

**Polímeros de coordinación de plata(I), cobalto(II) y manganeso(II) con
PVA inmovilizado en quitosano depositado en aluminio y vidrio
erosionado**

Viviana Díaz Canchimbo

**Directora
Yenny Patricia Avila Torres, Ph.D
Directora
Carolina Caicedo Cano, Ph.D**

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas,
Programa de Química
Santiago de Cali, Colombia
2019**

**Polímeros de coordinación de plata(I), cobalto(II) y manganeso(II) con
PVA inmovilizado en quitosano depositado en aluminio y vidrio
erosionado**

Viviana Díaz Canchimbo

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título
de:
Químico**

**Directora:
Yenny Patricia Avila Torres, Ph.D
Directora:
Carolina Caicedo Cano, Ph.D**

**Línea de Investigación:
Química supramolecular
Grupo de Investigación:
QUIBIO**

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas,
Programa de Química
Santiago de Cali, Colombia
2019**

IMPACTOS

Relacione el (los) impacto(s) que presentó el Trabajo de Grado

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico		
Responsabilidad social		
Científico		Los resultados del trabajo se presentarán en el V simposio de Materiales poliméricos (29-30 de Octubre de 2019)
Indicadores de Gestión		Presentación en modalidad de poster en el V Simposio de materiales poliméricos
Tecnológico		
Técnico		
Ambiental		Se exploraron nuevos materiales bactericidas a partir de polímeros biodegradables
Social		
Cultural		

*Incluir los productos obtenidos derivados de la investigación como: apropiación social del conocimiento, generación de nuevo conocimiento entre otros.

POLÍMEROS DE COORDINACIÓN DE PLATA(I), COBALTO(II) Y MANGANESO(II) CON PVA INMOVILIZADO EN QUITOSANO DEPOSITADO EN ALUMINIO Y VIDRIO EROSIONADO

Viviana Díaz-Canchimbo¹, John Vergara², Carolina Caicedo- Cano³, Yenny Avila- Torres^{1*}

1. Grupo QUIBIO, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali, Pampalinda, Cali, Colombia
2. Grupo QCOAMMSB. Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia
3. Grupo GIDEMP, ASTIN- Sena, Salomia, Cali, Colombia

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo el desarrollo de membranas de quitosano (Q) de bajo y mediano peso molecular con alcohol polivinílico embebido, las cuales fueron enriquecidas con los iones metálicos de: cobre(II), cobalto(II), manganeso(II) y plata(I) como nuevos materiales bactericidas. El método usado fue electrohilado, estableciendo condiciones óptimas de depósito (DC 11 cm, VB 0,01 mL/hr, V 16 Kv, T 70 min y 16 % de PVA) sobre dos superficies aluminio y vidrio erosionado. La actividad antibacteriana se llevó a cabo contra *Staphylococcus aureus* y *Eschericia Coli* comparando la actividad en disolución y su correspondiente membrana soportada. El método usado fue Kirby – Bauer modificado sobre discos, implementando como controles positivos amoxicilina a 25000 ppm y las sales metálicas a 50000 ppm de cada uno de los metales de transición. Los resultados preliminares muestran actividad bacteriocida y bacteriostática mediada por la naturaleza del ion metálico, estudios posteriores se plantean en función de comprender el proceso de difusión y el efecto en la estabilidad de los polímeros de coordinación con respecto a la actividad biológica.

Palabras clave: Actividad antimicrobiana, iones metálicos, quitosano, membranas.

COORDINATION POLYMERS OF SILVER (I), COPPER (II), COBALT (II) AND MANGANESE (II) IMMOBILIZED IN PVA WITHIN CHITOSAN DEPOSITED IN ALUMINUM AND EROSIONED GLASS

ABSTRACT

The aim of this research work was the development of low and medium molecular weight chitosan (Q) membranes embedded with polyvinyl alcohol, which were enriched with the metal ions of: copper (II), cobalt (II), manganese (II) and silver (I) as new bactericidal materials. The method used was electrospinning, establishing optimal deposit conditions (DC 11 cm, VB 0.01 mL / hr, V 16 Kv, T 70 min and 16% PVA) on two aluminum surfaces and eroded glass. The antibacterial activity was carried out against *Staphylococcus aureus* and *Eschericia Coli* by comparing the activity in solution and its corresponding supported membrane. The method used was Kirby - Bauer modified discs, implementing as positive controls amoxicillin at 25000 ppm and the metal salts at 50000 ppm by each transition metals. The preliminary results show bactericidal and bacteriostatic activity mediated by the nature of the metal ion, further studies are proposed in order to understand the diffusion process and the effect on the stability of the coordination polymers with respect to biological activity.

Keywords: Antimicrobial activity, metal ions, chitosan, membranes.



1. INTRODUCCIÓN

El quitosano (Q) se ha utilizado como agente antimicrobiano en los siguientes microorganismos: *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Drechtera sorokiana*, *Micronectriella nivallis*, *Piricularia oryzae*, *Rhizoctonia solanii*, *Trichophyton equinum*, algas y algunas bacterias Gram positivas y negativas como: *Escherichia coli* (EC), *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus*. REF La acción antimicrobiana está influenciada por factores intrínsecos como: tipo de quitosano, peso molecular del antimicrobiano, pH del medio de cultivo, condiciones ambientales, composición química y nutritiva del sustrato, grado de despolimerización y presencia o ausencia de sustancias que interfieran como lípidos y proteínas. Se ha demostrado que la actividad inhibitoria del quitosano contra hongos fitopatógenos es más efectiva a pH 6 o menor de pH 7.5; intervalo de pHs en los cuales los grupos aminos se encuentran protonados y con carga parcial positiva. La interacción del grupo amino libre protonado con la pared celular, interfirió con las propiedades de barrera de la pared, provocando pérdida de constituyentes intracelulares y la muerte de la bacteria. Z. Jia en 2011, reportaron en sales de amonio cuaternario de quitosano, tales como: N, N, N-trimetilquitosano, N-N-propil-N, N-dimetilquitosano, N-furfuril-N, N-dimetilquitosano; actividad antibacteriana contra EC relacionada con el peso molecular, grado de desacetilación del quitosano y concentración de ácido acético usado como medio de solubilización. I. M. Helander en 2011 encontró en análisis químicos y electroforéticos de sobrenadantes libres de células en suspensiones celulares tratadas con quitosano, que la interacción del quitosano con EC no implica liberación de lipopolisacáridos (LPS) u otros lípidos de la membrana. Sin embargo, el quitosano hizo que EC fuera más sensible a la acción inhibitoria de los colorantes y ácidos biliares utilizados en medios selectivos. La microscopía electrónica mostró que el quitosano causaba alteraciones extensas en la superficie celular uniéndose a la membrana externa, lo que explica la pérdida de la función de barrera. Esta propiedad mostró que el quitosano, puede ser usado como un antimicrobiano indirecto potencialmente útil para la protección de los alimentos.

Con base en la literatura, el quitosano puede llevar a cabo su actividad bactericida bajo tres mecanismos: El primer mecanismo está relacionado con las atracciones electrostáticas entre las cargas positivas del quitosano y las negativas presentes en la pared celular bacteriana, en ese sentido Q de bajo y mediano peso molecular pueden dañar la membrana de la célula a través de la disrupción e incluso la perforación, causando la fuga de componentes intracelulares y llevando a la lisis bacteriana y consecuentemente a la muerte celular; el segundo mecanismo sugiere que el quitosano de alto peso molecular puede formar una envoltura de polímero que encierra a la célula bacteriana, evitando así el intercambio celular y la absorción de nutrientes, en el caso de EC el mecanismo predominante es el primero, mientras que para SA el segundo mecanismo parece ser el más probable; el tercer mecanismo pone de manifiesto como el Q compleja oligoelementos y metales traza, que son esenciales para el crecimiento bacteriano, lo que lleva a una posterior desestabilización de su homeostasis. Es claro que aún no se ha establecido el mecanismo de acción sobre bacterias gram positivas o negativas, sin embargo, hasta el momento la susceptibilidad a cepas probablemente se deba a diferencias estructurales en la membrana bacteriana, faltan estudios de hidrofobicidad / hidrofiliicidad de la membrana bacteriana, así como sobre la densidad de carga superficial, la patogenicidad en la susceptibilidad o resistencia de ambos tipos de bacterias, (Arkoun, 2017).

Es importante, considerar el tercer mecanismo basado en la formación de enlaces de coordinación entre los metales traza u oligoelementos y el quitosano; como estrategia para desarrollar nuevos materiales bactericidas. Los cationes metálicos pueden ser adsorbidos por quelación por los grupos amina del quitosano en soluciones casi neutras, usando las interacciones electrostáticas o formando enlaces de coordinación con los pares electrónicos libres del grupo acetilo y del nitrógeno. Una vez estabilizados los compuestos de coordinación sobre la matriz de quitosano,



estos pueden llevar a cabo actividad antibacteriana asociada con su misma naturaleza metálica. Ciertos metales de transición activos redox, especialmente el cobre (Cu), pueden participar en la reacción de Fenton dando como resultado la producción de especies reactivas de oxígeno. Los ácidos blandos como Ag^+ , Au^+ , Cu^+ , Cu^{2+} y Zn^{2+} respectivamente, forman enlaces covalentes con tioles o proteínas que contienen grupos de azufre. Esto causa oxidación y posterior agotamiento de reservorios de antioxidantes microbianos. Los aminoácidos como la histidina, la arginina, la lisina y la prolina son susceptibles a oxidaciones basadas en metales que conducen a productos de carbonilo. Ag, Au y Cu atacan a las deshidratasa de hierro-sulfuro- (Fe-S-) y Ag, las cuales tienen una gran afinidad con las membranas poliméricas altamente electronegativas de las bacterias, (Mohandas, 2018). El ion Ag^+ se encuentra generalmente enlazado a grupos tiol o sulfhidrilo. Por lo tanto, una vez que nanopartículas de Ag ingresan a una célula, causan la muerte celular al interactuar con tioles contenidos en enzimas importantes. Por otro lado, siendo Ag un ácido de Pearson débil, tiene la tendencia a reaccionar con los grupos básicos débiles en el material genético, como el fosfato. Esto produce una alteración del ADN / ARN lo que conlleva a un bloqueo en la traducción de proteínas. Por otro lado, los iones de plata entran dentro de la membrana celular bacteriana, causando especies reactivas de oxígeno y síntesis de radicales libres que a su vez causan daño estructural e integral de la célula. (Mamonova, 2015). En el caso de cobalto(II), Huai-min y colaboradores en 2004 sintetizaron polímeros de coordinación entre quitosano y CoCl_2 , indicando que el cobalto actúa en configuración de espín alto y en presencia de $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{H}_2\text{O}$ a $\text{pH}=7.0$ este sistema puede usarse como catalizador en la polimerización de acetato de vinilo. Dado que este tipo de reacción se lleva a cabo vía radicales libres pone de manifiesto la actividad del metal en este tipo de contextos, materia importante para el ataque microbiano. Stenger en 2011 estudió el cloruro de cobalto como generador de especies reactivas de oxígeno, lo que lleva a la muerte celular. En estos estudios reportaron la muerte celular inducida por cobalto en líneas celulares de neuroblastoma. El efecto bactericida se asoció con translocación nuclear del factor inductor de apoptosis, pero también con un proceso autofágico atestiguado por expresión de LC3-II y activación de catepsina-B. Kamiya en 2009, también colocó de manifiesto el efecto que tiene el cobalto(II) como inductor de hipoxia que es asociado con la muerte celular, efecto que es sinérgico con actividad de otros compuestos que atacan por diferentes mecanismos a las bacterias.

Como en este trabajo se exploran nuevos materiales bactericidas a nivel de superficies, la metodología por la cual se obtienen éstas es importante. En este sentido, la técnica de electrohilado permite obtener nanofibras poliméricas con gran área superficial y alta porosidad similar al colágeno; estas características han demostrado favorecer una variedad de aplicaciones, tales como: ingeniería de tejidos, apósitos para heridas, liberación controlada de fármacos y la administración de genes, filtración de agua, inmovilización enzimática, así como los biosensores en el ámbito del diagnóstico (N.R. Sudarshan, 1999). A nivel de películas multicapa de quitosano con nano partículas de plata sobre polietileno, también se ha reportado actividad citotóxica. Sin embargo, hoy en día el método de deposición de nanofibras, por electrohilado, se ha empleado para introducir actividad antibacteriana y biocompatibilidad a la superficie de textiles de polietileno. Las mezclas de polímeros de polietileno (PET) y quitosano se electro-pasan a las esterillas de micro-no tejidos de PET para aplicaciones biomédicas. La actividad antibacteriana de las muestras se ha evaluado contra *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* han mostrando una tasa de inhibición del crecimiento significativamente mayor comparada con el control de la nanofibra de PET. Además, las células de fibroblastos se adhieren mejor a nanofibras de PET / quitosano que a las esteras de nanofibras de PET, lo que sugiere una mejor compatibilidad de tejidos. Dada la relación entre quitosano y otros polímeros para generar materiales compuestos, es importante estudiar la relación de depósito del electrohilado con respecto a la superficie sobre la cual se deposita. Una de las condiciones para usar una superficie de depósito en la técnica de electrohilado, es que ésta presente residuales de carga, razones por las cuales se deposita sobre aluminio.



Dado el contexto anterior, reconociendo la importancia del quitosano como material bactericida y del efecto sinérgico que se puede presentar en sistemas en donde se mezcle este polímero con metales de cobre(II), plata(I), cobalto(II) y manganeso(II), en este artículo se reportan las condiciones óptimas de electrohilado de polímeros de coordinación depositados sobre aluminio y vidrio erosionado con ácido fluorhídrico (HF), con el objeto de analizar el efecto de la superficie colectora. Adicionalmente se pone de manifiesto la necesidad de adicionar alcohol polivinílico a los polímeros de coordinación para mejorar las condiciones de electrohilado y dado que es un polímero sintético, no tóxico, soluble en agua, usado ampliamente en aplicaciones biomédicas, (Zheng, 2001). Finalmente, se reporta la evaluación antibacterial contra SA y EC con el método modificado de Kirby – Bauer sobre discos, comparando la actividad en disolución y en superficie.

2. MATERIALES Y METODOS

Esta sección debe ser lo abarcar los métodos usados por completo, proporcionar suficiente detalle como para permitir que el trabajo sea repetido por otros. Sin embargo, sólo los procedimientos verdaderamente nuevos deben ser descritos con detalle, los procedimientos publicados anteriormente deben ser citados, y mencionar brevemente las modificaciones importantes de procedimientos previos. Los métodos de uso general no necesitan ser descritos en detalle. Capitalizar nombres comerciales e incluir el nombre y la dirección de fabricantes. Se deben utilizar subtítulos. Debe escribirse un párrafo para detallar los análisis de los datos. **Reactivos y equipos:** $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, CH_3COOH , $\text{CoCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, MnCO_3 , AgCl, Quitosano BPM, Quitosano MPM, PVA 98-98% bajo peso molecular, marca aldrich. Disolventes: metanol, agua destilada, agar Mueller-Hinton, Infusión-Cerebro-Corazón (BHI).

Preparación de soluciones y condiciones de electrohilado: Las soluciones de PVA con respecto a QBPM y QMPM se prepararon al 8%, 16%, 80% y 90% p/v con agua destilada, 60°C mediante agitación constante y 2% en ácido acético. Dado que el quitosano electrohila deficientemente, fue necesario adicionar PVA, lo cual no solo mejora la estructura de las nanofibras, sino que puede incrementar las propiedades biológicas ya que *per se* presenta propiedades antibacterianas. Las variables establecidas para el proceso de electrohilado en cada solución previamente preparada fueron: distancia al colector, velocidad de bombeo, voltaje variable y tiempo, **tabla 1**. Posteriormente a la solución correspondiente al mejor electrohilado (16% de PVA) tanto para QMPM como para QBPM, fue adicionada una solución preparada de los respectivos haluros metálicos en solución acuosa, con una concentración final en el sistema de 2 %, manteniendo el pH a 3.5 asistido por agitación en un tiempo final de 30 min. Después de homogenización de las soluciones, se procedió a caracterizar las soluciones por técnicas espectroscópicas, así como a su electrohilado en las condiciones mencionadas en la **tabla 2**.

Tabla 1. Condiciones de electrohilado en soluciones de quitosano y PVA

Condiciones	Variables
Quitosano	QBPM, QMPM
Distancia del colector (cm)	21, 18, 21, 16 y 15
Velocidad del bombeo (mL/h)	0.07 -0.01 mL/hr
Voltaje variable (Kv)	20, 17, 15 y 14
Tiempo (min)	30, 45, 60, 70 min
% PVA	8, 16, 80 y 90



Tabla 2. Condiciones de electrohilado en soluciones de quitosano – PVA y haluros metálicos

Condiciones	Variables
Quitosano	QBPM, QMPM
Distancia del colector	11 cm
Velocidad del bombeo	0.07 -0.01 mL/hr
Voltaje variable	10, 12, 14, 16, 18 Kv
Tiempo	30, 45, 60, 70 min
% PVA	16%
Ion Metálico 2%	Cu(II), Co(II), Mn(II), Ag(I)

Instrumentación del equipo de electrohilado: Las soluciones preparadas fueron suministradas a temperatura ambiente en una jeringa de diámetro 12.45 mm, con aguja (capilar metálico) de diámetro interno 0,7 mm. La velocidad de flujo programada en la bomba de inyección (Syringe Pump, NE-1600) fue de 0,2 mL/ y 0,120 ml/h. Se utilizó una placa de aluminio estática para recolectar las nanofibras electrohiladas y vidrio erosionado con HF a diferentes distancias, como fue mencionado en la tabla 1 y 2.

Equipos usados en la caracterización física y espectroscópica de las disoluciones: UV-Vis, IR, viscosímetro, conductímetro.

Equipos usados en la caracterización física y espectroscópica de las nanofibras obtenidas: UV-Vis, IR. El Goniómetro Ramé-hart con sistema óptico fue usado para determinar el ángulo de contacto y la morfología de las nanofibras y microfibras usando MEB, con la ayuda del software *Image J6* para determinar el diámetro promedio de las fibras.

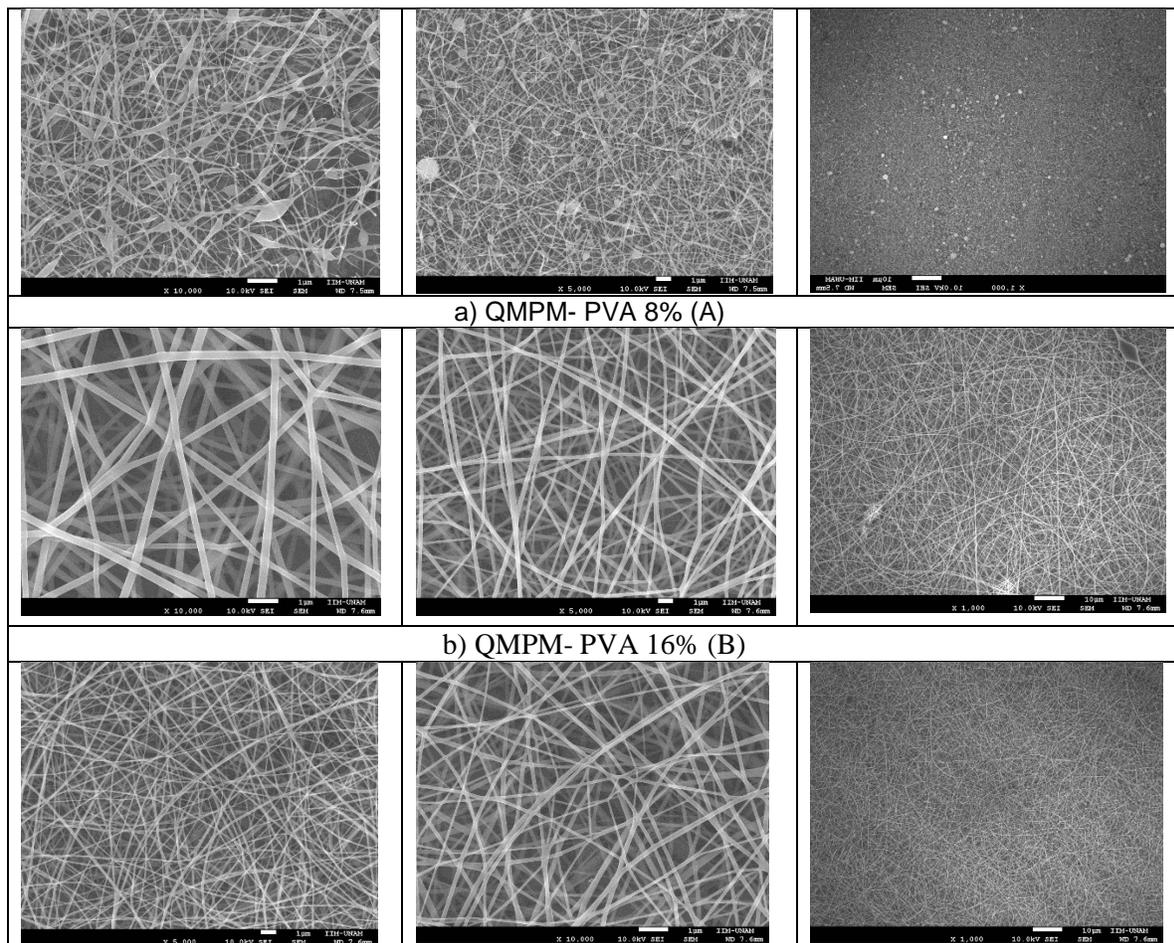
Método de evaluación microbiológica: La preparación del inculo se realizó tomando de 3 a 5 colonias aisladas del microorganismo, las cuales se transfirieron a un tubo con 4 a 5 mL del medio infusión cerebro corazón (BHI) incubando durante un tiempo de 24 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, 1 mL del inculo se transfirió a 4 mL de caldo y se midió la absorbancia a 540 nm, dependiendo de este resultado y del tiempo de generación característico de la bacteria, se calculó el tiempo de incubación para obtener una turbidez de 0,100 de absorbancia óptimamente comparable a un estándar de 0,5 McFarland; de forma que las bacterias se encontraban en fase exponencial al momento de realizar el ensayo. Posteriormente se realizó la siembra por profundidad, sobre el agar Mueller- Hinton, depositando discos de los nuevos materiales sintetizados. La siembra se realizó por triplicado en cada experimento programado, con un periodo de incubación de 24 h a a 37 °C. Los blancos utilizados fueron los antibióticos: ampicilina sódica y amoxicilina a concentraciones de 1000, 500, 250, 125 y 62,5 ppm, y un blanco de una solución de DMSO al 5%. En el caso de las películas depositadas sobre aluminio se cortaron los discos sobre este sustrato y en el caso de vidrio erosionado se desprendió la película del sustrato ya que la adherencia fue menor. En la estimación microbiológica en suspensión, las soluciones se colocaron sobre discos de papel comparándolas con los otros dos sustratos aluminio y vidrio erosionado.



PVA en QMPM	80	3310								
	90	3290								
	8									
	16									
	80									
	90									

Nanofibras a partir de QMPW con PVA

La adición de alcohol polivinílico a la matriz de quitosano mejora la calidad del electrohilado. En la **figura 1**, se muestran las imágenes de microscopía electrónica para las diferentes soluciones conformadas por 8%, 16%, 80 y 90% de PVA de forma independiente. Se observa el entrecruzamiento entre el polímero y la fibra; lo cual mejora en función del incremento de PVA. Sin embargo, en la **tabla 5**, se reporta la distribución del tamaño; para la concentración alrededor del 16% la distribución es uniforme (0.113- 0.237 μm), razón por la cual fue la concentración seleccionada a electrohilar.



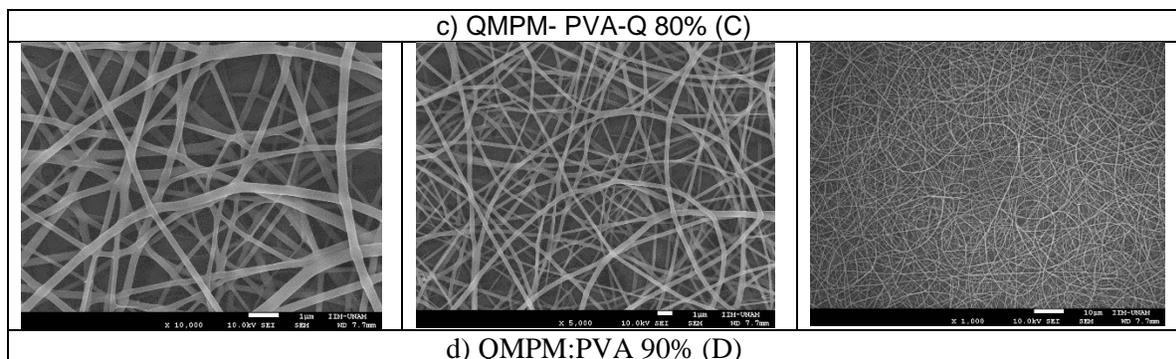
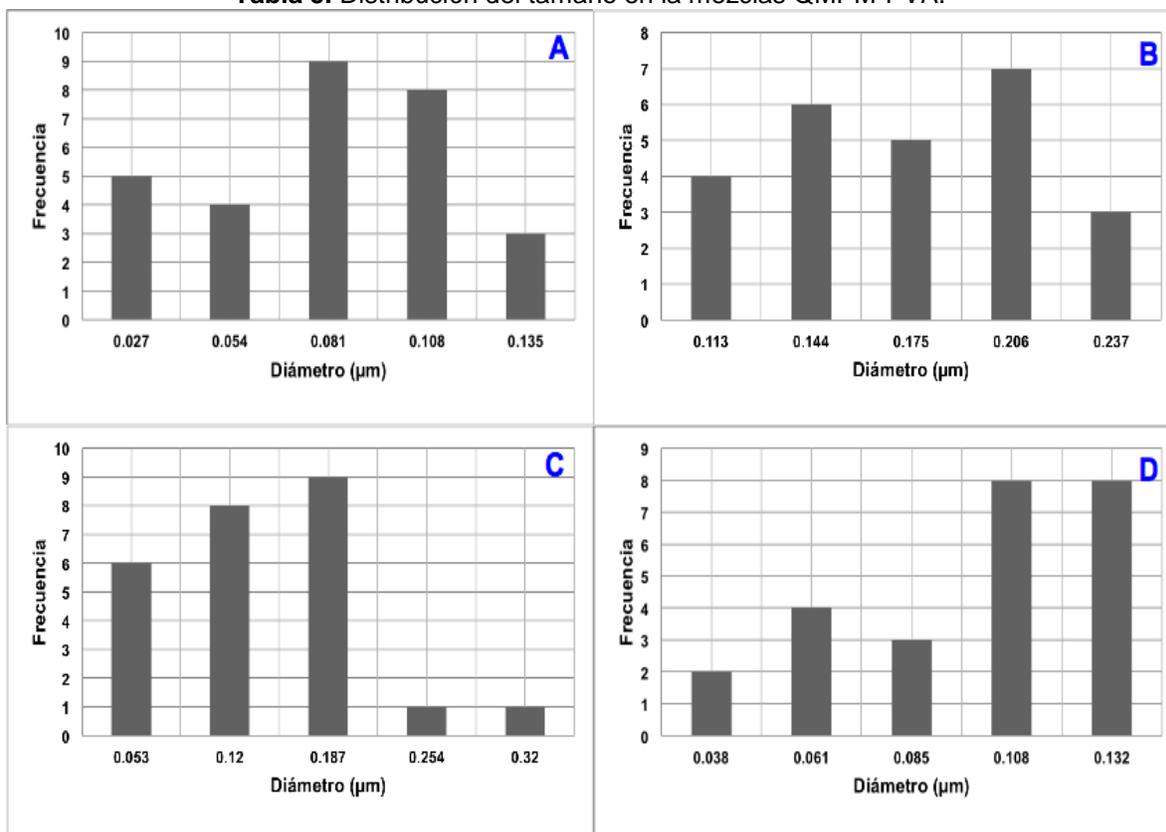


Figura 1. Micrografías de QMPM:PVA a diferentes concentraciones a) 8%, b) 16%, c) 80% y d) 90%

Tabla 5. Distribución del tamaño en la mezclas QMPM-PVA.



En la estabilización de las nanofibras es conveniente determinar la interacción del agua (6 μL) con la superficie de las membranas, dado que las aplicaciones se encontrarán en función del solvente y de la estabilidad en medio acuoso. En este sentido, en la medición del ángulo de contacto se utilizó un Goniómetro Ramé-hart con sistema óptico para QMPM-PVA a diferentes



concentraciones, tabla 6; luego se capturó la imagen del video a tiempo inicial t_0 (1 sg) y final t_f (30 sg), con el software *Image J6*, figura 2. El ángulo de contacto muestra la relación que existe entre las fuerzas adhesivas entre el líquido y el sólido y las fuerzas cohesivas del líquido. La mayor interacción con el agua fue de QMPM-PVA al 16%, lo cual es congruente con respecto a las características del quitosano solubilizado en medio de ácido acético con incremento de la interacción por efecto de zonas hidrofílicas del PVA.

Tabla 6. Ángulo de contacto para diferentes concentraciones QMPM- PVA

MUESTRA	ANGULO DE CONTACTO (°)
Q- PVA 16 %	t_0 : 49.8; t_f : 45.5
Q- PVA 90 %	t_0 : 55.1; t_f : 54.3
Q- PVA 80 %	t_0 : 67.7; t_f : 67.2

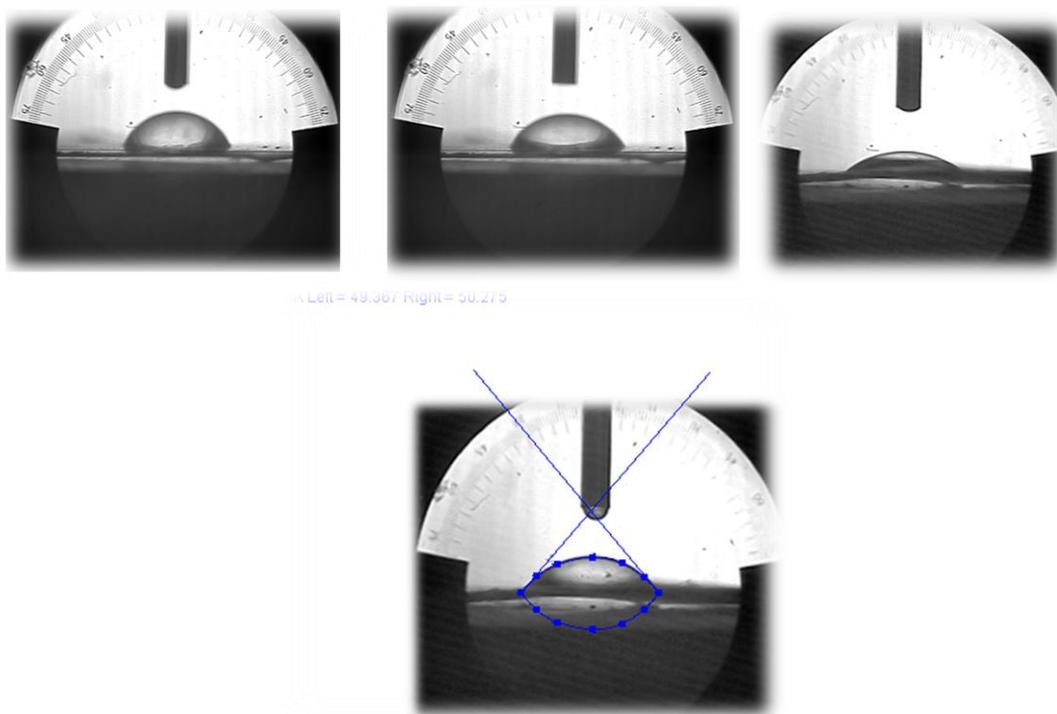


Figura 2. Imágenes del ángulo de contacto para diferentes concentraciones de QMPM:PVA; a).16%, b) 80%, c) 90% y especificación de la estimación del ángulo de contacto

Con base en la caracterización anterior, se eligió como solución de electrohilado la concentración de QMPM: PVA al 16%. Las condiciones a ajustar fueron las siguientes: distancia al colector, velocidad de bombeo, voltaje y tiempo de colección, como se menciona en la **tabla 1**. Las mejores condiciones de electrohilado fueron las siguientes: DC 11 cm, VB 0,01 mL/hr, V 14 Kv, T 70 min y 16 % de PVA. En condiciones diferentes se obtuvo goteo sobre el colector, como se muestra en la **figura 3**.

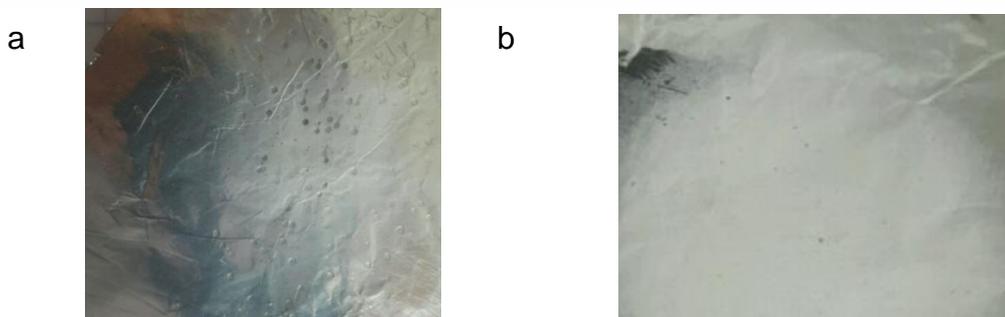


Figura 3. a). Goteo sobre la placa colectora de aluminio para condiciones diferentes de: DC 11 cm, VB 0,01 mL/hr, V 14 Kv, T 70 min, b) Nanofibras electrohiladas en las mejores condiciones

Las nanofibras hiladas pueden ser usadas en superficies antibacterianas. Sin embargo, es importante discriminar la actividad de la placa colectora de aluminio con respecto a la nanofibra. En Aluminio la adherencia es alta, lo cual dificulta el desprendimiento. Por esta razón, se usó vidrio erosionado con HF como mecanismo para disminuir la adherencia y realizar un posterior análisis microbiológico en función únicamente de la nanofibra. El vidrio usado tipo corne se erosionó a diferentes tiempos desde T= 1 min hasta T= 35 min, **figura 4.**

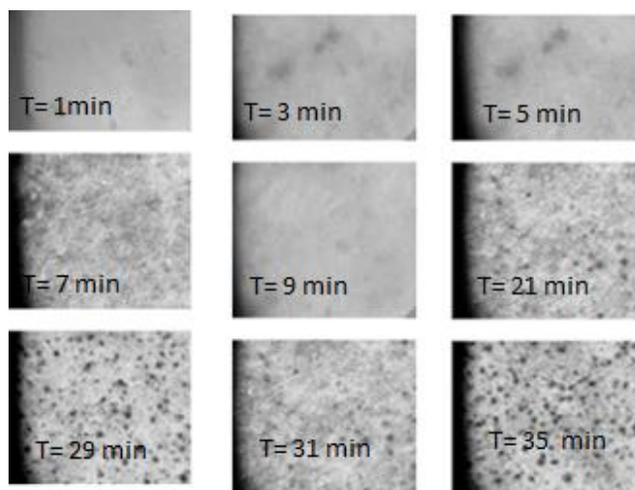


Figura 4. Superficies de vidrio erosionadas con HF al 10%.

Se eligió el tiempo de erosión correspondiente a 21 min, ya que al depositar la solución QMPM:PVA al 16% en las mejores condiciones de electrohilado para tiempos diferentes de erosión, el tiempo de colección fue superior a 70 min.

Caracterización de las soluciones QMPM- PVA con haluros metálicos

Las soluciones con los haluros metálicos fueron sintetizadas con se mencionó en la sección experimental con QMPM. Posteriormente se llevó a cabo la caracterización espectroscópica en disolución en la región del UV-Vis, **figura 5a.** Se observa un efecto electrónico significativo en las transiciones electrónicas asignadas a $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$ (entre 250- 300 nm) del quitosano, con



respecto a los compuestos obtenidos, lo cual sugiere una interacción o formación de enlaces entre la matriz polimérica y los centros metálicos. Para el caso de manganeso el efecto es significativo ya que en configuración de espín alto y estado de oxidación $^{2+}$, no hay transiciones electrónicas significativas en la región del visible, pero sí una fuerte transferencia de carga Metal- ligante y ligante-Metal. Es el mismo efecto con el ion Ag^{1+} , el cual no presenta transiciones electrónicas en el visible, pero sí un efecto de transferencia en la región del UV. Por otro lado, como las soluciones de haluros metálicos presentan contraiones como cloruros fácilmente desplazados por grupos coordinantes como $-OH$ y $-NH_2$ presentes en el quitosano, en la **figura 5b**, no se observa en la región del visible las transiciones electrónicas esperadas para una configuración $d9$, $d7$ para el cu^{2+} y Co^{2+} , lo cual sugiere que no hay coordinación o poco efecto electrónico del metal con respecto a la matriz polimérica.

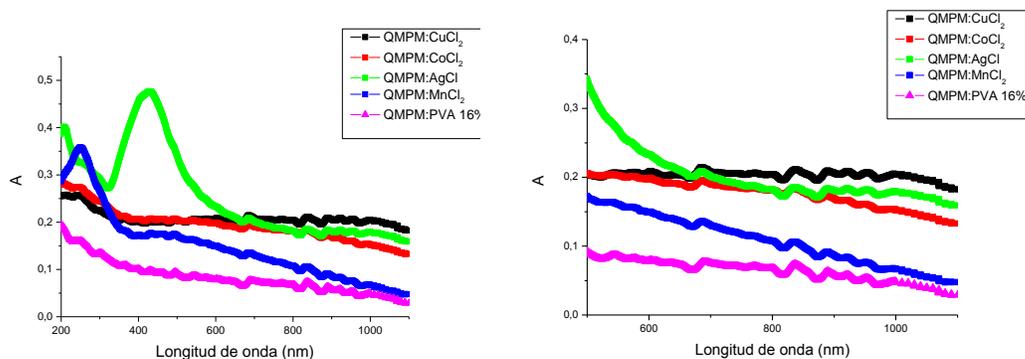


Figura 5. a). Espectro electrónico de las soluciones de QMPM:PVA y haluros metálicos en la región UV- Vis; b). Espectro electrónico de las soluciones de QMPM:PVA y haluros metálicos en la región visible

En el espectro IR dada la interacción de grupos que promueven enlaces de hidrógeno en el quitosano y en el PVA, no fue concluyente el desplazamiento de las bandas características en función de la coordinación.

En ese sentido, se electrohilaron todas las soluciones previamente sintetizadas en dos sustratos vidrio y aluminio, bajo los diferentes parámetros que se muestran en la **tabla 2**. Para cada caso, se reportan en la **tabla 7** las mejores condiciones establecidas de electrohilado para aluminio, que no presentaron burbujas en la placa colectora. En caso de vidrio, la única solución que hasta el momento se ha nanohilado ha sido la de $CuCl_2$.



Tabla 7. Parámetros adecuadas para las nanofibras hiladas de QMPM-PVA al 16%.

Muestra	Concentración (ppm)		CONDICIONES DE HILADO		
Sólida	Q-PVA	Q	84%	Velocidad de Bombeo	0,120 ml/h
				Distancia Colector	11 cm
		Voltaje variable	19,5Kv		
		PVA	16%	Tiempo	40 min
	Humedad			50%	
	Temperatura			25,7 °C	
	pH			5	
	Q-PVA-CuCl ₂	Q	84%	Velocidad de Bombeo	0,120ml/h
				Distancia Colector	11 cm
		PVA	16%	Voltaje variable	19,4Kv
				Tiempo	40 min
		CuCl ₂	2%	Humedad	54%
				Temperatura	24,8° C
	Q-PVA-CoCl ₂	Q	84%	Velocidad de Bombeo	0,120 ml/h
				Distancia Colector	11 cm
		PVA	16%	Voltaje variable	18,4 Kv
Tiempo				40 min	
CuCl ₂		2%	Humedad	52%	
			Temperatura	25,5°C	
Q-PVA-MnCl ₂		Q	84%	Velocidad de Bombeo	0,120 ml/h
				Distancia Colector	11 cm
		PVA	16%	Voltaje variable	18,3 KV
				Tiempo	40 min



		MnCO₃	2%	Humedad	52%
				Temperatura	26,3°C
				pH	5
	Q- PVA- AgCl	Q	84%	Velocidad de Bombeo	0,120 ml/h
				Distancia Colector	11 cm
				Voltaje variable	18,3 KV
		PVA	16%	Tiempo	40 min
				Humedad	51%
		AgCl	2%	Temperatura	26,3°C
				pH	4

Para continuar con el proceo de caracterización a estas nanofibras sobre aluminio y vidrio para el caso de CuCl₂ se les llevó a cabo caracterización por espectroscopia IR, **figura 6**.

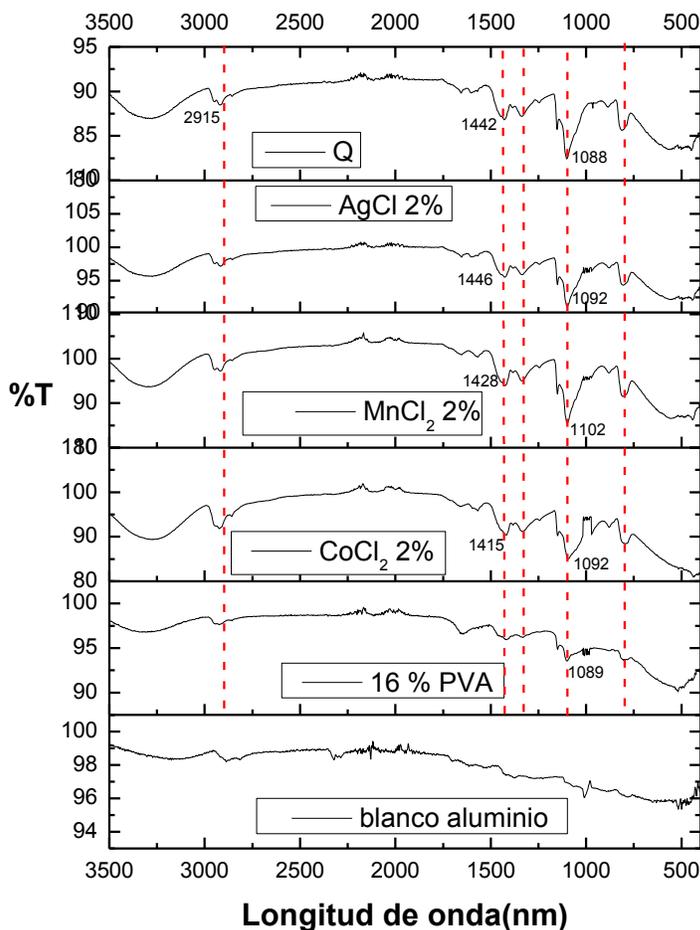


Figura 6. Espectros IR para las nanofibras obtenidas de QMPM- PVA al 16% y haluros metálicos al 2%.

Las vibraciones características del quitosano $-OH$ y $-NH_2$ se deben afectar al formar compuestos de coordinación con el ion metálico. Se observa en los espectros que la vibración $C-O$ se desplaza a mayor energía para manganeso(II) y plata(I). En caso de cobalto(II) no hay un desplazamiento significativo lo cual no sugiere coordinación y en caso de cobre(II) no hay coordinación al centro metálico ya que la vibración no se desplazó. El blanco aluminio no representa una influencia significativa con respecto a la deposición de estos sistemas sobre este. Este mismo comportamiento se puede apreciar con el espectro electrónico de la figura 10, en donde el aluminio presenta un espectro de absorción inferior al blanco de ZnO convencionalmente usado en estado sólido. Esto es importante ya que permite establecer las transiciones electrónicas con respecto a configuraciones diferentes a d^{10} . Para Ag^{1+} y Mn^{2+} es mayor la transferencia de carga como se observó en disolución. Sin embargo, en estado sólido es evidente el efecto electrónico de cobalto sobre quitosano a 230 nm, **figura 7**.

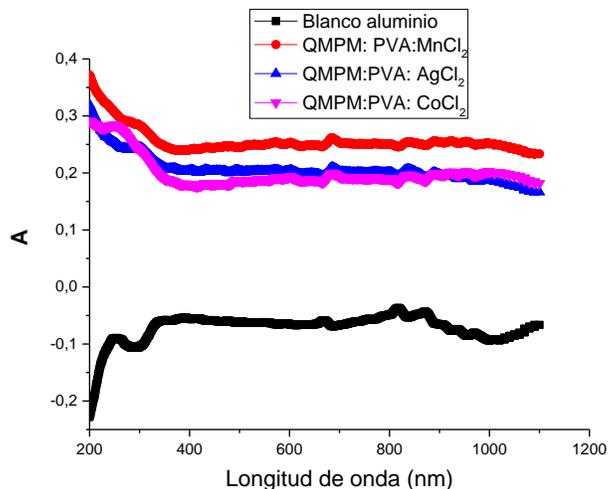


Figura 7. Espectro electrónico UV-Vis en estado sólido de QMPM:PVA y haluros metálicos.

Evaluación microbiológica

Las nanofibras obtenidas con QMPM- PVA al 16% con haluros fueron evaluadas contra SA con base en la metodología expuesta anteriormente. Así mismo se comparó la actividad biológica con las soluciones de partida, así como las sales metálicas. En la tabla 8, se puede observar que en estado sólido el mejor comportamiento fue para la nanofibra correspondiente a $MnCl_2$, con un efecto bactericida con respecto al control. En relación al quitosano y PVA no se presentó actividad bactericida sino bacteriostática. Por otro lado, plata y cobalto se encuentran ~ 50% de efecto bactericida. En la tabla 9, se observa el comportamiento análogo en solución observando mayor actividad bacteriostática para AgCl tanto para la sal metálica como para la solución con quitosano y PVA. Cabe resaltar que el QMPM y PVA no mejoran las propiedades biológicas con respecto a la sal de plata(I). Por otro lado, el efecto del ion metálico de manganeso(II) es menor en solución que en nanomembrana. En ambos casos solución y estado sólido el aporte de sistemas asociados con cobre no representaron actividad. Esto es congruente con los efectos electrónicos observados en espectroscopia electrónica en relación a transferencia de carga M-L y L-M para manganeso y plata y menos apreciable para cobre y cobalto.



Tabla 8. Evaluación microbiológica contra SA para las membranas nanohiladas de QMPM-PVA 16% y haluros metálicos

Muestra		Bactericida	Bacteriostático	% Inhibición (halo de inhibición muestra/ halo de inhibición antibiótico *100)
Sólida	PVA	-----	-----	-----
	Q-PVA	-----	-----	-----
	Q-PVA-CuCl ₂	-----	-----	-----
	Q-PVA- CoCl ₂	Activo	-----	44.4
	Q-PVA-MnCl ₂	Activo	-----	84.5
	Q-PVA-AgCl	Activo	-----	59.8

Tabla 9. Evaluación microbiológica contra SA para las soluciones de QMPM-PVA 16% y haluros metálicos con respecto a las sales metálicas de partida

Muestra		Bactericida	Bacteriostático	% de Inhibición (halo de inhibición muestra/ halo de inhibición del antibiotico)
Líquida	PVA	-----	Activo	64
	Q- PVA	-----	Activo	64
	Q-PVA- CuCl ₂	-----	-----	-----
	Q-PVA- CoCl ₂	-----	Activo	51.1
	Q-PVA MnCl ₂	-----	Activo	22.2
	Q- PVA- AgCl	Activo	-----	66.7
	CuCl ₂	-----	Activo	33.4
	CoCl ₂	-----	Activo	33.4
	MnCO ₃	-----	Activo	55.6
	AgCl	-----	Activo	84.5



4. CONCLUSIONES

Se han obtenido nanomembranas a partir de la metodología de electrohilado sobre dos sustratos aluminio y vidrio erosionado. Con Aluminio se han encontrado las mejores condiciones de depósito pero para vidrio erosionado aún se estabilizan los parámetros, ya que solo fue posible obtener nanomembranas fácilmente desprendibles con poca adherencia para cobre. Los estudios de caracterización espectroscópica muestran coordinación de los grupos C-OH del quitosano al centro metálico de plata(I) y manganeso(II), en caso de cobre y cobalto los resultados no son concluyentes. Esto es verificado con espectroscopia IR en donde las vibraciones características de la matriz de quitosano se afectan por presencia del metal desplazando a mayor energía las vibraciones C-O. El pH al cual se realizaron las soluciones oscila entre 4 y 6, siendo más efectivo a pHs bajos, lo cual puede estar relacionado con la condición de acidez para favorecer la solubilidad en agua del quitosano por adición de ácido acético. El efecto del ácido acético como complejante del centro metálico no ha sido evaluado, se considerará en estudios posteriores. Finalmente el efecto bactericida y bacteriostático ha sido evaluado mostrando actividad significativa para manganeso y plata, sin embargo, existen procesos de difusión en el agar que aún no han sido considerados y deben estudiarse posteriormente para comprender el mecanismo biocida de acción.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se desarrolló gracias al apoyo de los grupos de investigación QCOAMMSB (UTP), QUIBIO (USC) y el Centro- Astin, SENA grupo GIDEMP.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Ramakrishna S, Fujihara K, Teo WE, Lim TC, Ma Z “An Introduction to Electrospinning and Nanofibers”, National University of Singapore, (2005)
- [2]. Gopal R, Kaur S, Ma Z, Chan C, Ramakrishna S, Matsuura T “Electrospun Nanofibrous Filtration Membrane,” J. Membr. Sci, 2006, 281, 581
- [3]. Yun KM, Hogan CJ, Matsubayashi Y, Kawabe M, Iskandar F, Okuyama K “Nanoparticle Filtration by Electrospun Polymer Fibers,” Chem. Eng. Sci, 2007, 62, 4751.
- [4]. Kang H, Zhu Y, Jing Y, Yang X, Li C “Fabrication and Electrochemical Property of Ag–Doped SiO₂ Nanostructured Ribbons,” Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, 2010, 356, 120
- [5]. E. Hadipour-Goudarzi, M. Montazer, M. Latifi, A. A. Ghare-Aghaji. Electrospinning of chitosan/sericin/PVA nanofibers incorporated with in situ synthesis of nano silver. Carbohydrate Polymers, 2014, 113, 231.
- [6]. Gómez, A. G. G., Ramos, R. R., & Salazar, H. T. C. Aprovechamiento de las escamas de la industria acuícola en el departamento del Huila, Colombia. Producción más Limpia, 2017, 11, 2.



- [7] Gooday, G. W. The ecology of chitin degradation. In *Advances in microbial ecology*. Springer, Boston, MA, 1990, 387- 430.
- [8] Castañeda Ramírez, C., Fuente Salcido, N. M., Pacheco Cano, R. D., Ortiz-Rodríguez, T., & Barboza Corona, J. E. Potencial de los quito-oligosacáridos generados de quitina y quitosina. *Acta Universitaria*, 2011, 21, 3-8.
- [9] Jayakumar, R., Prabakaran, M., Kumar, P. S., Nair, S. V., & Tamura, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology advances*. 2011, 29, 322-337.
- [10] He, X., Li, K., Xing, R., Liu, S., Hu, L., & Li, P. The production of fully deacetylated chitosan by compression method. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 2016, 42, 75-81.
- [11] Pires, C. T., Vilela, J. A., & Airoidi, C. The effect of chitin alkaline deacetylation at different condition on particle properties. *Procedia Chemistry*. 2014, 9, 220-225.
- [12] Kasaai, M. R. Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review. *Carbohydrate polymers*. 2010. 79(4), 801-810.
- [13] Wardani, G., & Sudjarwo, S. A. In vitro antibacterial activity of chitosan nanoparticles against *Mycobacterium tuberculosis*. *Pharmacognosy Journal*. 2018. 10, 1.
- [14] Cabezas Medina, M. S. *Actividad antimicrobiana de recubrimientos de Quitosano y ϵ -polisina en moras inoculadas con *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Botrytis cinerea** (Bachelor's thesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería Bioquímica), 2017.
- [15] Goy, R. C., Morais, S. T., & Assis, O. B. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2016, 26, 122-127.
- [16] Rahangdale, D., & Kumar, A. Derivatized chitosan: fundamentals to applications. In *Biopolymer grafting*. 2018, 251-284.
- [17] He, G., Ke, W., Chen, X., Kong, Y., Zheng, H., Yin, Y., & Cai, W. Preparation and properties of quaternary ammonium chitosan-g-poly (acrylic acid-co-acrylamide) superabsorbent hydrogels. *Reactive and Functional Polymers*. 2017, 111, 14-21.
- [18] Wong, CY, Wong, WY, Loh, KS, Daud, WRW, Lim, KL, Loh, KS, Khalid, M. Estudio comparativo sobre la absorción de agua y las propiedades de transporte iónico de la membrana de intercambio de polímeros de quitosán / PVA pre y post sulfonados. En la *serie de conferencias IOP: Ciencia e Ingeniería de Materiales*. 2018, 458.
- [14] Rios-Donato, N., Carrión, L. E., Mayorga, J. R., Verduzco-Navarro, I. P., Katime, I., & Mendizábal, E. Removal of Cd (II) from aqueous solutions by batch and continuous process using chitosan sulfate dispersed in a calcium alginate hydrogel. *Afinidad*. 2018. 75, 582.



- [15] Kasiri, MB. Aplicación de derivados de quitosano como adsorbentes prometedores para el tratamiento de aguas residuales textiles. En *El impacto y las perspectivas de la química verde para la tecnología textil* (pp. 417-469), 2019, 417- 469.
- [17] Maldonado-Lara, K., Luna-Bárceñas, G., Luna-Hernández, E., Padilla-Vaca, F., Hernández-Sánchez, E., Betancourt-Galindo, R., & España-Sánchez, B. L. Preparación y Caracterización de Nanocompositos Quitosano-Cobre con Actividad Antibacteriana para aplicaciones en Ingeniería de Tejidos. *Revista mexicana de ingeniería biomédica*. 2017, 38(1), 306-313.
- [18] Qin, Y., Liu, Y., Yuan, L., Yong, H., & Liu, J. Preparation and characterization of antioxidant, antimicrobial and pH-sensitive films based on chitosan, silver nanoparticles and purple corn extract. *Food Hydrocolloids*. 2019.
- [19] Abolfazli, S., Navarchian, A. H., & Jazi, O. M. Effects of Poly (vinyl alcohol)/Chitosan Ratio and Glutaraldehyde Crosslinker Concentration on the Physical and Mechanical Properties of PVA/Cs Electrospun Fiber. *Chemical Engineering Letters: Modeling, Simulation and Control*. 2018, 3(1), 7-11.
- [20] Lozano-Navarro, J., Díaz-Zavala, N., Velasco-Santos, C., Melo-Banda, J., Páramo-García, U., Paraguay-Delgado, F., Zapién-Castillo, S. (2018). Chitosan-starch films with natural extracts: Physical, chemical, morphological and thermal properties. *Materials*. 2018, 11(1), 120.
- [21] Villemin, E., Ong, Y. C., Thomas, C. M., & Gasser, G. Polymer encapsulation of ruthenium complexes for biological and medicinal applications. *Nature Reviews Chemistry*. 2019, 1.
- [22] Sabbah, M., Di Pierro, P., Cammarota, M., Dell'Olmo, E., Arciello, A., & Porta, R. Development and properties of new chitosan-based films plasticized with spermidine and/or glycerol. *Food hydrocolloids*. 2019, 87, 245-252.
- [23] Islam, S., Bhuiyan, M. R., & Islam, M. N. Chitin and chitosan: structure, properties and applications in biomedical engineering. *Journal of Polymers and the Environment*. 2017. 25, 854-866.
- [24] Duan, C., Meng, X., Meng, J., KHAN, I. H., Dai, L., Avik, K. H. A. N., ... & Ni, Y. Chitosan as A Preservative for Fruits and Vegetables: A Review on Chemistry and Antimicrobial Properties. *Journal of Bioresources and Bioproducts*. 2019, 4(1), 11-21.
- [25] Rathore, H. S., Senthilvelan, T., Vasantharaja, R., Abraham, L. S., Prakash, D., Sivagnanam, U. T., & Gupta, S. Fabrication and characterization of chitosan film impregnated ciprofloxacin drug: A comparative study. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019, 101078.
- [26] Shariatinia, Z., & Mazloom-Jalali, A. Chitosan nanocomposite drug delivery systems designed for the ifosfamide anticancer drug using molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Liquids*. 2019, 273, 346-367.