

# ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE SOPORTADAS EN UNA MATRIZ DE QUITOSANO

Hernández-Sánchez Carlos Eduardo (1), España-Sánchez Beatriz Liliana (2), Gabriel Luna Bárcenas (2), Luna Hernández Erick (2), Padilla-Vaca Luis Felipe (1)

1 [Dpto de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [padillaf@ugto.mx](mailto:padillaf@ugto.mx)

2 [Dpto de nanomateriales, CINVESTAV unidad Querétaro] | [lilyespana\\_26@hotmail.com](mailto:lilyespana_26@hotmail.com)

## Resumen

En el presente trabajo se propone la preparación, caracterización y evaluación antimicrobiana de nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de cobre (QS/nCu). Para tal efecto, se realizó un análisis comparativo de la actividad antimicrobiana entre nanocompuestos con nCu y con CuSO<sub>4</sub>. Los nanocompuestos se prepararon mediante mezclado en solución a diferentes concentraciones, empleando como matriz polimérica el quitosano. Inicialmente, se llevó a cabo la caracterización estructural de los materiales, mediante, UV vis, FTIR y SEM, con el objetivo de evaluar sus propiedades fisicoquímicas y determinar si la presencia de nanopartículas y/o iones de cobre interactúa con la molécula del biopolímero. Posteriormente se evaluó la actividad bactericida de los nanocompuestos contra las bacterias patógenas, *Staphylococcus aureus* (Gram +) y *Pseudomonas aeruginosa* (Gram -). Asimismo se analizó el grado de interacción de las bacterias con la matriz polimérica mediante microscopía confocal. Se logró observar que las nCu poseen actividad antimicrobiana y que dicha característica está directamente relacionada con la concentración de nCu y el tiempo de interacción

## Abstract

In the present work, the preparation, characterization and antimicrobial evaluation of nanocomposites based on chitosan and copper nanoparticles (QS / nCu) is proposed. For this purpose, a comparative analysis of nanocomposites with antimicrobial activity between nCu and CuSO<sub>4</sub> was performed. Nanocomposites were prepared by solution blending at different concentrations, using as polymer matrix chitosan. Initially held structural characterization of materials by UV vis, FTIR and SEM, with the aim of assessing their physicochemical properties and determine whether the presence of nanoparticles and / or copper ions interact with the molecule of the biopolymer. Subsequently bactericidal activity against pathogenic bacteria nanocomposites, *Staphylococcus aureus* (Gram +) and *Pseudomonas aeruginosa* (Gram -) were assessed. The degree of interaction of the bacteria with the polymer matrix by confocal microscopy was also examined, which. Was achieved noted that the NCU possess antimicrobial activity and said characteristic is directly related to the concentration and nCu interaction time.

## Palabras Clave

Biopolímero 1; Polímero 2; Bactericida 3; Interacción 4.

## INTRODUCCIÓN

### Biopolímeros

De acuerdo con la Asociación Europea de Bioplásticos, los biopolímeros son producidos a partir de fuentes renovables, y pueden ser completamente degradados[1]. Actualmente estos materiales constituyen uno de los campos de mayor interés debido a su biocompatibilidad y degradabilidad, ya que pueden ser utilizados como dispositivos terapéuticos. Polímeros con estas características pueden ser obtenidos tanto de fuentes naturales como de manera sintética [2].

### Quitosano (Qs)

El Qs es un polisacárido, el cual se obtiene a partir del proceso de de-acetilación de la quitina. Dentro de sus propiedades se puede mencionar que es un polímero biocompatible, biodegradable, de bajo costo y que no genera daño o reacciones alérgicas al contacto con el cuerpo humano[3]. En los últimos años, el Qs se ha convertido en objeto de estudio debido a sus diversas aplicaciones, principalmente relacionadas con el ámbito de la salud. Recientemente, se ha reportado que las propiedades antibacterianas del quitosano se pueden potencializar al incorporar cargas nanométricas. Bajo este criterio, diversos autores han reportado la incorporación de nanopartículas metálicas, tales como cobre, plata, oro, entre otras.[4].

### Nanopartículas de Cobre (nCu)

Se ha reportado que las nCu y sus óxidos (CuO y Cu<sub>2</sub>O) cuentan con la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos [5]. Varios autores han reportado que el mecanismo de acción se debe al tamaño y forma de la partícula, así como la liberación de sus iones y la interacción de éstos con la pared de celular de las bacterias, aunque falta profundizar en el mecanismo de acción. Una de las principales características de las nCu es que presentan alta actividad antimicrobiana y que la liberación de sus iones se efectúa a largo plazo [6].

### *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

*S. aureus* es una bacteria patógena con gran potencial para desarrollar múltiples infecciones tanto en humanos como en animales. *S. aureus* es considerada la más virulenta de su género y causante de un amplio espectro de enfermedades, que van desde infecciones en piel y tejidos blandos, hasta enfermedades que comprometen la vida del paciente. Desafortunadamente, con el paso de los años, estas bacterias se han vuelto multi resistentes a antibióticos convencionales como la meticilina generando un problema de salud pública[7]

### *Pseudomona aeruginosa* (*P. aeruginosa*)

Esta bacteria es capaz de producir una gran variedad de infecciones, siendo las infecciones nosocomiales las más comunes, debido a que el estado de salud del paciente se encuentra comprometido. Es evidente que éste es el determinante primario del potencial patogénico de los factores de virulencia. Colonizando principalmente superficies húmedas como oído, axilas y periné[8]. Es causante de cuadros clínicos como pueden ser, neumonía [9].

### Justificación

Actualmente millones de personas a nivel mundial padecen algún tipo de lesión debido a diferentes causas como; accidentes, caídas, golpes, quemaduras, armas etc. Al presentarse una lesión existen dos problemas principales, que son el daño epitelial y la posible infección de la herida por la presencia de bacterias. De acuerdo con cifras de la Organización Mundial de la Salud, 830,000 niños mueren cada año a causa de lesiones y cerca de 2300 cada día. Más de 1000 de estos niños podrían salvarse si se aplicaran medidas adecuadas para su tratamiento evitando infecciones en este tipo de heridas, siendo los géneros *Staphylococcus* y *Pseudomonas* algunos de los más importantes causantes de infecciones en las lesiones antes mencionadas. Teniendo como alternativa para el tratamiento de este tipo de lesiones los nanocompuestos, ya que se ha demostrado que el quitosano ayuda al proceso de regeneración epitelial, aunado a esto, cuenta con un gran poder bactericida, acelerando el proceso de curación.

En el presente trabajo se propone la preparación, caracterización y evaluación antimicrobiana de

nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de cobre (QS/nCu), para evaluar su efecto bactericida utilizando dos modelos biológicos como *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación de los films de Qs con nCu

Se preparó una solución de ácido acético al 1%; la cual se utilizó para disolver el quitosano y una solución madre de nanopartículas de cobre al 10% dispersada por ultrasonido. Posteriormente se realizaron las diluciones correspondientes y se dispersaron por medio de ultrasonido, se vaciaron en cajas Petri de 10 cm y se secaron a 65°C durante 8 horas para la obtención de films cuyas concentraciones fueron: 1) 0,0176; 2) 0,0356; 3) 0,136; 4) 0,5; 5) 0,576; 6) 1,35; 7) 2,65; 8) 5,3; Porcentaje de cobre en peso.

### Ensayo de actividad antimicrobiana

Se depositaron muestras de quitosano sobre portaobjetos colocados en un sistema de cámara húmeda. Posteriormente se colocaron 25µL de una suspensión bacteriana de  $[1 \times 10^6]$  sobre la muestra, y se colocó el cubreobjetos, éstos se incubaron a diferentes tiempos, 0, 90, 180 y 360 minutos. Posteriormente se hizo un lavado con 10mL de PBS estéril y se agitó a 100 rpm durante 1 minuto para recuperar bacterias. Del lavado hecho con PBS, se tomaron 100mL y se colocaron en caja con agar LB, se estriaron con perlas de vidrio. Posteriormente, se incubaron durante 16 horas a 37°C para realizar el conteo de UFC de bacterias *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Para realizar los cálculos se tomó como el 100% de crecimiento el número de UFC contadas en las muestras de quitosano sin nanopartículas.

### Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Para evaluar la dispersión de NPs se utilizó SEM, en la cual se hace incidir un haz de electrones a partir de una fuente generadora para la observación detallada de la topografía del material[10]. Estos electrones son dirigidos hacia la superficie de una muestra colisionando y generando electrones secundarios que son detectados para generar una

imagen, por lo que es indispensable que las muestras sean conductoras. Para evaluar la dispersión de NPs, se realizó la fractura criogénica de Nanocompuestos Qs/nCu 5% para ser observadas en un equipo Jeol JSM-7041F con un voltaje de aceleración de 20kV.

### Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Con el objetivo de estudiar la interacción química entre los grupos funcionales presentes en el Qs y las nCu se utilizó FTIR. Los espectros de absorción, emisión y reflexión en la región del infrarrojo, se puede explicar asumiendo que todos son resultado de cambios energéticos producidos en las transiciones de las moléculas de unos estados de energía vibracionales y rotacionales a otros. Estos análisis se realizaron en un espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier, Spectrum GX de Perkin Elmer.

### Espectrometría UV-vis

Con la finalidad de observar la presencia de nCu en los nanocompuestos, se usó la espectroscopia UV-vis. Las muestras se analizaron en un equipo Agilent 8453, de 300 a 600nm.

### Interacción Bacteria/Qs

Con el objetivo de observar la interacción Bacterias con Qs se realizaron ensayos mediante microscopía confocal. Para lo cual se empleó un microscopio Zeiss LSM 700.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó la interacción de *P. aeruginosa* con los films de Qs conteniendo nCu a diferentes concentraciones (1, 5 y 8). En la Figura 1 se muestra el efecto antibacteriano a diferentes tiempos de incubación. Se encontró que la actividad antibacteriana se incrementa con respecto al tiempo de incubación y a la concentración creciente de nCu. A los 90 min de interacción se observó que la concentración 8 (5.3 %W) de nCu tiene un efecto

antibacteriano del 100% con respecto al Qs sin nCu.

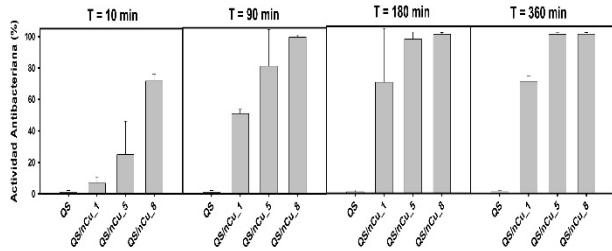


Figura 1. Efecto antibacteriano de Qs-nCu sobre *P. aeruginosa*.

En la figura 2 se muestra el efecto antibacteriano que presenta Qs-nCu cobre *S. aureus*, en el cual se observa que comienza a ser significativo a partir de los 90 minutos de incubación, incrementándose conforme aumenta el tiempo (180 y 360 minutos). De la misma manera que ocurre para *P. aeruginosa*.

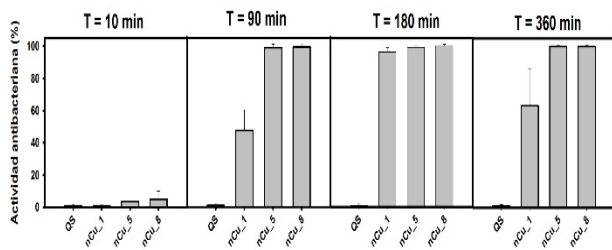


Figura 2 Efecto antibacteriano de Qs-nCu sobre *P. aerugnoisa*

En la Figura 3 se presenta la micrografía SEM, donde se puede observar la topografía del polímero, la presencia y dispersión de las nCu concentración 5. En la que se apreciar una buena dispersión, ya que, los aglomerados de nCu son muy escasos.

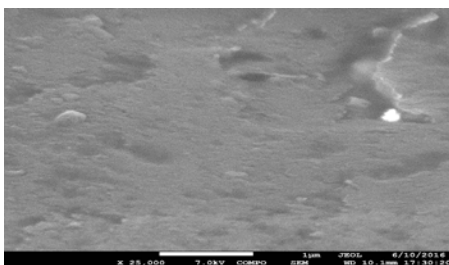


Figura 3 Micrografía SEM X25000

La figura 4 muestra el espectro de Qs/nCu, en la que se observa que existe interacción entre las nCu y Qs formando complejos. Resaltando la región que va de 3000-3500cm<sup>-1</sup> donde se forma el enlace Qs-nCu

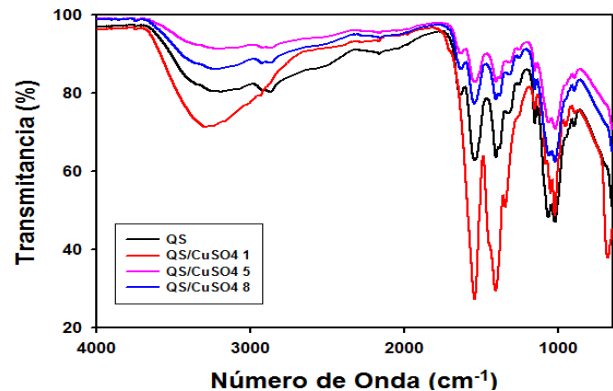


Figura 4 Espectrofotometría FTIR

En la figura 5 se presenta el espectro Uv-vis que comprueba que efectivamente están presentes las nCu, las señales características del cobre son las que van de los 700nm hasta 600nm.

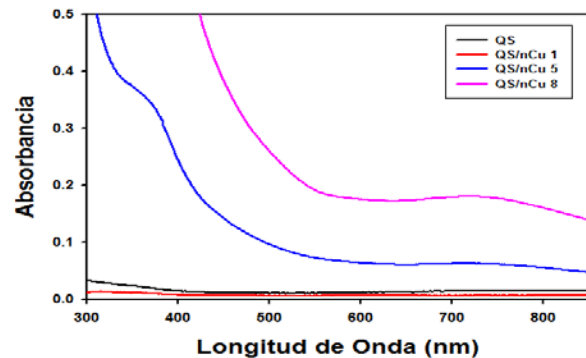


Figura 5 Uv-vis

Por medio de microscopía confocal, se logró observar que las bacterias son capaces de penetrar la malla formada por el polímero, para estar en contacto directo con las nCu, como se puede apreciar en la Figura 6

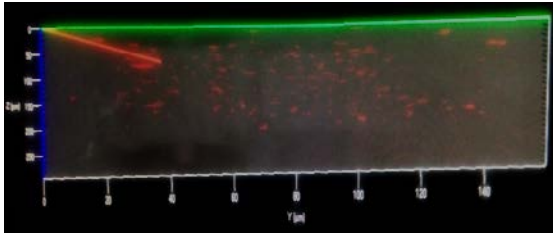


Figura 6 Microscopía confocal.

## CONCLUSIONES

Con este trabajo se logró comprobar que existe actividad bactericida por parte de nCu y que ésta depende de los tiempos de interacción y a la concentración de nCu.

## AGRADECIMIENTOS

- CINVESTAV Querétaro
- CONACyT
- Universidad de Guanajuato Departamento de Biología.

## REFERENCIAS

- [1] J. A. L. JIMÉNEZ, "BIOPOLÍMEROS DE INTERÉS INDUSTRIAL. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)," UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR, 2011.
- [2] M. G. R. Cortés<sup>1</sup>, B. M. V. Díaz<sup>2</sup>, and J. E. Perilla<sup>3</sup>, "Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico," *Rev. Ing. E Investig.*, vol. 28, 2008.
- [3] E. L. Hernández, "Síntesis de nanocompositos de quitosano y partículas metálicas para aplicaciones biomédicas," 2015.
- [4] M. S. Usman, N. A. Ibrahim, K. Shameli, N. Zainuddin, and W. M. Z. W. Yunus, "Copper nanoparticles mediated by chitosan: synthesis and characterization via chemical methods.," *Molecules*, vol. 17, no. 12, pp. 14928–36, Jan. 2012.
- [5] P. A. Ren Dawei; Cheng, Eileen W. C.; Vargas-Reus, Miguel A.; Reip and G. H. Robert P., "Characterisation of Copper Oxide Nanoparticles for Antimicrobial Applications.," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 33, p. 587–590., 2009.
- [6] Beatriz Liliana España Sánchez, "ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y MECANISMO DE ACCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y COBRE INCORPORADAS EN POLIPROPILENO," 2014.

- [7] P. M. S.-S. Estrella Cervantes-García,\* Rafael García-González, "Características generales del *Staphylococcus aureus*," *Rev. latinoamericana Patol. Clínica y médica laborator.*, p. 13.
- [8] M. M. Montero, "Pseudomonas aeruginosa multirresistente: aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos," 2012.
- [9] L. Garau, Javier; Gomez, "Pseudomonas aeruginosa pneumonia," *Curr. Opin. Infect. Dis. Respir. Infect.*, vol. 16, no. 2, pp. 135–143, 2003.
- [10] J. L. Wilson, "Synthesis and Magnetic Properties of Polymer Nanocomposites with Embedded Iron Nanoparticles," *J. Appl. Phys.*, vol. 95, p.