

Estudio antimicrobiano de películas de quitosano-alcohol polivinílico dopadas con TiO₂

Kety León ^a ketyleon@yahoo.com, Julieta Cabrera ^{a,b}, Julio Santiago ^{a,c} jsantiago@ipen.gob.pe

^a Dirección de Investigación y Desarrollo, Instituto Peruano de Energía Nuclear,
Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

^b Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Lima, Perú

^c Facultad de Química e Ing. Química, Universidad nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

Resumen

Se ha preparado películas de alcohol polivinílico (PVA), quitosano-PVA y quitosano-PVA dopadas con TiO₂ y evaluado sus propiedades antimicrobianas frente a cepas bacterianas de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Se encontró que estas películas no tienen actividad frente a estos microorganismos, pero si actúan como una barrera eficaz. Por estas propiedades tienen una potencial aplicación como películas protectoras de piel de quemados y como material para envasado de alimentos.

Abstract

Films of Poly(vinyl alcohol), PVA, chitosan-PVA and chitosan-PVA doped with TiO₂ 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 and food packaging applications.

1 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.

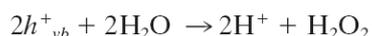
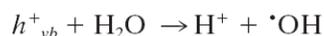
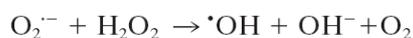
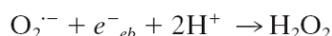
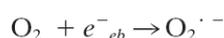
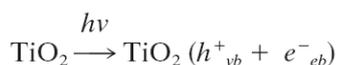
El quitosano es un polisacárido compuesto de dos subunidades, D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina, unidos por un enlace glucosídico de β-(1,4). Este polisacárido tiene muchas aplicaciones por sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradación, actividad antimicrobiana y no toxicidad [3]. El carácter 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 físicos [6] 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 [8-10].

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 Cu(OH)₂ intercalado con óxido de grafito [11] con Fe₂O₃ [12] Ag₂S [13] y óxido de litio y manganeso [14]. De otro lado, también se ha mezclado TiO₂ en suspensión con PVA con la intención de obtener, después de calcinación, nanopartículas de TiO₂ recubiertas de una capa de carbón [15,16]. En este trabajo se evalúa la susceptibilidad frente a *Pseudomonas 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 TiO₂. 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 TiO₂ en las películas de quitosano-PVA se debe a su inocuidad, ambientalmente limpio, fotoestable y de bajo coste, 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].



Esquema 1. Serie de reacciones fotocatalíticas que se realizan sobre la superficie de TiO₂ en presencia de luz ultravioleta.

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.

Otra razón por la que decidimos incluir nanopartículas de TiO₂ en las películas de quitosano-PVA es para darle mayor resistencia al esfuerzo, pues hemos observado recientemente que el módulo de Young de películas de PVA dopadas con TiO₂ se incrementó en función de la concentración del semiconductor [19].

2 Parte Experimental

2.1 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.

2.2 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 dispersaron en placas Petri y se secaron a temperatura ambiente.

2.3 Preparación del hidrogel quitosano-PVA-TiO₂

Se preparó una suspensión de TiO₂ en PVA, las que fueron estabilizadas por tratamiento con ultrasonido, y se mezcló con una solución de quitosano en AcOH al 1% en ácido acético. Luego, se dispersaron en placas Petri y se secaron a temperatura ambiente.

2.4 Preparación del inóculo

La preparación del inóculo se realizó tomando una cantidad de colonias de la cepa bacteriana pura y sembrando 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.

2.5 Susceptibilidad antimicrobiana

a) En placa

Se realizó por el método de difusión en agar de Bauer-Kirby siguiendo las recomendaciones del Comité Nacional de Control de Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS) [20]. Se incubó las placas con agar Muller Hinton a 37°C antes de su uso, se aplicó el inóculo en la placa con la ayuda de una torunda estéril, cubriendo totalmente la superficie de la placa sin dejar una zona libre. Se dejó secar de 3 a 5 minutos antes de depositar las películas cortadas en discos de 8mm de diámetro. Se incubó a 37°C por 18-24 h. 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.

2.6 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. Se incubó a 37°C. Los chequeos periódicos se realizaron durante 5 días.

3 Resultados y Discusión

3.1 Caracterización de las películas de quitosano-quitosano-PVA-TiO₂

Estas películas fueron caracterizadas por FT-IR, Figura 1. Los espectros de películas de quitosano-PVA dopadas con TiO₂ 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 obtenido evidencias de enlace covalente entre los átomos de Ti, de la superficie de las nanopartículas, con los oxígenos del PVA [22].

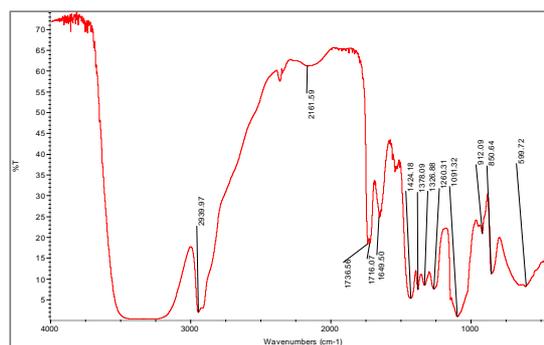


Figura 1. Espectro IR de la película de quitosano-PVA dopada con 1ppm de TiO₂.

3.2 Actividad antimicrobiana

Las películas probadas corresponden a:

A: película de alcohol polivinílico

F: quitosano-PVA

G: quitosano-PVA 1 ppm TiO₂

H: quitosano-PVA 5 ppm TiO₂

En placa

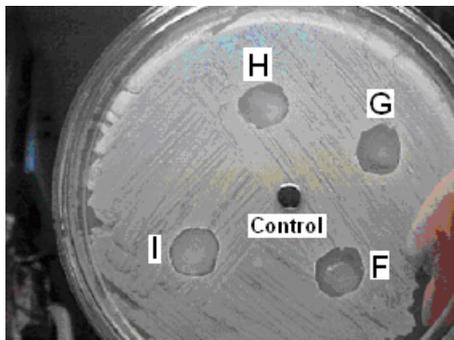
El crecimiento de *S. aureus* en el agar Baird Parker se observó como colonias negras con halo blanquecino. *E. coli* desarrolló colonias negras con brillo metálico en el agar EMB, mientras que *P. aeruginosa* mostró colonias translúcidas con pigmentación verde.

Todas las películas utilizadas en este estudio,

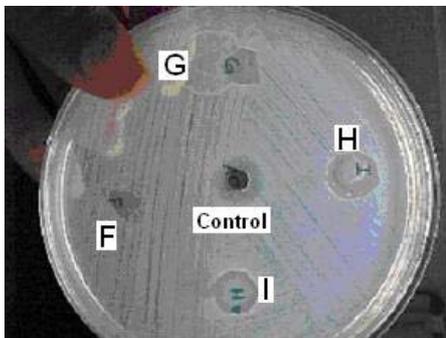
aparentemente solo presentan actividad en el área de la película propiamente dicha, ya que se observa que en esa zona no hay crecimiento (zona transparente), o hay crecimiento de colonias aisladas, lo que no se observa en las películas de PVA donde el área de la película presenta crecimiento para las 3 cepas bacterianas. En ningún caso se observa un halo alrededor de la película, figura 2.

Se realizaron controles para ver que la técnica funciona colocando en los medios de cultivo antibióticos específicos para cada cepa, observándose que los tamaños de los halos están dentro del intervalo recomendado por la NCCLS De igual modo se probó un desinfectante y se obtuvieron halos.

a)



b)



c)

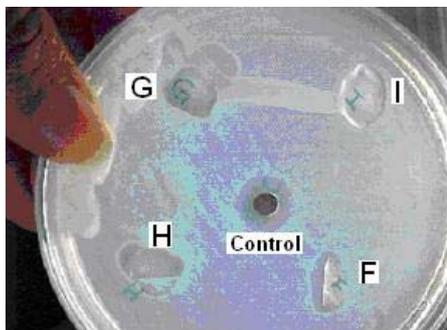
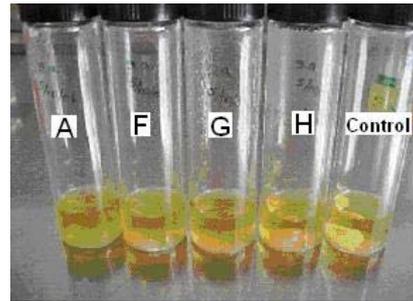


Figura 2. Películas de quitosano-PVA y quitosano-PVA-TiO₂ enfrentadas a: a) *S. aureus*, b) *E. coli* y c) *P. aeruginosa*.

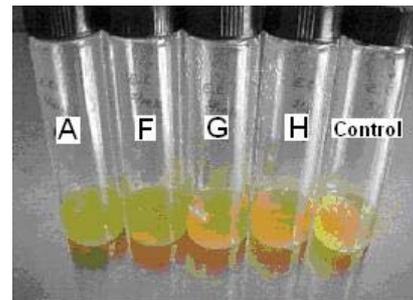
En tubo

Luego de la incubación, se observó presencia de turbidez en todos los tubos, lo que nos indica que las películas no inhiben el crecimiento de los microorganismos, figura 3. En los tubos que presentan una turbidez tenue se tomó una muestra y se sembró sobre agar Casoy para hacer un cultivo observando crecimiento microbiano.

a)



b)



c)

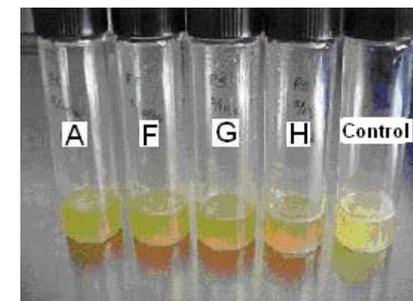


Figura 3. Películas en tubos conteniendo caldos con: a) *S. aureus*, b) *E. coli* y c) *P. aeruginosa*.

3.3 Permeabilidad microbiana

Las películas estudiadas fueron: A: quitosano-PVA; B: PVA; C: quitosano-PVA-10ppmTiO₂; D: quitosano-PVA-50ppmTiO₂ y E: quitosano-PVA-100ppmTiO₂. 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 había crecimiento de colonias características ni de ninguna otra. Sin embargo, sí hubo crecimiento de las bacterias utilizadas sobre la película. 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, Figura 4. Esto contrasta con lo reportado en la literatura para el caso de una membrana de PVA en la que se observó que no hubo crecimiento sobre las películas sembradas [18].

Estos resultados indican que las películas de quitosano-PVA y aquellas dopadas con TiO_2 no poseen propiedades antimicrobianas pero sí logran impedir el paso de *E. coli* estudiadas.

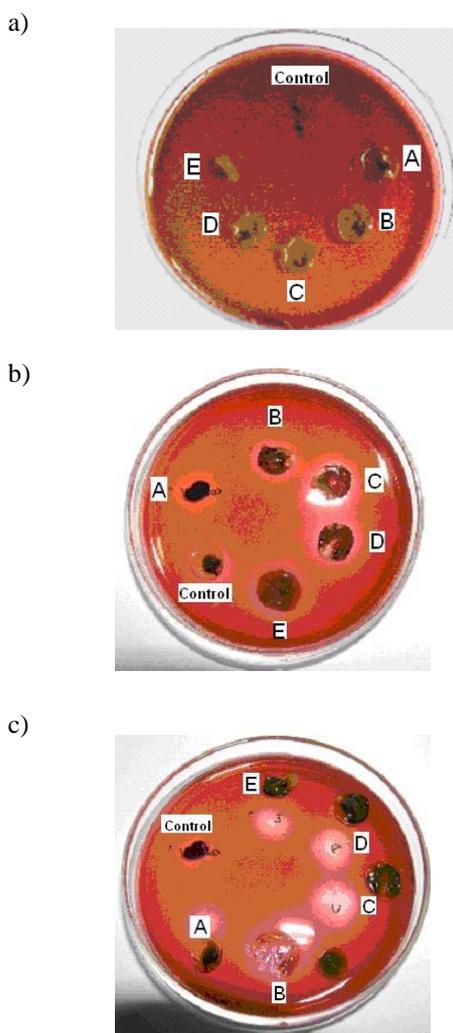


Figura 4. Cepas de *E. coli* sembrado sobre Películas en agar EMB: a) Tiempo 0 días, b) Placas después de 5 días de incubación, y c) Películas removidas.

La presencia de PVA en las películas ti confiere a estas una buena impermeabilidad frente al TiO_2 [23], la cual puede ser incrementada por la presencia de TiO_2 [24].

4 Conclusiones

Las películas preparadas en base a quitosano-PVA- TiO_2 incubadas en condiciones normales no presentan propiedades antibacterianas, sin embargo inhiben el crecimiento de los microorganismos evaluados en las zonas de contacto y son impermeables a los mismos. Por estas características, estas películas pueden utilizarse como protector de heridas y otras lesiones a la piel, para evitar su infección. La presencia de PVA y TiO_2 hacen que se espere de este material una buena impermeabilidad contra el oxígeno y pueda ser potencialmente utilizado como material de empaque de alimentos.

5 Referencias

- [1] Yang Z, Liang G, Ma M, Abbah A, Lu W, Xu B. D-Glucosamine-based supramolecular hydrogels to improve wound healing. *Chem. Commun.* 2007; 843-845.
- [2] Hüther A, Xu X, Maurer G. Swelling of *N*-isopropyl acrylamide hydrogels in aqueous solutions of sodium chloride. *Fluid Phase Equilibria* 240 (2006) 186-196.
- [3] Pastor A, Higuera I. Quitina y quitosano: obtención caracterización y aplicaciones. Fondo Editorial de la PUCP, Lima, 2004.
- [4] Jia Z, Shen D, Xu, W. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. *Carbohydr. Res.* 2001; 333: 1-6.
- [5] Lim L, Wan L. The effect of plasticizers on the properties of polyvinyl alcohol films. *Drug dev. ind. pharm.* 1994; 20: 1007-1020.
- [6] Hassan C, Peppas N. Structure and applications of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freeze/thawing

- methods. *Advances in Polymer Science*, pp. 37-65, Springer, Berlin, 153 (2004).
- [7] Bourke L, Al-Khalili M, Briggs T, Michniak B, Kohn J, Poole-Warren LA. Photo-Crosslinked Poly(vinyl Alcohol) Hydrogel Growth Factor Release Vehicle for Wound Healing Applications. *AAPS Pharm. Sci.* 2003; 5: 1-11.
- [8] Carhuapoma W, Santiago J. Preparación de hidrogeles de quitosano-PVA por radiación gamma. *Rev. Soc. Quím. Perú.* 2005; 71: 185-192.
- [9] Carhuapoma W, Santiago J. Caracterización de hidrogeles de quitosano-alcohol polivinílico obtenidos por radiación gamma. *Rev. Iberoamer. Polím.* 2005; 6: 333-346.
- [10] Rodas A, Ohnuki T, Mathor M, Lugao A. Irradiated PVAI membrane swelled with chitosan solution as dermal equivalent. *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. B: Beam Inter. Mater. Atoms.* 2005; 236: 536-539.
- [11] Matsuo Y, Hatase K, Sugie Y. Preparation and characterization of Poly(vinyl alcohol)-and $\text{Cu}(\text{OH})_2$ -Poly(vinyl alcohol)-intercalated graphite oxides. *Chem. Mater.* 1998; 10: 2266-2269.
- [12] Novakova A, Smirnov E, Gendler T. Magnetic anisotropy in Fe_3O_4 -PVA nanocomposites as a result of Fe_3O_4 -nanoparticles chains formation. *J. Magn. Magn. Mater.* 2006; 300: e354-e358.
- [13] Qian X, Yin J, Huang J, Yang Y, Guo X, Zhu Z. The preparation and characterization of PVA/ Ag_2S nanocomposite. *Mater. Chem. Phys.* 2001; 68: 95-97.
- [14] Lu CH, Saha S. Low Temperature Synthesis of Nano-Sized Lithium Manganese Oxide Powder by the Sol-Gel Process Using PVA. *J. Sol-Gel Sc. Techn.* 2001; 20: 27-34.
- [15] Inagaki M, Hirose Y, Matsunaga T, Tsumura T, Toyoda M. Carbon coating of anatase-type TiO_2 through their precipitation in PVA aqueous solution. *Carbon.* 2003; 41: 2619-2624.
- [16] Yu J, Ho W, Zhang L., Preparation of highly photocatalytic active nano-sized TiO_2 particles via ultrasonic irradiation. *Chem. Commun.* 2001: 1942-43.
- [17] Calza P, Pelizzetti E. Photocatalytic transformation of organic compounds in the presence of inorganic ions. *Pure Appl. Chem.* 2001; 73: 1839-48.
- [18] Maness P, Smolinski S, Blake D, Huang Z, Wolfrum E, Jacoby W. Bactericidal activity of photocatalytic TiO_2 reaction: toward an understanding of its killing mechanism. *Appl. Environm. Microb.* 1999: 4094-98.
- [19] Cabrera J, Paredes C, Urday E, Santiago J. Preparación y caracterización de películas de alcohol polivinílico conteniendo nanopartículas de TiO_2 . *Rev. Iberoamer. Polím., en evaluación.*
- [20] NCCLS. Performance standards of antimicrobial susceptibility testing. 2002; document N° NCCLS M100-S12.
- [21] Yokoi H, Kawata S, Iwaizumi M. Interaction modes between heavy metal ions and water-soluble polymers. 1. Spectroscopic and magnetic reexamination of the aqueous solutions of cupric ions and poly(vinyl alcohol), *J. Am. Chem. Soc.* 1986; 108: 3358-61.
- [22] Chen X. Preparation and property of TiO_2 nanoparticle dispersed polyvinyl alcohol composite materials. *J. Mater. Sci. Lett.* 2002; 21: 1637-39.
- [23] Jang J, Lee D. Oxygen barrier properties of biaxially oriented polypropylene/polyvinyl alcohol blend films. *Polym.* 2004; 45: 1599-1607.
- [24] Osman M, Rupp J, Suter U. Gas permeation properties of polyethylene-layered silicate nanocomposites. *J. Mater. Chem.* 2005; 15: 1298-1304.