



University of Zagreb

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Ana-Marija Milisav

**MATRICES FOR ANTIBACTERIAL
NANOPARTICLES DELIVERY IN BIOMEDICAL
IMPLANTS**

DOCTORAL DISSERTATION

Zagreb, 2025



University of Zagreb

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Ana-Marija Milisav

MATRICES FOR ANTIBACTERIAL NANOPARTICLES DELIVERY IN BIOMEDICAL IMPLANTS

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Assist. prof. Maja Dutour Sikirić, PhD

Prof. Jelena Macan, PhD

Zagreb, 2025



Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Ana-Marija Milisav

**MATRICE ZA DOSTAVU ANTIBAKTERIJSKIH
NANOČESTICA KOD BIOMEDICINSKIH
IMPLANTATA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Doc. dr. sc. Maja Dutour Sikirić, zn. savj.

Prof. dr. sc. Jelena Macan

Zagreb, 2025

ABSTRACT

Implant-associated infections that develop after surgery, together with bacterial resistance to antibiotics, are the main obstacles to the successful use of different types of implants. To combat this, innovative antibacterial implant materials that can release antimicrobial agents locally and have a low potential for causing bacterial resistance are being sought. Among various antimicrobial agents, metal or metal oxide nanoparticles (*e.g.* AgNP, CuNP, CuONP, ZnONP) are attracting special attention as they offer diverse antibacterial mechanisms to mitigate bacterial resistance. The risk of cytotoxicity of NP can be reduced by immobilizing them in matrices. In this work, three matrices for the delivery of NP were investigated, namely polyelectrolyte multilayers (PEM), magnetron-sputtered thin films, and alginate hydrogels, some of which were mineralized with calcium phosphates (CaP) to enhance their biocompatibility. These matrices were chosen for their versatility, ease of preparation and the possibility to scale up the coating procedure. All matrices were extensively physico-chemically characterized and their biological properties were investigated to determine their potential for application.

PEM were prepared on titanium surfaces using poly(amino acids), poly-L-lysine and poly-L-glutamic acid, with AgNP or CuONP incorporated as part of the multilayer. Compared to AgNP, CuONP was adsorbed in higher amount and formed aggregates on the surface, leading to increased roughness and hydrophilicity, as confirmed by energy dispersive X-ray spectroscopy, inductively coupled plasma mass spectrometry, atomic force microscopy and water contact angle measurements.

Biodegradable magnetron-sputtered ZnO thin films doped with Ag and Cu were prepared by co-deposition in a multi-source magnetron sputtering system, and their properties were compared. X-ray diffraction (XRD) of the prepared thin films revealed the formation of wurtzite structure in all cases. Opposing trends were observed for grain size and water contact angle with increasing Ag and Cu content. The biomimetic CaP deposition led to a partial surface coverage with an apatitic phase, improving surface hydrophilicity.

Non-mineralized and mineralized alginate hydrogels with incorporated AgNP, CuONP and ZnONP were prepared at different pH values (7.4 and 9.0). Mineralization was performed *in situ* using a CaCl₂ solution, which initiated both gelation and CaP mineralization in the hydrogels containing Na₂HPO₄. The influence of pH on mineralization was investigated with XRD and Fourier-transform infrared spectroscopy. It was revealed that the hydrogels prepared

at pH 7.4 contained calcium-deficient hydroxyapatite (CaDHA), while amorphous calcium phosphate formed in the hydrogels prepared at pH 9.0 and remained stable over time. The presence of NP influenced mineralization, with larger CaDHA crystals forming in CuONP-containing hydrogels. NP incorporation had negligible effect on the rheological properties of the hydrogels, but mineralization notably influenced the critical strain values, leading to earlier network breakdown in mineralized samples.

Ion release patterns were dependent on the type of matrices. The incorporation of NP in PEM prevented ion burst release. Magnetron-sputtered thin films followed a similar trend, with an initial rapid release followed by a slower, sustained release. CaP deposition slightly reduced Cu release and increased Ag release, Zn release remained unaffected. Alginate hydrogels showed the slowest initial release, which increased gradually over time, with variations depending on the type of NP and the pH conditions. Cu release from mineralized hydrogels at pH 7.4 and 9.0 and Zn release from mineralized hydrogels at pH 9.0 was reduced compared to the non-mineralized counterparts.

The antibacterial effects of NP varied depending on the matrices in which they were incorporated. Among the NP investigated, CuONP exhibited better antibacterial performance in PEM and magnetron-sputtered Cu-doped ZnO, while AgNP were more effective in alginate hydrogels, particularly in those prepared at pH 7.4, where they inhibited *Staphylococcus aureus* growth by approximately 50 %. Interestingly, despite copper's enhanced antibacterial activity in the other two matrices, CuONP-incorporated alginate hydrogels unexpectedly promoted the growth of *S. aureus*. NP-containing hydrogels exhibited lower antibacterial effect for *Pseudomonas aeruginosa*. Nevertheless, *S. aureus* was more difficult to inhibit than *P. aeruginosa* for other matrices. CaP mineralization improved the antibacterial properties of thin films, while its effect on NP-containing hydrogels was negligible. The only significant inhibition was observed for the mineralized CuONP-containing hydrogel prepared at pH 7.4 on *P. aeruginosa*.

Regarding cytotoxicity, PEM matrices were biocompatible regardless of NP incorporation, with MG-63 cell viability exceeding 70 %. In contrast, magnetron-sputtered thin films were cytotoxic. However, this issue was proven to be possible to address with biomimetic CaP deposition.

The results obtained confirmed high potential of PEM, magnetron-sputtered ZnO thin films and alginate hydrogels embedded with metal and metal oxide NP for biomedical

antibacterial applications, providing a promising approach to developing biocompatible surfaces.

Keywords: metal nanoparticles, metal oxide nanoparticles, polyelectrolyte multilayers, magnetron-sputtered thin films, alginate hydrogels, calcium phosphates

SAŽETAK

Glavne prepreke uspješnoj primjeni različitih vrsta implantata su infekcije koje se javljaju nakon njihove ugradnje, a čije je liječenje dodatno otežano porastom bakterijske otpornosti na antibiotike. Inovativni materijali za implantate koji imaju lokalno antimikrobno djelovanje i malu vjerojatnost razvijanja otpornosti bakterija se smatraju mogućim rješenjem tog problema. Pri tome kao antimikrobni materijali posebnu pažnju privlače nanočestice metala ili metalnih oksida (npr. AgNP, CuNP, CuONP i ZnONP) zbog višestrukih mehanizama antimikrobnog djelovanja zbog čega je vjerojatnost uzrokovanja bakterijske otpornosti mala. Potencijalna citotoksičnost NP-a se može smanjiti njihovom ugradnjom u odgovarajuće matrice. U ovoj disertaciji istražene su tri matrice za ugradnju NP-a: polielektrolitni višeslojni filmovi (PEM), tanki filmovi nanaseni magnetronskom rasprašanjem i alginatni hidrogelovi, od kojih su neki mineralizirani kalcijevim fosfatima (CaP) kako bi se poboljšala njihova biokompatibilnost. Navedene matrice su izabrane zbog mogućnosti primjene na različitim površinama, jednostavnosti pripreme i mogućnosti skaliranja pripreve. Sve matrice su detaljno fizikalno-kemijski okarakterizirane te su istražena njihova biološka svojstva kako bi se odredio njihov potencijal za primjenu.

PEM-ovi su pripremljeni na titanijevim površinama upotrebom poliaminokiseline, poli-L-lizina i poli-L-glutaminske kiseline, u koje su AgNP ili CuONP ugrađeni kao dio višesloja. Rezultati energijski razlučujuće rendgenske spektroskopije, spektrometrije masa s induktivno spregnutom plazmom, mikroskopije atomske sile i mjerenja kontaktnog kuta vode su pokazali da su se CuONP adsorbirale u većoj količini i agregirale se na površini, što je dovelo do povećane hrapavosti i hidrofilnosti u usporedbi s PEM AgNP.

Magnetronski rasprašeni biorazgradivi tanki filmovi ZnO dopirani s Ag i Cu, pripremljeni su ko-depozicijom u sustavu s više izvora. Rendgenska difrakcija na polikristalnom uzorku (XRD) pokazala je nastajanje strukture vrcita u svim uzorcima. Uočeni su suprotni učinci povećanja udjela Ag i Cu na veličinu zrna i kontaktni kut s vodom. Biomimetska depozicija CaP-a rezultirala je djelomičnim prekrivanjem površina tankih filmova apatitnom fazom, čime je poboljšana hidrofilnost površine.

Nemineralizirani i mineralizirani alginatni hidrogelovi s ugrađenim AgNP, CuONP i ZnONP pripremljeni su pri različitim pH vrijednostima (7,4 i 9,0). Mineralizacija se odvijala *in situ* uz upotrebu otopine CaCl_2 , koja je istovremeno služila za geliranje i mineralizaciju CaP kod hidrogelova koji su sadržavali Na_2HPO_4 . Utjecaj pH na mineralizaciju istražen je XRD-om

i infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom, pri čemu je utvrđeno nastajanje kalcij-deficijentnog hidroksiapatita (CaDHA) u hidrogelovima pripremljenim pri pH 7,4, dok je u hidrogelovima pripremljenim pri pH 9,0 istaložio amorfni kalcijev fosfat koji je ostao stabilan tijekom duljeg vremena. Ugradnja NP-a utjecala je na mineralizaciju što se očitovalo formiranjem većih kristala CaDHA u hidrogelovima s CuONP. Međutim, utjecaj na reološka svojstva hidrogelova bio je zanemariv. S druge strane, mineralizacija je značajno utjecala na kritične vrijednosti deformacije hidrogelova što je dovelo do ranijeg prekida mrežne strukture mineraliziranih uzoraka.

Brzine otpuštanja iona razlikovale su se ovisno o vrsti matrice. Ugradnjom NP-a u PEM se učinkovito spriječio naglo otpuštanje iona, a sličan trend se pokazao i kod tankih filmova nanesenih magnetronskim rasprašenjem. Naime, nakon inicijalno bržeg otpuštanja iona, uslijedilo je postepeno otpuštanje. CaP mineralizacijom tankih filmova se usporilo otpuštanje Cu, dok se otpuštanje Ag povećalo, a otpuštanje Zn se nije značajno promijenilo. Kod alginatnih hidrogelova početno otpuštanje je bilo najsporije, a tijekom vremena se postupno povećavalo. Zamijećene su razlike u otpuštanju ovisno o vrsti ugrađenih NP i pH vrijednosti pripremljenih hidrogelova. Za razliku od odgovarajućih nemineraliziranih hidrogelova, otpuštanje Cu iz mineraliziranih hidrogelova pripremljenih pri pH 7,4 i 9,0 i otpuštanje Zn iz mineraliziranih hidrogelova pripremljenih pri pH 9,0 je bilo smanjeno.

Antibakterijski učinci NP su se razlikovali ovisno o matricama u koje su bile ugrađene. Među ispitanim NP, CuONP su pokazale bolju antibakterijsku učinkovitost u PEM i Cu-dopiranim tankim filmovima ZnO nanesenim magnetronskim rasprašenjem, dok je AgNP bio učinkovitiji u alginatnim hidrogelovima, a posebno kod hidrogelova pripremljenih pri pH 7,4, kod kojih je došlo do inhibicije rasta *Staphylococcus aureus* za približno 50 %. Iako je bakar pokazao bolju antibakterijsku aktivnost kod druge dvije matrice, kod alginatnih hidrogelova s ugrađenim CuONP je došlo do neočekivano induciranog rasta *S. aureus*. Hidrogelovi s ugrađenim NP su pokazali slabiji antibakterijski učinak za *Pseudomonas aeruginosa*. No, za druge matrice se pokazalo da je *S. aureus* bilo teže inhibirati nego *P. aeruginosa*. CaP mineralizacija je poboljšala antibakterijska svojstva tankih filmova, a kod hidrogelova je njezin učinak bio zanemariv. Značajna inhibicija *P. aeruginosa* primijećena je jedino za mineralizirani hidrogel s ugrađenim CuONP pripremljen pri pH 7,4.

Ispitivanjem citotoksičnosti se utvrdilo kako su PEM matrice biokompatibilne bez obzira na ugradnju NP, pri čemu je vijabilnost MG-63 stanica bila veća od 70 %. S druge strane,

tanki filmovi nanesei magnetronskim rasprašenjem pokazali su citotoksičnost. Međutim, biomimetska CaP depozicija se pokazala kao učinkovita strategija za smanjenje citotoksičnosti.

Dobiveni rezultati su potvrdili veliki potencijal PEM-a, tankih ZnO filmova nanesenih magnetronskim rasprašenjem i alginatnih hidrogelova s ugrađenim NP metala i metalnih oksida za primjene u biomedicini kao antibakterijski materijali. Te matrice stoga imaju značajan potencijal u razvoju biokompatibilnih površina.

Ključne riječi: metalne nanočestice, nanočestice metalnih oksida, polielektrolitni višeslojni filmovi, magnetronsko rasprašivanje, alginatni hidrogelovi, kalcijevi fosfati