



Elaboración de matrices de celulosa con propiedades antimicrobianas para su aplicación en periodoncia

Development of cellulose matrix with antimicrobial properties for application in periodontics

Karla Lizette Tovar Carrillo,* Ricardo Peralta Estrada,[‡] Rodolfo Edgardo González Calderón,[§] León Francisco Espinosa Cristóbal,* Juan Carlos Cuevas González,[¶] Dalia Abril Guzmán Gastelum,[‡] José Luis Osornio Rojas,* Alma Graciela García Calderón,[‡] Alejandro Donohue Cornejo,[¶] Eligio Valera González[‡]

RESUMEN

Introducción: La creación y utilización de diferentes tipos de biomateriales para procedimientos de rehabilitación y regeneración de tejidos es de gran interés en la actualidad. Los hidrogeles de celulosa son biomateriales utilizados para ingeniería de tejidos por tener varias cualidades como biocompatibilidad, no presentan toxicidad, no provocan inflamación y son biodegradables, son adsorbidos en el organismo después de cumplir su función, de fácil procesamiento y con una durabilidad aceptable. El uso de estructuras poliméricas en la regeneración de tejido tuvo sus inicios en la utilización de membranas de diferentes tipos de polímeros como el politetrafluoroetileno (PTFE) o membranas de colágeno para la regeneración de la unión órgano dental-encía. Es bien conocido que la excelente biocompatibilidad y seguridad dentro de los polímeros naturales incluyen colágeno, quitosán, quitina, almidón y celulosa es resultado de sus características biológicas. **Objetivo:** Esta investigación se enfocó en desarrollar hidrogeles de celulosa con fines regenerativos adicionados con digluconato de clorhexidina, hidróxido de calcio y ozono como método antimicrobiano. **Diseño:** Se realizaron hidrogeles en cuatro etapas que incluyeron: 1) el lavado de fibras de *Agave tequilana* Weber; 2) la elaboración de la solución; 3) el de intercambio de solventes y 4) las pruebas microbiológicas. **Resultados:** Los resultados obtenidos experimentalmente nos indican que el diseño propuesto resultó ser efectivo y eficaz para lograr la inhibición *in vitro*. **Conclusiones:** La continuación del

ABSTRACT

Introduction: The creation and use of different types of biomaterials for tissue rehabilitation and regeneration procedures is an interesting topic today. Cellulose hydrogels are biomaterials used for tissue engineering because of their qualities such as biocompatibility, absence of toxicity and inflammation, they are biodegradable and adsorbed by the body after fulfilling their function, they are easy to process and have an acceptable durability. The use of polymeric structures in tissue regeneration began with the development of membranes of different types of polymers such as PTFE or collagen membranes for dental organ-gum junction regeneration. It is well known that excellent biocompatibility and safety within natural polymers including collagen, chitosan, chitin, starch, and cellulose is a result of their biological characteristics. **Objective:** The aim of this study was to develop cellulose hydrogels with regenerative purposes added with chlorhexidine digluconate, calcium hydroxide and ozone as an antimicrobial method. **Design:** Hydrogels were made in four stages that included: 1) washing *Agave tequilana* Weber fibers; 2) elaboration of the solution; 3) exchange of solvents and 4) microbiological tests. **Results:** The results obtained experimentally indicate that the proposed design turned out to be effective and efficient to achieve inhibition *in vitro*. **Conclusions:** The continuation of the research process with *in vivo* designs would be one of the ways to avoid the high cost of regenerative treatments in periodontics and thus avoid damage to the budget of our patients.

www.medigraphic.org.mx

* Docente del programa de la Maestría en Ciencias Odontológicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. México.

[‡] Docente del programa de la Especialidad en Periodoncia de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. México.

[§] Cirujano Dentista Especialista en Periodoncia de práctica privada. México.

[¶] Docente del programa de la Especialidad en Patología y Medicina Bucal de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. México.

Recibido: 15 de junio de 2021. Aceptado: 07 de octubre de 2021.

Citar como: Tovar CKL, Peralta ER, González CRE, Espinosa CLF, Cuevas GJC, Guzmán GDA et al. Elaboración de matrices de celulosa con propiedades antimicrobianas para su aplicación en periodoncia. Rev Mex Periodontol. 2021; 12 (1-3): 7-11. <https://dx.doi.org/10.35366/102953>



proceso de investigación con diseños *in vivo* sería uno de los caminos para evitar el elevado costo que tienen los tratamientos regenerativos en la periodoncia y así evitar estragos en el presupuesto de nuestros pacientes.

Palabras clave: Celulosa, antimicrobiana, matrices.

Keywords: Cellulose, antimicrobial, films.

En la naturaleza, la celulosa es el material estructural de las células vegetales y es el recurso natural más abundante en el planeta tierra.¹⁻³ Un hidrogel es una biomasa que tiene como finalidad aplicarse como andamio para la regeneración de tejidos.^{4,5} Se han fabricado hidrogeles a base de polímeros como el hialuronato, chitosán y sus derivados, en el cual existe un gran potencial en el área de los biomateriales.^{3,6-8} Un hidrogel con base en celulosa es una red polimérica tridimensional entrecruzada, la cual es capaz de absorber agua o fluidos corporales, hincharse sin disolverse y, con el tiempo, ser degradada de forma natural por el organismo sin causar daño alguno.⁹ Trabajar con polímeros naturales como la celulosa incrementa las propiedades de adhesión celular y formación de tejido del hidrogel, gracias a su hidrofilicidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad. En la actualidad, los polímeros naturales son los que más se utilizan como base para la regeneración de tejidos y como cualquier material de uso biomédico, tienen que cumplir una serie de requisitos, tales como ser compatibles con el organismo receptor, es decir, no generar rechazo ni alteraciones y ser biodegradables teniendo una vida media para poder desempeñar su objetivo.^{3,9} De acuerdo con la capacidad para ser eliminados, los polímeros se clasifican en biodegradables y no biodegradables. Entre los polímeros biodegradables se encuentran los naturales, como el colágeno, la celulosa, el quitosano, etc. La celulosa es el polímero biodegradable natural más abundante, y el acetato de celulosa y la hidroxiethylcelulosa como polímeros biodegradables naturales modificados.^{10,11} Los polímeros biodegradables como la celulosa no provocan algún proceso inflamatorio o tóxico, son absorbidos en el organismo después de cumplir su función, de fácil procesamiento, durabilidad aceptable y fácil esterilización.¹²⁻¹⁵ Entre los factores que influyen en las propiedades mecánicas en este grupo, se pueden señalar: la selección del monómero y del iniciador de reacción, la presencia de aditivos y las condiciones de procesado. Por otro lado, los factores que influyen en la velocidad de degradación de estos polímeros son: las características del polímero (presencia de enlaces químicos susceptibles a la hidrólisis); la estereoquímica; la hidrofilicidad; el peso molecular; la cristalinidad; las características específicas de la superficie; la temperatura de transición vítrea y de

fusión; la presencia de monómero residual o aditivos y distribución de la secuencia y las condiciones del medio (como temperatura, humedad, y pH). Por lo cual se propone adecuar un hidrogel derivado celulósico presente en el deshecho del agave, reduciendo su costo y el impacto ambiental y permitiendo generalizar su uso en el sector público de salud modificando sus características para conferir propiedades antimicrobianas al material.^{3,9,10}

MATERIAL Y MÉTODOS

La preparación del hidrogel consistió en obtener la celulosa a partir de la biomasa del deshecho de la planta del agave de la industria tequilera en México para la preparación del hidrogel, empleando para ello hidróxido de sodio (NaOH), ácido sulfúrico e hipoclorito de sodio (NaOCl), para el tratamiento de las fibras y posteriormente utilizando N-dimetilacetamida (DMAC) y cloruro de litio (LiCl) para obtener la solución de celulosa.³

Las fibras fueron lavadas tres veces con agua destilada para remover restos de azúcar por el proceso de manufactura de las fibras y se dejaron secar por dos días. Para el tratamiento de fibras se tomaron 3 g de fibras y se sumergieron en 1,000 mL de NaOH al 10% en constante agitación por 12 horas con una temperatura de 100 °C hasta que se obtuvo un líquido color negro. Posteriormente, se volvieron a lavar las fibras con abundante agua destilada cinco veces para eliminar los residuos de la solución de NaOH en las fibras. Se procedió a pasar las fibras a 1,000 mL de agua destilada pura, agitando constantemente a temperatura ambiente por 24 horas. Después de que las fibras se filtraron, se agregaron 1,000 mL de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) al 4% y se mantuvo en agitación por un periodo de 2 horas a 100 °C. Nuevamente se lavaron las fibras con abundante agua destilada cinco veces hasta que los residuos de H₂SO₄ fueron eliminados. Se agregaron 10 vol. % NaOCl como un agente blanqueador para obtener unas fibras de color blanco para la preparación de la solución de celulosa. Las fibras se sumergieron en 1,000 mL de NaOCl y agitadas a temperatura ambiente por un periodo de 2 horas. Finalmente, fueron lavadas cinco veces con abundante agua destilada y se dejaron secar por un periodo de dos días.

Para la preparación de la solución de celulosa de agave, las fibras previamente tratadas fueron utilizadas en la solución de DMAc/LiCl. Las fibras tratadas se dejaron en agitación en 300 mL de agua destilada de la noche a la mañana para permitir un hinchamiento. Después de que se removió el agua de la suspensión y se agregaron 300 mL de etanol a las fibras ya hinchadas y la mezcla se agitó por 24 horas. Se removieron los 300 mL de etanol y se colocaron a 300 mL de DMAc. Las fibras se dejaron de un día a otro en agitación. Se les agregaron LiCl y DMAc para obtener 1 wt% de concentración de solución tratada de agave.¹⁶ La solución se agitó a temperatura ambiente por un periodo de tres días hasta obtener una solución viscosa. Al obtener la solución de celulosa y antes de la preparación de las películas, la solución se ozonizó durante 15 min.¹⁷ Para la preparación de los hidrogeles, se pesaron 10 g de solución y se colocó en una tapa de caja de Petri estéril para transferirlo a un contenedor con 40 mL de etanol por 12 horas y generar la coagulación y obtener los hidrogeles por el método de fase inversa. Después del método de fase inversa, se obtiene un hidrogel transparente. El hidrogel se lava con etanol tres veces y después se pasa a una caja de plástico con agua destilada, y se deja en agitación por 24 horas para eliminar los restos de DMAc. La cantidad de digluconato de clorhexidina e hidróxido de calcio fue variada de 0.1 a 0.025 g, respectivamente.¹⁷⁻²⁰ Los compuestos

mencionados fueron añadidos a la solución de celulosa antes de la coagulación de la película, respectivamente.

Para el ensayo microbiológico se utilizaron cepas de *S. mutans* ATCC 25923 y *E. faecalis* ATCC 29212, en medio de cultivo agar Mueller-Hinton. Para preparar el medio de cultivo, se pesaron 19 g de agar Mueller-Hinton en 500 mL de agua destilada y se esterilizó para preparación de placas. Para la extensión en placa, las muestras de los microorganismos en la superficie de la placa de agar se extendieron mediante micropipeta (100 μ L) y extendiendo la muestra con un asa de Digirsky de cristal estéril.

RESULTADOS

El contenido de digluconato de clorhexidina e hidróxido de calcio añadidos a las soluciones de celulosa varió. Al preparar las películas de los hidrogeles con los compuestos activos, no se observó cambio aparente en las propiedades físicas de las películas obtenidas (Figura 1).

Se obtuvo un hidrogel de forma homogénea sin problemas de fisuras, solamente la coloración fue un poco más turbia no tan clara, a diferencia de los hidrogeles de hidróxido de calcio, entre más cantidad de hidróxido de calcio, más frágil es el hidrogel y la fisura era más común, pues las partículas del hidróxido de calcio no lograron disolverse por completo durante el periodo de agitación para la disolución del hidróxido en la solución de pulpa de celulosa; de cualquier modo, quedó suficiente estructura intacta para poder realizar las pruebas de inhibición bacteriana.

En el caso del ensayo microbiológico, se emplearon *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* en medio

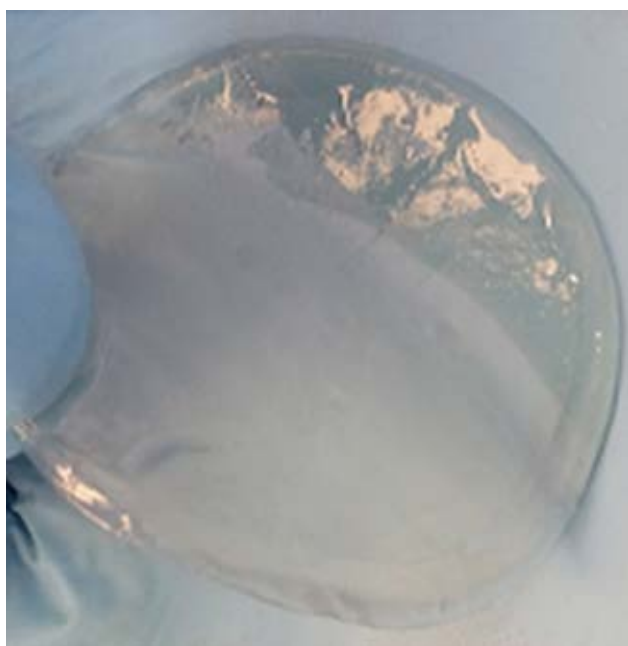


Figura 1: Película de celulosa enriquecida con hidróxido de calcio.

Tabla 1: Resultados de halos de inhibición del ensayo microbiológico de las películas de celulosa obtenidas.

	<i>S. mutans</i> (mm)	<i>E. faecalis</i> (mm)
Digluconato de clorhexidina (g)		
0.1	3.0	2.0
0.075	2.7	1.6
0.05	2.1	1.2
0.025	1.8	1.0
Hidróxido de calcio (g)		
0.1	1.0	0.5
0.075	0.8	S/I
0.05	0.6	S/I
0.025	0.5	S/I

S/I = sin inhibición.

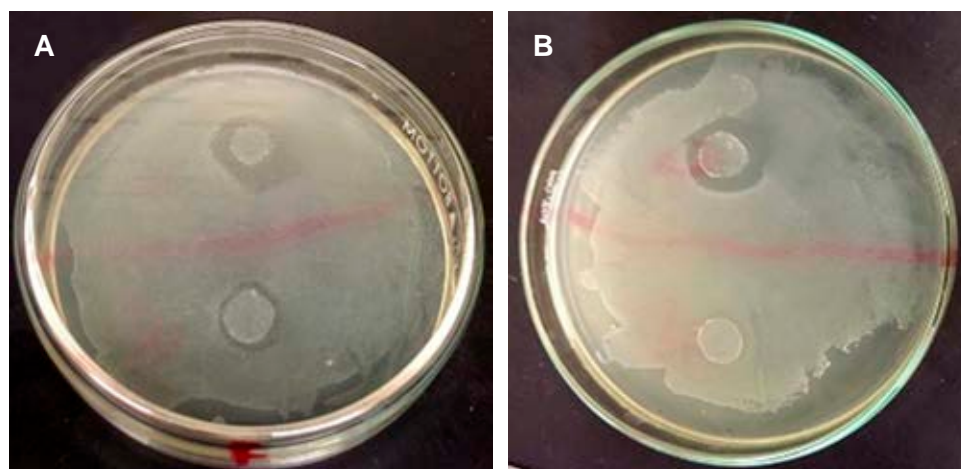


Figura 2:

Placas con halos de inhibición usando digluconato de clorhexidina e hidróxido de calcio 0.1 g, respectivamente, **A)** *S. mutans* y **B)** *E. faecalis*.

de cultivo de Hinton. Las bacterias fueron sembradas y se coloraron círculos (con un diámetro de 6 mm) de hidrogeles de cada una de las diferentes muestras preparadas. Los halos de inhibición fueron observados en películas de hidrogeles elaboradas tanto con digluconato de clorhexidina (DC) e hidróxido de calcio (HC) (Tabla 1). De igual manera, cabe destacar que un mayor halo de inhibición fue observado en muestras elaboradas con digluconato de clorhexidina (Figura 2).

DISCUSIÓN

Los materiales utilizados como andamios en la regeneración de tejidos deben cumplir con un número de requerimientos bastante complejos, como biocompatibilidad, biodegradabilidad, estructura porosa apropiada, propiedades mecánicas y una superficie química adecuada. Gracias a que no son tóxicos, son biocompatibles y biodegradables, los biopolímeros se han vuelto los materiales más atractivos para producir andamios en ingeniería tisular, al ser materiales muy versátiles.¹⁵ Los seres humanos poseen una microbiota oral dominada por bacterias anaerobias, donde el número de bacterias en la cavidad bucal es de alrededor de bacterias/g de placa dental y bacterias/mL de saliva.²¹⁻²³ El uso de agentes antimicrobianos para la eliminación de microorganismos que causan enfermedades infecciosas ha sido discutido por muchos años. La clorhexidina tiene el potencial de reducir los niveles de *Streptococcus mutans* en saliva y reducir su actividad cariogénica en la placa.^{18,19} Las propiedades antimicrobianas del hidróxido de calcio se le pueden atribuir a la liberación de iones de hidroxilo altamente reactivos y que su mecanismo de acción puede ser adscrito en los mecanismos de destrucción de la membrana citoplasmática de la bacteria; lisis de proteínas y daño al ADN bacteriano.²⁰

La acción microbicida del ozono es un proceso complejo al actuar en varios componentes celulares, incluyendo proteínas, lípidos no saturados y enzimas respiratorias en membranas celulares, peptidoglicanos en sobres celulares, enzimas y ácido nucleico en el citoplasma, proteínas y peptidoglicanos en recubrimiento de esporas. En los virus, el ozono inactiva bacteriófagos F2 y T4 al atacar la cápsula proteica para liberar e inactivar los ácidos nucleicos.¹⁷ La literatura no marca un procedimiento en específico para la aplicación de ozono, digluconato de clorhexidina o hidróxido de calcio a la solución de hidrogeles de celulosa, se experimentó con varios tipos de procedimientos para el ozono y por la naturaleza del ozono, al ser un gas inestable, no se logró una unión con el hidrogel, se descubrió el efecto de preservación que tiene el ozono, de tal manera que se utilizó como mantenedor de hidrogeles en un medio acuoso, proporcionándole al hidrogel un medio aséptico y manteniéndolo libre de la formación de hongo prolongando el tiempo de conservación.^{15,23-27} Por otra parte, respecto al tratamiento de fibras, fue posible extraer una mayor cantidad de lignina de las fibras de agave mediante tratamiento con NaOH. Después de un tratamiento ácido y alcalino, pudo extraerse lignina, hemicelulosa, ceras y demás componentes de las fibras de agave. Posteriormente, un proceso de blanqueamiento de las fibras tratadas fue necesario. De igual manera, en la preparación de las soluciones de celulosa, una solución transparente y viscosa fue obtenida. Finalmente, mediante la coagulación de la solución de celulosa fue posible obtener películas delgadas transparentes de hidrogeles suaves al tacto y elásticos. En cuanto al ensayo microbiológico, no fue posible incluir el ozono durante el ensayo. Los resultados mostraron diferencia significativa en el tamaño de los halos de inhibición obtenidos al utilizar digluconato de clorhexidina e hidróxido de calcio,

siendo la clorhexidina la que mostró halos de inhibición más grandes (Tabla 1 y Figura 2). De igual manera, se pudo observar mejores resultados de inhibición en *S. mutans*.

CONCLUSIONES

La obtención de hidrogeles de celulosa con propiedades antimicrobianas enriquecidos con hidróxido de calcio y digluconato de clorhexidina fue posible. Halos de inhibición fueron observados en todas las películas de hidrogeles analizadas. Un mayor halo de inhibición fue observado en membranas elaboradas con digluconato de clorhexidina. Por otra parte, similares resultados fueron obtenidos al incrementar la concentración de hidróxido de calcio empleada. La incorporación de ozono como agente microbiano presentó resultados positivos en la preservación de la solución de celulosa y la elaboración y almacenaje de las películas de celulosa. Sin embargo, no fue posible obtener resultados positivos en la incorporación de sólo ozono durante el ensayo microbiológico.

Los resultados obtenidos experimentalmente nos indican que el diseño propuesto resultó ser efectivo y eficaz para lograr la inhibición *in vitro*, por lo que se recomienda una continuación del proyecto con pruebas *in vitro* para afianzar los resultados y pasar a las pruebas *in vivo* para los procedimientos de regeneración de tejido conectivo y tejido óseo, siendo utilizado el hidrogel en este último procedimiento como barrera para la exclusión de tejido blando en defectos óseos y permitir así una regeneración ósea adecuada.

REFERENCIAS

1. Ruozzi B, Parma B, Croce MA, Tosi G, Bondioli L, Vismara S et al. Collagen-based modified membranes for tissue engineering: influence of type and molecular weight of GAGs on cell proliferation. *Int J Pharm*. 2009; 378: 108-115.
2. Stamatialis DF, Papenburg BJ, Girones M, Saiful S, Bettahalli SNM, Schmitmeier S et al. Medical applications of membranes: drug delivery, artificial organs and tissue engineering. *J Membr Sci*. 2008; 308: 1-34.
3. Tovar-Carrillo K, Satoshi Sugita S, Motohiro T, Kobayashi T. Fibroblast compatibility on scaffold hydrogels prepared from Agave tequilana weber bagasse for tissue regeneration. *Ind Eng Chem Res*. 2013; 52: 11607-11613.
4. Yamaoka H, Asato H, Ogasawara T, Nishizawa S, Takahashi T, Nakatsuka T et al. Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. *J Biomed Mater Res A*. 2006; 78: 1-11.
5. Li Y, Mai YW, Ye L. Sisal fibre and its composites: a review of recent developments. *Compos Sci Technol*. 2000; 60: 2037-2055.
6. Lydon MJ, Minett TW, Tighe BJ. Cellular interactions with synthetic polymer surfaces in culture. *Biomaterials*. 1985; 6: 396-402.
7. De Bartolo L, Morelli S, Bader A, Drioli E. Evaluation of cell behaviour related to physico-chemical properties of polymeric membranes to be used in bioartificial organs. *Biomaterials*. 2002; 23: 2485-2497.
8. Thomas BH, Craig Fryman J, Liu K, Mason J. Hydrophilic-hydrophobic hydrogels for cartilage replacement. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2009; 2: 588-595.
9. Chen H, Yuan L, Song W, Wu Z, Li D. Biocompatible polymer materials. Role of protein-surface interactions. *Prog Polym Sci*. 2008; 33: 1059-1087.
10. Heinze T, Dicke R, Koschella A, Kull AH, Kloth EA, Koch W. Effective preparation of cellulose derivatives in a new simple cellulose solvent. *Macromol Chem Phys*. 2000; 201: 627-631.
11. Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci*. 2007; 32: 762-798.
12. Gibson LJ. Biomechanics of cellular solids. *J Biomech*. 2005; 38: 377-399.
13. Jayakumar R, Prabakaran M, Sudheesh Kumar PT, Nair SV, Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol Adv*. 2011; 29: 322-337.
14. Striegel AM. Theory and applications of DMAc/LiCl in the analysis of poly-saccharides. *Carbohydr Polym*. 1997; 34: 267-274.
15. Cima LG, Vacanti JP, Vacanti C, Ingber D, Mooney D, Langer R. Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates. *J Biomech Eng*. 1991; 113: 143-151.
16. Kobayashi T, Tovar-Carrillo KL. Fibroblast cell cultivation on wooden pulp cellulose hydrogels for cytocompatibility scaffold method. *Pharm Anal Acta*. 2015; 6: 423.
17. Johansson E, Claesson R, van Dijken JW. Antibacterial effect of ozone on cariogenic bacterial species. *J Dent*. 2009; 37: 449-453.
18. Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res*. 1977; 85: 255-265.
19. Shah S, Bargale S, Dave BH, Deshpande A, Kariya P, Karri A. Comparison of antimicrobial efficacy of (between) 0.2% chlorhexidine and herbal mouthwash on salivary streptococcus mutans: a randomized controlled pilot study. *Clin Dent*. 2018; 9 (3): 440-445.
20. Siqueira JF Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J*. 1999; 32: 361-369.
21. Díaz Zúñiga J, Yáñez Figueroa J, Melgar Rodríguez S, Álvarez Rivas C, Rojas Lagos C, Vernal Astudillo R. Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral*. 2012; 5 (1): 40-45.
22. Carroll IM, Threadgill DW, Threadgill DS. The gastrointestinal microbiome: a malleable, third genome of mammals. *Mamm Genome*. 2009; 20 (7): 395-403.
23. Mondragon JD. *Endodoncia*. México: Nueva Editorial Interamericana; 1995. p. 250.
24. Vinogradov S. Colloidal microgels in drug delivery applications. *Curr Pharm Des*. 2006; 12 (36): 4703-4712.
25. Klawitter JJ, Bagwell JG, Weinstein AM, Sauer BW. An evaluation of bone growth into porous high density polyethylene. *J Biomed Mater Res*. 1976; 10 (2): 311-323.
26. Eggli PS, Müller W, Schenk RK. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution. *Clin Orthop Relat Res*. 1988; (232): 127-138.
27. Albertson PA. *Partition of cell particles and macromolecules*. 3rd ed. New York: Wiley; 1986.

Correspondencia:

Eligio Valera González

E-mail: eligio.valera@uacj.mx