los obtenidos con extractos, mostrados en la sección 5.3.1. A diferentes concentraciones no evidenciaron mejoras en la viabilidad celular por parte de los FF (Fig. A.3).

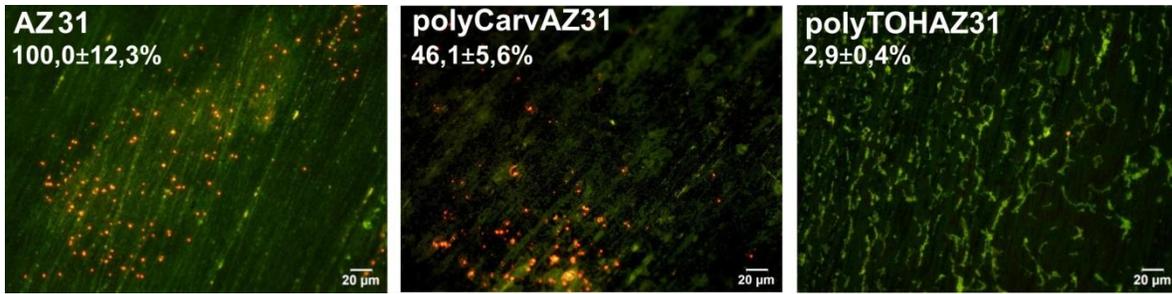


*Fig.A.3. Efecto de la exposición combinada de sales de  $\text{Cu}^{2+}$  con distintas concentraciones de TOH y Carv en células CHO-K1, evaluado mediante MTT luego de 24h de exposición.*

## **A.2. Comparación de la adhesión bacteriana en polyCarv-AZ31 y polyTOH-AZ31**

Con el fin de analizar comparativamente la adhesión bacteriana en sustratos electropolimerizados a partir de compuestos fenólicos con actividades antibacterianas, se utilizaron muestras de AZ31 recubiertas con polímeros de Carv. Para los ensayos comparativos de adhesión bacteriana en polyTOH-AZ31 y polyCarv-AZ31, los sustratos colonizados por bacterias se observaron por microscopia de epifluorescencia mediante tinción con naranja de acridina y se contabilizó el porcentaje de área cubierta por las bacterias adheridas.

Si bien ambos tratamientos evidenciaron un buen comportamiento antiadherente bacteriano, al observarlas por microscopía de fluorescencia y SEM el polyTOH-AZ31 presentó un menor porcentaje de área cubierta por bacterias llegando al  $2,9 \pm 0,4\%$  del correspondiente a las muestras sin película. El porcentaje de bacterias adheridas a polyCarv-AZ31 fue de un  $46,1 \pm 5,6\%$  frente al control de AZ31, pero esta disminución no resultó significativa (Fig. A.4).



*Fig. A.4. Imágenes de microscopía de epifluorescencia de las superficies luego de la adhesión de S. aureus por 2h, obtenidas mediante tinción con naranja de acridina. Se observa para cada tratamiento el porcentaje de área cubierta por bacterias.*

Pudo concluirse que las películas de polyTOH presentan una mayor eficacia que las de polyCarv logrando controlar la biodegradación de AZ31 y disminuir la adherencia de *S. aureus*.

### A.3. Abreviaturas utilizadas en el texto

adCarvCu: muestras de Cu con Carv adsorbido

adTOHCu: muestras de Cu con TOH adsorbido

AFM: microscopía de fuerza atómica

ATR-FTIR: FTIR por reflectancia total atenuada

BMB: biomateriales metálicos biodegradables

CA: cronoamperometría

Carv: carvacrol

CG/MS: cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa

Cu: cobre

DIU: dispositivo intrauterino

DL50: dosis letal 50

DMEM: medio MEM modificado por Dulbecco

E: potencial

EC50: concentración efectiva que induce un 50% de reducción de la viabilidad celular

EDS: espectroscopía de dispersión de energía de rayos X

EIE: estrategia innovadora ecocompatible

Epox: potenciales de pico de oxidación

EPS: exopolisacaridos

Ex 9: extracto de Cu de 9h

Ex12: extracto de Cu de 12h

Ex24: extracto de Cu de 24h

FF: fitocompuestos fenólicos

FTIR: espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

i: densidad de corriente

iP: intensidad de corriente del pico de reducción

MB: metales biodegradables

MCC: medio de cultivo celular

MIC: concentración mínima inhibitoria

Mg: magnesio

MTT: (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NA: naranja de acridina

PAN: (1-(2-piridilazo) -2-naftol)

PBS: medio buffer de fosfatos

PCA: potencial a circuito abierto

polyTOHCu: muestras de Cu con recubrimiento electropolimérico de TOH

polyCarvCu: muestras de Cu con recubrimiento electropolimérico de Carv

polyCarvCu-400mV: muestras de Cu con recubrimiento electropolimérico de Carv obtenidas por cronoamperometría a 400mV

polyTOH-AZ31: muestras de AZ31 con recubrimiento electropolimérico de TOH

polyCarv-AZ31: muestras de AZ31 con recubrimiento electropolimérico de Carv

polyTOHMg: muestras de Mg con recubrimiento electropolimérico de TOH

polyCarvMg: muestras de Mg con recubrimiento electropolimérico de Carv

Pt: platino

ROS: especies reactivas de oxígeno

SCE: electrodo de calomel saturado (saturated calomel electrode)

SEM: microscopía electrónica de barrido

SFB: suero fetal bovino

tBHP: tert-butilhidroperóxido

TOH: timol

Ti: titanio

VC: voltamperometría cíclica

XPS: espectroscopía fotoelectrónica de rayos X

## TRABAJOS EN EVENTOS CIENTÍFICO-TECNOLÓGICOS PUBLICADOS

Los resultados obtenidos se presentaron en 21 reuniones científicas nacionales y 5 internacionales de la especialidad. El trabajo “Constrained distribution of bacteria on biodegradable AZ31 Mg alloy. Protective effect of a polymerized phytocompound” presentado en 10th Biometal 2018 recibió el Certificate of Merit por la mejor presentación en la sección poster.

## TRABAJOS PUBLICADOS EN REVISTAS INDEXADAS

**Nota: Todas las publicaciones citadas tienen referato.**

Bertuola M.; Miñán A.; Grillo C.A.; Cortizo M.C.; Fernández Lorenzo De Mele M.A.. *Corrosion protection of AZ31 alloy and constrained bacterial adhesion mediated by a polymeric coating obtained from a phytocompound. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces.* Amsterdam: Elsevier Science BV. 2018. Vol. 172 p187–196. ISSN 0927-7765. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.08.025

Bertuola M.; Grillo C.A.; Pissinis D.; Prieto E.; Fernández Lorenzo M.. *Is the biocompatibility of copper with polymerized natural coating dependent on the potential selected for the electropolymerization process?. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces.* Amsterdam: Elsevier Science BV. 2017 vol.159 p673-683. ISSN 0927-7765. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.08.029

Bertuola M.; Pissinis D.; Rubert A.; Prieto E.; Fernández Lorenzo M.. *Impact of molecular structure of two natural phenolic isomers on the protective characteristics of electropolymerized nanolayers formed on copper. Electrochimica Acta.* Amsterdam: Pergamon-Elsevier Science LTD. 2016 vol. p289-297. ISSN 0013-4686. DOI: 10.1016/j.electacta.2016.08.100

Bertuola M.; Grillo C.A.; Fernández Lorenzo M.. *Reduction of copper ions release by a novel ecofriendly electropolymerized nanolayer obtained from a natural compound(carvacrol). Journal Of Hazardous Materials.* Amsterdam: Elsevier Science BV. 2016 vol.313 p262-271. ISSN 0304-3894. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.03.086