

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PELÍCULAS DE QUITOSANO-ALCOHOL POLIVINÍLICO DOPADAS CON TiO_2

Kety León P.,¹ Julieta Cabrera S.,^{1,2} Julio Santiago C.^{1,3}

¹ Investigación y Desarrollo, Instituto Peruano de Energía Nuclear, Lima Perú

² Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima Perú.

³ Facultad de Química e Ing. Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima Perú

Resumen

Películas de alcohol polivinílico (PVA), quitosano-PVA y quitosano-PVA dopadas con TiO_2 fueron preparadas para evaluar sus propiedades antimicrobianas frente a cepas bacterianas de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Se observó que estas películas no tienen actividad frente a estos microorganismos, pero sí actúan como una barrera eficaz. Por estas propiedades, éstas películas tienen una potencial aplicación como películas protectoras de piel de quemados y como material para envasado de alimentos.

Palabras claves: Susceptibilidad antimicrobiana, Quitosano, Alcohol polivinílico, Permeabilidad bacteriana, TiO_2

Abstract

Poly(vinyl alcohol), PVA, Chitosan-PVA and Chitosan-PVA films doped with TiO_2 have been prepared and their antimicrobial properties against *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* have been evaluated. These films do not have activity to those microorganisms, but they are an effective barrier. These properties make them attractive materials for wound-healing applications and food packaging.

Keywords: Antimicrobial susceptibility, Chitosan, polyvinyl Alcohol, Bacterial Permeability, TiO_2

I. INTRODUCCIÓN

El alto número de pacientes que sufren de lesiones a la piel como quemaduras, úlceras de uta o diabetes, o cicatrices post-operatorias, ha promovido el desarrollo de películas absorbentes o hidrogeles de origen natural, sintético o mezcla de ambos que puedan ser aplicadas no solamente para proteger dichas lesiones sino también para acelerar la cicatrización.¹

Los hidrogeles son materiales poliméricos entrecruzados en forma de red tridimensional de origen natural o sintético, que tienen la capacidad de absorber una gran cantidad de agua formando materiales blandos y elásticos.² En la preparación de hidrogeles para quemaduras se utilizan diferentes polímeros de origen natural o sintético.

El quitosano es un polisacárido compuesto de dos sub-unidades, D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina, unidos por un enlace glucosídico de β -(1,4). Este polisacárido tiene muchas aplicaciones por sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradación, con actividad antimicrobiana y no toxicidad.³ El

carácter antimicrobiano del quitosano se debe principalmente a su grupo amino cargado positivamente, el cual interacciona con la membrana celular de la bacteria cargada negativamente provocando el deterioro de las proteínas y de otros componentes de los microorganismos.⁴ Por dichas propiedades ha sido muy estudiado en la formación de películas para el tratamiento de heridas.

El alcohol polivinílico (PVA) es un polímero sintético obtenido por hidrólisis ácida o básica del acetato de polivinilo. A pesar de su origen sintético es un polímero biodegradable y biocompatible. Sus propiedades dependen de su peso molecular y de su grado de hidrólisis. El PVA con grado de hidrólisis del 90% es soluble en agua caliente. Se le utiliza en la preparación de materiales plásticos, en la industria textil y en la industria farmacéutica. En esta última se emplea como excipiente, como adhesivo, como formador de películas y como matriz.⁵ Este polímero forma fácilmente hidrogeles por métodos físicos⁶ y es muy utilizado en la preparación de biomateriales.⁷ También se ha preparado hidrogeles combinando quitosano con PVA por métodos químicos o físicos.

obteniéndose hidrogeles con buen grado de hinchamiento. Aquellos hidrogeles obtenidos por radiación gamma son los más estables y más adecuados para aplicaciones biomédicas pues no presenta trazas de agentes de entrecruzamiento.^{8,9,10}

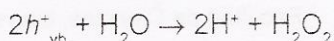
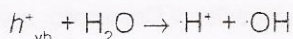
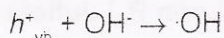
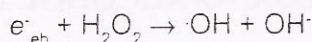
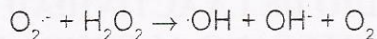
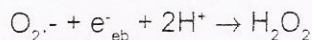
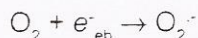
De otro lado, la mezcla de polímeros con cargas inorgánicas es una estrategia utilizada para obtener materiales híbridos con mejores propiedades que los polímeros precursores. En el caso del PVA, se ha preparado materiales compuestos combinándolo con $\text{Cu}(\text{OH})_2$ intercalado con óxido de grafito,¹¹ con Fe_2O_3 ,¹² Ag_2S ,¹³ y óxido de litio y manganeso.¹⁴ De otro lado, también se ha mezclado TiO_2 en suspensión con PVA con la intención de obtener, después de calcinación, nanopartículas de TiO_2 recubiertas de una capa de carbón.^{15,16}

En este trabajo se evalúa la susceptibilidad frente a *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* (ambas bacterias gram negativas) y *Staphylococcus aureus* (bacteria gram positiva) de las películas de PVA, quitosano-PVA y quitosano-PVA dopadas con TiO_2 . Igualmente se evalúa la permeabilidad de estas películas frente a estos microorganismos, que son los principales agentes causales de infecciones en heridas provocadas por quemaduras o trauma.

La inclusión del TiO_2 en las películas de quitosano-PVA se debe a su inocuidad, ambientalmente limpio, fotoestable y de bajo costo, capaz de producir la mineralización completa de la inmensa mayoría de los contaminantes orgánicos, incluso PCBs y dioxinas, en condiciones ambientales de temperatura y presión, permitiendo también la eliminación de elementos inorgánicos, como los cianuros.¹⁷

Esto se realiza mediante reacciones fotocatalíticas, en las que se generan radicales hidroxilo que atacan y degradan rápidamente la materia orgánica. Por la misma razón también presentan actividad antimicrobiana.¹⁸ Las reacciones involucradas en estos procesos se muestran en el esquema 1, e incluyen la formación de radicales neutros y aniónicos.

Otra razón por la que decidimos incluir nanopartículas de TiO_2 en las películas de quitosano-PVA es para mejorar sus propiedades mecánicas, pues hemos observado recientemente que el módulo de Young de películas de PVA dopadas con TiO_2 se incrementó en función de la concentración del semiconductor.¹⁹



Esquema N° 1. Serie de reacciones fotocatalíticas que se realizan sobre la superficie de TiO_2 en presencia de luz ultravioleta

II. PARTE EXPERIMENTAL

Materiales

El quitosano utilizado en este estudio proviene de Fluka (viscosidad >400mPa.s, 1% en ácidos acético al 1%), mientras que el ácido acético glacial, agar EMB, agar *Pseudomonas* P, agar Baird Parker, agar Casoy, caldo Casoy y agar Muller Hinton, provienen de Merck. El Dióxido de titanio (P25) proviene de Degusa. Las cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 fueron adquiridas en el Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú.

Preparación del hidrogel quitosano-PVA

El quitosano fue disuelto en ácido acético al 1%. El PVA al 10 % fue disuelto en agua destilada a 80°C. Se mezclaron volúmenes iguales de las soluciones de quitosano y PVA. Se dispensaron en placas Petri y se secaron a temperatura ambiente.

Preparación del hidrogel quitosano-PVA-TiO₂

Se preparó una suspensión de TiO_2 en PVA, las que fueron estabilizadas por tratamiento con ultrasonido, y se mezcló con una solución de quitosano en ácido acético al 1%. Luego, se dispensaron en placas Petri y se secaron a temperatura ambiente.

Preparación del inóculo

La preparación del inóculo se realizó tomando cinco colonias de la cepa bacteriana pura y sembrada sobre un tubo conteniendo agar Casoy en plano inclinado. Se incubó a 37°C por 18 horas. Trascorrido este tiempo se cosechó en un recipiente con caldo Casoy y

se ajustó a una turbidez equivalente a 0,5 de MacFarland.

Susceptibilidad antimicrobiana

a) En placa

Se realizó por el método de difusión en agar de Kirby-Bauer siguiendo las indicaciones del Comité Nacional de Control de Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS).²⁰ Las placas con agar Muller Hinton fueron incubadas a 37°C antes de su uso, se aplicó el inóculo en la placa con la ayuda de una torunda (bola de algodón envuelta en gasa) estéril, cubriendo totalmente la superficie de la placa sin dejar una zona libre. Se dejó secar 5 minutos antes de depositar las películas cortadas en discos de 8mm de diámetro. Se incubó a 37°C por 18-24 horas. La presencia de halos alrededor de las películas nos indicará que los microorganismos son susceptibles a dicho material. Dependiendo del tamaño del mismo se podrá hacer una evaluación cualitativa.

b) En tubo

Se realizó mediante el método de siembra en caldo.²⁰ En tubos conteniendo caldo Casoy fueron depositadas las películas preparadas en base a PVA, PVA-quitosano y PVA-quitosano-TiO₂ en concentraciones de óxido de titanio de 1, 5, 10, 50 y 100 ppm. Se inocularon la serie de tubos con cultivo bacteriano, salvo al control negativo. Se incubó a 37°C por 18-24 horas. La presencia de turbidez en los tubos nos indicará que no hay actividad antimicrobiana frente a las películas.

Permeabilidad microbiana

Se contaron con tres medios de cultivo diferenciales, agar EMB para *E. coli*, agar Baird Parker para *S. aureus* y agar Pseudomonas P para *P. aeruginosa*. Sobre la superficie de los respectivos agares se depositaron las películas de PVA, PVA-quitosano y PVA-quitosano-TiO₂ previamente embebidas en agua estéril para evitar que las películas se arruguen. Se inoculó el cultivo sobre las películas para ser incubadas a 37°C. Los chequeos periódicos se realizaron durante 5 días.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de las películas de quitosano-PVA-TiO₂

Estas películas fueron caracterizadas por FT-IR, Figura N° 1. Los espectros de películas de

quitosano-PVA dopadas con TiO₂ presentan los picos característicos del PVA y del quitosano y no muestran ninguna diferencia con respecto a las películas sin dopaje. Algo similar ya se había observado en el caso de las películas de PVA dopadas con TiO₂.¹⁹ Esto sugiere que las nanopartículas de TiO₂ se encuentran simplemente dispersadas en la matriz polimérica sin interacción entre los diferentes grupos funcionales de los polímeros. Las partículas del semiconductor estarían interactuando con las zonas hidrofóbicas del PVA, de la misma manera como se explica la solubilidad del hidróxido de cobre(II) en PVA a pH>6.²¹ En cambio, cuando se prepara las nanopartículas de TiO₂ *in situ* se ha reportado evidencias de enlace covalente entre los átomos de Ti, de la superficie de las nanopartículas, con los oxígenos del PVA.²²

Susceptibilidad antimicrobiana

Las películas probadas corresponden a:

A: película de alcohol polivinílico

F: quitosano-PVA

G: quitosano-PVA 1ppm TiO₂

H: quitosano-PVA 5ppm TiO₂

I: quitosano-PVA 10ppm TiO₂

a) En placa

La zona de contacto entre las películas evaluadas y el medio de cultivo quedaron transparentes mientras que fuera de la zona de contacto el crecimiento de las bacterias fue mucho mayor y presentaba un color más oscuro, Figura N° 2. Las zonas fueron más transparentes con *S. aureus* que con *E. coli* y *P. aeruginosa*. En algunos casos se observó el crecimiento de colonias aisladas, pero en todos los casos las muestras tomadas debajo de las películas mostraron crecimiento de bacterias cuando se les colocó en un medio de cultivo, sugiriendo que las películas de quitosano-PVA y quitosano-PVA-TiO₂ poseen un poder bacteriostático mas no así bactericida. En ningún caso se observó un halo alrededor de la película.

Se realizaron controles para evaluar el funcionamiento de la técnica colocando en los medios de cultivo antibióticos específicos para cada cepa, observándose que los tamaños de los halos formados están dentro del intervalo recomendado por la NCCLS.²⁰ De igual modo se probó una solución desinfectante (Tego al

0,1%) como control positivo y se obtuvieron halos de inhibición.

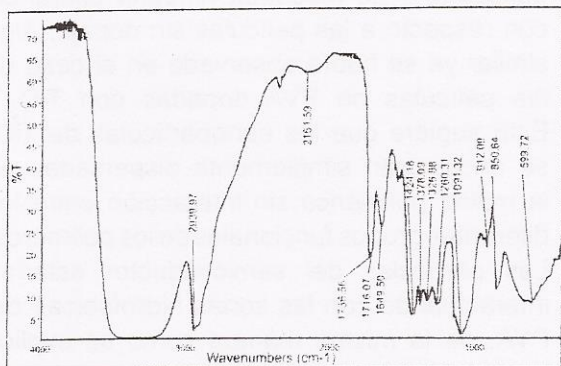


Figura N° 1. Espectro IR de la película de quitosano-PVA dopada con 1ppm de TiO₂.

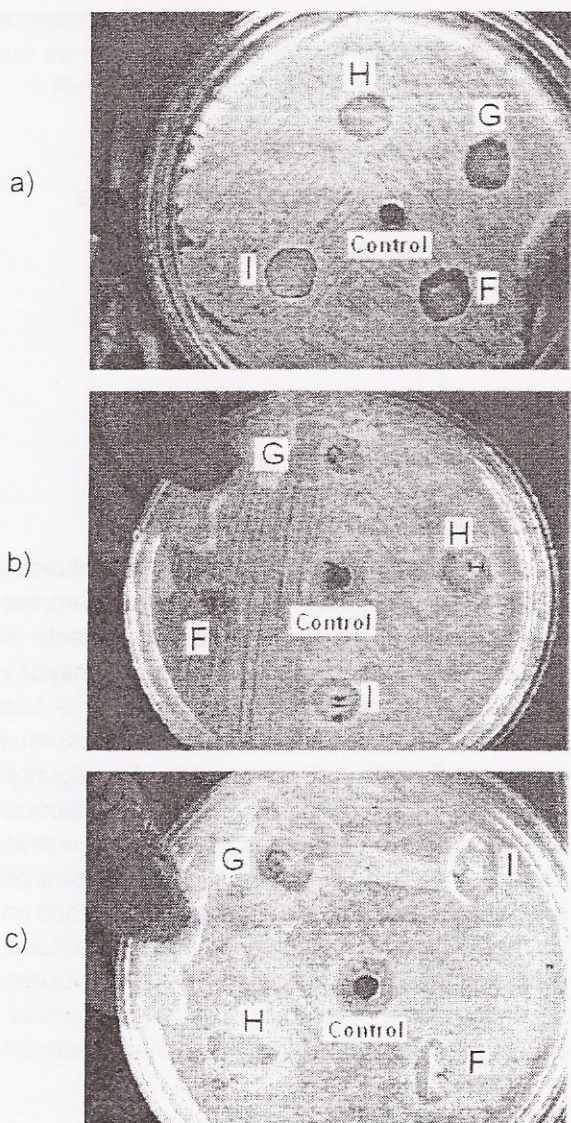


Figura N° 2. Películas de quitosano-PVA y quitosano-PVA-TiO₂ enfrentadas a: a) *S. aureus*, b) *E. coli* y c) *P. aeruginosa*.

b) En tubo

Luego de la incubación por 24 horas de los tubos conteniendo el caldo de cultivo, las

cepas y las películas, se observó presencia de turbidez en todos los casos, lo que nos indica que las películas no inhiben el crecimiento de los microorganismos en estas condiciones. En el caso de *S. aureus*, los tubos presentaron una turbidez tenue con sedimentación importante. Se tomó una muestra de estos tubos y se sembró sobre agar Casoy observando crecimiento microbiano. Para las otras dos cepas los tubos mostraron una turbidez apreciable, Figura N° 3.

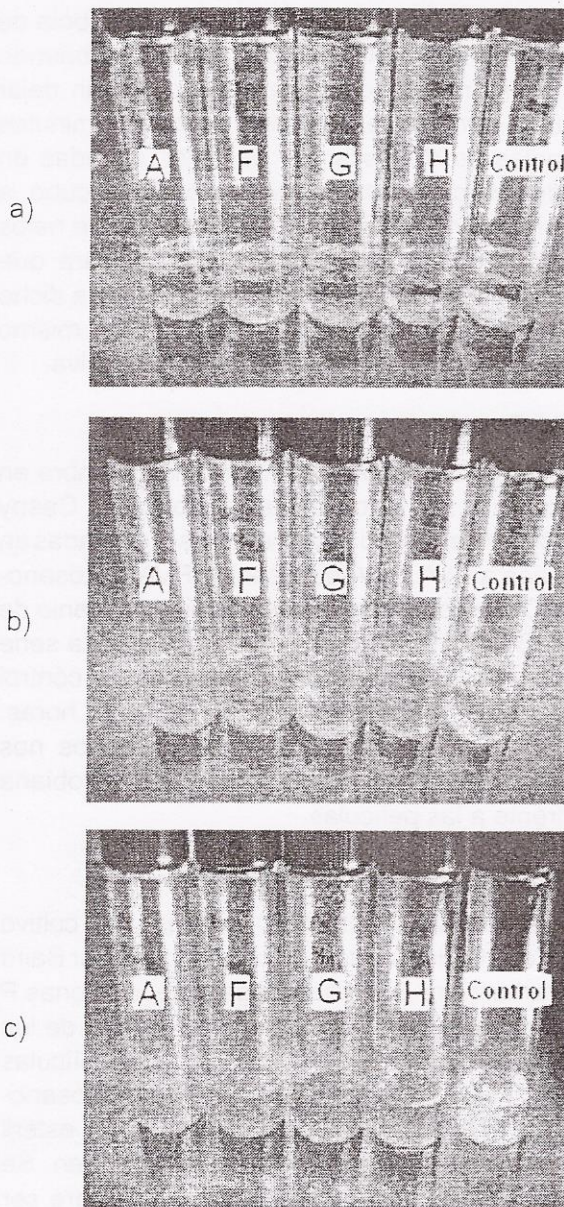


Figura N° 3. Películas en tubos conteniendo caldos con: a) *S. aureus*, b) *E. coli* y c) *P. aeruginosa*.

La sedimentación de *S. aureus* en los tubos puede deberse a modificaciones en la superficie de la membrana de esta bacteria gram(+) rica en peptidoglucanos. En cambio, *E. coli* y *P. aeruginosa*, ambas bacterias gram(-), poseen una membrana con doble capa. La

capa externa no sería sensible al contacto con las películas de quitosano-PVA-TiO₂.

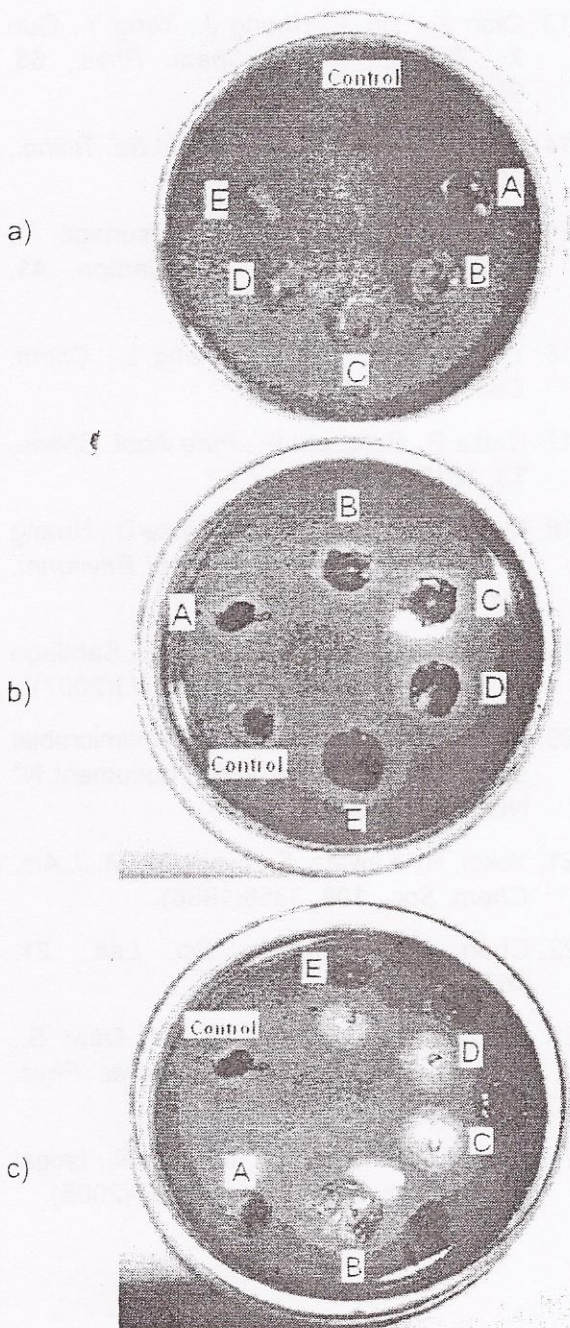


Figura N° 4. *E. coli* sobre películas de quitosano-PVA-TiO₂ (agar EMB) luego de a) 0 días y b) 5 días de incubación. c) Películas removidas.

Permeabilidad microbiana

El crecimiento de *S. aureus* colocada sobre las películas de quitosano-PVA-TiO₂ en el agar Baird Parker muestra colonias negras. En cambio, *E. coli* desarrolló colonias negras con brillo metálico en el agar EMB (Figura N° 4), mientras que *P. aeruginosa* mostró colonias translúcidas con pigmentación verde. La evaluación de las películas se realizó durante 5 días. Al quinto día se procedió a sacar las

películas y se observó que la zona por debajo de las mismas estaba limpia, no se observó crecimiento de ninguna colonia. Las películas estudiadas fueron:

- A: quitosano-PVA
- B: PVA
- C: quitosano-PVA-10ppmTiO₂
- D: quitosano-PVA-50ppmTiO₂
- E: quitosano-PVA-100ppmTiO₂

Sin embargo, sí hubo crecimiento a 37°C de las bacterias colocadas sobre las películas. Incluso, en el caso de la cepa de *P. aeruginosa*, la bacteria es capaz de continuar su metabolismo normal produciendo una sustancia verde clara que sí llega a atravesar la película. Esto contrasta con lo reportado en la literatura para el caso de una película de PVA en la que no se observó crecimiento sobre las películas sembradas.²³ Estos resultados están resumidos en la Tabla N° 1.

Tabla N° 1. Relación de microorganismos frente a películas de quitosano-PVA

Microorganismo	Películas					Crecimiento 37°C
	A	B	C	D	E	
<i>S. aureus</i>	T	T	T	T	T	+
<i>P. aeruginosa</i> *	T	T	T	T	T	+
<i>E. coli</i>	T	T	T	T	T	+

T = zona transparente debajo de la película

* = Coloración verde claro debajo de las películas.

Los resultados obtenidos son un tanto contradictorios, ya que en la prueba de susceptibilidad antimicrobiana se observó un cierto efecto bacteriostático en la zona de contacto entre el agar y la película, mientras que en la prueba de permeabilidad hubo crecimiento sobre la película. Estas observaciones sugieren que la película de quitosano-PVA no dejaría pasar el oxígeno necesario para el crecimiento de estas bacterias. Esta hipótesis está fundamentada en el hecho de que las películas de PVA son bastante impermeables al oxígeno.²⁴

IV. CONCLUSIONES

Las películas preparadas en base a quitosano-PVA-TiO₂ incubadas en condiciones normales no presentan propiedades antibacterianas, sin embargo disminuyen la tasa de crecimiento de

los microorganismos evaluados en las zonas de contacto y son impermeables a los mismos. Por estas características, estas películas tienen potencial aplicación como protector de heridas y otras lesiones a la piel.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yang Z., Liang G., Ma M., Abbah A., Lu W., Xu B., *Chem. Commun.*, 843(2007).
2. Hüther A., Xu X., Maurer G., *Fluid Phase Equilibria* 240, 186(2006).
3. APastor, I. Higuera, en *Quitina y quitosano: obtención caracterización y aplicaciones*, Fondo Editorial de la PUCP, Lima, 2004.
4. Jia, Z.; Shen, D.; Xu, W., *Carbohydr. Res.*, 333, 1(2001).
5. Lim L., Wan L., *Drug dev. ind. pharm.*, 20, 1007(1994).
6. Peppas H., en *Advances in Polymer Science*, 153, 37(2000).
7. Bourke L., Al-Khalili M., Briggs T., Michniak B., Kohn J., Poole-Warren L., *AAPS Pharm. Sci.*, 5, 1(2003).
8. Carhuapoma W., Santiago J., *Rev. Soc. Quím. Perú*, 71, 185(2005).
9. Carhuapoma W., Santiago J., *Rev. Iberoamer. Polím.*, 6, 333(2005).
10. Rodas A., Ohnuki T., Mathor M., Lugao A., *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. B: Beam Inter. Mater. Atoms*, 236, 536(2005).
11. Matsuo Y., Hatase K., Sugie Y., *Chem. Mater.*, 10, 2266(1998).
12. Novakova A., Smirnov E., Gendler T., *J. Magn. Magn. Mater.*, 300, e354(2006).
13. Qian X., Yin J., Huang J., Yang Y., Guo X., Zhu Z., *Mater. Chem. Phys.*, 68, 95(2001).
14. Lu C.-H., Saha S., *J. Sol-Gel Sc. Techn.*, 20, 27(2001).
15. Inagaki M., Hirose Y., Matsunaga T., Tsumura T., Toyoda M., *Carbon*, 41, 2619(2003).
16. Yu J., Yu J., Ho W., Zhang L., *Chem. Commun.*, 1942(2001).
17. Calza P., Pelizzetti E., *Pure Appl. Chem.*, 73, 1839(2001).
18. Maness P., Smolinski S., Blake D., Huang Z., Wolfrum E., Jacoby W., *Appl. Environm. Microb.*, 4094(1999).
19. Cabrera J., Paredes C., Urday E., Santiago J., *Rev. Iberoamer. Polím.*, 8, 323(2007).
20. Performance standards of antimicrobial susceptibility testing. 2002; document N° NCCLS M100-S12, 1975.
21. Yokoi, H.; Kawata, S.; Iwaizumi, M. *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 3358(1986).
22. Chen X., *J. Mater. Sci. Lett.*, 21, 1637(2002).
23. Razzak M., Zainuddin, Erizal, Dewi S., Lely H., Taty E., Sukirno, *Radiat. Phys. Chem.*, 55, 153(1999).
24. Kato Y., Kaminaga, J., Matsuo R., Isogai A., *J. Polym. Environm.*, 13, 261(2005).