

## MATRICES NANOCOMPUESTAS DE ALCOHOL DE POLIVINILO (PVA)/CELULOSA BACTERIANA (CB) PARA EL CRECIMIENTO CELULAR Y LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS

Marlon Osorio<sup>1</sup>, Isabel Ortíz<sup>2</sup>, Gloria Caro<sup>1</sup>, Luz Marina Restrepo<sup>3</sup>, Lina Martínez<sup>2</sup>, Camilo Agudelo<sup>2</sup>, Robín Zuluaga<sup>1</sup>, Jorge Velásquez-Cock<sup>1</sup>, Piedad Gañán<sup>1</sup>, Cristina Castro<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Ingenierías; Universidad Pontificia Bolivariana; Circular 1°, No 70-01, Medellín, Colombia.

<sup>2</sup>Escuela Ciencias de la Salud; Universidad Pontificia Bolivariana; Calle 78B No. 72A-109, Medellín, Colombia.

<sup>3</sup>Facultad de Medicina; Universidad de Antioquia; Calle 51D 62-29, Medellín, Colombia.

\* Contacto: cristina.castro@upb.edu.co

### RESUMEN

En esta investigación se desarrollaron biomateriales de PVA, CB y nanocompuestos PVA/CB mediante fermentación in situ utilizando una bacteria productora de celulosa *Gluconacetobacter medellinensis*. Los biomateriales fueron caracterizados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), pruebas de hinchamiento y proliferación celular in-vitro utilizando células de piel humana (Fibroblastos). No se observaron cambios en la morfología celular por el uso de los biomateriales y su microestructura estuvo estrechamente ligada a la proliferación celular. Las células mostraron una mayor afinidad por la CB, resultado relacionado con su similitud en morfología y estructura química con el colágeno. La respuesta obtenida sumada a la capacidad de la CB de imitar la forma de la interfaz gas-líquido durante su síntesis, permitió la construcción de una prenda apósito de CB en forma de guante que podría tener aplicaciones en el tratamiento de quemaduras y úlceras cutáneas.

**Palabras Clave:** *Celulosa bacteriana, Alcohol de polivinilo, Material nanocompuesto, Crecimiento celular, Renda apósito*

### ABSTRACT

In this research, biomaterials of PVA, CB and in situ fermented PVA/CB nanocomposites were developed, using a cellulose producer bacterium, *Gluconacetobacter medellinensis*. The biomaterials were characterized through scanning electron microscopy (SEM), swelling and in vitro cell proliferation assay with skin cells (Fibroblast). Changes in the cell morphology were not found by the use of the biomaterials and the cell proliferation is associated with the microstructure of them. Cells showed a higher affinity to CB, outcome related to the morphological and chemical similitudes with collagen. Joining this response with the CB capacity of mimic the gas-liquid interface, was developed a glove shaped wound dressing that will have applications in burn and skin ulcer treatment.

**Keywords:** *Bacterial cellulose, Polyvinyl alcohol, Nanocomposite, Cell growth, Wound dressing*

## **1 INTRODUCCIÓN**

La celulosa es el biopolímero más abundante en la naturaleza, representa un importante rol como elemento de refuerzo sin dejar de ser biodegradable, debido a esto, en los últimos años se ha incrementado el interés en el uso y desarrollo de materiales compuestos reforzados con esta, aislándola de fuentes como plantas, animales y microorganismos [1]. En el caso de la celulosa bacteriana (CB) esta es producida por bacterias del género *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, entre otros [2-6]. Estos microorganismos pueden sintetizar nanocintas de celulosa a partir de fuentes de carbono como glucosa, fructosa, entre otros [7-8]. En la actualidad se estudia la CB en aplicaciones biomédicas, debido a que es químicamente pura, no tóxica, no pirogénica, bio-compatibile [9] y conformable, es decir, durante su biosíntesis el microorganismo puede producir una membrana que imita la forma de un contenedor permeable al oxígeno [10]. El alcohol de polivinilo (PVA), por su parte, es un polímero sintético soluble en agua que puede generar hidrogeles mediante la generación de enlaces tanto físicos como químicos [11-12].

Estudios recientes han caracterizado la CB, el PVA y materiales nanocompuestos de PVA/CB en aplicaciones médicas como córneas [11], cartílagos [13], vasos sanguíneos [12] y piel artificial [9]; en esta búsqueda, diferentes autores han estudiado la biocompatibilidad, tanto de la CB como la del PVA, en pruebas que buscan evaluar la respuesta de diferentes tipos de células humanas y animales ante la presencia de estos biomateriales [12-14]. En contraste, son pocos los estudios relacionados a los materiales compuestos PVA/CB y, hasta el momento, no se han registrado investigaciones en los que la bioingeniería de bacterias productoras de celulosa sea explorada en la producción de materiales para fines biomédicos. Debido a lo anterior, en esta investigación se abordó el desarrollo y la evaluación de materiales de PVA, CB y PVA reforzados con nanocintas de CB, para su uso como matrices en el crecimiento celular y la regeneración de tejidos con una futura aplicación en el tratamiento de quemaduras y úlceras cutáneas.

## **2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Materiales.**

Para la preparación de los biomateriales se utilizó el medio de cultivo Hestrin & Schramm (H-S) preparado a partir de glucosa, extracto de levadura, peptona, fosfato ácido disódico y ácido cítrico [15], además, se utilizó hidróxido de potasio, caucho de silicona y PVA de peso molecular promedio de 89000-98000 y 99% de hidrólisis. Para las pruebas de proliferación celular in vitro, se usó medio de cultivo *Eagle* modificado de Dulbecco (DMEM) y suero bovino fetal (FCS).

### **2.2 Métodos.**

#### *2.2.1 Desarrollo de los biomateriales*

Para desarrollar los biomateriales de CB se utilizaron 100 ml de medio de cultivo H-S [15] a pH 3,6. Luego, el medio de cultivo fue inoculado al 10% v/v con un preinóculo de *Gluconacetobacter medellinensis*, cepa aislada por el grupo de investigación sobre nuevos

materiales (GINUMA) [2] y se distribuyó en cajas de cultivo celular de 6 pozos. El tiempo de fermentación fue de 7 días a 28 °C, luego los biomateriales de CB se purificaron con una solución de KOH al 5% p/p durante 14 h, seguido de lavados con agua desionizada hasta pH= 7,0 y esterilizados para usos posteriores. Para el desarrollo de los biomateriales de PVA/CB, el medio de cultivo H-S fue modificado con PVA al 2,5; 5; y 10% p/p, posteriormente, el PVA fue solubilizado a 90°C con agitación de 1000 rpm durante 1h, esterilizado e inoculado. Después de 15 días de incubación a 28°C, se sometieron a 6 ciclos de congelación/descongelación entre 20 y -20°C para propiciar la formación de enlaces físicos. Para el desarrollo de los materiales de PVA, se utilizó el mismo medio de cultivo para PVA/CB, seguido por los 6 ciclos de congelación/descongelación. Tanto los materiales de PVA como los de PVA/CB se purificaron con KOH al 5% p/p durante 14 h, seguido de lavados con agua desionizada hasta pH= 7,0 y, posteriormente, fueron secados en horno a 50°C, cortados en discos de 3 cm y esterilizados.

### 2.2.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Esta prueba se realizó para evaluar la microestructura de los biomateriales secados por liofilización y recubiertos con oro/paladio usando un aspersor de iones para su observación en un microscopio Jeol JSM 5910 LV operado a 10 kV.

### 2.2.3 Porcentaje de hinchamiento

Esta prueba se realizó para determinar el porcentaje de absorción de agua de los biomateriales de PVA y PVA/CB, y el contenido de agua de la CB. Los dos primeros se hidrataron con agua destilada por 2 semanas a temperatura ambiente después del secado. Como paso posterior, se retiró el exceso de agua con ayuda de papel tisú y fueron pesados para obtener  $W_s$ , el cual, es el peso de los biomateriales en su estado hidratado. Luego, los materiales se secaron a 70°C con una presión de vacío de 0,7 Bar, para registrar  $W_d$ , que representa el peso de los biomateriales secos, luego de alcanzar el peso constante. A partir de estos datos se calculó el porcentaje de hinchamiento utilizando la ecuación 1 [16].

$$S \% = \frac{W_s}{W_d} * 100 \quad (1) [16]$$

### 2.2.4 Proliferación celular in vitro

Esta prueba se realizó para observar el crecimiento de fibroblastos humanos en los biomateriales. Las muestras se humedecieron en una caja para cultivo celular de 6 pozos con DMEM al 10% v/v FCS durante 4 días, luego se sembraron 50000 fibroblastos por pozo, se incubaron durante 8 días, a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% v/v, posteriormente, se colorearon con hematoxilina-eosina y se tomaron imágenes con un microscopio óptico Leica a 20X con cámara integrada.

### 2.2.5 Desarrollo de una prenda apósito

Se construyó un molde de caucho de silicona en forma de guante, el cual fue utilizado para contener el medio de cultivo. El medio fue esterilizado, inoculado con la bacteria e incubado por 10 días, luego de este tiempo, se retiró la membrana de celulosa con forma de guante y se purificó como se describe en la sección 2.2.1.

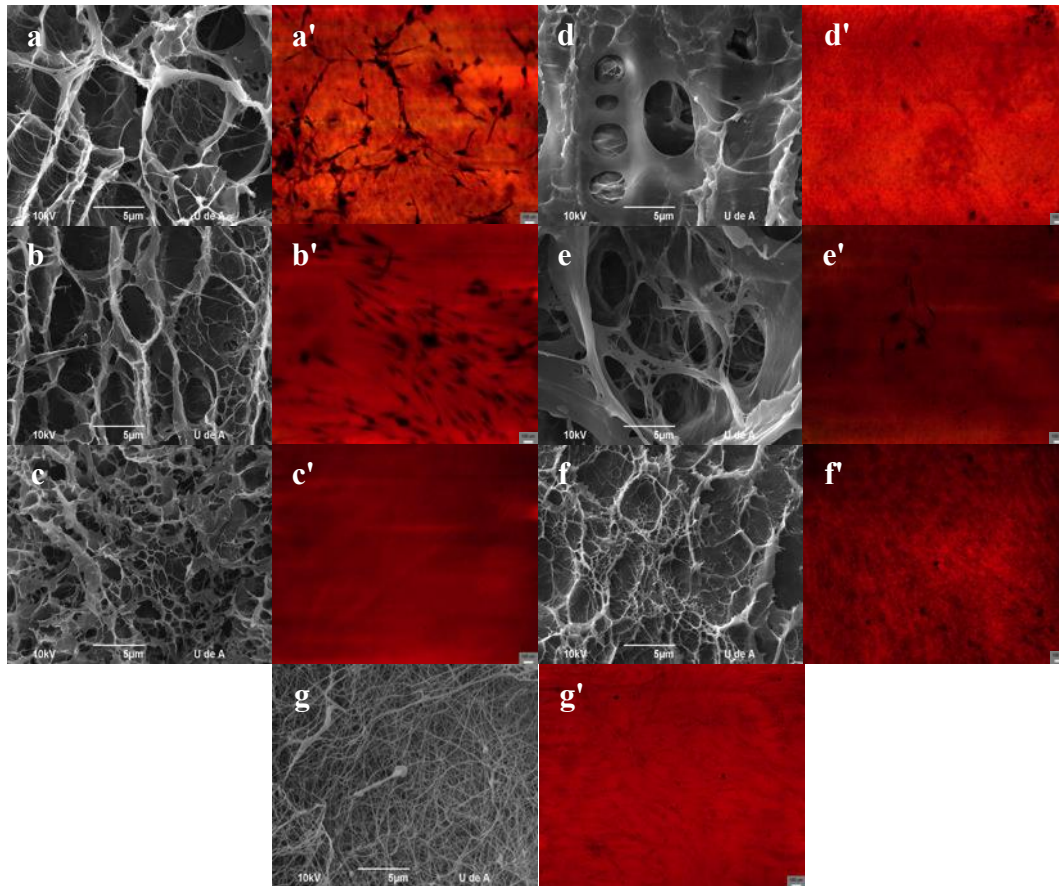
### **3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En la Figura 1a-g se presenta las imágenes SEM de los biomateriales de PVA, PVA/CB y CB. A partir de estos resultados, se puede relacionar la microestructura de los biomateriales con su capacidad para permitir la proliferación celular, de hecho, la topografía de un material, incluyendo su textura, tamaño de poro y porosidad, afecta la absorción de proteínas de adhesión y, por ende, la fijación de la célula con la matriz [17].

Los diámetros de poro obtenidos en este trabajo son inferiores a 5  $\mu\text{m}$ , Norman y Desai en su review enuncian las técnicas para obtener porosidades de este tipo y señalan las ventajas que estas exhiben en la proliferación celular, debido a que imitan la matriz extracelular (el sustrato que las células habitan in vivo), que generalmente se encuentra en la nanoescala [18].

En las imágenes de los biomateriales de PVA se observó una porosidad abierta, en la cual a medida que aumenta el porcentaje de PVA el tamaño del poro disminuye (Figura 1a-c). Para el caso de los materiales compuestos, el refuerzo con CB produce un cambio en la porosidad de la matriz, de abierta a cerrada (Figura 1d-f), debido a que la celulosa es considerada como un agente de nucleación de matrices poliméricas [19], de esta forma, el PVA se enlaza físicamente desde la nanocinta hacia el seno del material, formándose un sistema de porosidad cerrada.

En la micrografía de CB (Figura 1g) se observa una porosidad abierta en la que se presentan cintas de tamaño nanométrico con anchos entre 50 y 70 nm formando una red interconectada [2], esta característica hace que diferentes autores le atribuyan una buena proliferación celular debido a que presenta fibras con ancho similar al colágeno [20].



**Figura 1.** Micrografías a 5  $\mu\text{m}$  a. 2,5 % p/p PVA; b. 5 % p/p PVA; c. 10 % p/p PVA; d. 2,5 % p/p PVA/CB; e. 5 % p/p PVA/CB; f. 10 % p/p PVA/CB; g. CB. Imágenes de crecimiento celular a 100  $\mu\text{m}$  a'. 2,5 % p/p PVA; b'. 5 % p/p PVA; c'. 10 % p/p PVA; d'/ 2,5 % p/p PVA/CB; e'. 5 % p/p PVA/CB; f. 10 % p/p PVA/CB; g'. CB.

Los resultados de las pruebas de hinchamiento (Tabla 1.) muestran que el refuerzo del PVA con CB no afecta su capacidad para absorber agua, sin embargo, el resultado más importante de esta prueba es la gran capacidad de la CB para contener agua. La CB está constituida en un 98,56% p/p de agua, lo cual representa un hinchamiento del 7000% aproximadamente; cabe anotar que el hinchamiento de la CB ocurre durante su fermentación, si se seca no rehidrata, debido a un fenómeno denominado hornificación [21]. La cantidad de agua en estos biomateriales es muy importante, ya que puede determinar la cantidad de nutrientes disponible para las células y la migración de los productos celulares [22]. De acuerdo con lo anterior, es de esperarse una mayor proliferación celular en la CB.

**Tabla 1.** Porcentaje de hinchamiento de los biomateriales.

<b>Biomaterial</b>	<b>Hinchamiento %</b>
2,5% p/p PVA	347,1 ± 7,4
2,5% p/p PVA/CB	319,6 ± 10,5
5% p/p PVA	298,9 ± 4,9
5% p/p PVA/CB	305,7 ± 7,1
10% p/p PVA	268,4 ± 7,4
10% p/p PVA/CB	270,3 ± 4,8
CB*	6951,4 ± 200,9

*\*Resultado relacionado con un contenido de agua del 98,56% p/p*

Los resultados de la proliferación celular se muestran en la Figura 1a'-g'. En el PVA se presentó una menor proliferación celular que en la CB, al punto que para el material de 10% p/p el PVA no presenta crecimiento, lo anterior se encuentra relacionado con la disminución en el tamaño de poro a medida que aumenta el porcentaje de PVA en la matriz. Para el caso de los biomateriales PVA/CB la proliferación no fue significativa, sólo un par de células son visibles en el material 5% p/p PVA/CB. Comparados con la matriz, los materiales compuestos presentaron una porosidad cerrada en la que su superficie es menos activa para la proliferación celular, es decir, se dificulta la migración de proteínas de adhesión hacia el material [17]. En los biomateriales de CB se observó una buena proliferación de fibroblastos con morfología fusiforme y confluyente. Esta situación se debe a que la CB cuenta con una morfología similar al colágeno, y sus 3 grupos hidroxilos por monómero interactúan con sus contrapartes polares en la célula mediante puentes de hidrógeno [23], facilitando la adhesión celular.

Como parte final de esta investigación, teniendo presente los resultados obtenidos de proliferación celular, se construyó una prenda apósito para el tratamiento de quemaduras y úlceras cutáneas con forma de guante usando CB (Figura 2). Para estos tratamientos la alta capacidad de retención de agua de la CB y su compatibilidad con células de piel son aspectos importantes para mantener la humectación de la herida y la proliferación celular, respectivamente, lo que favorece finalmente la epitelización [10].



**Figura 2.** Prenda apósito de CB

#### 4 CONCLUSIONES

Luego de analizar los resultados obtenidos, es posible relacionar la microestructura de biomateriales de PVA y de PVA/CB con la proliferación de fibroblastos humanos, a menor tamaño de poro y porosidad cerrada, la proliferación celular es reducida. En la CB los fibroblastos se presentaron en mayor cantidad y su morfología fusiforme y confluyente se mantuvo, lo que está relacionado con su similitud estructural con el colágeno, su capacidad de hinchamiento y su estructura química. Aprovechando la bioingeniería del microorganismo fue posible desarrollar una prenda apósito de CB con forma de guante, la cual podría tener aplicación en el tratamiento de quemaduras y úlceras cutáneas.

#### 5 AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Colciencias y a la Universidad Pontificia Bolivariana por los recursos económicos, infraestructura y equipos que hicieron posible la realización de esta investigación.

#### 6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. S. J. Eichhorn, a. Dufresne, M. Aranguren, N. E. Marcovich, J. R. Capadona, S. J. Rowan, C. Weder, W. Thielemans, M. Roman, S. Renneckar, W. Gindl, S. Veigel, J. Keckes, H. Yano, K. Abe, M. Nogi, a. N. Nakagaito, a. Mangalam, J. Simonsen, a. S. Benight, a. Bismarck, L. a. Berglund, and T. Peijs, *Review: current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites*, vol. 45, no. 1. 2009, pp. 1–33.
2. C. Castro, I. Cleenwerck, J. Trcek, R. Zuluaga, P. De Vos, G. Caro, R. Aguirre, J.-L. Putaux, and P. Gañán, “Gluconacetobacter medellinensis sp. nov., cellulose- and non-cellulose-producing acetic acid bacteria isolated from vinegar,” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 63, no. Pt 3, pp. 1119–25, Mar. 2013.
3. H. El-Saied, A. H. Basta, and R. H. Gobran, “Research Progress in Friendly Environmental Technology for the Production of Cellulose Products (Bacterial Cellulose and Its Application),” *Polym. Plast. Technol. Eng.*, vol. 43, no. 3, pp. 797–820, Jan. 2004.
4. C. Castro, R. Zuluaga, C. Álvarez, J.-L. Putaux, G. Caro, O. J. Rojas, I. Mondragon, and P. Gañán, “Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of Gluconacetobacter genus,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 89, no. 4, pp. 1033–1037, Aug. 2012.
5. B. a. McKenna, D. Mikkelsen, J. B. Wehr, M. J. Gidley, and N. W. Menzies, “Mechanical and structural properties of native and alkali-treated bacterial cellulose produced by Gluconacetobacter xylinus strain ATCC 53524,” *Cellulose*, vol. 16, no. 6, pp. 1047–1055, Jul. 2009.
6. C. Castro, R. Zuluaga, J.-L. Putaux, G. Caro, I. Mondragon, and P. Gañán, “Structural characterization of bacterial cellulose produced by Gluconacetobacter swingsii sp. from

- Colombian agroindustrial wastes,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 84, no. 1, pp. 96–102, Feb. 2011.
7. [W. K. Czaja, D. J. Young, M. Kawecki, and R. M. Brown, “The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications.,” *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2007.
  8. P. Ross, R. Mayer, and M. Benziman, “Cellulose biosynthesis and function in bacteria.,” *Microbiol. Rev.*, vol. 55, no. 1, pp. 35–58, Mar. 1991.
  9. W. Czaja, A. Krystynowicz, S. Bielecki, and R. M. Brown, “Microbial cellulose--the natural power to heal wounds.,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 2, pp. 145–51, Jan. 2006.
  10. W. Czaja, M. Kawecki, P. Wróblewski, A. Krystynowicz, K. Wysota, J. Glik, S. Bielecki, M. Nowak, and S. Sakiel, “Biomedical applications of microbial cellulose in burn wound recovery,” in in *Cellulose: Molecular and Structural Biology*, no. d, Springer, 2007, pp. 307–321.
  11. J. Wang, C. Gao, Y. Zhang, and Y. Wan, “Preparation and in vitro characterization of BC/PVA hydrogel composite for its potential use as artificial cornea biomaterial,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 30, no. 1, pp. 214–218, Jan. 2010.
  12. Y. Liu, N. E. Vrana, P. a Cahill, and G. B. McGuinness, “Physically crosslinked composite hydrogels of PVA with natural macromolecules: structure, mechanical properties, and endothelial cell compatibility.,” *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, vol. 90, no. 2, pp. 492–502, Aug. 2009.
  13. M. I. Baker, S. P. Walsh, Z. Schwartz, and B. D. Boyan, “A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications.,” *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, vol. 100, no. 5, pp. 1451–7, Jul. 2012.
  14. P. N. Mendes, S. C. Rahal, O. C. M. Pereira-Junior, V. E. Fabris, S. L. R. Lenharo, J. F. de Lima-Neto, and F. da Cruz Landim-Alvarenga, “In vivo and in vitro evaluation of an *Acetobacter xylinum* synthesized microbial cellulose membrane intended for guided tissue repair.,” *Acta Vet. Scand.*, vol. 51, p. 12, Jan. 2009.
  15. M. Schramm and S. Hestrin, “Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*.,” *J. Gen. Microbiol.*, vol. 11, no. 1, pp. 123–9, Aug. 1954.
  16. C. Chang, A. Lue, and L. Zhang, “Effects of Crosslinking Methods on Structure and Properties of Cellulose/PVA Hydrogels,” *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 209, no. 12, pp. 1266–1273, Jun. 2008.



17. G. Zhao, Z. Schwartz, M. Wieland, F. Rupp, J. Geis-Gerstorfer, D. L. Cochran, and B. D. Boyan, "High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure.," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 74, no. 1, pp. 49–58, Jul. 2005.
18. J. J. Norman and T. a Desai, "Methods for fabrication of nanoscale topography for tissue engineering scaffolds.," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 34, no. 1, pp. 89–101, Jan. 2006.
19. C. Morphology, "Crystallinity in the Polypropylene/ Cellulose System. 1. Nucleation and Crystalline Morphology," pp. 1187–1194.
20. F. Torres, S. Commeaux, and O. Troncoso, "Biocompatibility of Bacterial Cellulose Based Biomaterials," *J. Funct. Biomater.*, vol. 3, no. 4, pp. 864–878, Dec. 2012.
21. J. M. B. Fernandes Diniz, M. H. Gil, and J. a. a. M. Castro, "Hornification-its origin and interpretation in wood pulps," *Wood Sci. Technol.*, vol. 37, no. 6, pp. 489–494, Apr. 2004.
22. A. S. Hoffman, "Hydrogels for biomedical applications," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, pp. 18–23, Dec. 2012.
23. J. H. Lee, H. W. Jung, I. K. Kang, and H. B. Lee, "Cell behaviour on polymer surfaces with different functional groups.," *Biomaterials*, vol. 15, no. 9, pp. 705–11, Jul. 1994.