

Caracterización y evaluación antimicrobiana de hidrogeles de quitosano cargados con agua activada por plasma/carvacrol

Diego Méndez-Cepeda^a, Claudia Gabriela Cuéllar-Gaona^{b*}, María Guadalupe Neira-Velázquez^{b*}.

^a) Universidad tecnológica de Coahuila, Av. Industria Metalúrgica, Blvd. del Parque Industrial Francisco R. Alanís 2001, 25900 Ramos Arizpe, Coah. ^b) Centro de Investigación en Química Aplicada, Enrique Reyna H. 140, San José de los Cerritos, 25294 Saltillo, Coah.

Resumen: La tecnología del plasma ha surgido como una herramienta destacada y versátil, que ha atraído una atención significativa en diversos dominios. Esta tecnología se ha utilizado para la activación química del agua, la cual adquiere radicales bien conocidos como óxido nítrico, dióxido de nitrógeno, ozono, trióxido de dióxido de nitrógeno, nitrato, superóxido y iones de hidrógeno, entre otros. En el presente trabajo se activó agua de grifo mediante tecnología de plasma, variando los tiempos de tratamiento de 3, 30 y 60 minutos. Se midieron los valores de conductividad eléctrica (CE), porcentaje de sólidos totales (%ST) y pH antes y después del tratamiento con plasma, observándose un incremento de la CE y %ST después de la activación. Se sintetizaron hidrogeles de quitosano cargados con 3% de carvacrol y 3% de agua activada por plasma (AAP) para cada tratamiento con plasma. Los hidrogeles se analizaron mediante FTIR, SEM, hemocompatibilidad y evaluación antimicrobiana. Los espectros FTIR mostraron picos asociados a grupos funcionales específicos del quitosano y a la interacción entre el quitosano y el carvacrol. La microscopía de SEM evidenció la presencia del carvacrol en los hidrogeles, los cuales presentaban una morfología rugosa y heterogénea. La prueba de hemólisis directa demostró que todos los hidrogeles evaluados resultaron hemocompatibles, siendo seguros para aplicaciones biomédicas. El ensayo antimicrobiano reveló que los hidrogeles con carvacrol y AAP presentaron actividad antimicrobiana significativa contra las sepas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus niger*, lo que sugiere su uso como biomateriales para prevención y tratamiento de infecciones.

Introducción.

En los últimos años, los avances en la investigación han revelado que el agua activada por plasma es efectiva en la esterilización y desinfección de superficies y líquidos. Los estudios han demostrado que el agua activada por plasma puede inactivar de manera eficaz una amplia gama de bacterias patógenas ¹. Los hidrogeles son una matriz tridimensional entrelazada, con gran capacidad de retención de agua, y que están siendo utilizados en el área biomédica como apósito de heridas ^{2, 3}. A su vez tiene la capacidad de cargarse con diferentes sustancias como agua activada por plasma, fármacos o extractos naturales con propiedades antimicrobianas como el carvacrol ⁴, para ofrecer al hidrogel actividad antagonista contra microorganismos patógenos. El objetivo del presente trabajo fue la obtención de hidrogeles de quitosano cargados con agua activada por plasma/carvacrol con propiedades antimicrobianas mejoradas.

Parte experimental.

Materiales. Para la activación del agua se utilizó agua de grifo. Los reactivos utilizados para la síntesis del hidrogel fueron: Quitosano (QS) de alto peso molecular (300, 000 g/mol) quitina desacetilada, Poli (D- glucosamina)), ácido acético glacial (CH₃COOH, 99.98%), hidróxido de sodio (NaOH 98%), y carvacrol, adquiridos en Sigma Aldrich y utilizados sin tratamiento adicional.

Metodología. La activación del agua de la llave se llevó a cabo a diferentes tiempos de tratamiento por tecnología de plasma, 3, 30 y 60 minutos, a 60 volts y utilizando aire a un flujo de aire de 25 L/min. El extremo de la punta del plasma jet se introdujo a una profundidad de aproximadamente 1 cm dentro del agua, para permitir que las burbujas generadas alrededor de la punta agitaran de forma continua el agua.

El agua activada y sin activar se evaluó con un potenciómetro y un conductímetro de la marca HANNA, el cual medía el pH, el % de sólidos,

y la conductividad eléctrica. Las propiedades del agua son medibles una vez que el AAP haya alcanzado la temperatura ambiente.

Para la preparación del hidrogel control se utilizó 3% de quitosano (QS) disuelto en ácido acético glacial al 2%, en agitación constante, a una temperatura de 60 °C; la solución de QS se vació en una placa celular de 24 pocillos, se ajustó el pH a 7, con NaOH 0.1 M. Los hidrogeles cargados con extracto de carvacrol y AAP se prepararon siguiendo la metodología anterior, pero añadiendo 3 % de AAP (v/v) y 3% de carvacrol (v/v) a la solución de QS, se agitó constantemente la solución, para posteriormente vaciar en los pocillos de la placa celular, y ajustar el pH a 7 con NaOH 0.1 M. Los hidrogeles se dejaron incubar durante 24 h a 37 °C. Transcurridas las 24 h, se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de NaOH.

Los espectros FTIR-ATR para los hidrogeles, se realizaron en un equipo Thermo Scientific Nicolet i S10 en un rango de 600 a 4000 cm^{-1} con 100 escaneos y una resolución de 0.4 cm^{-1} . Para la caracterización morfológica de los hidrogeles se empleó un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo SEM Hitachi SU8010. Las muestras se recubrieron con plata para facilitar la conductividad eléctrica de los hidrogeles, antes del análisis.

La evaluación de la hemocompatibilidad se realizó con sangre humana recién obtenida de donantes voluntarios no fumadores, la cual fue recolectada en tubos heparinizados y posteriormente centrifugada a 3000 rpm durante 4 minutos a 4 °C. El sedimento resultante se lavó tres veces con una solución Alsever fría. El sobrenadante resultante se diluyó 1:99 con la solución Alsever. Se tomaron 150 μL de esta suspensión para la evaluación de cada muestra. Las muestras se prepararon en concentraciones de 1, 2.5 y 5 mg/mL de los hidrogeles. La solución Alsever y el agua desionizada se usaron como controles negativo y positivo, respectivamente. Las muestras se centrifugaron a 2500 rpm durante 4 minutos y la hemoglobina libre en el sobrenadante se

midió espectrofotométricamente por UV a 415 nm utilizando el modelo HTX de Sinergy.

Las propiedades antimicrobianas de los materiales se investigaron con un ensayo cualitativo, utilizando el método de inhibición por formación de halo. Se eligieron dos cepas bacterianas patógenas clínicas, una gram positiva (*Staphylococcus aureus*) y una gram negativa (*Escherichia coli*). Se utilizó el hongo *Aspergillus niger* para la evaluación de las propiedades antifúngicas. Estas cepas fueron proporcionadas por el laboratorio de microbiología de la Universidad Autónoma de Coahuila.

Se realizaron diluciones seriadas para disminuir la concentración de la cepa bacteriana. Se inocularon 200 μL de la tercera dilución en las cajas con agar nutritivo, se sembraron de manera uniforme, posteriormente se colocó un hidrogel por cada caja, previamente esterilizado mediante irradiación con luz ultravioleta durante 20 min., cada hidrogel tenía un diámetro de 7 mm. Se incubaron las cajas por 24 h a una temperatura de 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se observaron los halos de inhibición formados, y se midieron los diámetros de los mismos.

Para evaluar la actividad antifúngica se colocaron cuadrados de 10 mm por lado al centro de la caja con agar nutritivo, y los hidrogeles se colocaron en los cuatro puntos cardinales de la caja. Para el control solo se sembró el hongo sin hidrogeles, se dejó crecer el hongo a 37 °C hasta que el control cubriera la caja en su totalidad, (7 días) y se midió el crecimiento del hongo frente a los hidrogeles.

Resultados y discusión.

Para la caracterización del agua de grifo, se midieron los siguientes parámetros antes y después de la activación del plasma conductividad eléctrica (CE), porcentaje de sólidos totales (%ST) y pH. Antes de la activación del plasma, el agua del grifo tenía una CE de 964 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y un %ST de 474 ppm, mientras que el valor de pH se encontraba en 7.8. El agua se activó con plasma variando los tiempos de tratamiento (3, 30 y 60 min). Después de la activación con plasma, el agua aumenta las cantidades de CE con valores de 936, 1017 y 1077 $\mu\text{S}/\text{cm}$ respectivamente al

tiempo de tratamiento. El aumento en los valores de CE y %ST observados después de la activación se pueden atribuir a la presencia de iones activos, que se generan en el proceso de interacción entre el plasma y el agua ⁵⁻⁹.

El pH del agua del grifo sin tratar oscilaba alrededor de 7,8. Tras la activación del plasma, se observó un aumento del pH. Con un tiempo de activación de 3 minutos, el pH subió a 8,7; con 15 minutos, a 8,8; y con 30 minutos, bajó a las 8,7. En la literatura existen reportes de agua tratada donde el pH disminuye tras la activación, sin embargo, los investigadores utilizaron agua purificada, destilada o desionizada ¹⁰⁻¹². En el presente trabajo el agua de grifo se vuelve una base débil, esto debido a la presencia de minerales y otras sustancias disueltas en el agua del grifo que pueden actuar como amortiguadores, evitando que el pH disminuya lo suficiente como para volverla ácida, esto se puede corroborar con el valor de %ST que antes de la activación están elevados.

FTIR

La Figura 1 muestra las bandas espectrales de los hidrogeles evaluados por FTIR. Los espectros FTIR mostraron picos correspondientes a grupos funcionales específicos, la vibración de estiramiento del OH presentó un pico entre 3500 y 3400 cm^{-1} . Las vibraciones de estiramiento simétricas y asimétricas correspondieron a CH_3 y CH_2 alrededor de 3000 y 2900 cm^{-1} respectivamente. Se puede observar una banda entre 1300 y 1450 cm^{-1} correspondiente al enlace C-N del hidrogel de quitosano. En esta misma área se superpone una banda muy pronunciada alrededor de los 1450 cm^{-1} correspondiente al enlace C=C de los anillos aromáticos del carvacrol, que se puede observar únicamente en los hidrogeles con este compuesto ^{13, 14}. Y finalmente, las bandas de estiramiento aproximadamente a los 1025 cm^{-1} y a los 890 cm^{-1} representan a los enlaces C-O y C-H que están presentes en la estructura química del quitosano ¹⁵.

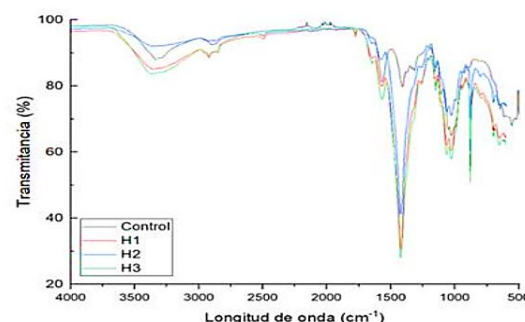


Figura 1. Bandas espectrales obtenidas del análisis de FTIR en las muestras de hidrogeles de quitosano cargados con agua activada por plasma/carvacrol.

SEM

La Figura 2 representa los resultados de microscopía electrónica de barrido, donde las imágenes a) y e), son hidrogeles de quitosano control (HCS); b) y f), H1; c) y g), H2 y d) y h), H3. En los incisos a) y e) se muestra una estructura rugosa y una superficie irregular. Este es un hidrogel de quitosano puro sin adición de carvacrol ni agua activada por plasma, y la morfología rugosa es característica del quitosano en su forma básica. En las Figuras 2b) y f) La superficie parece más lisa y menos granulada que en la imagen. A una magnificación de 8000x se pueden observar estructuras globulares atribuidas a la presencia de carvacrol en el hidrogel. En las Figuras c) y g) se observa una superficie rugosa con una textura heterogénea. Las Figuras 2d) y h) presentan una estructura con formaciones esféricas y agrupaciones de partículas. Esto sugiere una interacción significativa entre el quitosano y el carvacrol, posiblemente formando agregados que alteran la morfología superficial del hidrogel. La homogeneidad en la superficie de los hidrogeles varía entre un hidrogel y otro, este se atribuye al método manual de obtención de los hidrogeles, sin embargo, los hidrogeles con carvacrol muestran superficies con formaciones esféricas y agregados, en contraste con el hidrogel de quitosano puro que presenta una estructura más rugosa y porosa.

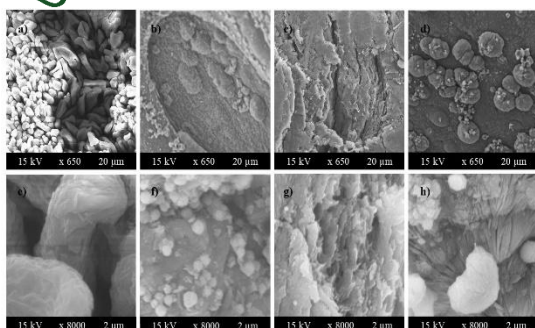


Figura 2 Microscopía electrónica de barrido, a) HCS (x650), b) H1 (x650), c) H2 (x650), d) H3 (x650), e) HCS (x8000), f) H1 (x8000), g) H2 (x8000), h) H3 (x8000).

Prueba de hemólisis directa

Se realizó una prueba de hemólisis directa utilizando sangre humana con el fin de analizar la hemocompatibilidad de los hidrogeles. En la Figura 3 se presentan los resultados obtenidos en la prueba. Los resultados muestran que todos los hidrogeles evaluados (CS, H1, H2 y H3) presentaron valores de hemólisis por debajo del 2%, lo que indica que son no hemolíticos. Esto de acuerdo a los parámetros establecidos por la Norma ASTM F 756 17, que indica que valores inferiores al 2% son considerados no hemolíticos, del 2 al 5% ligeramente hemolíticos y valores superiores al 5% son hemolíticos. También, se observa que al aumentar la concentración evaluada del hidrogel con agua activada por plasma/carvacrol, el porcentaje de hemólisis incrementa. En la gráfica a) se presenta el control utilizado y el cual contiene únicamente quitosano. Al comparar esta gráfica con las demás, se puede observar que al añadir agua activada y carvacrol si afecta el comportamiento del hidrogel, aumentando su porcentaje de hemólisis, sin embargo, los hidrogeles siguieron presentando resultados no hemolíticos, convirtiéndolos en materiales seguros al contacto con la sangre y por lo tanto podrían utilizarse en futuras aplicaciones biomédicas ¹⁶.

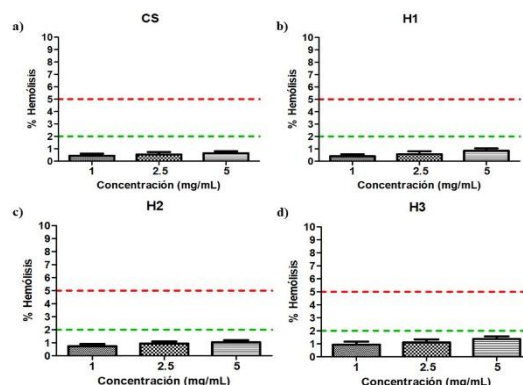


Figura 3 Graficas representativas de la prueba de hemocompatibilidad para los hidrogeles de quitosano cargados con agua activada por plasma/carvacrol.

Ensayo cualitativo antimicrobiano

La Figura 4 muestra los resultados de la prueba antimicrobiana de los hidrogeles evaluados. El hidrogel control de quitosano no mostró actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus* ni *A. niger*. Este mismo efecto fue observado en la investigación de Hernández, et al. 2011; donde los investigadores evaluaron películas de quitosano sin tratamiento adicional y sin adición de algún otro componente contra la cepa *S. aureus* y las películas no exhibieron zona de inhibición contra la cepa probada, los autores mencionan que independientemente del efecto antimicrobiano reportado en la literatura del quitosano, esta actividad ocurre sin la migración de agentes activos y que el quitosano no se difunde a través del agar, por lo tanto, solo produce inhibición en contacto directo con los sitios activos del quitosano ¹⁷. Todos los hidrogeles evaluados (H1, H2 y H3) presentaron actividad antimicrobiana contra las sepas *E. coli*, *S. aureus* y *A. niger*, ya que el halo de inhibición fue evidente. La inhibición mostrada por los hidrogeles es gracias a la sinergia entre dos compuestos antimicrobianos, el agua activada por plasma y el carvacrol. Por un lado, el agua activada por plasma tiene especies reactivas (RONs) conocidas por sus propiedades antimicrobianas ^{18, 19}. Las especies reactivas pueden interactuar con la membrana bacteriana y dañarla a través de la peroxidación lipídica, que altera la estructura, seguida de cambios morfológicos, daño del

ADN y alteraciones de las estructuras funcionales de las proteínas. Por otro lado, el carvacrol ha sido ampliamente reportado como un aceite antimicrobiano que puede reducir poblaciones de *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella spp* entre otros ¹⁵.

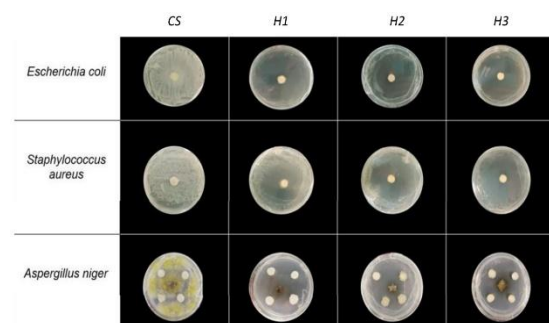


Figura 4 Halos de inhibición en la prueba antimicrobiana realizada a los hidrogeles de quitosano cargados con agua activada por plasma/carvacrol.

Conclusiones.

Se obtuvieron exitosamente hidrogeles estables de quitosano cargados con agua activada por plasma y carvacrol. La sinergia entre estos elementos con propiedades antimicrobianas, lograron que el hidrogel presentara actividad antagonista contra distintas cepas bacterianas y hongos, además se demostró que el hidrogel es seguro para aplicaciones en el área médica ya que presentó hemocompatibilidad.

Agradecimientos.

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por la beca posdoctoral 618041, de la Dra. Gabriela Cuéllar. Se agradece al CIQA por su apoyo a través del proyecto interno de hidrogeles (6749). Los autores también agradecen a G. Méndez-Padilla por el apoyo en los análisis térmicos.

Referencias.

[1] Wang, J.; Wang, L.; Maimaitiyiming, R., Aihaiti, A. Comparison of plasma-activated water and free chlorine in disinfecting *Escherichia coli* O157:H7- and *Salmonella Typhimurium*-inoculated blueberry, cherry tomato, fresh-cut lettuce, and baby spinach.

LWT 2023.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115384>

[2] Egle, K.; Dohle, E.; Hoffmann, V.; Salma, I.; Al-Maawi, S.; Ghanaati, S.; Dubnika, A. Fucoidan/chitosan hydrogels as carrier for sustained delivery of platelet-rich fibrin containing bioactive molecules. *Int J Biol Macromol* 2024, 129561. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129651>

[3] Deng, P.; Yao, L.; Chen, J.; Tang, Z.; Zhou, J. Chitosan-based hydrogels with injectable, self-healing and antibacterial properties for wound healing. *Carbohydr polym* 2022, 118718. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118718>

[4] Sijongesonke, P.; Namhla, S.; Blessing, A. Carvacrol and Thymol Hybrids: Potential Anticancer and Antibacterial Therapeutics. *Molecules* 2024, 2277. <https://doi.org/10.3390/molecules29102277>

[5] Schmidt, M.; Hahn, V.; Altrock, B.; Gerling, T.; Gerber, I.C.; Weltmann, K.D.; von Woedtk, T. Plasma-Activation of Larger Liquid Volumes by an Inductively-Limited Discharge for Antimicrobial Purposes. *Appl Sci* 2019, 9, 2150. <https://doi.org/10.3390/app9102150>

[6] Lee, H.R.; Lee, Y.S.; You, Y.S.; Huh, J.Y.; Kim, K.; Hong, Y.C.; Kim, C.H. Antimicrobial effects of microwave plasma-activated water with skin protective effect for novel disinfectants in pandemic era. *Sci Rep* 2022, 5968. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10009-1>

[7] Ma, R.; Wang, G.; Tian, Y.; Wang, K.; Zhang, J.; Fang, J. Non-thermal plasma-activated water inactivation of food-borne pathogen on fresh produce. *J Hazardous Mater* 2015, 643-651. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.07.061>

[8] Wu, S.; Zhang, Q.; Ma, R.; Yu, S.; Wang, K.; Zhang, J. Fang, J. Reactive radical-driven bacterial inactivation by hydrogen-peroxide-enhanced plasma-activated-water. *Eur Phys J Spec Top* 2017, 226, 2887-2899. <https://doi.org/10.1140/epjst/e2016-60330-y>

[9] Xiang, Q.; Wang, W.; Zhao, D.; Niu, L.; Li, K.; Bai, Y. Synergistic inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by plasma-activated water and mild heat. *Food Control* 2019, 106741.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106741>.

[10] Lee, G.J.; Lamichhane, P.; Ahn, S.J.; Kim, S.H.; Yewale, M.A.; Choong, C.E.; Jang, M.; Choi, E.H. Nitrate Capture Investigation in Plasma-Activated Water and Its Antifungal Effect on *Cryptococcus pseudolongus* Cells. *Int J Mol Sci* 2021, 222312773.

[11] Jiang, B.; Zheng, J.; Qiu, S.; Wu, M.; Zhang, K.; Yan, Z.; Xue, Q. Review on electrical discharge plasma technology for wastewater remediation. *Chem Eng J* 2021, 236, 348-368.

[12] Shen, J.; Tian, Y.; Li, Y.; Ma, R.; Zhang, Q.; Zhang, J.; Fang, J. Bactericidal effects against *S. aureus* and physicochemical properties of plasma activated water (PAW) stored at different temperatures. *Sci Rep* 2016. <https://doi.org/10.1038/srep28505>

[13] Wang, Y.; Deng, J.; Liu, H.; Ran, R.; Zhang, T.; Li, Z. Enzyme-chitosan hydrogels for high sensitivity flexible silk-based electrochemical glucose sensor. *Microchem J* 2024, 110306.

[14] Wang, H.; Ding, C.; Lu, J.; Bao, Y.; Han, B.; Zhang, J.; Duan, S.; Song, Z.; Chen, H. Study on the thawing characteristics of beef in ultrasound combined with plasma-activated water. *Food Chemistry* 2024, 101104.

[15] Tópor, A.; Veras, F.F.; Cacciatore, F.A.; Silveira, R.D.; da Silva Malheiros, P.; Welke, J.E. Carvacrol nanocapsules as a new antifungal strategy: Characterization and

evaluation against fungi important for grape quality and to control the synthesis of ochratoxins. *Int J Food Microbiol* 2024, 416, 110659.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110659>

[16] Cuellar et al. (2023). Revisión y Análisis de Pruebas Biológicas sobre Nanomateriales para Aplicación en Áreas Biológicas. (P. i. Springer, Ed.) *Materiales y aplicaciones de nanocompuestos ecológicos*, 339-363.

[17] Hernández-Ochoa, L.; Gonzales-Gonzales, A.; Gutiérrez-Méndez, N.; Muñoz-Castellanos, L.N.; Quintero-Ramos, A. Estudio de la actividad antibacteriana de películas elaboradas con quitosano a diferentes pesos moleculares incorporando aceites. *Rev Mex Ing Quim* 2011, 455-463.

[18] Choi, E.J.; Park, H.W.; Kim, S.B.; Ryu, S.; Lim, J.; Hong, E.J.; Byeon, Y.S.; Chun, H. Sequential application of plasma-activated water and mild heating improves microbiological quality of ready-to-use shredded salted kimchi cabbage. *Food Control* 2019, 501-509.

[19] Tayebbeh, S.; Lavasani, A.S.; Dastmalchi, F.; Zarei, H.; Hajizadeh, K. Evaluation of Cold Plasma-Activated Water "Enriched Metal..." Cations as an Antifungal Agent for Controlling of *Penicillium Italicum* and *Penicillium Digitatum* Molds. *J Food Protection* 2024, 100310.

<https://doi.org/10.1016/j.jfp.2024.100310>