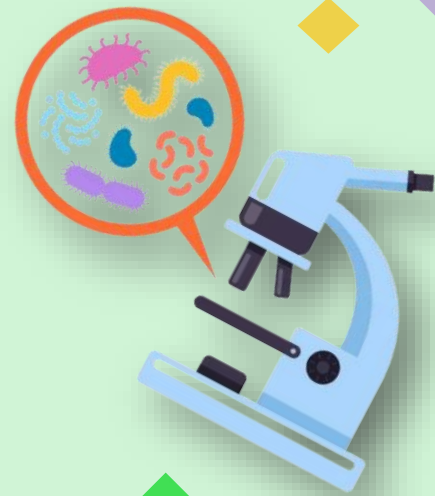




I Congreso Internacional de Ciencias Exactas y Naturales

Editado por
Yuri Morales López



Universidad Nacional
Costa Rica, 2019.



Desarrollo de un apósito biodegradable con potencial actividad protectora para el tratamiento de infecciones

Geannina Ramos Rodríguez

gramos.r18@gmail.com

Laboratorio de Polímeros (POLIUNA),
Escuela de Química, Universidad Nacional
Costa Rica

Marianelly Esquivel Alfaro

mesquive@una.ac.cr

Laboratorio de Polímeros (POLIUNA),
Escuela de Química, Universidad Nacional
Costa Rica

Sergio Madrigal Carballo

madrigalcarb@wisc.edu

University of Wisconsin-Madison
Estados Unidos

Luis Roberto Villegas Peñaranda

luis.villegas.penaranda@una.cr

Laboratorio de Biorefinería,
Escuela de Química, Universidad Nacional
Costa Rica

Resumen

Se obtuvieron apósitos biodegradables para tratamiento de heridas, con potencial actividad protectora contra infecciones. Las muestras se sintetizaron a partir de los residuos generados durante el procesamiento del camarón camello (*Heterocarpus vicarius*) y se cargaron con un antibiótico modelo. Los apósitos de quitosano cargados con antibiótico se formularon con concentraciones de antibióticos entre 0,65 y 4 mg/ml. Los apósitos obtenidos tenían un tamaño de poro entre 317 y 180 μm , mostraron un porcentaje de hinchamiento de 83 a 92% y el mecanismo de liberación del fármaco siguió a una cinética de primer orden, que se relaciona con un mecanismo de liberación de la inflamación por

Tema: Desarrollo y aplicaciones científicas y tecnológicas

Principal área: Química

Ramos Rodríguez, G., Esquivel Alfaro, M., Madrigal Carballo, S. & Villegas Peñaranda, L.R. (2019). Desarrollo de un apósito biodegradable con potencial actividad protectora para el tratamiento de infecciones. En Y. Morales-López (Ed.), *Memorias del I Congreso Internacional de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional, Costa Rica, 2019* (e189, pp. 1-9).

Heredia: Universidad Nacional. doi <http://dx.doi.org/10.15359/cicen.1.55>

erosión del fármaco. Además, la evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* mostró que el apósito para heridas cargado con antibióticos inhibe el crecimiento bacteriano de las cepas *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las muestras desarrolladas permiten la liberación de antibióticos, poros para el crecimiento celular, capacidad de absorción de líquidos y protección antimicrobiana efectiva en el tratamiento de infecciones bacterianas.

Abstract

Biodegradable wound dressings with potential protective activity against infections were obtained. The samples were synthesized from waste generated during the processing of the camel shrimp (*Heterocarpus vicarius*) and were loaded with a model antibiotic. The wound dressings obtained had a pore size between 317 and 180 μm , showed a swelling percentage from 83 to 92% and the mechanism of drug release followed a first-order kinetic, which is related with a swelling-erosion release mechanism of the drug. In addition, the evaluation of the antimicrobial activity *in vitro* test showed that wound dressing loaded with antibiotic inhibits the bacterial growth of strains *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The developed samples allow the release of the antibiotic, pores for cell growth, fluid absorption capacity and effective antimicrobial protection in the treatment of bacterial infections.

Palabras clave: apósito; biopolímero; quitosano; polímero natural; infecciones

Introducción

Los pacientes con quemaduras son especialmente susceptibles a infecciones, esto debido a la eliminación de la barrera protectora proporcionada por la piel, combinada con la inhibición del sistema inmune, la presencia de microflora endógena, estancias hospitalarias prolongadas y procedimientos terapéuticos invasivos. Por consiguiente, a pesar de que el tratamiento se realiza de forma cuidadosa, la infección de las heridas por quemaduras se da fácilmente debido a la fácil colonización de microorganismos patógenos, retrasando significativamente la curación y aumentando los riesgos de infección sistémica. (Guggenheim, Thurnheer, Gmur, Giovanoli, Guggenheim, 2011)

Por lo que es de suma importancia evitar que estas heridas se infecten y si se llegaran a infectar es vital contar con un apósito que pueda controlar o eliminar dicha infección. La cirugía temprana, al eliminar el tejido en una herida, tiene el reto de la carencia de zonas donadoras de injertos de piel del propio paciente. Por este motivo es indispensable echar mano de sustitutos de piel, que sean temporales o permanentes, para favorecer la supervivencia del paciente. Se considera que el sustituto ideal de la piel no existe en la actualidad, sin embargo, se tienen grandes avances en este campo como lo son los apósitos biológicos y sintéticos. (Hajska, Slobodnikova, Hupkova, Koller, 2014)

Una posible fuente de materia prima para elaborar apósitos biodegradables es el quitosano, que se extrae a partir del exoesqueleto de los crustáceos. En nuestro país, aunque el camarón es un producto generado por captura o acuicultura y procesado por su carne, alrededor del 50% de su peso crudo es descartado como desecho dependiendo de la especie. De hecho, los residuos del procesamiento de camarón son uno de los principales



subproductos de la industria pesquera. El uso de los residuos de crustáceos ha sido de interés para los investigadores por dos razones: estos residuos son altamente perecederos y ocasionan contaminación ambiental, lo que los puede ocasionar en una molestia y un peligro para la salud pública. (Monserrat, 2013)

La industria camaronera actualmente saca poco provecho de estos residuos. Los desechos de camarón pueden ser usados en la alimentación animal. Usualmente lo comercializan en forma de harina de camarón (un producto de bajo valor económico) por lo que no se obtiene un valor agregado significativo. El principal obstáculo para el uso de residuos de camarón como una fuente de alimento es la presencia de quitina, que no puede ser digerida con eficacia por los herbívoros. (Shahidi, Abuzaytoun, 2005)

Esta investigación centra sus esfuerzos en el estudio del potencial de los residuos de camarón para extraer quitosano, donde este polímero cumpla una función de vehículo farmacéutico de un medicamento modelo, en el diseño de apósitos como sistema de liberación controlada con potenciales aplicaciones en el campo biomédico

Marco teórico

La quitina es el aminopolisacárido natural más abundante en la naturaleza, casi tanto como la celulosa. Es el componente principal de los invertebrados, crustáceos, exoesqueleto de los insectos y de la pared celular de hongos (Beaney, Lizardi-Mendoza, Healy, 2005). La diferencia estructural del quitosano, poli [β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranos], y la quitina, poli [β -(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranos], radica en el carbono número 2, en donde la quitina posee un grupo acetoamida, mientras en el quitosano ese grupo es desacetilado, resultando en un grupo amino. La configuración β -1,4 del enlace provoca la estructura rígida y sin ramificaciones de ambas moléculas. Esta desacetilación se obtiene en medio alcalino, con hidróxido de sodio, tratando el camarón u otras cáscaras de crustáceos ((Jayakumar Reis, Mano, 2006).

Una de las características más importantes del quitosano es su capacidad para formar hidrogeles (Kamoun, Kenawy, Chen, 2017). Los hidrogeles son redes macromoleculares muy hidrófilas, que se producen por reticulación química o física de polímeros solubles en agua. Debido a las propiedades peculiares de los hidrogeles tales como: alta sensibilidad a ambientes fisiológicos, naturaleza hidrofílica, contenido adecuado de líquidos de tejidos blandos y flexibilidad, los convierten en excelentes candidatos para aplicaciones biomédicas. Los hidrogeles pueden hincharse y deshincharse reversiblemente, mostrando respuesta ante estimulantes ambientales específicos como temperatura, pH y fuerza iónica. Por lo tanto, tal respuesta inteligente de los hidrogeles hacia cambios de variables fisiológicas sugiere su uso en varias aplicaciones biomédicas (Agostino, Gatta, Rosa, Schiraldi, 2012).

Hasta mediados de 1962, las investigaciones sobre el vendaje de las heridas y la curación fueron algo descuidadas. Anteriormente se creía que la cicatrización de la herida es más rápida y eficiente si se mantenía seca y sin cubrir. Esta especulación se asumió antes de establecer los requisitos ideales para los materiales de cicatrización de heridas (Patel, Bonde, Srinivasan, 2011).



El trabajo pionero de Winter, quien diseñó la primera generación de películas para heridas o "apósitos", donde se observó que la reparación epitelial de la piel herida del cerdo tratada con un apósito era por lo menos dos veces mayor en comparación con las heridas expuestas al aire. A partir de estos resultados, se intensificaron los estudios e investigaciones sobre el desarrollo de apósitos, sugiriendo que los vendajes de heridas ideales deben mantener un ambiente húmedo con alta biocompatibilidad y prevenir la infección bacteriana para acelerar la regeneración del tejido. (Winter, 1962)

En los años ochenta, los vendajes de las heridas se clasificaron según su grado de humectabilidad en apósitos secos y húmedos. Según las últimas investigaciones, Winter demostró que, en caso de apósitos secos, una costra puede cubrir toda la zona de la herida, lo que disminuye la tasa de epitelización e inhibe efectividad del vendaje. Por lo tanto, los apósitos de algodón de gasa (vendajes secos) que antes se usaban frecuentemente como vendajes de heridas, ahora no son tan útiles debido a sus propios inconvenientes, como: i) incapacidad para proteger la herida de la invasión microbiana; (ii) exudado acumulado de la herida en la superficie de la herida debido a su baja tasa de absorción, que facilita el ataque microbiano, (iii) baja permeabilidad a los gases, (iv) no adecuado para heridas crónicas, y (v) mantener la herida seca, lo que disminuye la tasa de epitelización y la proliferación celular (Winter, 1962).

Se ha demostrado que la cicatrización de la herida con apósitos húmedos es más rápida que la de los apósitos secos. Este hecho se atribuye a que la curación de la piel renovada sin formación de escaras o inflamación, solo puede tener lugar en un ambiente húmedo. Por lo tanto, los apósitos húmedos se tomaron en cuenta para ser los apósitos más adecuados para la reparación de la piel. (Banoriya, Purohit, Dwivedi, 2017)

La infección es una preocupación importante en los pacientes que han sufrido una herida o quemadura, debido a esta complicación, los índices de morbilidad se han estimado que representan más del 75% de la mortalidad y por ende representa un alto costo de los servicios sanitarios (factura sanitaria) (Church, Elsayed, Reid, Winston, Lindsay, 2006). Las bacterias más frecuentemente implicadas en la generación de infecciones son *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter spp.* De estos, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* son los más prevalentes (McManus, Mason, McManus, Pruitt, Manus, 1985).

Existe una gran variedad de vendajes y una serie de factores que rigen la elección del apósito apropiado para el tratamiento de heridas (por ejemplo, tipo de herida, etapa del proceso de cicatrización y volumen de exudado). Sin embargo, para quemaduras y otras heridas donde la infección es un riesgo alto, se pueden usar apósitos antimicrobianos (AMD). Típicamente, el agente antimicrobiano (AMD) está contenido dentro de un apósito para heridas, que puede usarse tanto profilácticamente (para evitar la colonización de la herida y posterior formación de biofilm) así como en el tratamiento de la infección establecida (Anon, 2010).

Metodología

Para la obtención de los apósitos de quitosano purificado se realizó mediante la técnica de liofilización. Para esto se prepararon tres disoluciones de diferente concentración



de quitosano al 1%, 2% y 4% m/v en ácido acético al 0.5% v/v. Se tomaron alícuotas de 3 mL de la solución y se depositaron en cada uno de los pozos de la placa de poliestireno esterilizadas. Se congelaron a -20 °C por 24 horas. Una vez congeladas las placas se liofilizaron a una presión de 0,030 Torr, temperatura de -80 °C por 24 horas, hasta obtener una estructura 3D porosa estable.

Para el caso de los apósitos cargados con un antibiótico modelo, se prepararon disoluciones de quitosano al 2% m/v en ácido acético al 0.5% v/v, con concentraciones distintas de sulfato de gentamicina (0.65 mg/mL, 1.00 mg/mL y 1.50 mg/mL). Se tomaron alícuotas de 3 mL de cada una de las disoluciones y se depositaron en cada uno de los pozos de la placa de poliestireno esterilizadas. Se congelaron a -20 °C por 24 horas. Una vez congeladas las placas se liofilizaron a una presión de 0.030 Torr, temperatura de -80 °C por 24 horas, hasta obtener una estructura 3D porosa estable.

El comportamiento de hinchamiento de los apósitos Q-G se evaluó mediante el método gravimétrico (Elsner, Zilberman, 2010). El análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) se llevó a cabo utilizando un Microscopio electrónico de barrido marca HITACHI modelo S-3700n.

La determinación de la concentración del sulfato de gentamicina se realizó mediante espectroscopia UV-VIS, utilizando el NanoDrop 2000/2000c, siguiendo la metodología descrita en la farmacopea USP30–NF25 2010-2013 (Peles, Zilberman, 2012).

Para evaluar la actividad antimicrobiana se siguió la metodología de difusión en agar Kirby Bauer. Este es un método estandarizado de difusión en disco descrito por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Se preparó un control negativo para determinar la viabilidad del ensayo, para lo cual se utiliza el apósito de quitosano sin antibiótico

Análisis

El quitosano grado técnico, obtenido de la modificación química de quitina producido a partir del material de desecho pesquero de camarón, se purificó mediante la precipitación con NaOH al 25%. Se caracterizó, obteniendo un porcentaje de cenizas de 1,47%, un peso molecular de 181 kDa y un grado de desacetilación de 82%.

Los apósitos de quitosano-sulfato de gentamicina (Q-SG) (figura 1) se formularon con concentraciones de antibiótico entre 0.65, y 1.50 mg/mL).

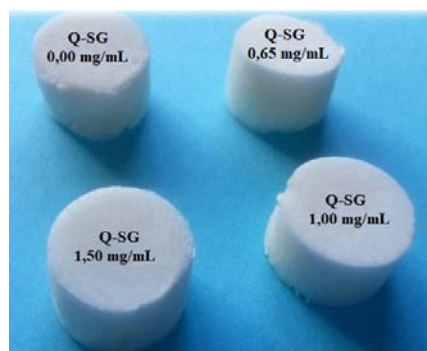


Figura 1. Apósitos de quitosano- sulfato de gentamicina (Q-SG) y sus diferentes concentraciones de antibiótico.

Mediante microscopía de barrido electrónico (SEM) se determinó que la estructura de los apósitos presenta poros con diámetros entre 317-180 μm , estables al medio ambiente. Las imágenes de microscopia electrónica de barrido (SEM) (figura 2) revelan un aumento en el tamaño de poro de los apósitos con antibiótico, y una disminución paulatina al aumentar la concentración del antibiótico.

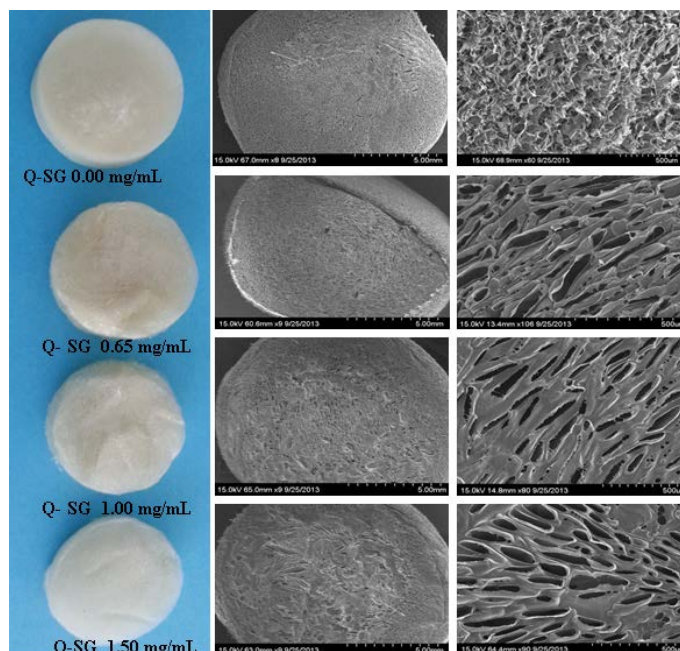


Figura 2. Comparación de las fotografías obtenidas en el análisis SEM de los apósitos.

Los resultados demuestran una capacidad de absorción del buffer utilizado como simulación del exudado entre el 83-92%. Los ensayos de la cinética de liberación del fármaco demuestran una cinética de primer orden, gobernado por la difusión de partículas del antibiótico a través de la matriz polimérica, estimulada por el gradiente de concentración que existe entre el sistema de liberación y el medio circulante. El mecanismo de liberación se ve afectado por la erosión y relajación de las cadenas poliméricas.

La evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* prueba como el apósito con el antibiótico inhibe el crecimiento bacteriano de ambas cepas utilizadas *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) (figuras 3 y 4).

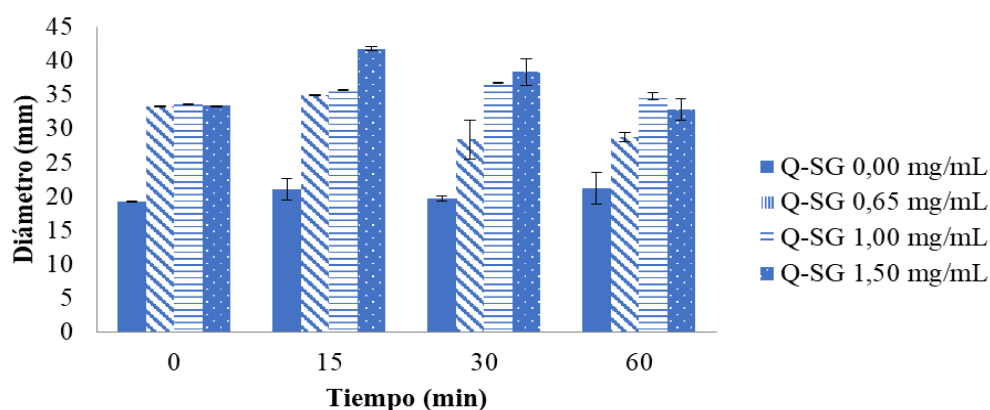


Figura 3. Diámetros de inhibición de los diferentes apósitos, hasta un tiempo máximo de exposición de 1 h en la cepa *S. aureus*.

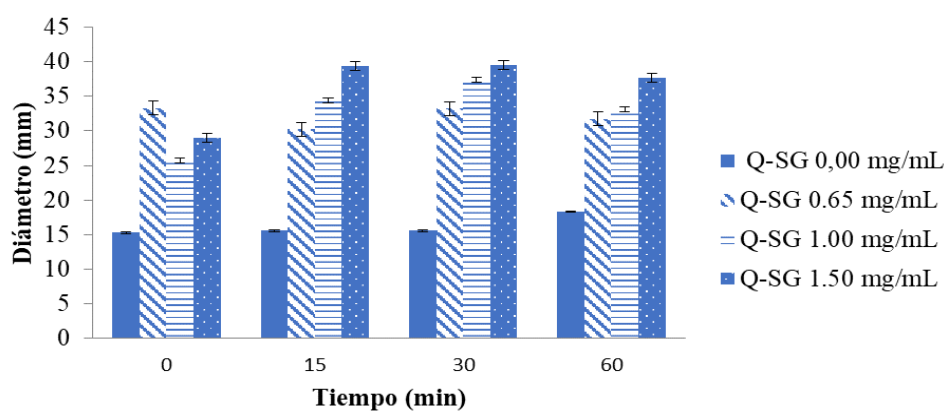


Figura 4. Diámetros de inhibición de los diferentes apósitos, hasta un tiempo máximo de exposición de 1 h en la cepa *P. aureginosa*.

Finalmente, el apósito desarrollado presenta las propiedades necesarias para la liberación del antibiótico modelo, así como, propiedades estructurales para promover la liberación de sustancias activas; tales como formación de poros, capacidad de absorción de líquidos y finalmente una protección antimicrobiana efectiva en el tratamiento de infecciones bacterianas.

Conclusiones

Esta investigación demostró que se pueden desarrollar apósitos de quitosano con potencial actividad antibiótica, mediante la técnica de liofilización. Los apósitos obtenidos fueron cargados con el antibiótico modelo (SG), presentando estructuras porosas con diámetros entre 317 μm y 180 μm , las matrices obtenidas son estables al medio ambiente.

El ensayo de determinación del porcentaje de hinchamiento demuestra como la capacidad de hinchamiento de los apósitos varía entre 83% y 92%, presentando valores muy similares a los apósitos comerciales (96%) para tratamiento antibacteriano, disminuyendo las posibles fugas que se puedan presentar de exudado en las quemaduras, siendo esta una ventaja en la utilización de apósitos.



Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), revelan el aumento en el tamaño de poro en los apósitos con antibiótico en comparación con el apósito sin antibiótico. Además, se observó una disminución del poro al aumentar la concentración de la gentamicina en la matriz. Esta característica es importante en la capacidad de las células de adherirse y proliferarse a la matriz.

El perfil de liberación de antibiótico muestra que el proceso se da de forma bifásica, en la primera etapa se libera el mayor porcentaje del antibiótico (60% a 70%), posiblemente por la disolución de cristales de SG en la superficie del apósito y en la segunda etapa se difunde a través de la estructura polimérica. Los resultados de la cinética demuestran una cinética de primer orden, gobernado por la difusión de partículas del antibiótico a través de la matriz polimérica, estimulada por el gradiente de concentración que existe entre el sistema de liberación y el medio circulante. El mecanismo de liberación estudiado se ve afectado por la erosión y la relajación de las cadenas poliméricas.

La evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* comprueba como el apósito inhibe el crecimiento bacteriano de las cepas utilizadas (*S.aureus* y *P.aureginosa*), siendo estos expuestos en diferentes tiempos en el buffer que simula el exudado, hasta un máximo de una hora. Los diámetros de inhibición en comparación con el apósito sin antibiótico y el apósito con antibiótico muestran un aumento de aproximadamente 20 mm, lo que conduce a una actividad biocida exitosa para los apósitos desarrollados.

Con los resultados anteriormente citados podemos concluir que el apósito desarrollado presenta las propiedades necesarias para aplicaciones como apósito para la liberación del antibiótico modelo, así como, propiedades estructurales necesarias para promover la liberación de sustancias activas; tales como formación de poros, capacidad de absorción de líquidos y finalmente una protección antimicrobiana efectiva en el tratamiento de infecciones bacterianas.

Referencias

- Agostino, A.D., Gatta, A.L., Rosa, M., Schiraldi, C. (2012). Semi-interpenetrated hydrogels composed of PVA and hyaluronan or chondroitin sulphate: chemico-physical and biological characterization. *J. Biotech Biomater*, 2(140), 1–6. doi: 10.4172/2155-952X.1000140
- Anon. (2010). Silver dressings – do they work?. *Drug Ther Bull*, 48, 38–42. doi: 10.1136/dtb.2010.02.0014
- Banoriya, D., Purohit, R., Dwivedi, R. K. (2017). Advanced Application of Polymer based Biomaterials. *Mater. Today Proc*, 4(2), 3534–3541. doi: 10.1016/j.matpr.2017.02.244
- Beaney, P., Lizardi-Mendoza, J., Healy, M. (2005). Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80(2), 145–150. doi: 10.1002/jctb.1164
- Church, D., Elsayed, S., Reid, O., Winston, B., Lindsay, R. (2006). Burn wound infections. *Clin. Microbiol. Rev*, 19(2), 403–434. doi: 10.1128/CMR.19.2.403-434.2006



- Elsner, J. J., Zilberman, M. (2010). Novel antibiotic-eluting wound dressings: an in vitro study and engineering aspects in the dressing's design. *J. Tissue Viability*, 19(2), 54–66. doi: 10.1016/j.jtv.2009.11.001
- Guggenheim, M., Thurnheer, T., Gmur, R., Giovanoli, P., Guggenheim, B. (2011). Validation of the Zurich burn-biofilm model. *Burns*. 37(7), 1125–1133. doi: 10.1016/j.burns.2011.05.017
- Hajska, M., Slobodnikova, L., Hupkova H., Koller J. (2014). In vitro efficacy of various topical antimicrobial agents in different time periods from contamination to application against 6 multidrug-resistant bacterial strains isolated from burn patients. *Burns*, 40(4), 713–718. doi: 10.1016/j.burns.2013.09.003
- Jayakumar, R., Reis, R.L., Mano, J.F. (2006). Chemistry and applications of phosphorylated chitin and chitosan. *e-Polymers*. 35, 1–16. Recuperado de: <https://core.ac.uk/download/pdf/55620460.pdf>
- Kamoun, E., Kenawy, E. R. S., Chen, X. (2017). A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *J. Adv. Res.* 8(3), 217–233. doi: 10.1016/j.jare.2017.01.005.
- McManus, A.T., Mason, A.D., McManus, WF., Pruitt, BA. (1985). Twenty-five year review of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia in a burn center. *Eur J Clin Microbiol.* 4(2), 219–223.
- Monserrat, O. R. A. (2013). Tratamiento químico y biotecnológico de residuos de camarón para la obtención de productos de valor agregado (Monografía). Ingeniería en Ciencias Ambientales, Universidad Veracruzana, Veracruz, México.
- NCCLS. (2012). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 32(1)
- Patel, H., Bonde, M., Srinivasan, G. (2011). Biodegradable polymer scaffold for tissue engineering. *Trends Biomater Artif Organs*, 25(1), 20–29. Recuperado de: <http://medind.nic.in/ta/t11/i1sji/taat11i1sji20.pdf>
- Peles, Z., Zilberman, M. (2012). Novel soy protein wound dressings with controlled antibiotic release: mechanical and physical properties. *Acta Biomater*, 8(1), 209–217. doi: 10.1016/j.actbio.2011.08.022
- Shahidi, F., Abuzaytoun, R. (2005). Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects. *Adv. Food Nutr. Res.* 49, 93–135. doi: 10.1016/S1043-4526(05)49003-8
- Winter, G.D. (1962). Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature*. 193, 293–294.



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional.

