

[dx.doi.org/10.17488/RMIB.38.1.26](https://doi.org/10.17488/RMIB.38.1.26)

Preparación y Caracterización de Nanocompositos Quitosano-Cobre con Actividad Antibacteriana para aplicaciones en Ingeniería de Tejidos

Preparation and characterization of Copper Chitosan Nanocomposites with Antibacterial Activity for Applications in Tissue Engineering

K. Maldonado-Lara¹, G. Luna-Bárceñas², E. Luna-Hernández², F. Padilla-Vaca³, E. Hernández-Sánchez³, R. Betancourt-Galindo⁴, J.L. Menchaca-Arredondo⁵, B.L. España-Sánchez²

¹Departamento de Ingeniería Biomédica, Universidad de Celaya

²Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Querétaro

³Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato

⁴Departamento de Materiales Avanzados, Centro de Investigación en Química Aplicada

⁵Facultad de Ciencias Físico Matemáticas, Universidad Autónoma de Nuevo León

RESUMEN

El presente trabajo describe la preparación de nanocompositos formulados a partir de quitosano (QS)/nanopartículas de cobre (nCu) con características antibacterianas y aplicación potencial en ingeniería de tejidos. Para ello, se prepararon nanocompositos mediante mezclado en solución asistido con ultrasonido con el objetivo de incrementar la dispersión de la carga nanométrica en el biopolímero. El análisis de FTIR demostró que la presencia de nCu en la matriz de QS favorece la interacción del nCu con los grupos amino/hidroxilo de la molécula del QS. Se determinó mediante UV-Vis que los nanocompositos QS/nCu presentan absorción asociada con la presencia de nanopartículas y la posible liberación de iones Cu^{2+} en medio líquido. Mediante AFM se determinó que el QS hidratado forma una malla con microporos, que puede favorecer la penetración de bacterias en el nanocomposito y su interacción con las nCu. Finalmente, se determinó el efecto antibacteriano del material al contacto con la bacteria *Staphylococcus aureus*, en donde se presenta una actividad antibacteriana superior al 90% entre los 90 y 180 min de interacción. Dichos resultados sugieren que es posible obtener nanomateriales antibacterianos biocompatibles para su posible aplicación en ingeniería tisular.

KEYWORDS: Quitosano, Nanopartículas de cobre, Nanocompositos antibacterianos.

ABSTRACT

The Present work describes the preparation of nanocomposites based on chitosan (QS)/copper nanoparticles (nCu) with antibacterial properties and potential application in tissue engineering. For this purpose, nanocomposites were prepared by solution blending with ultrasound assisted, aiming to increase the nanoparticles dispersion in the biopolymer. FTIR analyses demonstrates that nCu supported in QS increase their interaction of nanoparticles with amine/hydroxyl groups of QS molecule. UV-Vis analyses demonstrates that QS/nCu nanocomposites have an absorption signal associated with the presence of nanoparticles and the possible Cu²⁺ ions release in liquid media. AFM analyses shown that hydrated QS form a mesh with micro pores, improving the bacterial penetration and the direct contact with nCu. This behavior was corroborated by antibacterial assays, where QS/nCu nanocomposites shown an antibacterial activity higher than 90% between 90-180 minutes of interaction. Our results suggest that is possible to obtain combined antibacterial/biocompatible nanomaterials with potential application in tissue engineering.

PALABRAS CLAVE: Chitosan, Copper nanoparticles, Antibacterial nanocomposites.

Correspondencia

DESTINATARIO: B.L. España-Sánchez
INSTITUCIÓN: Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad
Querétaro
DIRECCIÓN: Libramiento Norponiente #2000, Fracc.
Real de Juriquilla, C.P. 76230, Querétaro, Querétaro,
México
CORREO ELECTRÓNICO: lespana@cinvestav.mx

Fecha de recepción:

15 de octubre de 2016

Fecha de aceptación:

26 de diciembre de 2016

INTRODUCTION

El desarrollo de biomateriales para regeneración de tejidos es una disciplina relativamente nueva que ha permitido resolver problemas asociados a la pérdida de tejidos y deficiencia de órganos. En los últimos años, los nanocompuestos de polímeros y nanopartículas metálicas han sido ampliamente estudiados, debido a que la incorporación de cargas nanométricas representa un incremento significativo en sus propiedades físicoquímicas, que pueden ser aprovechadas en diferentes áreas, principalmente en el área biomédica.

Uno de los biopolímeros de mayor interés en el área de ingeniería de tejidos es el quitosano (QS), el cual se define como un polisacárido lineal formado predominantemente por unidades de glucosamina, que se obtiene a partir del proceso de desacetilación de la quitina [1]. El QS posee propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad, no es tóxico [2] e incluso se ha demostrado que presenta propiedades antimicrobianas al contacto con patógenos, tales como bacterias y hongos [3, 4]. De acuerdo a lo anterior, el QS puede ser considerado como un material prometedor para una amplia variedad de aplicaciones biomédicas, como material para medicina regenerativa e ingeniería de tejidos, sustitutos de piel, hueso, cartílago, hígado, nervios y vasos sanguíneos, entre otros [5].

A pesar de que se ha reportado que el QS por si solo presenta actividad antimicrobiana, esta capacidad puede ser potencializada al incorporar cargas nanométricas específicas. Se ha reportado que existen diversos tipos de nanopartículas metálicas con características antimicrobianas, dentro de las cuales destacan plata [6], oro [7], cobre [8], zinc [9] y dióxido de titanio [10] entre otras. Recientemente, se ha despertado el interés científico e industrial por el estudio de nanopartículas de cobre (nCu), debido a que poseen propiedades antimicrobianas y físicoquímicas similares a las nanopartículas de plata, con la diferencia de que su costo de producción es mucho menor [11].

De acuerdo a lo anterior, es posible que al formular nanocompuestos quitosano/nanopartículas de cobre (QS/nCu) se puedan incrementar sus propiedades físico-químicas y antibacterianas, manteniendo la biocompatibilidad del biopolímero. En estudios preliminares, se han desarrollado diferentes nanocompuestos con quitosano y nanopartículas metálicas, que han sido aplicados para la regeneración en lesiones térmicas en un modelo animal [12], por lo cual el material presentado es un candidato efectivo para aplicaciones en ingeniería tisular.

En el presente trabajo se reporta la preparación de nanocompuestos basados en quitosano-nanopartículas de cobre (QS/nCu) mediante mezclado en solución asistido con ultrasonido a diferentes concentraciones, con el objetivo de obtener un nanocomposito con alta actividad antibacteriana y con aplicación potencial en el área biomédica e ingeniería de tejidos.

METODOLOGÍA

Se utilizó QS proveniente de Sigma Aldrich con un peso molecular medio y un grado de desacetilación del 75% - 85%. La solución de QS fue preparada disolviendo 1 gr del biopolímero en 99 mL de solución de ácido acético al 1% v/v, dejándose en agitación durante 4 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró la fracción no soluble del biopolímero mediante centrifugación. Como carga nanométrica se emplearon nanopartículas de cobre (nCu) sintetizadas mediante el método de descomposición térmica descrito por Betancourt y col. [13], con un diámetro promedio de entre 4 y 18 nm y morfología esférica. Para la evaluación antibacteriana, se utilizó como modelo la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC #6538, empleando como medio de cultivo para su crecimiento LB (Luria Bertani) proveniente de BD-BIOXON.

Preparación de nanocompuestos QS/nCu

Para la preparación de los nanocompuestos QS/nCu, se preparó una solución madre de nCu al 10% p/v, la cual

fue mezclada en 25 mL de la solución de QS y se dispersó con un equipo de ultrasonido de frecuencia fija marca Branson en un baño de hielo durante 6 minutos, con una amplitud del 60%. Se prepararon tres concentraciones de nCu: 0.01%, 0.57% y 5.30 % p/v. Las concentraciones de nanocompositos Qs/nCu fueron establecidas a partir de resultados previos obtenidos en trabajos anteriores [12]. Cada nanocomposito fue vertido en cajas Petri de 10 cm con un volumen promedio de 20 mL colocándose en estufa a 60 °C durante 8 horas para la obtención de películas, con un espesor promedio de 100 μm.

Caracterización de nanocompositos Qs/nCu

Para evaluar las propiedades químicas de las películas de QS/nCu, se llevó a cabo el análisis mediante la técnica de espectroscopia infrarroja (FTIR) empleando un equipo marca Perkin Elmer, a partir de reflectancia total atenuada (ATR), con una punta de diamante, escaneo de 24 barridos y una resolución de 4 cm⁻¹. Para determinar la presencia de nanopartículas/iones Cu²⁺ en las soluciones de Qs/nCu, se llevó a cabo el análisis mediante la técnica de espectroscopia UV Visible (UV-Vis) con un equipo marca Agilent 8453 empleando un barrido de 250 a 800 nm. Con el propósito de determinar las propiedades de superficie de los nanocompositos se realizaron mediciones mediante la técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM) con un equipo NT MDT NTEGRA Prima, a partir de una punta de nitruro de silicio en modo contacto y no contacto.

Actividad antibacteriana de nanocompositos QS/nCu

Para determinar la actividad antimicrobiana de los nanocompositos QS/nCu, se cortaron películas circulares con un diámetro de 2 cm y se realizó la neutralización-hidratación de las películas con una solución de NaOH 0.1 M y agua des-ionizada, mediante tres ciclos de lavado. Las películas fueron colocadas al centro de una caja Petri de 10 cm, colocando papel filtro húmedo estéril con el objetivo de simular una cámara

húmeda. En la superficie de cada película, se colocaron 25 μm de una suspensión de bacterias *S. aureus* de 16 horas de crecimiento, a una concentración de 1x10⁶ UFC/mL. Como control se colocó una película de QS sin nanopartículas. Posteriormente, se colocó un cubreobjetos sobre la superficie de cada película a fin de evitar la evaporación de la suspensión de bacterias. Los nanocompositos en sus diferentes concentraciones fueron incubados a 37 °C a diferentes tiempos (10, 90, 180 y 360 min). Posteriormente, cada película fue lavada con 10 mL de una solución buffer de fosfatos (PBS) estéril, agitando durante un minuto a 100 rpm. Finalmente, se tomaron alícuotas de 100 μL de la suspensión de lavado y se colocaron en una caja Petri con Agar LB, incubando a 37 °C durante 14 h.

El cálculo de actividad antibacteriana se efectuó a partir de la diferencia en el crecimiento de colonias que sobrevivieron a la interacción con las películas de QS/nCu (C) al ser comparados con las colonias de bacterias que crecieron en el control sin carga nanométrica (Co). El cálculo se realizó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad Antibacteriana (\%)} = \frac{C_0 - C}{C_0}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis mediante FTIR de nanocompositos QS/nCu

En la Figura 1 se presentan los espectros de FTIR obtenidos para el QS y los nanocompositos QS/nCu en sus diferentes concentraciones. Se puede observar las vibraciones características de la molécula del QS, localizadas alrededor de 1000 cm⁻¹, asociadas al enlace C-O-C del anillo glucopiranososa, además de la señal localizada alrededor de 1300 cm⁻¹, que corresponde a la vibración del C-N del grupo acetamido; la señal localizada alrededor de 1600 cm⁻¹ que corresponde a la

vibración del enlace C-N de la amida I, mientras que la señal localizada alrededor de 3400 cm^{-1} corresponde a la vibración de los enlaces OH/NH de la cadena principal del QS. Se puede apreciar que la presencia de nCu en la matriz de QS produce una disminución en la intensidad de la señal asociada a las vibraciones de los grupos hidroxilo y amino (OH/NH) de la cadena polimérica, la cual es proporcional a la concentración de nanopartículas. Lo anterior sugiere que las nCu y los iones Cu^{2+} liberados durante el mezclado en solución pueden interactuar con los grupos HO/NH de la cadena del QS, favoreciendo la formación de quelatos, lo cual coincide con lo reportado por diversos autores [12, 14-15], tal como se representa en la Figura 2.

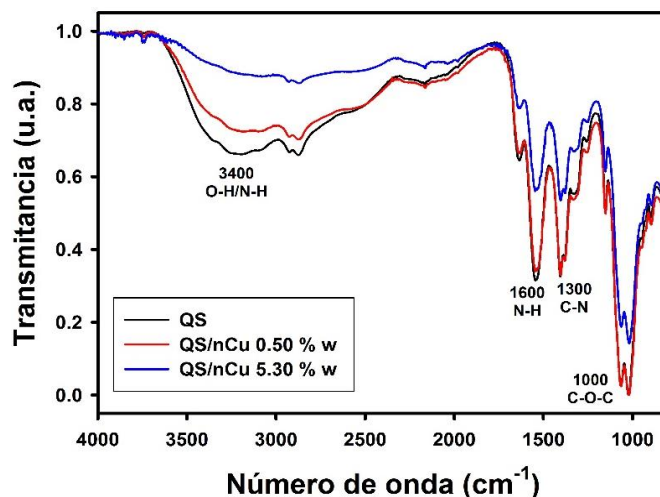


FIGURA 1. Espectros FTIR de QS y de nanocompositos QS/nCu a diferentes concentraciones.

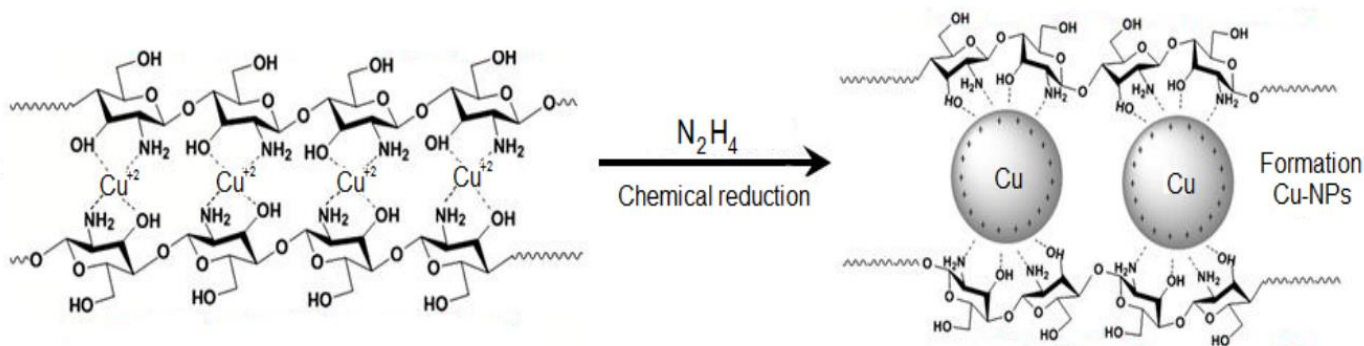


FIGURA 2. Representación esquemática del complejo QS/nCu [14].

Análisis mediante UV-Vis de nanocompositos QS/nCu

En la Figura 3 se presentan los espectros UV-Vis de los nanocompositos QS/nCu en diferentes concentraciones y su comparación con el QS. Se puede observar que el QS no presenta absorción en la región de análisis ($300\text{--}800\text{ nm}$). En el caso de los nanocompositos QS/nCu, conforme se incrementa la concentración de nCu, se incrementa la intensidad de las señales localizadas

alrededor de 370 nm , asociada a la presencia de iones Cu^{2+} , además de la señal localizada entre $600\text{--}700\text{ nm}$, la cual corresponde a la oscilación colectiva de electrones (surface plasmon resonance, SPR) característica de las nCu. Lo anterior indica que la presencia de nCu y su preparación mediante mezclado asistido con ultrasonido pueden producir la liberación de iones Cu^{2+} , lo que sugiere la presencia combinada de nanopartículas/iones en el nanocomposito en solución [15].

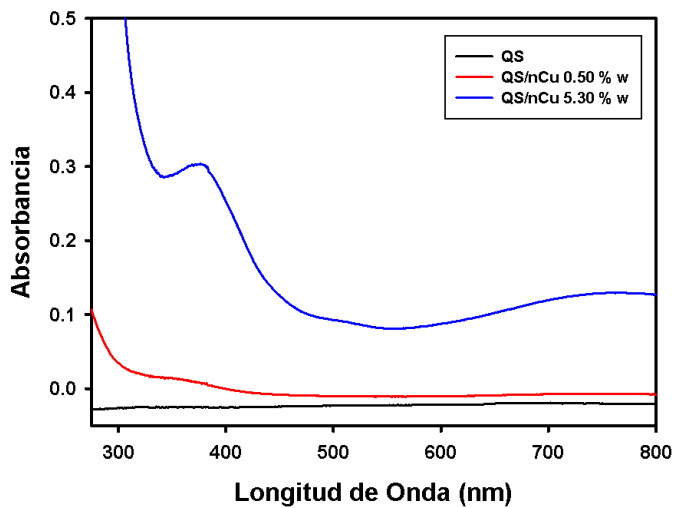


FIGURA 3. Espectros UV-Vis de QS y de nanocompositos QS/nCu a diferentes concentraciones.

Actividad antibacteriana de nanocompositos QS/nCu

Con el objetivo de elucidar las propiedades de superficie de la película de QS y el efecto de la hidratación de la misma, se llevaron a cabo análisis de AFM sobre el biopolímero antes y después de su hidratación. Además, se efectuó el análisis de bacterias colocadas en el QS hidratado y su comportamiento al contacto con el nanocomposito QS/nCu, tal como se observa en la Figura 4. En la Figura 4a se presenta la imagen 2D de la película de QS seco, en donde se aprecia la presencia de una superficie con una rugosidad promedio de 46.4952 nm , además de algunos agregados, producto de la fracción no soluble del QS durante su preparación en película.

Al hidratar la película de QS (Figura 4b) se puede observar la formación de una malla con microporos con morfología irregular, con un diámetro promedio de $10 \mu\text{m}$, además de un incremento en la rugosidad del biopolímero (82.0396 nm). Este comportamiento sugiere que la hidratación del biopolímero y de los nanocompositos QS/nCu pueden favorecer la formación de una malla que permita la posible penetración de bacterias dentro del material. En la Figura 4c se presenta la imagen de bacterias *S. aureus* depositadas en la superficie de una

película de QS, en donde se aprecia una morfología bacteriana característica de *S. aureus*, con un diámetro promedio de $1.5 \mu\text{m}$. El tamaño de las bacterias promueve su penetración a través de la malla del nanocomposito hidratado, incrementando su interacción con las nCu embebidas en el biopolímero. Finalmente, en la Figura 4d se presenta la imagen 2D del nanocomposito QS/nCu en concentración de $5.3\% \text{ p/v}$, en donde se observa la presencia de diversos aglomerados de nCu localizados en los primeros 100 nm de la superficie del biopolímero. Los resultados obtenidos sugieren que la hidratación del nanocomposito QS/nCu es crucial para la penetración de las bacterias y su posible interacción con las nCu soportadas en el material.

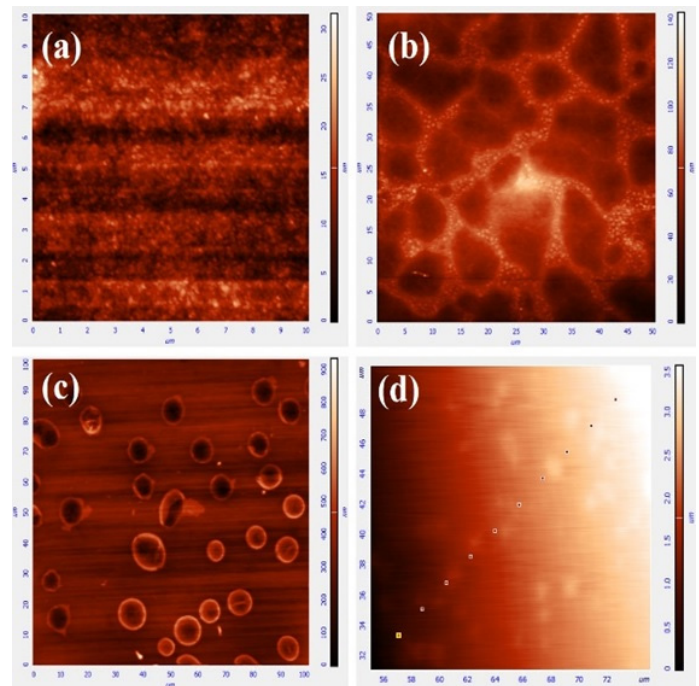


FIGURA 4. Imágenes 2D obtenidas mediante AFM de películas de QS y QS/nCu. (a) QS seco. (b) QS hidratado. (c) bacteria *S. aureus* depositada en superficie de QS y (d) QS/nCu $5.3\% \text{ p/v}$.

Actividad antibacteriana de nanocompositos QS/nCu

En la Figura 5 se presenta la actividad antibacteriana de los nanocompositos QS/nCu y su comparación con el biopolímero sin carga, contra la bacteria *S. aureus*. Cabe señalar que el QS por sí solo no presenta actividad antibacteriana, posiblemente asociada con la neutralización previa del material. Se puede observar que a los 10 min de interacción de las bacterias con los nanocompositos, la actividad antibacteriana es dependiente de la concentración de nCu en el biopolímero. A partir de los 90-180

min de interacción se inhibe por completo el crecimiento de las bacterias en contacto con el material en todas las concentraciones de QS/nCu analizadas. De acuerdo con los resultados obtenidos, los nanocompositos QS/nCu presentan alta eficacia bactericida al contacto con *S. aureus*, uno de los principales patógenos causantes de infecciones nosocomiales; por lo que los nanocompositos QS/nCu pueden ser candidatos efectivos para su uso en el área biomédica, enfocados al diseño de dispositivos aplicados en ingeniería de tejidos.

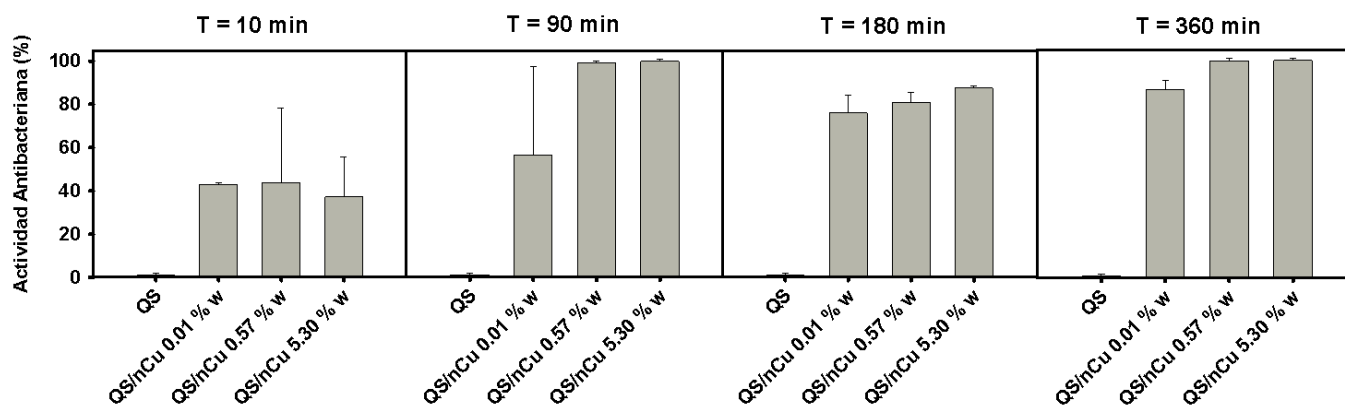


FIGURA 5. Actividad antibacteriana de nanocompositos QS/nCu a diferentes concentraciones, al contacto con la bacteria *S. Aureus*.

CONCLUSIONES

El presente trabajo describe la preparación de nanocompositos QS/nCu en diferentes concentraciones, en donde se evaluaron sus características físico-químicas y antibacterianas en comparación con el biopolímero sin carga. Se determinó que los nanocompositos presentan alta eficacia bactericida al contacto con la bacteria *S. aureus*, en un tiempo promedio entre 90 y 180 min. Nuestros resultados sugieren que el material obtenido presenta las propiedades biológicas y funcionales del QS, así como las propiedades antimicrobianas de las nCu, por lo que los nanocompositos QS/nCu presentan una excelente alternativa como biomaterial para su posible aplicación en ingeniería de tejidos.

RECONOCIMIENTOS

Esta investigación fue realizada gracias al apoyo del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), unidad Querétaro, a través de su colaboración con la Facultad de Físico Matemáticas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y el Departamento de Biología de la Universidad de Guanajuato.

REFERENCIAS

- [1] E. Khor, and L. Y. Lim, "Implantable Applications of Chitin and Chitosan," *Biomaterials*, 24(1), 2339-2349, 2003. [http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00026-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00026-7)
- [2] B. Carreño-Gomez, and R. Duncan, "Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres," *International Journal of Pharmaceutics*, 148(2), 231-240, 1997. [10.1016/S0378-5173\(96\)04847-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173(96)04847-8)
- [3] M. Kong, X. G. Chen, K. Xing, and H. J. Park, "Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review," *International journal of food microbiology*, 144(1), 51-63, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>
- [4] S. Sagoo, R. Board, and S. Roller, "Chitosan inhibits growth of spoilage micro-organisms in chilled pork products", *Food Microbiology*, 19(2), 175-182, 2002. [10.1006/fmic.2001.0474](http://dx.doi.org/10.1006/fmic.2001.0474)
- [5] H. K. No, N. Y. Park, S. H. Lee, and S. P. Meyers, "Antibacterial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weights," *International journal of food microbiology*, 74(1), 65-72, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00717-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00717-6)
- [6] I. Sondi, and B. Salopek-Sondi, "Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria" *Journal of colloid and interface science*, 275(1), 177-182, 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012>
- [7] S. Perni, C. Piccirillo, J. Pratten, P. Prokopovich, W. Chrzanowski, I. Parkin and P. M. Wilson, "The antimicrobial properties of light-activated polymers containing methylene blue and gold nanoparticles", *Biomaterials*, 30(1), 89-93, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.09.020>
- [8] M. Raffi, S. Mehrwan, T. M. Bhatti, J. I. Akhter, A. Hameed, W. Yawar, and M. M. Hasan, "Investigations into the antibacterial behavior of copper nanoparticles against Escherichia coli", *Annals of microbiology*, 60(1) 75-80, 2010. [10.1007/s13213-010-0015-6](http://dx.doi.org/10.1007/s13213-010-0015-6)
- [9] Y. Xie, Y. He, P. L. Irwin, T. Jin and X. Shi, "Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against Campylobacter jejuni", *Applied and environmental microbiology*, 77(7), 2325-2331, 2011. [10.1128/AEM.02149-10](http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02149-10)
- [10] L. Brunet, D. Y. Lyon, E. M. Hotze, P. J. Alvarez and M. R. Wiesner, "Comparative photoactivity and antibacterial properties of C60 fullerenes and titanium dioxide nanoparticles", *Environmental science & technology*, 43(12), 4355-4360, 2009. [10.1021/es803093t](http://dx.doi.org/10.1021/es803093t)
- [11] J. P. Ruparelia, A. K. Chatterjee, S. P. Duttagupta and S. Mukherji, "Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles" *Acta Biomaterialia*, 4(3), 707-716, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2007.11.006>
- [12] Luna Hernández, E. "Síntesis de nanocompositos de quitosano y partículas metálicas para aplicaciones biomédicas". Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Materiales. CINVESTAV Unidad Querétaro. Febrero 2015.
- [13] R. Betancourt-Galindo, P. Y. Reyes-Rodríguez, B. A. Puente-Urbina, C. A. Avila-Orta, O. S. Rodríguez-Fernández, G. Cadenas-Pliego, and L. A. García-Cerda, "Synthesis of copper nanoparticles by thermal decomposition and their antimicrobial properties", *Journal of Nanomaterials*, 10(1), 2014. [10.1155/2014/980545](http://dx.doi.org/10.1155/2014/980545)
- [14] M. S. Usman, N. A. Ibrahim, K. Shameli, N. Zainuddin and W. M. Yunus, "Copper nanoparticles mediated by chitosan: synthesis and characterization via chemical methods", *Molecules*, 17(12), 14928-14936, 2012. [10.3390/molecules171214928](http://dx.doi.org/10.3390/molecules171214928)
- [15] S. Kumar-Krishnan, E. Prokhorov, M. Hernández-Iturriaga, J.D. Mota-Morales, M. Vázquez-Lepe, Y. Kovalenko, I.C. Sanchez, G. Luna-Bárcenas; "Chitosan/silver nanocomposites: Synergistic antibacterial action of silver nanoparticles and silver ions", *Eur. Polym. J.*, 67, 242-251, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.03.066>