

SINTESIS DEL BIO-NANOCOMPUESTO DE Ag-NTC/QUITOSANO Y LA EVALUACION DE SUS PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS

J. Hernández-Vargas^a, J. López-Tinoco^a, J. Lara-Romero^a, F. Paraguay-Delgado^b, J. B. González-Campos^{a*}

^aFacultad de Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio VI, ^{a*}Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Edificio B1, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58060, Morelia, Mich., México

^bCentro de Investigación en Materiales Avanzados, Unidad Chihuahua, Chihuahua, México

Resumen.- Uno de los problemas más grandes que enfrenta el hombre en la actualidad son las enfermedades infecciosas causadas por cepas bacterianas resistentes a tratamientos con antibióticos existentes, razón por la cual es importante descubrir nuevas maneras de atacar a estos microorganismos. El rápido crecimiento de la nanotecnología ha estimulado gran interés en las aplicaciones antimicrobiales de los nanomateriales los cuales poseen excelentes propiedades debido a su alta área superficial específica y a su alta reactividad. El presente trabajo propone la síntesis y evaluación de las propiedades antibacterianas del bio-nanocompuesto (CS/NTC-AgNP) integrado por nanopartículas de plata (AgNP) soportadas sobre nanotubos de carbono de pared múltiple (NTC) incorporados a una red polimérica de Quitosano (CS). Los microorganismos evaluados fueron las bacterias E. Coli, B. Subtilis y S. Aureus y las levaduras S. Cerevisiate y D. Hansenii. Se demostró que el bio-nanocompuesto sintetizado posee excelentes propiedades antibacterianas tanto para bacterias como para las levaduras.

Introducción

Un antibiótico es una sustancia química producida por un ser vivo o derivada sintéticamente a partir de ella y que a bajas concentraciones mata o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles, generalmente bacterias. Se dice que un antibiótico es bacteriostático si impide el crecimiento de las bacterias, y bactericida si las destruye.

Las bacterias son microorganismos unicelulares que presentan un tamaño de algunos micrómetros de largo (entre 0,5 y 5 μm , por lo general) y diversas formas incluyendo esferas, barras y hélices. Las bacterias son procariontas y, por lo tanto, a diferencia de las células eucariotas (de animales, plantas, etc.), no tienen núcleo ni orgánulos internos. Las bacterias se pueden clasificar en Gram Positivas (tiñen de coloración rosado el Gram) y las Gram negativas (tiñen de color violeta o azul el Gram).

Las colonias pastosas corresponden a un grupo de hongos conocido como levaduras.

Éstas son organismos unicelulares en algún momento de su ciclo de vida y se multiplican por brotación o fisión.

Recientemente se ha demostrado que varios nanomateriales, naturales y artificiales, poseen excelentes propiedades antimicrobianas [1]. Entre los nanomateriales más estudiados se encuentran las nanopartículas de plata, las cuales se integran a una matriz polimérica, ya sea directamente o soportados sobre nanotubos de carbono (NTC). Entre los polímeros utilizados para este fin se encuentran el nafion y el quitosano (CS), el derivado principal de la quitina, un biopolímero proveniente de los caparazones de los crustáceos, y que posee actividad antibacteriana [1, 2, 5]. Por su parte, la capacidad inhibitoria de la plata en el crecimiento de bacterias, y sus propiedades bactericidas son conocidas desde tiempos ancestrales [3], mientras que los NTC también han demostrado poseer excelentes propiedades bactericidas y contra algunos virus [1,4].

Los Nanomateriales como antimicrobianos

El rápido crecimiento de la nanotecnología ha estimulado gran interés en las aplicaciones antimicrobiales de los nanomateriales. Los nanomateriales son excelentes adsorbentes, catalizadores y sensores debido a su gran área superficial específica y a su alta

reactividad. Los nanomateriales más utilizados como antimicrobianos son nanopartículas de plata, oro, cobre, galio, y algunas estructuras orgánicas como el quitosano, nanotubos de carbono, nafión, etc.

Nanotubos de Carbono (NTC).

Todos los materiales de carbono están compuestos de átomos de carbono, sin embargo dependiendo de la organización que presenten estos átomos dichos materiales pueden ser muy diferentes unos de otros. Los NTC están constituidos por redes hexagonales de carbono, estructuradas en forma de tubos, cuyo diámetro es del orden de algunos cuantos nanómetros, fueron descubiertos por Sumio Iijima (1993) [6]. Son sistemas ligeros y huecos, exhiben alta resistencia mecánica e interesantes propiedades eléctricas. Se presentan en diferentes formas como nanotubos de pared sencilla (un solo tubo) y los nanotubos de pared múltiple (varios nanotubos concéntricos).

Los NTC se pueden obtener por diferentes métodos como: método de descarga arco, método de vaporización láser, método de rocío pirolítico, método de alta presión, microondas, etc.

Debido a las excelentes propiedades que poseen los NTC, cada día se encuentran nuevas e interesantes aplicaciones que podrían tener estos en áreas de ciencias y ramas industriales. Algunas de estas podrían ser para encapsular materiales sensibles y para reforzar materiales compuestos, almacenamiento de hidrógeno, purificación de agua, como antimicrobiales en la industria textil, entre muchas otras.

Nanopartículas de Plata

Un especial énfasis se le ha dado a la síntesis de una nueva familia de antibióticos basada en compuestos de plata, debido a la eficiencia mostrada en recientes estudios y la antigua trayectoria de este metal como agente microbicida.

Recientemente, las nanopartículas de plata han tenido auge como un potente agente antimicrobiano y se siguen descubriendo nuevos métodos de aplicación. Los dispositivos y productos en los que se usa las nanopartículas de plata han hecho que la plata se considere como un componente antiséptico. [3].

Durante el siglo XIX, se encontró que el nitrato de plata, una de las sales de este metal, ayudaba en la cicatrización y prevención de infecciones en quemaduras y heridas. Este uso del nitrato de plata sigue vigente en la actualidad.

Quitosano

Entre los materiales naturales más usados en la actualidad se encuentra una pareja de polisacáridos que ha tomado mucho auge por la infinidad de aplicaciones que ha logrado encontrarseles, y, especialmente, por su poco impacto ambiental, lo constituye la quitina y el quitosano.

Ambos biopolímeros están químicamente emparentados; la quitina, por su parte, es una poli (β -N-acetil- glucosamina) la cual, mediante una reacción de desacetilación que elimine al menos un 50 % de sus grupos acetilo, se convierte en quitosano (poli (β -N-acetil-glucosamina-co- β -glucosamina).

La quitina (del griego tunic, envoltura) se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza y, después de la celulosa (materia base del papel), es el segundo polisacárido en abundancia. Sus fuentes principales son el exoesqueleto (caparazón) de muchos crustáceos, alas de insectos (escarabajos, cucarachas), paredes celulares de hongos, algas, etc. Sin embargo, la producción industrial de este biomaterial prácticamente se basa en el tratamiento de las conchas de diversos tipos de crustáceos (camarones, langostas, cangrejos y krill) debido a la facilidad de encontrar estos materiales como desecho de las plantas procesadoras de estas especies.

Actualmente, se le ha prestado especial atención al quitosano, por ser un polisacárido de gran potencial. El quitosano tiene un gran número de aplicaciones en la Agricultura

(liberación de fertilizantes, agentes bactericidas y fungicidas para la protección de plantas, almacenamiento de semillas, etc.), en medicina (acelerar el saneamiento de heridas, producción de gasas, vendajes, suturas, etc.), tratamientos de aguas (captura de metales pesados, como coagulantes, etc.), cosméticos (capsulas para adelgazar, agente hidratante y aditivo bactericida en jabones, shapoops, etc.) , biosensores (Sensores de glucosa) [7].

Metodología Experimental.

Síntesis de los Nanotubos de Carbon (NTC).

Se sintetizaron por el método rocío pirolítico el cual consiste en inyectar una mezcla de una fuente de carbono y un catalizador de un nebulizador a un horno tubular a 800°C. Como fuente de carbono se utilizó el alfa-pineno, como catalizador el Ferroceno y como gas de arrastre el Argón. Una vez consumida la mezcla de alfa-pineno/catalizador, el horno se enfría bajo flujo del argón hasta alcanzar la temperatura ambiente. La película de NTC formada se remueve mecánicamente con una espátula de longitud adecuada.

Una vez obtenidos son funcionalización por lixiviación de ácidos para poder dispersarlos en agua.

Decoración de los NTC con las nanopartículas de plata (Ag-NTC).

Las nanopartículas fueron sintetizadas sobre la superficie de los NTC mediante la técnica de microondas. Una solución de nitrato de plata, el BH_4 como agente reductor y un surfactante, son adicionados a una solución de NTC dispersos en agua y expuestos a la radiación de microondas por 15 minutos a una temperatura de 80°C.

Síntesis del Bionanocompuesto.

Las películas delgadas de quitosano se prepararon a partir de polvo de Quitosano (Aldrich) en una solución de ácido acético al 1% en peso. Una vez obtenidas las películas de quitosano se prepararon películas del bio-nanocompuesto a diferentes concentraciones de NTC y de Ag-NTC al 0.5%, 1%, 3% y 4% en peso en cada película de quitosano.

Análisis Atibacterial.

Los antibiogramas se obtuvieron por medio de la técnica del halo de inhibición con las bacterias E. Coli, B. Subtilis y S. Aureus y para las levaduras S. Cerevisiate y D. Hansenii. Se disolvieron las películas del bio-nanocompuesto en una solución de ácido acético al 1% en peso. Para el cultivo de las bacterias se utilizaron los medios de cultivo Mueller Hilton y para el cultivo de las levaduras se empleó la técnica YPD. Una vez sembrada la bacteria se inyectó 0.5 microlitros de la solución de las películas del bio-nanocompuesto. Se incubó de 24-48 horas para poder determinar los halos de inhibición.

Discusión de Resultados

La Figura 1 muestra las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) en la cual se pueden identificar los NTC formados de pared múltiple con un diámetro externo de ~40 nm.

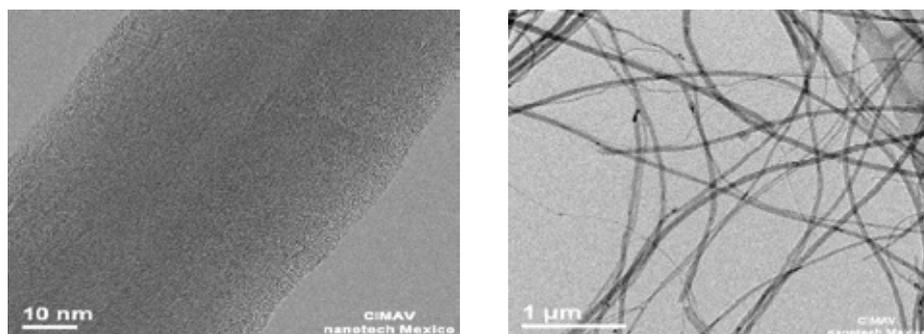


Figura 1: Imágenes de TEM de los NTC sintetizados.

En la figura 2 se muestran imágenes TEM de las nanopartículas de plata soportadas sobre los NTC. Podemos determinar que se tienen nanopartículas sobre la superficie de los NTC. Se puede observar que se tiene una buena distribución de tamaños y dispersión de las nanopartículas.

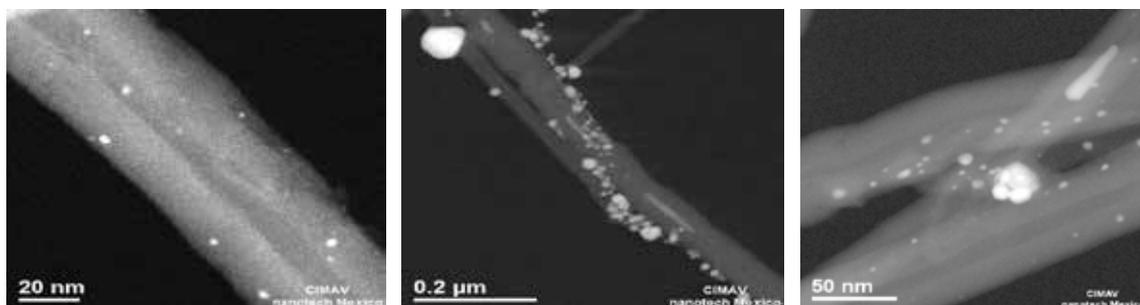


Figura 2: Imágenes de TEM de los NTC soportados con nanopartículas de plata.

La Figura 3 muestra el análisis de espectroscopia Raman para los NTC y el Ag-NTC en donde se pueden observar las relaciones que existen entre las bandas G, D y G' de los espectros. La relación $I_{D/G}$ podemos relacionarla con los defectos estructurales de los NTC, entre mayor sea el valor menos cristalino es el NTC estructuralmente. De esta manera, tenemos que los NTC sintetizados tiene un valor de 0.63 que es característico de un compuesto cristalino y los Ag-NTC tienen un valor de 2.62 esto se puede deber a que las nanopartículas de plata son identificadas como defectos en la red cristalina de los NTC. Por otro lado tenemos la relación $I_{G'}/I_G$ que nos indica los defectos superficiales del NTC. En este caso, entre menor sea el valor de esta relación, existe un mayor número de defectos superficiales. Para los NTC se tiene un valor de 1.60 y para Ag-NTC se tiene un valor de cero, lo que indica que cuando las nanopartículas de plata son colocadas sobre los NTC, se detectan como defectos superficiales.

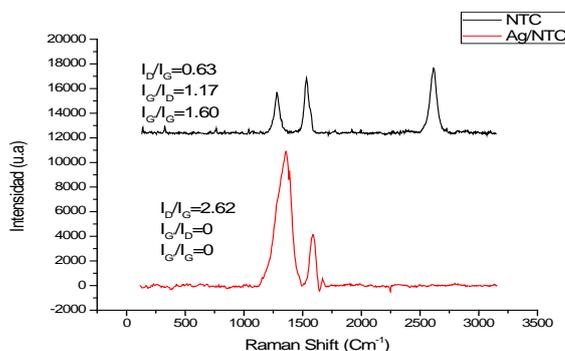


Figura 3.-Espectroscopia Raman de los NTC y de Ag-NTC.

La Figura 4a muestra la película delgada de quitosano formada y la Figura 4b muestra la película del bio-nanocompuesto formado.

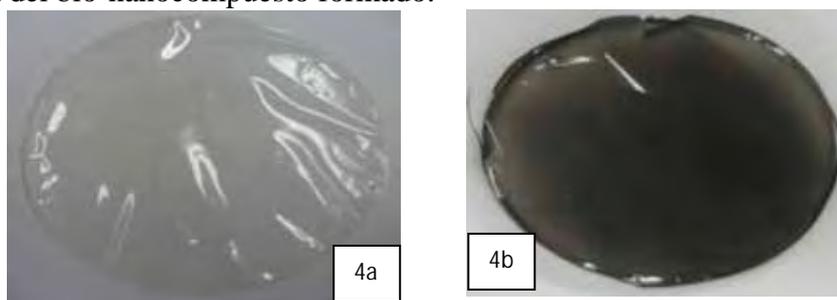


Figura 4.- Películas de quitosano y bio-nanocompuesto CS/NTC-AgnP

La Figura 5a nos muestra los antibiogramas para la bacteria *S. Aureus* y 5b para la levadura *D. Hansenii*. Se puede observar el círculo de inhibición para cada una de las concentraciones manejadas y descritas en la tabla 1.

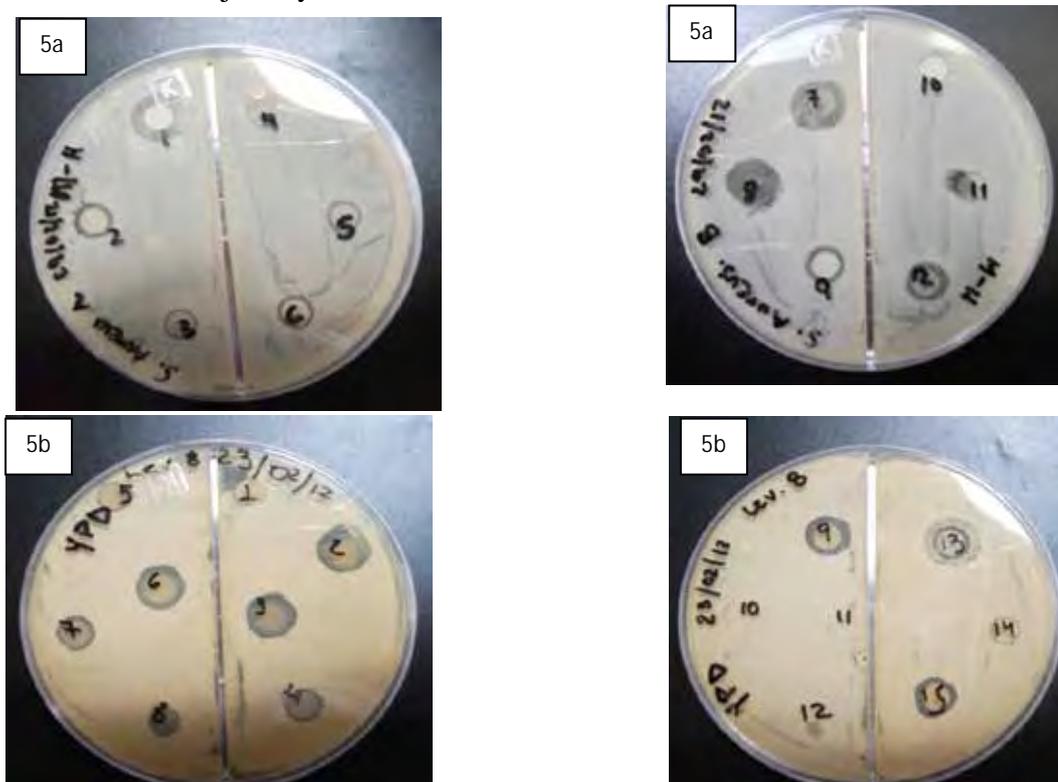


Figura 5.- Halos de Inhibición de *S. Aureus* y *D. Hansenii*.

TABLA 1: Diámetros de Inhibición obtenidos en mm para cada Sensidisco.

Num.	Concentración	<i>E. Coli</i>	<i>B. Subtilis</i>	<i>S. Aureus</i>	<i>S.Cerevisiate</i>	<i>D. Hansenii</i>
1	Quitosano (cs)	11	12	11	9	12
2	Cs/NTC 0.5%	13	11	10	11	11
3	Cs/NTC 1.0%	11	12	14	11	10
4	Cs/NTC 3.0%	9	10	11	10	11
5	Cs/NTC 4.0%	10	14	10	10	10
6	Cs/Ag-NTC 0.5%	10	15	15	9	12
7	Cs/Ag-NTC 1.0%	12	10	11	11	13
8	Cs/Ag-NTC 3.0%	10	13	15	9	11
9	Cs/Ag-NTC 4.0%	10	11	11	9	10
10	Sol.Ac. Acético 1%	7	6	7	8	8
11	NTC	8	6	7	8	7
12	Ag-NTC	7	6	8	8	9

Conclusiones.

Se soportaron nanopartículas de plata sobre la pared de los NTC de pared múltiple esto se puede observar mediante las imágenes de TEM y comprobar mediante Raman. Se obtuvieron películas delgadas del bio-nanocompuesto con capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias y de levaduras. Se probaron diferentes concentraciones de NTC y Ag-NTC sobre la red polimérica del quitosano y se determinó que para bacterias la

concentración con la que se obtiene una mayor capacidad antibacterial es entre 0.5 y 1% de Ag-NTC y para las levaduras se encontró que se obtiene la mayor capacidad inhibitoria en 1% de Ag-NTC.

Referencias.

- (1). Qilin Li, et al. *Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications*. Science Direct. (2008).
- (2). Liam Matthews, et al. *Applications of Nanomedicine in Antibacterial Medical Therapeutics and Diagnostics*. The Open Tropical Medicine Journal, (2010).
- (3). Franck Furno, et al. *Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2004)
- (4) Roya Dastjerdi, et al. *A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. (2010).
- (5) Liying Zhu, et al. *Ripening of Silver Nanoparticles on Carbon Nanotubes*. World Scientific. Vol. 2, No. 3 (2007).
- (6) S. Iijima, Nature, 1991, 354, 56
- (7) Niu Mei, Liu, et al. *Antibacterial activity of chitosan coated Ag-loaded nano-SiO₂ composites*. Carbohydrate Polymers (2009)