

MATRIZ A PARTIR DE UN HIDROGEL DE ALCOHOL POLIVINÍLICO (PVA) COMBINADA CON SULFADIAZINA DE PLATA CON POTENCIAL APLICACION EN EL MANEJO Y CONTROL DE LA SEPSIS EN HERIDAS DÉRMICAS

Alejandro Arredondo^{1*}, José F. Patiño², Martha E. Londoño¹, Claudia E. Echeverri¹

¹ Laboratorio de Biomateriales, Grupo de investigación en Ingeniería Biomédica (GIBEC), Escuela de Ingeniería de Antioquia, Universidad CES, Medellín, Colombia. Correo electrónico: bmalar@eia.edu.co*

² Facultad de Odontología, Universidad CES, Medellín, Colombia

Recibido: Marzo de 2011; Aceptado: Mayo 2011

RESUMEN

El presente trabajo propone la producción de matrices a partir de hidrogeles de alcohol polivinílico (PVA) cargados con el agente antibacteriano sulfadiazina de plata (AgSD), de uso clínico en el tratamiento de infecciones debidas a quemaduras. Estos hidrogeles se obtuvieron por medio de la técnica de criogenización para obtener hidrogeles físicos. Se verificó la presencia de AgSD por medio de espectroscopia infrarroja (ATR- FTIR) y se realizó un ensayo de desempeño que permitiera determinar el efecto antibacteriano que produce sobre un cultivo de *Staphylococcus aureus*. Los resultados indican que la AgSD se integró a la matriz de PVA pero además fue liberado matando esta colonia bacteriana, por lo que estas matrices poseen gran potencialidad en el control de la sepsis para el tratamiento de quemaduras.

Palabras claves: Alcohol polivinílico, hidrogeles, sulfadiazina de plata, técnica de criogenización, apósitos dérmicos.

ABSTRACT

This work proposes the production of matrices from polyvinyl alcohol hydrogels (PVA) loaded with an antibacterial agent as Silver Sulfadiazine (AgSD) which is long used in treatment of infections caused by skin burns. These hydrogels were obtained by physical method of cryogenization. Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) was used to confirm the remained antibacterial AgSD inside the matrices as well as a biologic assay was done to show the antibacterial effect of AgSD against a *Staphylococcus aureus* strain. These results proved that AgSD remained inside the hydrogel but also was released to the environment to kill the bacterial colony, that is why, these matrices could have a potential in sepsis control in burns.

Key words: Polyvinyl Alcohol, Hydrogels, Silver Sulfadiazine, Cryogenization Method, Wound Dressings.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los hidrogeles son materiales que han despertado gran interés para ser aplicados en la protección de heridas, debido a que poseen buenas propiedades de biocompatibilidad, pueden estar en contacto directo con la herida (*dressings* primarios) y cuando se obtienen en forma de lámina, no necesitan un recubrimiento secundario. Además, crean un ambiente húmedo que es el ambiente ideal para la curación de la herida [1].

Los hidrogeles de alcohol polivinílico obtenidos por la técnica física de congelación/descongelación, también llamados criogeles de PVA (crioPVAGs), son geles macroporosos, heterogéneos, termorreversibles, altamente elásticos [2] y no covalentes que son formados por ciclos repetidos de congelación y descongelación de las soluciones concentradas del polímero de PVA [3], además, son biocompatibles por la naturaleza de su obtención puesto que esta técnica únicamente emplea ciclos repetidos de congelación/descongelación para generar la formación de los enlaces entre las cadenas y, en ningún momento, se adiciona algún entrecruzante

químico al polímero.

Estos geles fueron inicialmente descritos en patentes de *Inoue* a comienzos de los 70's [4] y luego, se reportaron estudios de la formación de especies tipo geles desde el polímero de PVA por ciclos de congelación/descongelación en las investigaciones de *Kukharchik* y *Baramboim* en 1972 [5], así como también de *Peppas* en 1975 [6]. *Peppas* y *Scott* en 1992 realizaron un estudio acerca del PVA como apósito y establecieron que éste tiene excelente transparencia, es suave como membrana y también es biológicamente inerte. Estas propiedades contribuyeron a que los hidrogeles de PVA se perfilaran como buenos candidatos para la protección temporal de la piel y apósito de quemaduras [7].

Son diversos los estudios que relacionan las condiciones de preparación de los hidrogeles de PVA por la técnica de congelación/descongelación con su estructura, morfología y estabilidad sobre largos periodos de tiempo [8, 9].

Los hidrogeles poseen la mayoría de las características deseadas para un recubrimiento ideal [10]. Son adecuados para utilizar sobre una herida seca o necrótica ya que rehidratan el tejido muerto y mejoran el *debridamiento autolítico*. Los recubrimientos de hidrogeles son no reactivos, permeables a metabolitos, no irritantes, no adherentes y refrescan la superficie de la herida, lo cual podría producir como consecuencia una disminución del dolor y alta aceptabilidad para el paciente [11].

La sulfadiazina de plata (AgSD) pertenece a un grupo de químicos muy específicos llamados sulfadrogas. Los sulfofármacos [12] son compuestos químicos sintéticos derivados de las sulfanilamidas y fueron por primera vez sintetizados en 1908 por el químico austriaco *Paul Gelmo*. Desde antes de 1928 hasta la actualidad, estos fármacos se han seguido usando ampliamente y existen en el mercado cerca de 150 derivados de sulfofármacos, cada uno con modificaciones específicas para atacar determinados microorganismos actuando específicamente sobre la membrana celular y la pared celular. Dado su precio asequible ellos son también ampliamente usados hasta hoy, pero como los antibióticos, enfrentan problemas de resistencia por parte de los microorganismos [12].

Los sulfofármacos se degradan más frecuentemente por fotólisis, que es la degradación que provoca la absorción de energía desde la luz [13]. Para prevenir la degradación de la sulfadiazina sensible a la luz, se deben tener en cuenta ciertas condiciones de luz, temperatura y pH.

El objetivo del estudio es obtener una matriz de PVA combinada con AgSD, verificando su eficacia contra una colonia bacteriana y cómo el AgSD interacciona con la matriz.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Se usó alcohol polivinílico de un peso molecular de 89.000 a 98.000 g/mol y grado de hidrólisis del 99% (*Aldrich, USA*), disuelto en agua destilada, para preparar las soluciones que se dejaron en agitación continua, a 80°C de temperatura, durante 3 horas. Se preparó una suspensión de sulfadiazina de plata (98%, grado puro, *Aldrich, EE. UU.*), en glicerina y, luego, se mezclaron el polímero y el medicamento en la cantidad necesaria para que la solución final tuviera un porcentaje del 15% P/V de PVA y 1% P/V de sulfadiazina de plata. Las soluciones obtenidas de apariencia transparente, se sometieron a congelamiento a -20°C y descongelación 20°C. En todos los casos, los hidrogeles fueron sometidos a 4 ciclos de 12 horas de congelación y 1 hora de descongelación. Las muestras se mantuvieron almacenadas en una nevera a 4°C para evitar su desecación.

Se recolectaron los espectros infrarrojos para los hidrogeles de PVA con y sin contenido del medicamento, además del medicamento por separado usando un Espectrómetro Infrarrojo con Transformada de *Fourier* (FTIR) *Spectrum 100*, con accesorio de muestras Universal ATR (Reflectancia Total Atenuada) (*Perkin Elmer, EE.UU.*). Todos los espectros fueron obtenidos desde un promedio de 8 escaneos con 4 cm⁻¹ de resolución en el intervalo de longitud de onda de 4.000 a 650 cm⁻¹. Para esta prueba se secaron algunas láminas en horno a 30°C durante 24 horas hasta alcanzar el estado seco (xerogel).

Para evaluar el desempeño antimicrobiano de los hidrogeles de PVA cargados con el antibiótico sulfadiazina de plata, se usó el método de *Kirby-Bauer*. Se eligieron como controles positivos y negativos, discos de 13 mm de diámetro de hidrogeles de PVA con y sin medicamento, respectivamente. Los discos fueron cortados dentro de una cámara de flujo laminar bajo condiciones de esterilidad para impedir su contaminación, obteniéndose así los *sensidiscos*. Luego, se diluyeron unas colonias de *Staphylococcus aureus* ATCC: 25923 en medio de crecimiento *BHI*, hasta quedar a una concentración equivalente al patrón 0,5 de *Mac Farland*. La inoculación de las placas de agar *Mieller Hinton*, se realizó adicionando un volumen de 0,5 µL de la solución de *Staphylococcus aureus* ATCC: 25923 a la superficie del agar, para ser distribuida con un aplicador estéril en forma homogénea sobre toda su superficie. Una vez inoculadas las placas de agar, se procedió a depositar por duplicado en la superficie, los *sensidiscos* correspondientes a la muestra, control positivo y control negativo. Estas placas se llevaron a una temperatura de incubación de 37°C durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas de incubación, las placas fueron retiradas de la incubadora y se procedió a realizar las mediciones de los halos de inhibición de los controles y las muestras. Luego de la lectura de los halos de inhibición, se procedió a retirar de los agares los *sensidiscos* en una cámara de flujo laminar bajo condiciones de esterilidad. Con los mismos

sensidiscos que fueron retirados se repitió el proceso descrito anteriormente, con el fin de poder determinar el desempeño de la acción antibiótica por seis días consecutivos.

Con el fin de conocer las características morfológicas de las matrices de PVA con AgSD, después de realizar los ensayos microbiológicos, se obtuvieron microfotografías en un microscopio electrónico de barrido SEM (JEOL JSM-6490LV), a un voltaje de aceleración de 10 kV. Todas las muestras se recubrieron con una fina capa de oro, en una cámara en atmósfera de argón al vacío.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Espectros infrarrojos (FTIR). En el espectro FTIR para el hidrogel de PVA sin medicamento, se detectó la banda en 1.142 cm^{-1} que confirma la semicristalinidad del polímero de PVA, la cual se mantiene en estado hidrogel, mostrando que este sistema es capaz de formar algunos dominios dependiendo de algunos parámetros del proceso.

La banda en 3.280 cm^{-1} (correspondiente a los átomos de H vinculados) se observa intensa y bien definida indicando la presencia de agua en la muestra; además, indica la fortaleza de los enlaces de hidrógeno en las cadenas de poliméricas del hidrogel, lo cual es característico de los hidrogeles físicos producidos por la técnica de ciclos repetidos congelación/descongelación. Ambas bandas descritas para 3.280 y 1.142 cm^{-1} son características de los hidrogeles de PVA.

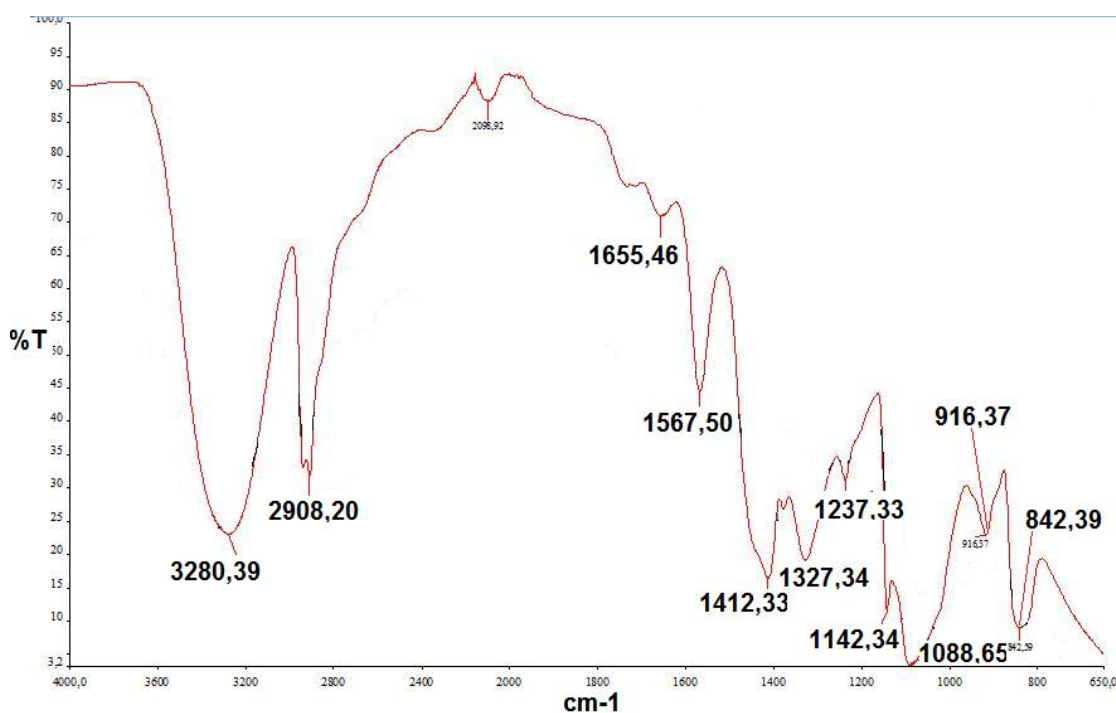


Figura 1. Espectro infrarrojo (FTIR) del hidrogel de PVA 15% 4C.

Se observó la banda en 2.908 cm^{-1} , fuerte, correspondiente a una vibración del grupo C-H.

Hay también confirmación del grupo C-OH de los alcoholes con bandas en 1.237 (débil) y 1.415 cm^{-1} (ancha e intensa) y una vibración de flexión en 1.330 cm^{-1} (intensa) que corresponde nuevamente al enlace de O-H. En 1.088 cm^{-1} se observó una vibración de tensión del grupo C-O (grupo carboxilo), que suele tomar mayor tamaño con el aumento del grado de cristalinidad. En la figura 1 se observa el espectro infrarrojo del PVA y en la Tabla 1, se resumen las bandas de absorción infrarrojas observadas con el respectivo grupo funcional que representan.

Tabla 1. Regiones de absorción para los hidrogeles de PVA.

<i>Región del espectro (cm^{-1})</i>	<i>Grupo funcional</i>
3.400-3.200 (banda en: 3.270-3.280)	-O-H Alcoholes: Banda fuerte y ancha
2.965-2.850 (banda en: 2.908)	C-H Alcano: Fuerte
1.500-1.200 (bandas en: 1.237(débil) y 1.415(intensa y ancha))	C-OH Alcoholes: Flexión en el plano
1.330 (banda en: 1.327)	O-H Vibración de flexión
1.300-1.000 (banda en: 1.088 y 1.142)	C-O Alcoholes

La Figura 2 muestra el espectro FTIR de sulfadiazina de plata pura en polvo. En este espectro los picos a 3.618, 3.522 y 3.437 cm^{-1} son atribuidos a la vibración de tensión del enlace N-H. El pico en 1.552 cm^{-1} es causado por los anillos fenilo y pirimidilo, y el pico en 1.232 cm^{-1} es asignado al γ (SO_2), todo esto de acuerdo con los datos de la literatura [14].

En el espectro FTIR para el hidrogel cargado con el medicamento (Figura 3) se observa un espectro que es claramente la combinación de los espectros del hidrogel solo (Figura 1) y la sulfadiazina de plata pura (Figura 2). Se aprecian las bandas predominantes del espectro del hidrogel y al mismo tiempo algunos picos correspondientes al medicamento que se proyectan entre las otras bandas. En la Figura 3, los círculos rojos encierran los picos que son predominantes de la sulfadiazina y las flechas señalan las bandas para el hidrogel. Se observa claramente la banda ancha e intensa en 3.358 cm^{-1} , la cual corresponde con la banda característica del hidrogel de PVA en 3.280 cm^{-1} . Aunque la banda está desplazada, esto podría deberse al solapamiento con las bandas en esa región para la sulfadiazina. También se observó que la banda en 2.905 cm^{-1} correspondiente al hidrogel de PVA sin medicamento, se conservó casi intacta sin presentar solapamiento.

Otro ejemplo es la banda en 1.016 cm^{-1} que tiene toda la forma de aquella banda característica del PVA en 1088 cm^{-1} , aunque desplazada por el solapamiento con la banda en 1.014 cm^{-1} de la sulfadiazina de plata, que es una banda muy fuerte del medicamento. Los picos en 3.617, 3.522,

1.420, 1.325, 965 y 914 cm^{-1} pertenecientes al espectro normal de la sulfadiazina de plata, también se pueden observar, confirmando la presencia del medicamento en el hidrogel.

Este ensayo demuestra la carga efectiva de la sulfadiazina de plata en el hidrogel de PVA ya que son detectables los principales picos del medicamento en el espectro infrarrojo efectuado para el hidrogel de PVA combinado con el medicamento. Por otro lado, con los resultados del método de difusión en disco, se corroboró nuevamente que la sulfadiazina efectivamente se conservaba en el hidrogel.

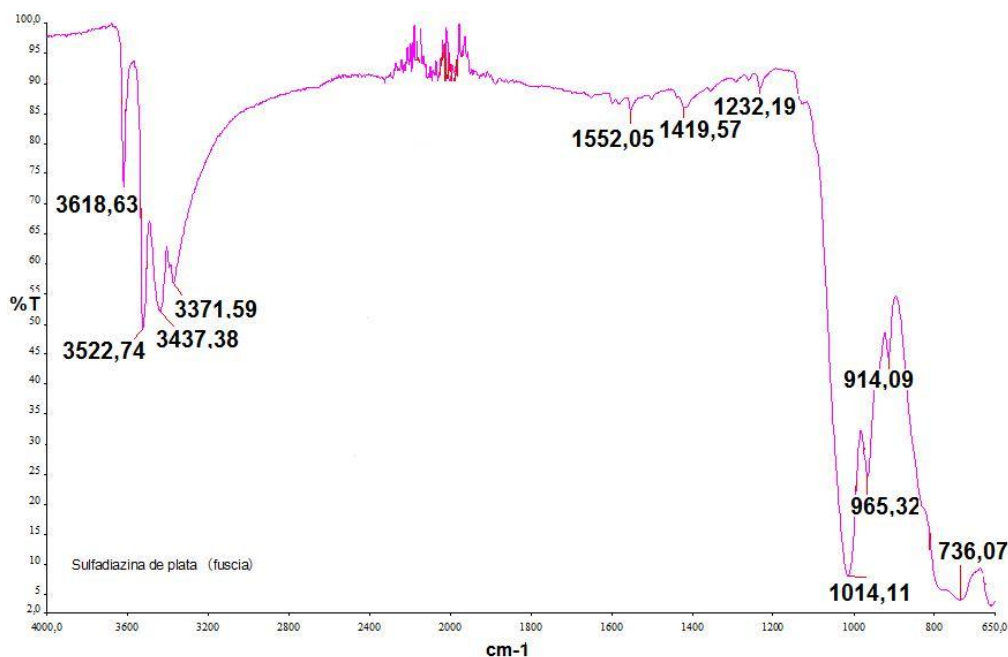


Figura 2. Espectro Infrarrojo (FTIR) de la sulfadiazina de plata (98% Sigma-Aldrich).

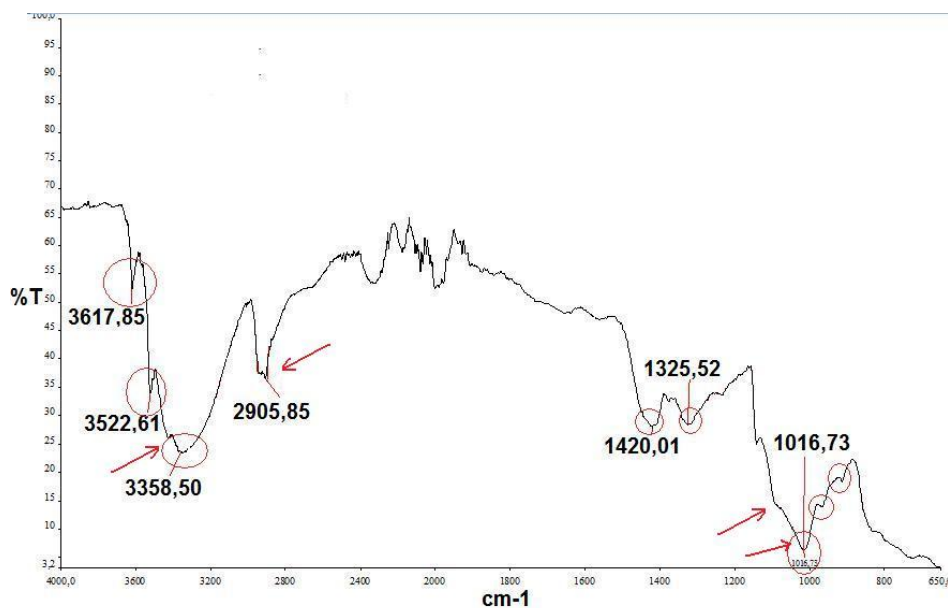


Figura 3. Espectro infrarrojo (FTIR) del hidrogel de PVA 15% 4C combinado con la sulfadiazina de plata al 1%.

3.2. Comportamiento antimicrobiano de las matrices. Durante seis días se tomaron medidas de los halos de inhibición. Transcurridos estos seis días de procedimientos consecutivos fue posible determinar un halo de inhibición constante, comportamiento antimicrobiano y la comprobación de la difusión gradual del antibiótico por parte del hidrogel. El aspecto de los sensidiscos con sus halos de inhibición al sexto día de ensayos se observa en la Figura 4.

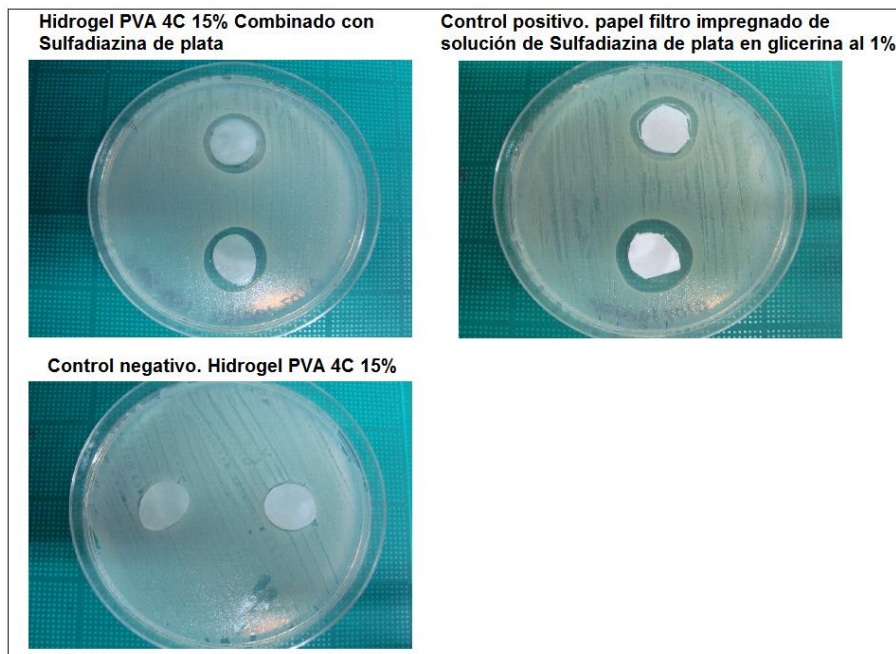


Figura 4. Prueba del comportamiento microbiológico del hidrogel de PVA combinado con sulfadiazina de plata al 1%.

Los promedios de los halos de inhibición de los sensidiscos se presentan en la Tabla 2 que corresponde a cada uno de los intervalos de tiempo de lectura.

Los halos de inhibición observados durante los 6 días consecutivos del ensayo, comprobaron el efecto antibacteriano sostenido del sistema hidrogel-sulfadiazina de plata, contra *Staphylococcus aureus*. Aunque el ensayo terminó al sexto día, es posible que el hidrogel obtenido tenga un efecto durante más tiempo, ya que durante los seis días de la prueba el halo de inhibición, como se puede apreciar, se mantuvo constante lo que hace pensar que la liberación podría ocurrir por más tiempo.

La selección del hidrogel de PVA no cargado (control negativo) no mostró ningún efecto antibacteriano, como se esperaba. En cambio, el control positivo mostró un efecto antibacteriano mayor que el de los hidrogeles, aunque no por mucho. Esto confirma que existe un efecto antibacteriano, aunque se sabe que la cantidad en gramos de medicamento en el sensidisco es mucho menor que la usada en el control positivo.

Tabla 2. Ensayo de efecto antibacteriano *Kirby-Bauer*. Ensayo de efecto antibacteriano *Kirby-Bauer*. Promedio de los halos de inhibición para muestras de PVA cargadas con sulfadiazina de plata sembradas sobre *S. aureus* y replicadas a cultivos frescos cada 24 horas durante seis días consecutivos.

<i>SENSIDISCO</i>	<i>Tiempo de incubación</i>					
	<i>24 horas</i>	<i>48 horas</i>	<i>72 horas</i>	<i>96 horas</i>	<i>120 horas</i>	<i>144 horas</i>
<i>Control Negativo</i>	0,0 mm	0,0 mm	0,0 mm	0,0 mm	0,0 mm	0,0 mm
<i>Control positivo</i>	3,52 mm	3,23 mm	3,22 mm	3,13 mm	3,22 mm	3,13 mm
<i>PVA-sulfadiazina</i>	2,75 mm	2,83 mm	2,91 mm	3,01 mm	2,83 mm	2,96 mm

Estos resultados sugieren que efectivamente las matrices de PVA permiten la difusión de la sulfadiazina de plata al medio circundante y que este proceso ocurre de manera sostenida durante al menos seis días consecutivos. Como se pensó antes de realizar esta prueba, podría haber ocurrido que sólo las bacterias que hacen contacto directo con la matriz fueran inhibidas, pero no sólo no crecieron aquellas en contacto directo sino aquellas más allá del área de la matriz, lo cual indica de que el principio activo que causa la muerte bacteriana (sulfadiazina de plata) se difunde en el medio en lugar de quedarse solamente sobre la superficie del hidrogel. Además, es de anotar, que si el medicamento no difundiera desde la matriz, lo cual no se pudo comprobar con las técnicas de la química analítica, no se mantendría el efecto por mucho tiempo.

3.3. Microfotografías SEM. Luego de hacer varios lavados durante una semana, se obtuvo una imagen por microscopía electrónica de barrido (SEM) de la superficie de la matriz (Figura 5).

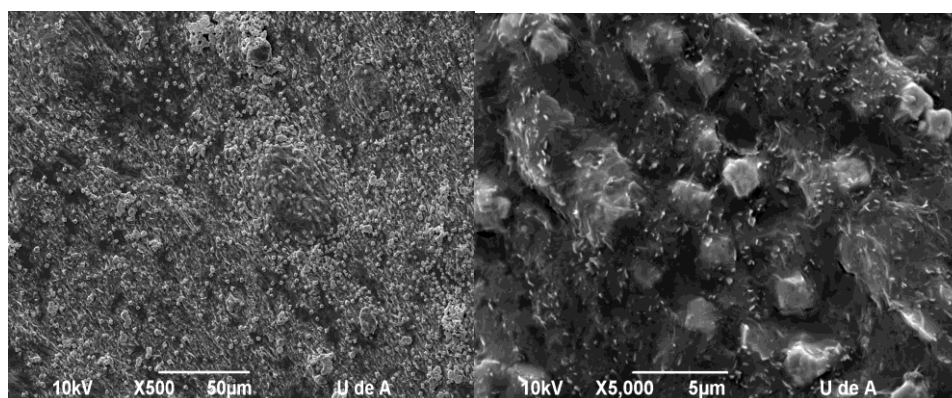


Figura 5. Microscopía electrónica de barrido SEM. Muestras de PVA con AgSD, después de haber sido sometidas a diferentes lavados en agua destilada y expuestas a *Staphylococcus aureus*.

Es importante señalar que las matrices cargadas con el medicamento habían sido obtenidas 15

días atrás en el momento de iniciar este ensayo, sin embargo, se notó la presencia del antibacteriano. Esto podría explicarse debido a que las partículas de AgSD quedan adheridas a la superficie de la matriz como se observa en la Figura 5.

1. CONCLUSIONES

Se obtuvieron hidrogeles de alcohol polivinílico (PVA) por el método físico de congelación/descongelación cargados con el fármaco antibacteriano de uso clínico para el tratamiento de quemaduras, sulfadiazina de plata, a una concentración reportada para producir el efecto inhibitor de amplio espectro. Se comprobó la eficacia del dispositivo contra una colonia bacteriana, al realizar una prueba de desempeño microbiológico que pudo comprobar la eficacia contra *Staphylococcus aureus*, que es una bacteria muy común en infecciones de la piel y que pueden generar infecciones graves en quemaduras.

Se identificó la dificultad de disolver el medicamento además de su alta fotosensibilidad, lo cual implicó que se establecieran otras variables que influyen en la estabilidad del medicamento y que, a su vez, pueden generar errores en las medidas de absorbancia. Sin embargo, mediante espectroscopia infrarroja se pudo determinar la presencia de los principales grupos funcionales que deben estar presentes en el medicamento y el hidrogel de PVA. Igualmente, por SEM se pudo determinar que las partículas de AgSD quedan adheridas a la superficie de la matriz, por lo cual es capaz de mantener su actividad antimicrobiana.

Se comprobó la difusión de la sulfadiazina de plata por medio del método de difusión en disco, que permitió identificar el efecto microbiológico realizado durante seis días consecutivos. Esto indicó que la sulfadiazina de plata salió de la matriz por al menos los seis días que duró el ensayo, pues se observó la formación de halos de inhibición alrededor de las matrices cargadas, lo que para estos casos es indicativo de liberación y por supuesto, del efecto antimicrobiano contra la cepa bacteriana.

Además de confirmar la presencia del medicamento y su efectividad al estar embebido en la matriz, con el protocolo final se pudieron analizar otras características visibles, como lo son la humedad del apósito, que bajo refrigeración a 4°C y protegido de la luz, se mantuvo durante 20 días. Esto se debe a que la naturaleza del entrecruzamiento físico por ciclos repetidos de congelación/descongelación permite que las matrices mantengan agua no ligada a la estructura que puede difundir al exterior y brindar humectación y esa sensación de frescura que es tan beneficiosa para el tratamiento de heridas sobretodo de quemaduras. Pero, además, se les percibió suaves al tacto, se observaron semitransparentes y elásticos, con lo que nunca sufrieron desintegración del material, soportando todos los esfuerzos mecánicos de la manipulación normal en el laboratorio.

Es posible que la inclusión de la glicerina haya mejorado también las propiedades fisicoquímicas del hidrogel, lo cual deberá ser evaluado en estudios futuros de validación del dispositivo.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Winter GD “Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig”, *Nature*, **193**, 293 (1962)
- [2] Lozinsky V, Solodova EV, Zubov A, Simenel A “Study of Cryostructuration of Polymer Systems. The Formation of PVA Cryogels by Freezing-Thawing the Polymer Aqueous Solutions Containing Additives of Some Polyols”, *J. Appl. Polym. Sci.*, **58**, 171 (1995)
- [3] Lozinski VI, Zubov AL, Savina IN, Plieva FM “Study of criostrucuration of polymer systems. XIV. Poly(vinyl alcohol) Cryogels: Apparent Yield of the Freeze-Thaw-Induced Gelation of Concentrate Aqueous Solutions of the Polymer”, *J. App. Polym. Sci.*, **77**, 1822 (2000)
- [4] Inoue T. *US Patent* 3875302, 1972. Inoue T. *Japan Patent* 47-012854, 1972. Inoue T. *Japan Patent* 48-030463, 1973.
- [5] Kukharchik MM, Baramboim NK, *Vysokomolekul soed.*, **14B**, 843 (in Russian), 1972
- [6] Peppas NA, *Makromol. Chem.*, **176**, 3433 (1975)
- [7] Peppas NA, Scott JE “Controlled release from poly(vinyl alcohol) gels prepared by freezing–thawing processes”, *J. Control. Release*, **18**, 95 (1992)
- [8] Hassan CM, Peppas NA, *Polym. Mater. Sci. Eng. Proc.*, **79**, 473 (1998)
- [9] Hassan CM, Trakarnpan P, Peppas NA “Water soluble polymer: solution properties and applications”. *Plenum Press*, New York, pp 31-40, 1998
- [10] Willey T “Use a decision tree to choose wound dressings”, *Am. J. Nurs.*, **43** (1992)
- [11] Morgan DA “Wound management products in the drug tariff”, *Pharm. J.*, **263**, 820 (1999)
- [12] Jessie B, Rachael H, Kelsey P. Sulfadiazine Report Chemistry 128 Laboratory. Disponible en: <http://concordiachemistry128lab.wikispaces.com/file/view/Sulfadiazine+-+Monday+Evening.pdf.2010>.
- [13] Werner JJ, Anne LB, Betsy E, Kristine HW, Elizabeth M, Kristopher Mc, Willian AA “Photochemical Transformation of Antibiotics in Minnesota Waters”. *CURA Reporter*, **5**, 1 (2005)
- [14] Zhengbing C, Xinbo S, Yuyu S, Hao F “Rechargeable Antibacterial and Antifungal Polymeric Silver Sulfadiazines”, *J. Bio. & Comp. Polym.*, **24**, 350 (2009)