

Síntesis de Nanopartículas Poliméricas de Quitosano Funcionalizadas con extractos de la mora (*Rubus glaucus*) y su Evaluación preliminar como agentes antimicrobianos

Porras, M¹., Madrigal, S² y Vega, J¹

¹Laboratorio Nacional de Nanotecnología LANOTEC, Costa Rica

²Laboratorio Nacional de Polímeros PoliUNA, Costa Rica

Resumen

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el efecto bacteriostático de nanopartículas de quitosano funcionalizadas con agentes antioxidantes de extractos de frutas tropicales.

En la síntesis y caracterización de nanopartículas de quitosano funcionalizadas se manipulan variables experimentales para obtener concentraciones y otros parámetros que presenten efecto bacteriostático en seis especies de bacterias patógenas ATCC, tanto gram-negativas: *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* y *Pseudomonas aeruginosa*; como gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Enterococcus faecalis*. La hipótesis planteada supone que al funcionalizar las nanopartículas sintetizadas mediante el método de gelificación iónica con tripolifosfato de sodio como agente entrecruzante, con agentes activos provenientes de extractos de la fruta tropical mora (*Rubus glaucus*), al contener agentes antioxidantes, expresados como concentración de ácido gálico, otorgan a las nanopartículas de quitosano la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano.

Este trabajo se ha concentrado en el estudio de las propiedades de la mora como agente modificante de las nanopartículas de quitosano y la evaluación preliminar de su actividad antimicrobiana. Se evaluó el contenido de polifenoles de la fruta y su actividad antimicrobiana en conjunto con las nanopartículas frente a los microorganismos patógenos antes mencionados. Las frutas evaluadas presentan contenidos de compuestos fenólicos de aproximadamente 100 mg de ácido gálico/100g y actividad antimicrobiana frente a las bacterias gram-positivas *S. aureus*, *E. faecalis*, y *B. subtilis* y la gram-negativa *S. marcescens*, determinada por porcentajes de inhibición de un ámbito entre 10% y 60% con respecto al control positivo. Estos resultados muestran que estos nanoproductos tienen potencial como posibles agentes antimicrobianos para ser utilizados en la industria farmacéutica.

Palabras clave: agentes antimicrobianos, polifenoles, efecto bacteriostático, quitosano, nanopartículas poliméricas.

Synthesis of polymer chitosan nanoparticles functionalized with blackberry extracts (*Rubus glaucus*) and its preliminary evaluation as antimicrobial agents

Abstract

The aim of this study is to evaluate the bacteriostatic effect of functionalized chitosan nanoparticles with antioxidants from tropical fruit extracts.

In the synthesis and characterization of functionalized chitosan nanoparticles variables are treated in order to obtain concentrations and other parameters, which shows bacteriostatic effect on some species of pathogenic gram-negative ATCC bacterias: *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* and *Pseudomona aeruginosa*, and gram-positives: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecalis*.

The hypothesis assumes that functionalized nanoparticles synthesized according to the ion gelation method using tripolyphosphate as crosslinking agent, with modifying agents from blackberry tropical fruit extracts (*Rubus glaucus*), containing antioxidants, expressed as gallic acid concentration, provides chitosan nanoparticles the ability to inhibit bacterial growth.

This research performed a preliminary evaluation of the polyphenol content and antimicrobial activity in conjunction with the nanoparticles against pathogens mentioned above. The evaluated fruits exhibit concentrations of 100 mg of gallic acid/100g and antimicrobial activity against the gram-positive *S. aureus* *E. faecalis* and *B. subtilis*, and the gram-negative *S. marcescens* determined by disc diffusion method showing an inhibition diameter between 10% and 60 % compared to positive control. These results show the potential of these nanoproducts as antimicrobial agents for use in the pharmaceutical industry.

Key words: antimicrobial agents, polyphenols, bacteriostatic effect, chitosan, polymeric nanoparticles.

Introducción

Los productos derivados de frutas tropicales se han considerado por siglos únicamente como *delicatessen* gastronómicos. Sólo recientemente se han reconocido como fuentes de compuestos fitoquímicos con potenciales efectos favorables para la salud. Las moras son consideradas en la actualidad como una fuente rica de polifenoles. Estudios recientes (Armentia, Lombardero, Barber, Callejo, Vega, Martínez y Rebollo, 1999) han encontrado que los extractos de antocianinas provenientes de varias especies de mora podrían ejercer actividades anticancerígenas *in vitro*, reducir la inflamación y modular la respuesta inmune. Los compuestos polifenólicos presentes mayoritariamente en esta fruta son taninos elágicos y antocianinas. Los compuestos formados a partir de la hidrólisis de taninos elágicos han recibido gran atención, debido a sus importantes actividades biológicas tales como actividad antimutagénica, antiviral, anticancerígena, antitumoral y antioxidante (Armentia, *et al.*, 1999, p. 398). Las antocianinas son los pigmentos más importantes de las plantas vasculares, responsables de colores naranja, rosa, rojo, violeta y azul en las flores y frutos de algunas de ellas. Estos compuestos además poseen actividad antioxidante y desempeñan un papel importante en la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes, entre otras.

Un grupo creciente de evidencias sugieren que el consumo regular de los productos de frutas como mora y cacao o el uso de sus principios activos como agentes terapéuticos podrían influir favorablemente en la lucha contra las enfermedades cardiovasculares e incluso en otras patologías como el cáncer. Sin embargo, se hacen investigaciones para definir la magnitud real de estos beneficios y elucidar sus posibles mecanismos de acción (Gutiérrez, 2002). Las áreas tropicales son ricas en fuentes desconocidas de fitoquímicos con potenciales aplicaciones en farmacología, medicina y alimentos funcionales. Un estudio reciente efectuado en Costa Rica (Madrigal, Rodríguez, Krueger, y Reed, 2010) con una colección de frutas tradicionales (17 muestras) fueron seleccionadas para identificar su composición polifenólica (ensayo Folin-Ciocalteu), su actividad antioxidante (ensayo DPPH) y propiedades antibacterianas *in vitro* (difusión en disco). Los resultados mostraron que al menos ocho de las muestras analizadas son fuentes naturales de polifenoles con importante actividad antioxidante y

tres de ellas muestran un significativo efecto antibacteriano tanto en bacterias gram-positivas como bacterias gram-negativas, en comparación con el control (ampicilina 2 mg/ml). Los datos experimentales sugieren que los extractos polifenólicos aislados de las frutas tradicionales de Costa Rica podrían ser fuentes interesantes de los fitoquímicos para controlar o prevenir las infecciones bacterianas en humanos.

Es importante aclarar términos de actividad microbiana; al hablar acerca de un antibiótico o sustancia bactericida se hace referencia a un antimicrobiano que es capaz de destruir el agente patógeno de interés (destrucción de la pared celular de la bacteria). Dentro de este grupo se encuentran las penicilinas, las quinolonas, las cefalosporinas, la vancomicina, los aminoglucósidos y la polimixina. Para el caso de las sustancias o antibióticos bacteriostáticos se hace referencia a otro mecanismo de acción que se traduce en una inhibición del crecimiento o multiplicación de las bacterias con el objetivo de que, al aplicarlo, sea el propio sistema inmunológico del animal el que detenga la infección. Dentro de este grupo se clasifican las tetraciclinas, la lincomicina, la eritromicina, las sulfamidas, el cloramfenicol, entre otros. El presente trabajo se ha enfocado en la búsqueda de agentes bacteriostáticos aplicables contra las bacterias gram-positivas y gram-negativas mencionadas anteriormente. En la actualidad los polímeros naturales son utilizados como biomateriales siendo uno de los más importantes el quitosano, polisacárido catiónico lineal compuesto por unidades de (1-4)-2-desoxi-2-amino-D-glucopiranos (D-glucosamina) (GlcN) y (1-4)-2-desoxi-2-acetamido-D-glucopiranos (N-acetyl-D-glucosamina) (GlcNAc) derivado por desacetilación de quitina: poli [(1-4)-2 acetamida-2-desoxi-D-glucopiranos]. Esta última es la segunda sustancia polimérica natural más abundante después de la celulosa y se extrae por métodos químicos a partir de los exoesqueletos de crustáceos y de la concha caliza de moluscos (Gutiérrez, 2002). En su estructura, de acuerdo con la Fig. 1, el nitrógeno se encuentra como una amina alifática primaria y origina reacciones típicas de ese grupo funcional.

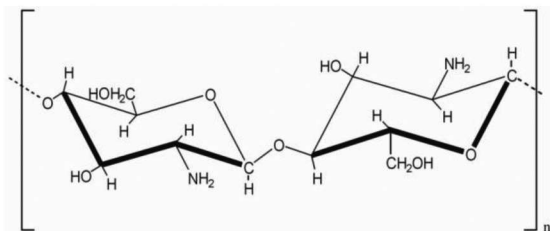


Figura 1. Unidades repetidas de quitosano
D= D-Glucosamina A= N-acetil-D-glucosamina.

Debido a las características benéficas mencionadas, el quitosano ha sido utilizado como material de pared para encapsular compuestos bioactivos y en el desarrollo de sistemas de liberación de sustancias (Peniche, Argüelles, Peniche, y Acosta, 2003). Investigaciones realizadas en 1992 (Hassan, Parish, y Gallo, 1992) y 1993 (Ohya, Takei, Kobayashi, y Ouchi, 1993) desarrollaron microcápsulas de quitosano ($<10\mu\text{m}$) para la liberación específica de agentes anticancerígenos.

El quitosano tiene aplicaciones farmacéuticas como matriz de liberación prolongada de drogas y en terapia génica, aplicaciones biomédicas tales como fabricación de materiales bioadhesivos, fungistáticos, hemostáticos y en el tratamiento de heridas por quemaduras, donde se aplican vendajes húmedos denominados apósitos, que deben comportarse de manera homóloga a la piel alcanzando un 85% de humedad y buena permeabilidad, otorgándole así, condiciones adecuadas para repararse sin alteraciones. El quitosano ha mostrado buenos resultados facilitando la cicatrización y mejorando las funciones de las células inflamatorias (Fuentes y Pastor de Abram, 2004).

El quitosano puede asociarse a sustancias cargadas negativamente, incluidas proteínas, polisacáridos aniónicos y ácidos nucleicos presentes en la piel. Posee propiedades antimicrobianas, es biocompatible y clínicamente ha demostrado no producir reacciones alérgicas después de su implantación, inyección o aplicación tópica. Además es biodegradable (Márquez, Cartagena y Pérez, 2009).

Las nanopartículas sintetizadas a partir de quitosano se forman de acuerdo a una aproximación de tipo *bottom-up* como resultado de procesos de auto-asociación o entrecruzamiento, en virtud de los cuales las cadenas poliméricas se ordenan en estructuras nanoscópicas, ya sea por interacciones inter o intramoleculares de tipo covalente o no covalente. En estas nanopartículas o nanoesferas el fármaco

puede ser atrapado o ligado a la matriz polimérica sólida o semisólida (Rinaudo, 2008).

El quitosano inhibe el crecimiento de bacterias eficazmente, pero los efectos inhibitorios difieren con respecto al peso molecular del quitosano y el tipo de bacteria. El quitosano generalmente ejerce mayor efecto bactericida contra microorganismos gram-positivos. La actividad antibacteriana del quitosano es afectado por el pH y su mayor actividad se encuentra con bajos valores de pH, aquellos verificados experimentalmente en el rango 4,5-5,8. (Begin y Calsteren, 1999).

En este trabajo se han evaluado las propiedades antimicrobianas del quitosano como sistema de encapsulamiento y transporte de moléculas provenientes de la extracción de compuestos de la fruta tropical *Rubus glaucus* con alto contenido en compuestos fenólicos.

Materiales y métodos

Síntesis de las nanopartículas de quitosano

Se empleó el método de gelificación iónica con tripolifosfato sódico. En esta técnica la formación de la cubierta de las nanopartículas tiene lugar debido a una reacción de gelificación iónica entre un polímero y un ion de carga opuesta.

Se preparó una solución de quitosano de 0.10% v/v en ácido acético 0.50% v/v, a base de una solución madre de 0.50% m/v de quitosano.

Como agente entrecruzante se empleó tripolifosfato de sodio 0.25% m/v.

Para la formación de las nanopartículas se mezcla poco a poco en agitación constante la solución de quitosano con las soluciones de tripolifosfato de sodio.

Funcionalización de las nanopartículas de quitosano

El extracto de la mora (*rubus glaucus*) se empleó como agente modificante de las nanopartículas de quitosano.

La extracción se realizó a través de acetona al 70%; los productos se liofilizaron durante tres días para su deshidratación.

Para la identificación de la composición polifenólica se realizó el ensayo *Folin-Ciocalteu* con el que se obtuvo la concentración de ácido gálico como se expresa en la Tabla 1 de la sección de los resultados.

Tabla 1. Concentración de ácido gálico de la mora por triplicado.

Fruta	EAG mg/100 mg
	98,00
<i>Rubus Glaucus</i>	95,60
	94,58

En la Tabla 2 se visualiza la identificación para los productos obtenidos.

Mediante vórtex en agitación constante se mezcló la solución de nanopartículas de quitosano con la solución del agente modificante (0,02 g/mL) para su funcionalización. Es importante mencionar que esto produce la funcionalización de la superficie de la nanopartícula, con el fin de evitar que en el sistema sea necesario estrictamente la ruptura de las nanopartículas para que se libere el componente.

Tabla 2 Nomenclatura para las nanopartículas funcionalizadas.

Identificación	Significado
NCs	Nanopartículas de quitosano
NCs M	Nanopartículas con agente modificante mora
M std	Agente modificante

Caracterización de las nanopartículas de quitosano

Para la caracterización de los productos obtenidos, tanto en el caso de las nanopartículas de quitosano simples, como para las nanopartículas de quitosano funcionalizadas, se emplearon las técnicas de

microscopía de fuerza atómica, termogravimetría y goniometría.

Ensayos microbiológicos

Se empleó el método Kirby-Bauer (método de difusión en agar) para la determinación de sensibilidad de los agentes microbianos a los agentes de prueba, con la modificación de aplicar los agentes de prueba de manera directa sobre el cultivo y no utilizar discos de papel de filtro. Se mide el diámetro (halos) de inhibición producido por cada agente de prueba. Se empleó como control positivo cloramfenicol 30 μg y como control negativo ácido acético 0,5% v/v durante los ensayos.

Es importante desatacar que los resultados de los ensayos microbiológicos son preliminares y se presentan sólo de manera descriptiva. El número de réplicas para los ensayos fue de tres, por tanto se aplica desviación estándar para las pruebas de sensibilidad, pero no para los controles.

Resultados Preliminares

Los resultados obtenidos mediante microscopía de fuerza atómica, puede visualizarse en la Fig. 2. las imágenes escaneadas con $5 \mu\text{m}$ de área. En la imagen **A** aparecen las nanopartículas de quitosano sin funcionalización y se observa que están más dispersas en comparación con la imagen **B**. De esto se concluye que el agente modificante también funciona como agente entrecruzante, ya que se observa mayor aglomeración en las nanopartículas funcionalizadas con el agente modificante de la mora.

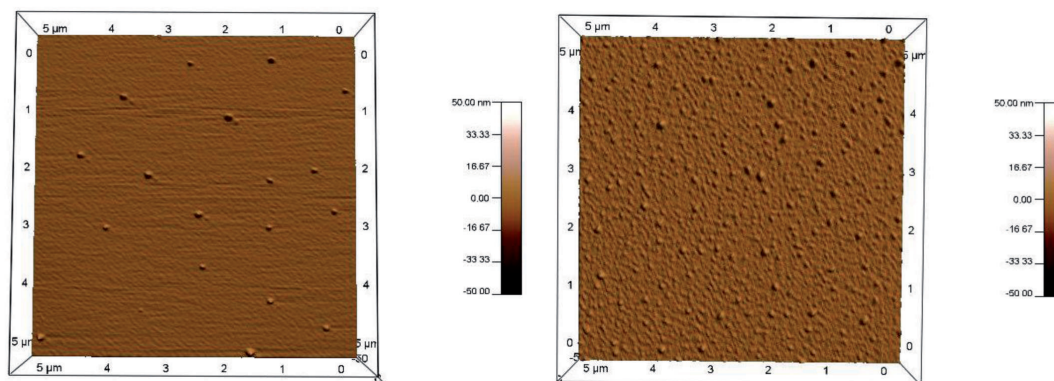


Figura 2. Imágenes de microscopía de fuerza atómica donde **A** representa el barrido de las NCs y **B** el de las NCS funcionalizadas.

De acuerdo a la Fig. 3, que representa el gráfico de longitud y tamaño de los escaneos y la Tabla 3,

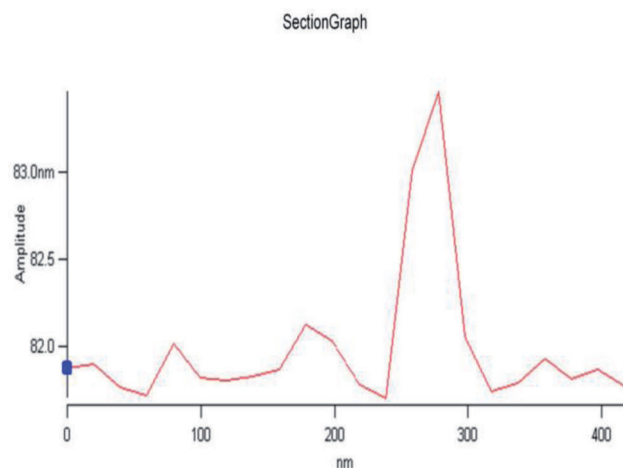


Figura 3. Gráfico de longitud por microscopía defuerza atómica.

Tabla 3. Diámetro promedio de las nanopartículas.

Muestra	Diámetro promedio (nm)	Desv. Stand.
NCs	98,5	0,33
NCs M	101,5	0,42

los diámetros de partícula oscilan entre 98 nm y 102 nm en promedio. Los resultados obtenidos con goniometría (Fig. 4)

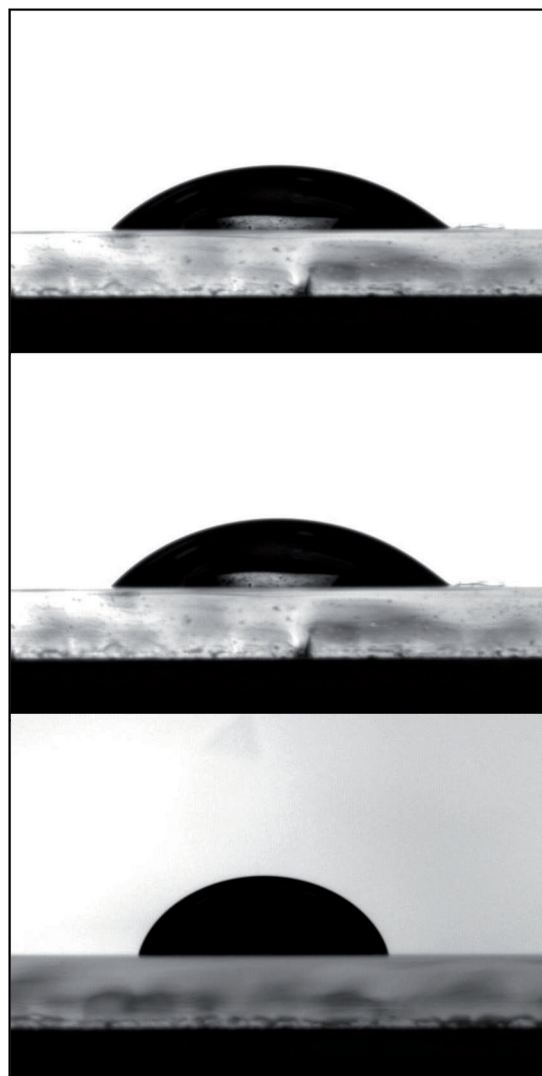


Figura 4. Imágenes de goniometría para las muestras

muestran una efectiva incorporación de la sustancia activa en la nanopartícula, lo que evidencia su funcionalización. Lo anterior se deduce debido a que en la imagen **A** el promedio de ángulo de contacto fue muy similar al del agente modificante de mora (imagen **B**), con valores de 59,49 y 56,60 respectivamente. Por otra parte, para las nanopartículas funcionalizadas (imagen **C**) el ángulo aumentó a un valor promedio de 87,08. De acuerdo al termograma (Fig. 5) y la Tabla 4, las nanopartículas funcionalizadas presentan un comportamiento térmico dual con respecto a los dos precursores, las curvas de las nanopartículas con y sin funcionalización son similares al inicio del termograma, pero a medida que este avanza en

función de la temperatura se asemejan las nanopartículas funcionalizadas y el agente modificante de la mora.

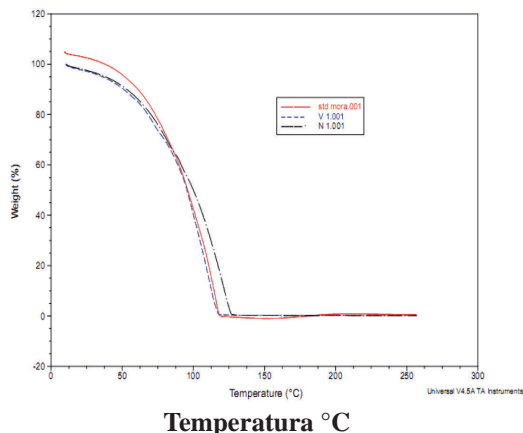


Figura 5. Termograma de las tres muestras.

Tabla 4. Temperaturas de descomposición para las muestras

Muestra	Temperatura de Descomposición (C)
NCs	129,0
M std	112,0
NCs M	112.8

Las nanopartículas de quitosano funcionalizadas presentan mayor efecto bacteriostático en microorganismos gram-positivos que las nanopartículas de quitosano sin funcionalizar, tal como se muestra en los gráficos de la Fig. 6.

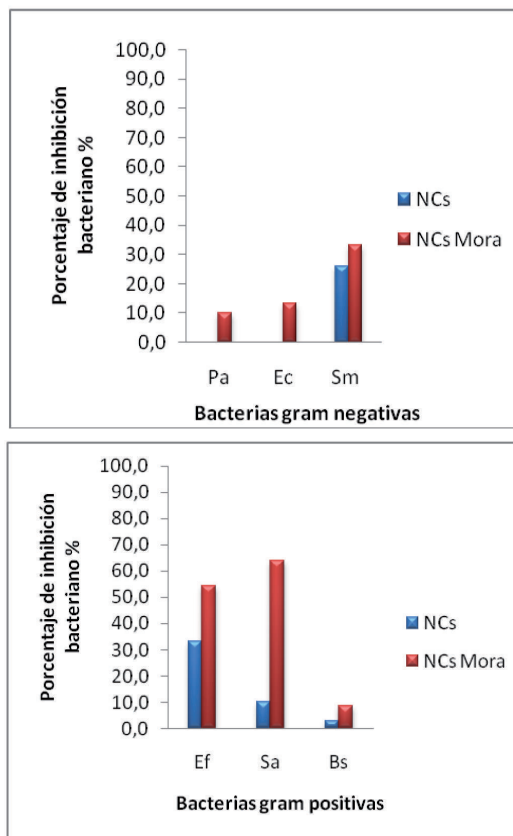
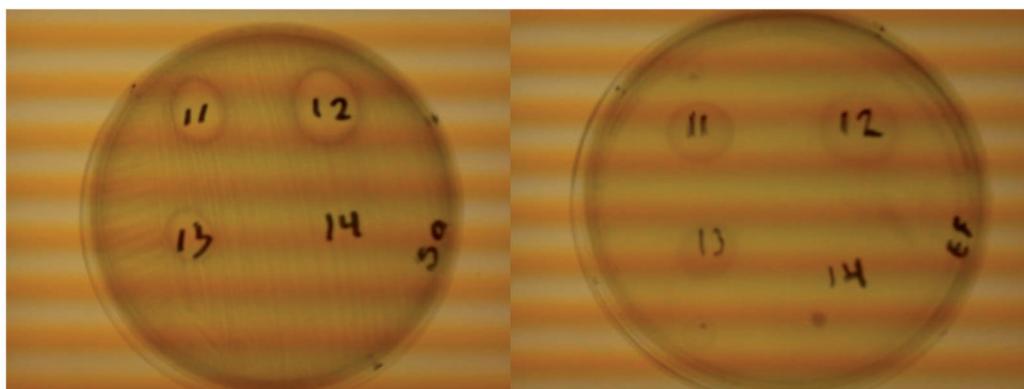


Figura 6. Gráficos del porcentaje de inhibición en bacterias gram-negativas y gram-positivas. En la Fig. 7 se ilustran algunos de los halos inhibitorios en *S. aureus* y *E. faecalis* para muestras de nanopartículas funcionalizadas con el agente modificante proveniente del extracto de mora (11, 12 y 13).



las bacterias Sa y Ef.

Discusión

La concentración de ácido gálico del extracto de la mora oscila entre 90 y 100 mg/100mg (Tabla 2).

Según las imágenes de microscopía de fuerza atómica las nanopartículas funcionalizadas presentan mayor aglomeración y están presentes en mayor cantidad que las no funcionalizadas.

El tamaño promedio del diámetro de las nanopartículas de quitosano es de 100 nm aproximadamente (Tabla 3).

Con los resultados de termogravimetría y goniometría se concluye que la funcionalización de las nanopartículas es efectiva, ya que estas presentan propiedades tanto de sus precursores, es decir, de las nanopartículas sin funcionalizar como del agente modificante.

De acuerdo al gráfico de la Fig. 6 y las Tablas 5-11, dónde se determinan los halos inhibitorios; ocurre inhibición bacteriana en las bacterias gram-positivas: 64% de inhibición en *S. aureus* y 54,2% en *E. faecalis*, con respecto al control positivo.

Tabla 5. Diámetros de inhibición bacteriana (mm).

Bacterias	Gram negativas			Gram positiva		
	Pa	Ec	Sm	Ef	Sa	Bs
Control +	10,0	15,0	2,70	24,0	25,0	3,50
NCs	0,00	0,00	0,70	8,00	2,5	0,10
NCs M	1,00	2,00	0,90	13,0	16,0	0,30
Control -	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabla 6. Diámetros (mm) y porcentajes (%) de inhibición en *P. aeruginosa*.

Agente de prueba	Halo de inhibición para pa (mm)	Desviación estándar	Porcentaje de inhibición para pa (%)
Control Positivo	10,0	N.A.	100
NCs	0,00	0,00	0,00
NCs M	1,00	0,06	10,0
Control Negativo	0,00	N.A.	0,00

Tabla 7. Diámetros (mm) y porcentajes (%) de inhibición en *E. coli*.

Agente de prueba	Desviación estándar		
	Halo de inhibición para <i>Ec</i> (mm)		Porcentaje de inhibición para <i>Ec</i> (%)
Control Positivo	15,0	N.A.	100
NCs	0,00	0,00	0,00
NCs M	2,00	0,06	13,3
Control Negativo	0,00	N.A.	0,00

Tabla 8. Diámetros (mm) y porcentajes (%) de inhibición en *S. marcescens*.

Agente de prueba	Halo de inhibición para <i>Sm</i> (mm)	Desviación estándar	Porcentaje de inhibición para <i>Sm</i> (%)
Control Positivo	2,70	N.A.	100
NCs	0,70	0,01	25,9
NCs M	0,90	0,02	33,3
Control Negativo	0,00	N.A.	0,00

Tabla 9. Diámetros (mm) y porcentajes (%) de inhibición en *E. faecalis*.

Agente de prueba	Desviación estándar		
	Halo de inhibición para <i>Ef</i> (mm)		Porcentaje de inhibición para <i>Ef</i> (%)
Control Positivo	24,0	N.A.	100
NCs	8,00	0,09	33,3
NCs M	13,0	0,10	54,2
Control Negativo	0,00	N.A.	0,00

Tabla 10. Diámetros (mm) y porcentajes (%) de inhibición en *S. aureus*.

Agente de prueba	Halo de inhibición para Sa (mm)	Desviación estándar	Porcentaje de inhibición para Ef (%)
Control Positivo	25,0	N.A.	100
NCs	2,5	0,09	10,0
NCs M	16,0	0,20	64,0
Control Negativo	0,00	N.A.	0,00

Tabla 11. Diámetros (mm) y porcentajes (%) de inhibición en *B. subtilis*.

Agente de prueba	Halo de inhibición para Bs (mm)	Desviación estándar	Porcentaje de inhibición para Bs (%)
Control Positivo	3,50	N.A.	100
NCs	0,10	0,06	2,90
NCs M	0,30	0,06	8,60
Control Negativo	0,00	N.A.	0,00

En microorganismos gram-negativos la bacteria *S. marcescens* alcanzó 33,3% de inhibición, mientras que la inhibición en *P. aeruginosa* y *E. coli* fue menor a 20,0%.

De los halos de inhibición según la Tabla 5, se concluye que las nanopartículas de quitosano poseen inhibición del crecimiento microbiano y que la funcionalización de las mismas con moléculas del extracto de mora (agente modificante) aumenta dicha actividad.

El efecto resultante sobre los agentes patógenos puede atribuirse a la presencia de polifenoles, saponinas, alcaloides, taninos, entre otros, presentes en el agente modificante empleado (extracto de mora).

Referencias

Armentia, A., Lombardero, M., Barber, D., Callejo, A., Vega, J., Martínez, C., y Rebollo, S. (1999). Anafilaxia por moras (*Morus nigra*). *Alergología e Inmunología Clínica* 14, 398-401.

Begin, A., y Calsteren, M. R. (1999). Antimicrobial films produced from chitosan. *International Journal of Biological Macromol*, 26, 63-67.

Fuentes, L. B., y Pastor de Abram, A. (2004). Preparación, caracterización y evaluación de películas de quitosano proveniente de calamar gigante "*Dosidicus gigas*" para uso médico. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. Per, 75 (1).

Gutiérrez, B. A. (2002). Chocolate, polifenoles y protección a la salud. *Acta Farmacèutica. Bonaerense*, 21 (2), 149-52.

Márquez, C., Cartagena, J., y Pérez, M. (2009). Efecto de recubrimientos comestibles sobre la calidad en poscosecha del níspero japonés (*Eriobotrya japonica T.*). *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 16, 304-310.

Peniche, C., Argüelles, W., Peniche, H., & Acosta, N. (2003). Chitosan: An Attractive Biocompatible Polymer for Microencapsulation. *Macromolecular Bioscience*, 3, (10), 511-520.

Hassan, E., Parish, R., & Gallo, R. (1992). Optimized formulation of magnetic chitosan microspheres containing the anticancer agent, oxantrazole. *Pharmaceutical Research*, 9, 390-397.

Rinaudo, M. (2008). Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer. International*. 57, (3), 97-430.

Madrigal, S., Rodríguez, G., Krueger, C., & Reed, J. (2010). Evaluation of Costa Rican Traditional Fruits as potencial sources of natural polyphenolic antioxidants and antimicrobials. *Inventi Journals*, 1.

Ohya, Y., Takei, T., Kobayashi, H., & Ouchi, T., (1993). Release behavior of 5-fluorouracil from chitosan-gel microspheres immobilizing 5-fluorouracil derivative coated with polysaccharides and their cell specific recognition. *Journal of Microencapsulation* 10, 1-9.