

## PROPIEDADES AUTOLIMPIANTES Y ANTIMICROBIANAS DE PELÍCULAS DE QUITOSANO FUNCIONALIZADAS CON NANOPARTÍCULAS DE UREA/TiO<sub>2</sub>

J. Perez-Obando<sup>1</sup>; D. Marin-Silva<sup>2</sup>; A. Pinotti<sup>2,3</sup>, L. Pizzio<sup>4</sup>; P. Osorio-Vargas<sup>1</sup>; J. Rengifo-Herrera<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidad Tecnológica de Pereira, Escuela de Química, Risaralda, Colombia

<sup>2</sup>Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA-UNLP-CIC-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. <sup>3</sup>Facultad de Ingeniería, UNLP.

<sup>4</sup> Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas (CINDECA), Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP-CCT La Plata, CONICET.

[julianandres.rengifo@gmail.com](mailto:julianandres.rengifo@gmail.com)

### INTRODUCCIÓN

Las propiedades autolimpiantes de superficies de TiO<sub>2</sub> son el resultado de un efecto sinérgico entre la luz UV que induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre la superficie, que atacan moléculas orgánicas adsorbidas y la superhidrofilicidad que conduce a la extensión de las gotas de agua. Por otra parte, el TiO<sub>2</sub> es un semiconductor con una diferencia de energía (band gap) entre la banda de valencia y la de conducción de 3,2 eV, permitiendo la producción de ROS sólo bajo irradiación UV de longitud de onda inferior a 387 nm. Pocos estudios pueden encontrarse en la literatura sobre la utilización de TiO<sub>2</sub> modificado con nitrógeno activado por medio de luz visible como material autolimpiante. Por ejemplo, Irie *et al.* (2003) y Premkumar (2004) encontraron que películas delgadas de TiO<sub>2</sub> dopadas con N<sub>2</sub> depositadas sobre SiO<sub>2</sub> mostraron super hidrofiliicidad bajo luz visible.

Ambos autores sugirieron que la actividad a la luz visible sería causada por la disminución del valor del band gap, como fue descrito por Asahi *et al.* (2001).

Por otra parte, polímeros biodegradables pueden usarse como sustratos de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> para ser evaluados como superficies autolimpiantes. El quitosano (QS) es un poliaminosácarido lineal compuesto por unidades monoméricas, N-acetil glucosamina y D-glucosamina, unidas a través de enlaces glucosídicos β-(1-4) (Lamarra *et al.* 2017).

El QS es un polímero natural con hidrofiliicidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad y con propiedades no tóxicas que ha sido estudiado como un sustrato para inmovilizar nanopartículas de TiO<sub>2</sub>. Sin embargo, la mayor parte de parte de los estudios ha sido dirigidos a la absorción de tintes orgánicos de ambientes marítimos, inactivación de bacterias y apósitos cicatrizante de heridas (Archana *et al.* 2013).

En este contexto, los objetivos del trabajo fueron obtener matrices utilizando quitosano como material soporte de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> estudiando sus propiedades físico-químicas, antimicrobianas y autolimpiantes.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### **Preparación de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>**

Se preparó una solución de isopropóxido de titanio (Aldrich, 26,7 g) con etanol absoluto (Merck, 186,6 g) bajo atmósfera de N<sub>2</sub> y temperatura ambiente, agitando en forma continua. Seguidamente se agregó una solución alcohólica de urea (en relaciones de 10, 30 y 60% p/p) con un volumen apropiado de HCl 0.28 M y se agitó vigorosamente por 2 h. El gel se secó a temperatura ambiente, se molió y se calcinó a 400°C durante 1h.

El material obtenido se lavó 3 veces usando un ultrasonicador durante 3 min en agua Milli-Q, se filtró y se secó a 60°C durante 24 h. Los materiales sintetizados se nombraron UTiO<sub>2</sub>-10, UTiO<sub>2</sub>-30 y UTiO<sub>2</sub>-60.

#### **Obtención de películas a base de quitosano**

Las suspensiones filmogénicas de quitosano (QS) se prepararon por disolución de QS 1% (p/v) en una solución al 1% (v/v) de ácido acético. Posteriormente diferentes concentraciones de UTiO<sub>2</sub> se dispersaron para obtener relaciones QS:UTiO<sub>2</sub> 70:30 y 50:50 (% en peso). Las muestras se homogeneizaron utilizando un equipo sonicador Sonic Vibra-Cell y las películas se obtuvieron por moldeo y secado a 37°C. Las películas funcionalizadas se llamaron 70QS/30UTiO<sub>2</sub>-X o 50QS/50UTiO<sub>2</sub>-X (donde X representa el porcentaje de urea).

#### **Espectroscopía de reflectancia difusa (DRS)**

Los espectros de reflectancia difusa se obtuvieron usando un espectrofotómetro UV-visible Lambda 35 (Perkin Elmer), equipado con una cámara reflectancia difusa Labsphere RSA-PE-20 con una esfera integradora de 50 mm de diámetro.

#### **Análisis por microscopía de fuerza atómica**

El análisis por microscopía de fuerza atómica (AFM) fue realizado con un microscopio MFP-3D Infinity (Oxford Instruments) en modo no-contacto. Las medidas se hicieron por duplicado y las escalas fueron 14, 5 y 2 μm con un *set point* y una frecuencia de escaneo de 519 mV y 0,53 Hz, respectivamente.

#### **Espectroscopía de infrarrojo (ATR-FTIR)**

Los espectros ATR-FTIR de las muestras se registraron por medio de un equipo Nicolet, iS10 Thermo Scientific (Madison, USA) en el rango 4000-400 cm<sup>-1</sup> por acumulación de 32 barridos con una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>, sobre un cristal de diamante (Smart iTX).

#### **Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Los estudios de la morfología de las películas se realizaron por microscopía electrónica de barrido con un SEM Philips 505, sobre muestras criofracturadas por inmersión en N<sub>2</sub> líquido. Las muestras colocadas sobre tacos de bronce con una cinta bifaz fueron metalizadas con oro.

#### **Difracción de rayos X (DRX)**

Las películas formuladas a base de quitosano fueron analizadas por difracción de rayos X usando un equipo Philips PW 1732. Se operó con radiación CuK (1.542 Å) a temperatura ambiente a 40 kV y 30 mA. La intensidad relativa fue registrada en el rango de (2θ) 5-60°.

#### **Propiedades antimicrobianas**

Las propiedades antimicrobianas se estudiaron siguiendo el protocolo descrito por Lamarra *et al.* (2017) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (SA) y *Escherichia coli* ATCC 25922 (EC). Se empleó el método de difusión en agar, colocando discos de películas sobre la superficie de placas de Petri previamente inoculadas con el patógeno. Placas sin películas fueron incluidas como control de crecimiento del patógeno. Las placas se incubaron bajo luz visible y se midieron los halos de inhibición.

#### **Experimentos de fotoblanqueo**

Muestras de películas de 2 x 2 cm<sup>2</sup> QS/UTiO<sub>2</sub>-X se usaron para los experimentos. Luego, 80 μL de una solución etanólica de verde de malaquita (MG, 1x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>) se agregaron sobre las muestras y se secaron a temperatura ambiente. Para la irradiación se usó como fuente de luz una lámpara de 200 W Xe-Arc (Newport, USA). Este sistema se equipó con filtros (Newport, USA) los cuales permiten pasar radiaciones superiores a 320 nm y 450 nm. La emisión UVA se

medió usando un medidor Lutron YK-35UV UV que dió un valor de  $35 \text{ W m}^{-2}$ . La evolución de la principal banda de absorción del colorante MG (624 nm) se registró mediante la técnica DRS en función del tiempo de irradiación y la degradación del MG también se siguió por ATR-FTIR.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización de nanopartículas $UTiO_2$

El patrón de difracción de rayos X (Figura 1a) mostró la presencia de picos localizados a  $2\theta = 24.9^\circ$  (101),  $37.9^\circ$  (004),  $47.8^\circ$  (200) y  $54.3^\circ$  (211) atribuidos a la forma anatasa del  $TiO_2$  (Pizzio *et al.* 2008)

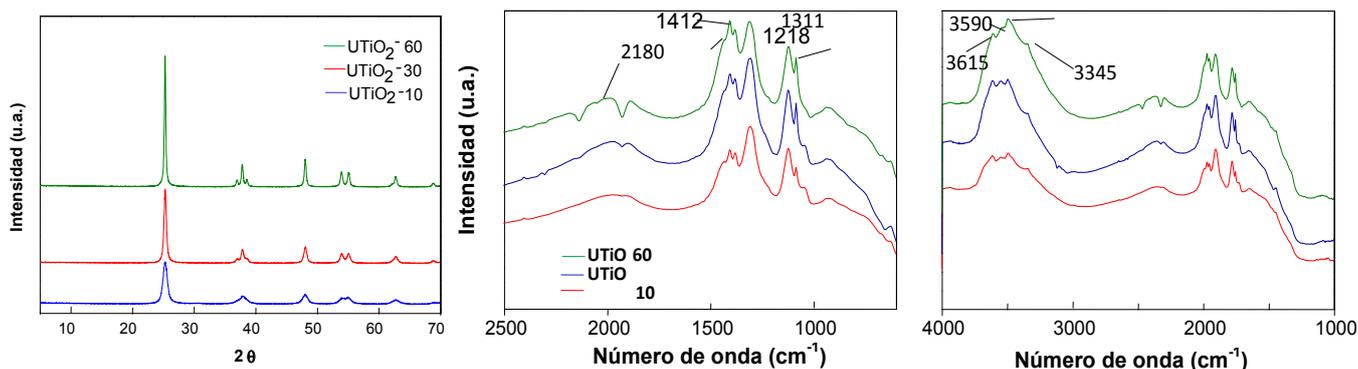


Figura 1. a) Difractograma de rayos X y ATR-FTIR de nanopartículas de  $TiO_2$  modificadas con urea de nanopartículas de  $UTiO_2$ ; b) región espectral  $2500-800 \text{ cm}^{-1}$ , c) región espectral  $4000-1000 \text{ cm}^{-1}$ .

El espectro ATR-FTIR de la Figura 1b y c mostró bandas localizadas a 3345, 3490, 3590 y 3615  $\text{cm}^{-1}$  asignados a las uniones N-H. Otro grupo de señales se detectaron a 1589, 1412, 1311 y 1218  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a los enlaces N=C y N-C. Las mismas son asignadas a especies nitrogenadas denominadas “melon”.

### Caracterización de películas de quitosano conteniendo nanopartículas de $UTiO_2$

Las micrografías obtenidas por SEM (Figura 2) muestran la superficie rugosa de las matrices relacionada con la presencia de nanopartículas de  $TiO_2$  modificadas con urea. Además, el mapa EDS siguiendo la línea  $K\alpha_1$  del Ti reveló que las nanopartículas  $UTiO_2$  estuvieron homogéneamente dispersas en la matriz de quitosano. Resultados similares se obtuvieron en el caso de las películas 50QS/50 $UTiO_2$ .

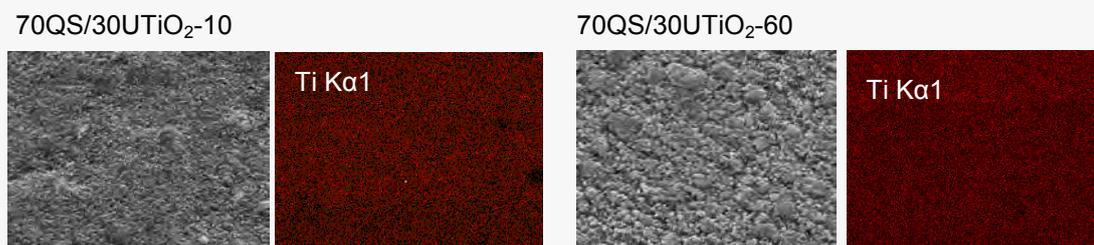


Figura 2. Micrografías obtenidas por SEM de películas 70QS/30 $UTiO_2$  con diferentes relaciones de urea. Mapa de distribución EDS siguiendo la línea  $K\alpha_1$  del Ti.

Los espectros DRS de películas conteniendo 30% de nanopartículas  $UTiO_2$  (% peso) (Figura 3) (70QS/30 $UTiO_2$ ) exhibieron la absorción UV correspondiente al quitosano independientemente de la concentración de urea. Sin embargo, las curvas de absorbancia mostraron la aparición de

un hombro entre 400 y 500 nm vinculado a la presencia de nanopartículas  $\text{UTiO}_2$ . Resultados similares fueron encontrados realizando ensayos sobre películas  $50\text{QS}/50\text{UTiO}_2$ .

La topografía de las películas usando la técnica AFM se analizó sobre áreas de  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ . La película QS mostró una superficie suave y de baja rugosidad (Figura 4a). Por otra parte, las matrices  $70\text{QS}/30\text{UTiO}_2-10$  y  $50\text{QS}/50\text{UTiO}_2-10$  (Figura 4b y c) expusieron superficies con mayor rugosidad confirmada por datos de la desviación cuadrática media de la rugosidad (RMS). Estos resultados revelaron que la presencia de nanopartículas  $\text{UTiO}_2$  produjeron cambios en las propiedades superficiales de las películas QS.

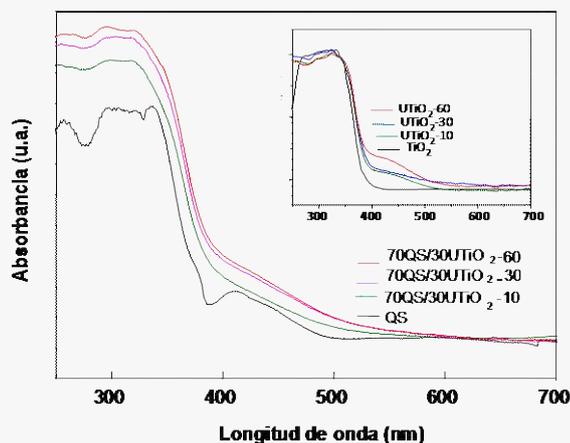


Figura 3. Espectro DRS de películas de quitosano funcionalizadas ( $70\text{QS}/30\text{UTiO}_2\text{-X}$ ) conteniendo nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  modificadas con urea con diferentes relaciones U: $\text{TiO}_2$  (% peso). La Figura inserta muestra los espectros DRS de nanopartículas de  $\text{UTiO}_2$ .

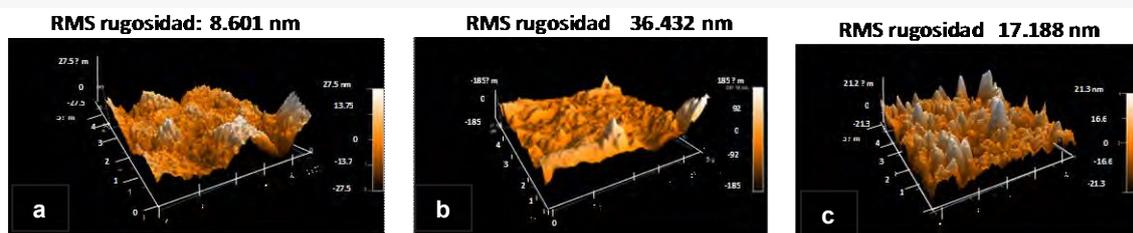


Figura 4. Imágenes en tres dimensiones obtenidas por AFM en modo no-contacto de películas: a) QS, b)  $70\text{QS}/30\text{UTiO}_2-10$  y c)  $50\text{QS}/50\text{UTiO}_2-10$

Las películas  $\text{QS}/\text{UTiO}_2$  tratadas con soluciones etanólicas de MG fueron irradiadas durante 6 h con diferentes longitudes de onda.

La Figura 5a muestra los resultados obtenidos bajo irradiación UVA+visible (320-800 nm). Experimentos realizados con matrices  $70\text{QS}/30\text{UTiO}_2$  revelaron una actividad de fotoblanqueo significativa.

La absorbancia normalizada en función del tiempo de irradiación (Figura 5b) mostró que las películas con nanopartículas  $\text{UTiO}_2$  preparadas con el 10% de urea ( $70\text{QS}/30\text{UTiO}_2-10$ ) presentaron la mayor actividad fotoblanqueante. Asimismo, las muestras  $50\text{QS}/50\text{UTiO}_2$  (no mostrada) tuvieron un comportamiento similar

El espectro de absorción del verde de malaquita fue adquirido por DRS para diferentes tiempos de irradiación para las películas  $70\text{QS}/30\text{UTiO}_2-10$  (Figura 6a y b) y  $50\text{QS}/50\text{UTiO}_2-10$  (datos no mostrados). Dos rasgos fueron identificados: (i) la intensidad de la principal banda de absorción del MG disminuyó a medida que aumentó el tiempo ( $\text{max}=624 \text{ nm}$ ) y (ii) esta banda

sufrió un corrimiento hacia menores longitud de onda (593 nm) causado probablemente por la N-dimetilación del colorante (Figura 6a) (Rengifo-Herrera *et al.* 2014).

Las determinaciones de ATR-FTIR sobre películas 70QS/30UTiO<sub>2</sub>-10 (Figura 6b) mostraron que después de 6 h de irradiación con luz UVA+visible, las bandas ubicadas a 2800 y 1375 cm<sup>-1</sup> correspondientes a los enlaces C-H y C-N del grupo -CH<sub>3</sub>, sufrieron una reducción en su intensidad.

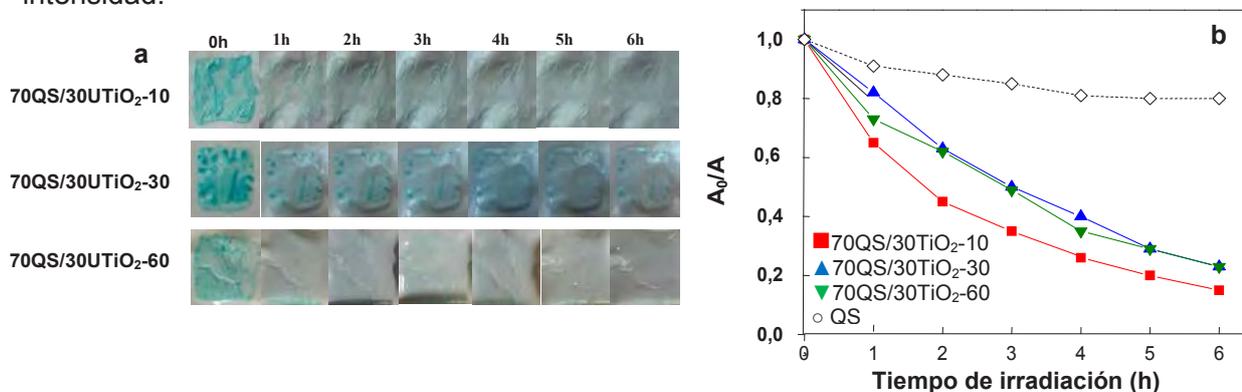


Figura 5. a) Evolución del fotoblanqueo del colorante MG ( $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>) durante 6 h sobre películas 70QS/30UTiO<sub>2</sub>-X bajo irradiación UVA+visible (320–800 nm) usando una lámpara de 200W Xe-Arc. b) Plot de absorbancia normalizada a 624 nm en función del tiempo para películas 70QS/30UTiO<sub>2</sub>-X.

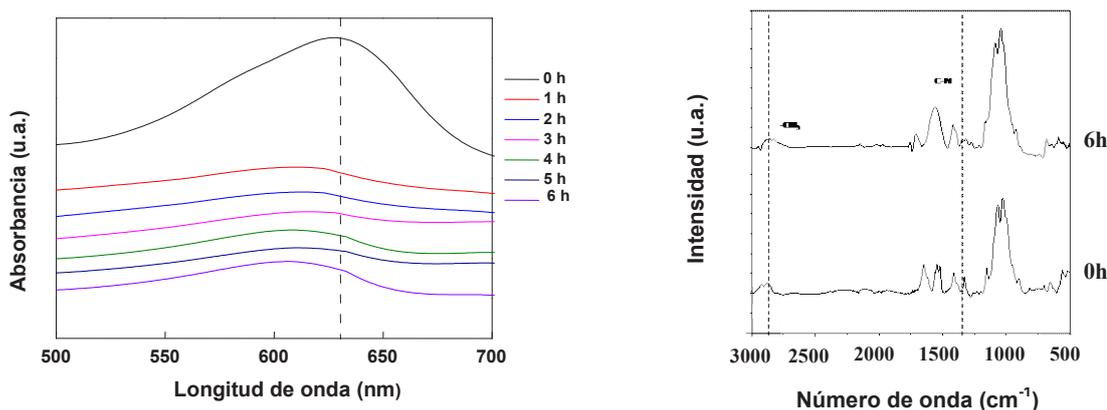


Figura 6. a) Evolución de la banda de absorción ubicada a 624 del colorante MG durante la irradiación con luz UVA+visible (320-800 nm) sobre películas 70QS/30UTiO<sub>2</sub>-10; b) ATR-FTIR de las películas 70QS/30UTiO<sub>2</sub>-10 tratadas con el colorante MG. Se realizó la sustracción de las bandas correspondientes a QS y UTiO<sub>2</sub>.

Por otra parte, bajo irradiación con luz visible (450-800 nm), donde tanto las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> modificadas con urea como la el verde de malaquita pueden absorber luz, las fotografías revelaron un significativo fotoblanqueo del colorante (datos no mostrados) sobre las películas 70QS/30UTiO<sub>2</sub>-10 y 50QS/50UTiO<sub>2</sub>-10.

El espectro ATR-FTIR de 70QS/30UTiO<sub>2</sub>-10 tratada con verde de malaquita mostró que el pico a 2800 cm<sup>-1</sup> correspondiente al -CH<sub>3</sub> del colorante, no fue afectado. Sin embargo, una nueva banda localizada a 1620 cm<sup>-1</sup> apareció después de 6 h de irradiación. Esta banda podría ser asignada a las vibraciones -C=O de las cetonas. Estudios previos han mostrado que el verde de malaquita podría recibir un ataque oxidativo del oxígeno singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) conduciendo a la producción de benzofenonas. Así, estas vibraciones -C=O podrían ser asignadas a la presencia de estas sustancias químicas.

Como se muestra en la Tabla 1 las películas cargadas con nanopartículas y en contacto directo con los patógenos presentaron un efecto bacteriostático contra los microorganismos ensayados. En el caso de la EC se observó la formación de un halo de inhibición alrededor de las películas mientras que la inhibición del crecimiento microbiano del SA se produjo por contacto de la película con el medio de cultivo.

Tabla 1. Diámetro total de inhibición (Dti) e inhibición por contacto (Ic) para los microorganismos ensayados.

| Microorganismos                      | Ahi (cm <sup>2</sup> ) | Ic  |
|--------------------------------------|------------------------|-----|
| <i>Escherichia coli</i> (EC)         | 4.8                    | +   |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>(SA) | nd                     | -/+ |

Ahi: área total de inhibición. Ic: inhibición por contacto.  
+: representa inhibición; -/+: inhibición parcial

## CONCLUSIONES

Las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> modificadas con urea mostraron absorción de luz visible, posiblemente debido a la formación de subproductos de la termólisis de la urea, tales como el melón. Todas las matrices QS/UTiO<sub>2</sub> expusieron alta actividad fotoblanqueante del verde de malaquita bajo diferentes longitudes de onda. Cuando se emplea radiación UVA, tienen lugar los procesos fotocatalíticos clásicos que implican agujeros en la banda de valencia o radicales <sup>•</sup>OH, que serían responsables del efecto de fotoblanqueo. Bajo irradiación con luz visible, especialmente luz azul (400-500 nm), el “melón” jugaría un papel clave que podría producir tanto radicales <sup>•</sup>OH como oxígeno singlete, las que serían las principales especies oxidativas que conducen al fotoblanqueo del verde de malaquita. Adicionalmente, las matrices QS/UTiO<sub>2</sub> mostraron actividad antimicrobiana frente a *S.aureus* y *E.coli*.

## REFERENCIAS

- Archana, D., Singh, B.K., Dutta, J., Dutta, P.K. (2013). In vivo evaluation of chitosan–PVP–titanium dioxide nanocomposite as wound dressing material. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 530-539.
- Asahi, R.Y., Morikawa, T.A., Ohwaki, T., Aoki, K., Taga, Y. (2001). Visible-light photocatalysis in nitrogen-doped titanium oxides. *Science*, 293(5528), 269-271.
- Irie, H., Washizuka, S., Yoshino, N., Hashimoto, K. (2003). Visible-light induced hydrophilicity on nitrogen-substituted titanium dioxide films. *Chemical Communications*, (11), 1298-1299.
- Lamarra, J., Giannuzzi, L., Rivero, S., Pinotti, A. (2017). Assembly of chitosan support matrix with gallic acid-functionalized nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, 79, 848–859.
- Premkumar, J. (2004). Development of super-hydrophilicity on nitrogen-doped TiO<sub>2</sub> thin film surface by photoelectrochemical method under visible light. *Chemistry of Materials*, 16(21), 3980-3981.
- Rengifo-Herrera, J. A., Blanco, M. N., Pizzio, L. R. (2014). Visible light absorption of TiO<sub>2</sub> materials impregnated with tungstophosphoric acid ethanol–aqueous solution at different pH values. *Materials Research Bulletin*, 49, 618-624.
- Rengifo-Herrera, J.A., Pizzio, L.R., Blanco, M.N., Roussel, C., Pulgarin, C. (2011). Photocatalytic discoloration of aqueous malachite green solutions by UV-illuminated TiO<sub>2</sub> nanoparticles under air and nitrogen atmospheres: effects of counter-ions and pH. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 10, 29-34.