

PELÍCULAS ANTIBACTERIANAS DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)

M.M. Quispe¹, M.E. Villanueva², O.V. López¹, G. Copello³ y M.A. Villar^{1,4}

¹Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI, UNS-CONICET), Camino la Carrindanga Km 7 (8000), Bahía Blanca, Argentina-
maytemilenkaquispe@gmail.com

²Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján (6700), Buenos Aires, Argentina.

³Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA, UBA-CONICET), Buenos Aires, Argentina.

⁴Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Sur, Av. Alem 1253 (8000), Bahía Blanca, Argentina.

RESUMEN

La situación actual de pandemia nos ha llevado a revalorizar el desarrollo de materiales con capacidad de inhibir el desarrollo de microorganismos. En este trabajo se ha estudiado la capacidad antibacteriana de películas de polihidroxicanoato (PHB), utilizando sulfato de cobre como compuesto activo inhibidor. Además, se realizaron ensayos de tracción para evaluar los cambios en las propiedades mecánicas, para estudiar la microestructura se empleó microscopía electrónica acoplada a un EDX. Se detectó la presencia de microcristales de sulfato de cobre en la matriz de PHB que afectaron el desempeño mecánico de las películas, las mismas demostraron tener capacidad antibacteriana contra *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

1. INTRODUCCIÓN

El PHB es uno de los biopolímeros más estudiados y, además posee buenas propiedades mecánicas. Sin embargo, a diferencia de otros biopolímeros como el quitosano, no posee actividad antibacteriana. En 2008, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos reconoció al cobre como el primer metal antimicrobiano. Se ha demostrado en ensayos in vitro que sobre superficies sólidas de cobre se puede eliminar el 99,9 % de los microorganismos [1]. La actividad antibacteriana del cobre se atribuye principalmente a la liberación de iones Cu^{2+} que afectan la integridad de la membrana/pared bacteriana. Posteriormente, generan estrés oxidativo intracelular y modifican el ADN, resultando finalmente en la muerte de microorganismos [2, 3]. Por ello, considerando la situación de pandemia, una manera de potenciar el uso del PHB es otorgarle propiedades antibacterianas.

El objetivo de este trabajo fue incorporar sulfato de cobre a películas a base de PHB plastificadas con tributirato de glicerol (TBG) y procesadas en presencia de un estabilizante (Irganox 1010, I).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. PROCESAMIENTO Y MOLDEO

Se procesaron diferentes formulaciones de PHB, TBG y sulfato de cobre pentahidratado (Cu), en presencia de I, en una mezcladora Brabender a 180°C, durante 15 min a 60 rpm (Tabla 1).

Tabla 1. Formulaciones de películas a base de PHB.

Tabla	TBG (% p/ ρ_{PHB})	Cu (% p/ ρ_{PHB})
PHB-I-0Cu	-	-
PHB-I-0,5Cu	-	0,5
PHB-I-2,5Cu	-	2,5
PHB-I-5,0Cu	-	5,0
PHB-I-7,5Cu	-	7,5
PHB-I-0Cu _{TBG}	20	-
PHB-I-0,5Cu _{TBG}	20	0.5
PHB-I-2,5Cu _{TBG}	20	2,5
PHB-I-5,0Cu _{TBG}	20	5,0
PHB-I-7,5Cu _{TBG}	20	7,5

2.2. ENSAYOS DE DIFUSIÓN DE AGAR

Se realizaron ensayos de difusión en agar LB para evaluar la actividad antibacteriana contra *Pseudomona aeruginosa* (gram -) y *Staphylococcus aureus* (gram +). Las colonias de las bacterias obtenidas de un cultivo durante la noche se suspendieron en caldo LB y la concentración se ajustó a 105 UFC mL⁻¹. Luego, se extendieron 200 μL de esta suspensión en placas de agar LB. Las muestras de películas (discos de 0,5 cm de diámetro) se desinfectaron con 1 mL de etanol al 70 % y se utilizaron para el ensayo de eficacia antibacteriana después de lavar tres veces con agua esterilizada. A continuación, las muestras se dejaron reposar sobre el medio inoculado y después de la incubación a 37 ° C durante 24 h, se observó la zona de inhibición.

2.3. ESTUDIO DE LA MICROESTRUCTURA (SEM Y EDX)

Este estudio se realizó en un microscopio electrónico JEOL JSM-35 CF (Japón), con un detector secundario de electrones. Las películas se montaron sobre tacos de bronce, se recubrieron con una capa de oro usando un metalizador de plasma de argón y se observaron con un aumento de 2880 X. Este equipo está acoplado a un detector de Rayos X que permite determinar zona a zona las variaciones exactas de contenido atómico.

2.4. ENSAYOS DE TRACCIÓN

Se realizaron ensayos de tracción en un equipo de ensayos mecánicos Instron 3369, con una velocidad de 5 mm / min y una celda de carga de 1 kN. Se calcularon la resistencia máxima a la tracción (σ_m), el módulo de Young (E) y el alargamiento a la rotura (ϵ_B), de acuerdo con ASTM D882-91.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1, se muestra las micrografías SEM para la concentración mínima de sulfato de cobre a 0,5 %. Se puede evidenciar la presencia de cristales de sulfato de cobre en la matriz de PHB. Además, mediante la técnica de EDX se confirmó que un alto contenido de cobre en esas regiones.

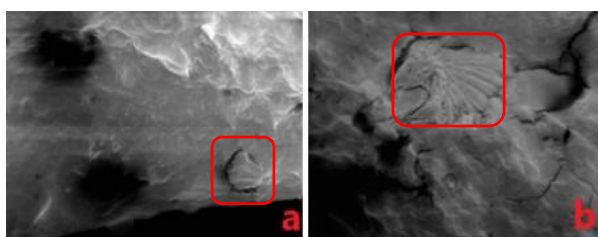


Figura 1. Micrografías de películas, a) PHB-I-0,5Cu, b) PHB-I-0,5Cu_{TBG}.

Las películas sin cobre no presentaron halo de inhibición bacteriana. Se evidenció halo de inhibición de bacterias gram + en todas las películas que contenían cobre. Para el caso de las bacterias gram -, las películas sin plastificante sólo inhibieron el crecimiento a partir de 5 % de sulfato de cobre mientras que las que contenían TBG inhibieron el crecimiento a partir de 2,5 % de sulfato de cobre. Estos resultados se visualizan en la Figura 2.

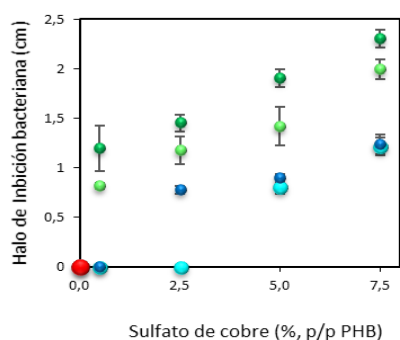


Figura 2. Inhibición bacteriana de gram -: (●) PHB-I-Cu, (●) PHB-I-Cu_{TBG}. Inhibición bacteriana de gram +: (●) PHB-I-Cu, (●) PHB-I-Cu_{TBG}. Inhibición bacteriana de gram + y gram - de (●) PHB-I-0Cu y PHB-I-0Cu_{TBG}.

En la Tabla 2 se muestran los resultados de las propiedades mecánicas. Si bien, la adición del plastificante permitió mejorar la deformación a la ruptura la presencia de sulfato de cobre redujo la ductilidad de las películas debido principalmente al tamaño y la distribución poco homogénea de los cristales de la sal.

Tabla 2 Propiedades mecánicas de películas de PHB.

Tabla	E (MPa)	σ_m (MPa)	ϵ_B (%)
PHB-I-0Cu	53,2 ±6,1	34,0 ±5,1	1,40 ±0,15
PHB-I-0.5Cu	59,7 ±7,0	35,7 ±2,9	1,35 ±0,14
PHB-I-2.5Cu	46,6 ±5,6	25,3 ±3,0	0,92 ±0,16
PHB-I-5.0Cu	37,5 ±4,5	26,4 ±3,4	0,90 ±0,11
PHB-I-7.5Cu	43,3 ±5,2	27,5 ±1,0	0,59 ±0,07
PHB-I-0Cu _{TBG}	16,1 ±2,6	27,8 ±2,3	5,46 ±0,66
PHB-I-0.5Cu _{TBG}	28,1 ±3,8	19,9 ±2,4	1,86 ±0,24
PHB-I-2.5Cu _{TBG}	25,4 ±2,4	11,5 ±1,6	0,80 ±0,16
PHB-I-5.0Cu _{TBG}	26,2 ±1,6	15,0 ±1,6	1,18 ±0,17
PHB-I-7.5Cu _{TBG}	25,8 ±1,6	16,8 ±1,7	1,44 ±0,16

4. CONCLUSIÓN

Se recomienda incluir plastificante en las formulaciones ya que se obtienen materiales dúctiles con inhibición bacteriana a bajas concentraciones de cobre. Los resultados de las propiedades mecánicas demostraron la necesidad de realizar procesos mecánicos previos al procesamiento para disminuir el tamaño de los cristales de sulfato de cobre. De esta manera, sería factible desarrollar películas a base de PHB con buenas propiedades mecánicas y capacidad antimicrobiana que podrían utilizarse para controlar infecciones bacterianas.

5. AGRADECIMIENTOS

A CONICET y FONCYT por financiar nuestras investigaciones.

6. REFERENCIAS

1. Prado, J.V., Vidal, A.R., Durán T. C. *Revista Médica de Chile.* (140), pp. 1325–32, 2021.
2. Grass, G., Rensing, C., Solioz, M. *Applied Environmental Microbiology.* (77), pp. 1541–7, 2011.
3. Vincent, M., Duval, R.E., Hartemann, P., Engels-Deutsch, M., *J Appl Microbiol*, 1–15.2018.