

Obtención de materiales electrohilados polímero-nanopartículas con propiedades bactericidas

Meléndez-Estrada Idahli Alejandra, Muñoz-Escobar Antonio de Jesús, Garibay-Alvarado Jesús Alberto, Lang-Salas Michelle Gerardo, Cuevas-González Juan Carlos, Donohué-Cornejo Alejandro Espinosa-Cristóbal León Francisco, Reyes-López Simón Yobanny

Resumen— En la actualidad la resistencia bacteriana es un problema a nivel mundial. Las bacterias han desarrollado la capacidad de sobrevivir a condiciones de estrés con diversos mecanismos contra los fármacos causando infecciones con mayor morbilidad, mortalidad y generando altos costos para su tratamiento. El presente trabajo tiene como objetivo elaborar un compuesto polímero-cerámico a partir de poli-épsilon-caprolactona con nanopartículas de ceria en forma de membrana que mantenga estable la liberación de las nanopartículas de ceria propiciando un carácter bactericida para la aplicación biomédica en el recubrimiento de heridas cutáneas y así evitar la infección causada por bacterias patógenas.

Palabras clave— Nanopartículas, ceria, nanofibras, electrohilado, resistencia bacteriana

Introducción

Aunque para cada nueva forma de resistencia se ha desarrollado un nuevo antibiótico, existe el problema que la reserva de antibióticos ya no es suficiente porque se presentan cepas multirresistentes (Oromí Durich, 1980). Las nanopartículas se han optado para la investigación como nuevo tratamiento pensando en la forma que ataque directamente a las bacterias y no haya daño adverso, pero se presenta una desventaja que en su forma coloidal se encuentran aglomeraciones (Lu & Chou, 2008) afectando su actividad contra las bacterias. Las nanopartículas son de interés por sus propiedades reactividad y comportamiento óptico, por ejemplo, el óxido de titanio y dióxido de zinc se vuelven transparentes cuando su escala es nanométrica y a su vez pueden absorber la luz UV que son utilizados como protector solar (Vegas, 2017).

Estudios sobre el óxido de cerio a una escala nanométrica han mostrado que la ceria libera iones atravesando la membrana de la bacteria generando poros en su estructura y ocasionando su muerte (Goh et al 2014), además la ceria ayuda a la regeneración de heridas dérmicas en el aumento de proliferación y migración de fibroblastos, queratinocitos (Chigurupati et al 2013). Entre las características del óxido de cerio destaca la capacidad de almacenamiento de oxígeno. Esta propiedad se debe que se presenta como un conjunto de fases no estequiométricas comprendidas entre CeO_2 y Ce_2O_3 . El cerio se oxida a CeO_2 y almacena oxígeno, mientras se encuentra una mezcla de gases se produce la reducción a Ce_2O_3 y se desprende el oxígeno (Ramos Castellanos et al., 2002). Un polímero que tiene características para ser el agente indicado de matriz de liberación es la poli- ϵ -caprolactona (PCL), que es un poliéster hidrofóbico, biocompatible, alta plasticidad, dúctil y con una velocidad de degradación lenta; que no presenta reacciones inflamatorias y ayuda a la cicatrización de manera normal (Gomes et al 2015). La PCL es un polímero biodegradable con un largo tiempo de degradación por el cual es usado in vivo e in vitro. Posee propiedades mecánicas superiores a comparación de otro polímero biodegradable por su alta resistencia y elasticidad dependiendo de su peso molecular. Por el cual es adecuado para su uso en suturas, tendones, cartílago, hueso y en otras aplicaciones biomédicas donde se requiere resistencia mecánica. Sus aplicaciones biomédicas son: injertos vasculares, como materia prima para fabricar andamios de vasos sanguíneos de diámetro pequeño mediante electrohilado “electrospinning”. Elaborar un compuesto polímero-cerámico a partir de poli-épsilon-caprolactona con nanopartículas de ceria en forma de membrana con propiedades bactericidas.

Descripción del Método

Fabricación de fibras de PCL y PCL/ CeO_2 ; En una balanza analítica se pesaron 2 g del polímero poli- ϵ -caprolactona (PCL)(Sigma-Aldrich®), la masa de PCL se adicionó a un tubo Falcón® de 40 mL que se mantuvo en agitación hasta la disolución del polímero en 20 ml de acetona pura (Salmek®), se agregó 0.5 y 1 g de nanopulvos de óxido de cerio (SkySpringNanomaterials,Inc) obteniendo concentraciones al 2.5% y 5%, respectivamente. En una jeringa de vidrio de un volumen de 10 mL se colocó 2 mL de la solución de PCL/ CeO_2 , con una aguja de acero inoxidable de 0.80 mm de diámetro, la jeringa cargada se acomodó en la bomba inyectora ScientificLegato100®, la cual se programó con un flujo en un rango de 8-10 $\mu\text{L}/\text{min}$. En un colector rotatorio se colocó una hoja de aluminio, la distancia entre el colector y la punta de la aguja será de 15 cm. Finalmente, de una fuente de poder se colocó el polo positivo en la aguja y el polo negativo en el colector rotatorio, se administró un voltaje en un rango de 10-12 Kv.

La morfología de las fibras se observó por microscopía electrónica de barrido (MEB) (Hitachi©, FE-SEM, SU5000). El diámetro promedio de las fibras se determinó analizando las imágenes de MEB con el software de análisis de imágenes Fiji (Schindelin et al., 2012). Las muestras de los distintos tipos de fibras se analizaron con espectroscopia infrarroja con un espectrómetro (Brucker Optics®, ALPHA™) en el intervalo de número de onda 400–4000 cm⁻¹.

Evaluación de la actividad antimicrobiana

a) Difusión en agar; Se preparo 1L de agar Mueller-Hinton (Bioxon®), pesando en una balanza granataria 38 g de agar, se colocaron en un matraz (Pyrex®) de 1L y se agregó un volumen de 1L de agua destilada, se agitó el matraz manualmente hasta la disolución completa del agar. Una vez disuelto el agar, se colocó dentro de un microondas se calentó por 1 minuto para la clarificación del medio, finalmente se esterilizo en una autoclave, se seleccionó el ciclo de esterilización para líquidos durante 90 minutos. Terminado el tiempo de esterilización, en 20 cajas Petri (Plastik®) se vertieron 15 mL de agar Mueller-Hinton, las 20 cajas son esterilizadas bajo una lámpara de luz Ultravioleta durante 15 minutos. Con un asa bacteriológica calibrada, se tomó un inóculo de cada bacteria y se sembró por estría cruzada en cajas Petri con agar Mueller-Hinton, 2 cajas por cada bacteria. Con una perforadora se cortaron sensidiscos de PCL/CeO₂ con concentraciones de 2.5% y 5%, se colocaron en cada caja Petri para obtener duplicados de cada bacteria y de cada concentración de PCL/CeO₂ obteniendo así 20 cajas Petri, las cajas se incubarán a 37° C durante 24 horas. Finalmente, transcurrido el tiempo, con un vernier se medirá el halo generado por el sensidisco.

b) Método Espectrofotométrico; Para el ensayo por turbidimetría se preparó 1L de caldo nutritivo (Bioxon®), se pesó en una balanza granataria 8 g del caldo nutritivo en polvo, la masa pesada se colocó en un matraz de 1L y se agregó un volumen de 1L de agua destilada, se agitó el matraz manualmente hasta la disolución completa del polvo. En 18 tubos de ensayo de 10 x 10 mm se vertió un volumen de 3 mL por cada tubo, se taparon los tubos y se metieron a esterilizar en una autoclave, se seleccionó el ciclo de esterilización para líquidos durante 90 minutos. Terminado el tiempo de esterilización, con una micropipeta, se inoculó 100 µL de Staphylococcus aureus, Streptococcus mutans, Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli y Klebsiella oxytoca. Con una perforadora se cortaron 4 sensidiscos de PCL/CeO₂ de concentraciones de 0.05 g, 0.01 g, 0.02 g y 0.03 g, se colocó en cada tubo, se incubaron a 37° C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, con espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm se medirá la absorbancia de los tubos.

c) Metodo Milles-Misra; Para el ensayo de Milles-Misra se preparó 500 mL de caldo nutritivo (Bioxon®) y 1 L de agar nutritivo (Bioxon®), se pesó en la balanza granataria 4 g de caldo nutritivo en polvo y 38 g de agar nutritivo, la masa pesada se colocó en un matraz (Pyrex®) de 500 mL y se agregó el volumen de 500 mL de agua destilada, se agitó el matraz manualmente hasta la disolución del polvo, se llevó a esterilizar el matraz en autoclave (Lindberg Blue M) en el ciclo de esterilización para líquidos durante 90 minutos. En 500 microtubos de 1 mL se vertió 900µL de caldo nutritivo a cada uno. Previamente estandarizado las bacterias a una densidad óptica del 0.01 en el primer microtubo se agregó 100 µL de la bacteria y se realizó diluciones hasta 1 millón, se desechó 100 µL de este último. En una caja Petri dividida en 3 secciones previamente marcadas con las diluciones diez mil, cien mil y un millón. Se agregó 100 µL de cada dilución en la caja Petri una vez que la muestra se absorbió en el agar, se llevaron a incubar a 37 °C durante 24 horas. Al pasar el tiempo se realizó conteo de colonias en las 3 diluciones de cada caja Petri.

d) Análisis de datos; los datos obtenidos en el método espectrofotométrico y Miles-Misra se analizarán por medio de un ANOVA de Tukey con un criterio de significancia del 0.5. Se utilizará el programa SPSS versión 20 (SPSS, Chicago, USA).

Resumen de resultados

Caracterización de partículas de ceria (CeO₂) y de las fibras de poli-é-caprolactona-ceria (PCL-CeO₂).

La nanopartícula de ceria fue caracterizado por medio de espectroscopia infrarroja se observaron los grupos funcionales de la partícula en la figura 1-a se observan bandas en 3417, 1632 y 1381 cm⁻¹ están relacionadas con las vibraciones de las moléculas de agua absorbidas, el pico 533 cm⁻¹ que representa vibraciones de estiramiento del grupo cerio (Ce-O). Se caracterizo la partícula de ceria mediante difracción de rayos x en la figura 1-b se observaron picos de difracción característicos de la estructura cubica tipo fluorita del óxido de cerio, de acuerdo con su número de tarjeta JCPDS: 34-394 (Joint Committee on Powder Diffraction Standar).

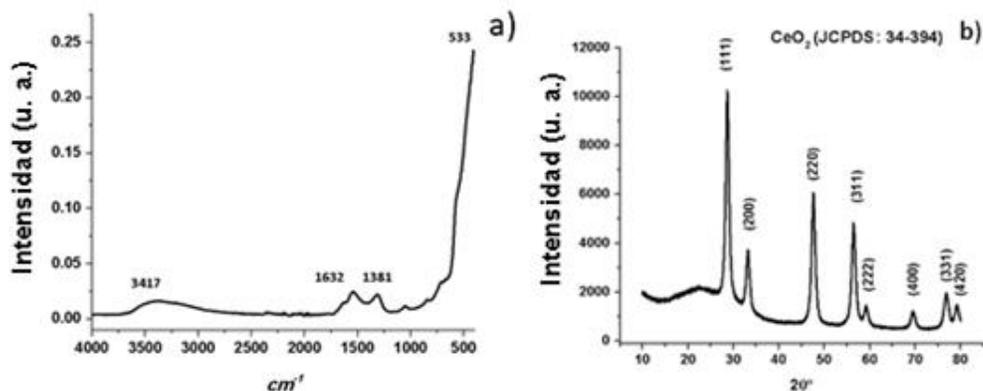


Figura 1. a) Espectroscopía infrarroja y b) difractograma de la nanopartícula de ceria (CeO_2).

En la figura 2-a se encuentra el espectro infrarrojo de la PCL, se observa la banda 1727 cm^{-1} que corresponde las vibraciones de estiramiento del grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$), la banda 1240 cm^{-1} vibraciones de estiramiento asimétricos del grupo éter ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$); la banda 1190 cm^{-1} vibraciones de estiramiento del enlace éter ($\text{O}-\text{C}-\text{O}$), las bandas 1949 cm^{-1} y 5865 cm^{-1} corresponden a vibraciones de estiramiento asimétricas y simétricas del grupo metileno (CH_2), por último la banda 1293 cm^{-1} corresponde a vibraciones de estiramiento de los grupos carbonilo ($\text{C}-\text{O}$) y alcano ($\text{C}-\text{C}$). En la figura 2-b se observan los grupos funcionales de la fibra PCL- CeO_2 donde se observan las bandas características relacionadas con las vibraciones de los grupos pertenecientes de la PCL y como de CeO_2 .

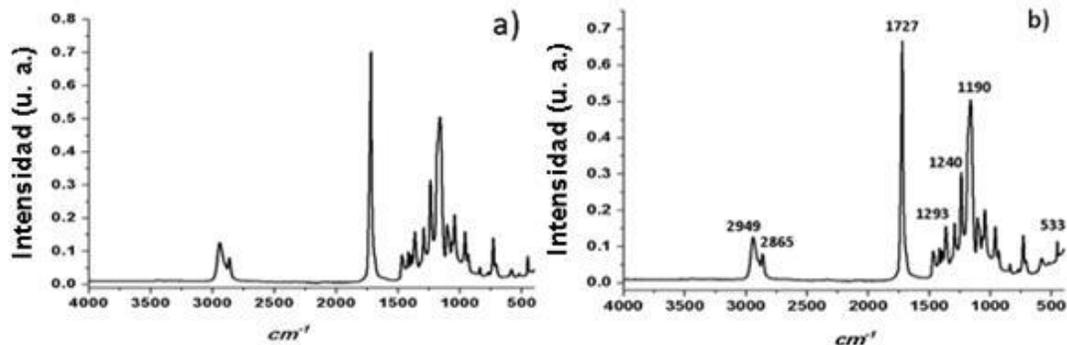


Figura 2. Espectro infrarrojo de las fibras PCL y PCL- CeO_2 .

Se analizó la microestructura de la fibra de poli-épsilon-caprolactona-ceria (PCL- CeO_2) a una concentración de 2.5 y 5.0 % por microscopía electrónica de barrido a 5,000 X. En la figura 3 se observa que tanto la distribución y forma de las fibras. La dispersión de la partícula CeO_2 no es homogénea.

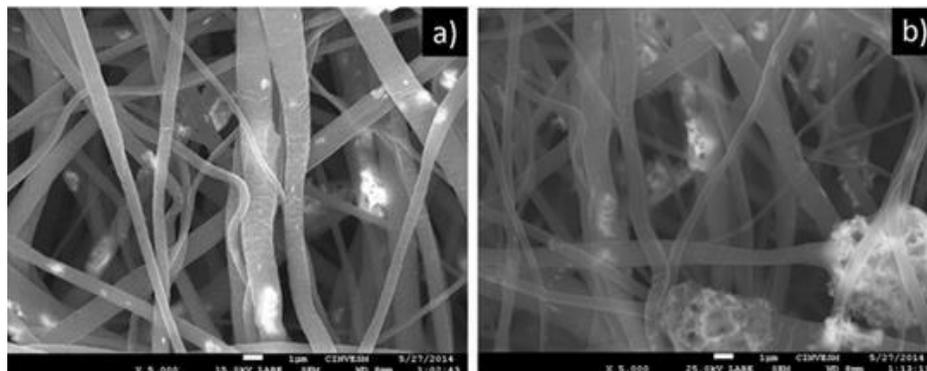


Figura 3. Micrografías de MEB a 5,000 X de la microestructura de la fibra PCL- CeO_2 al 2.5 y 5.0 % (a y b respectivamente).

Evaluación de la actividad antimicrobiana: Gram positivas.

Al realizar los ensayos de halo de inhibición del polvo de ceria y fibras de PCL, PCL-CeO₂ no se encontró ninguna inhibición como se puede apreciar en la figura 4, debido a la poca difusión de la partícula en un medio sólido.

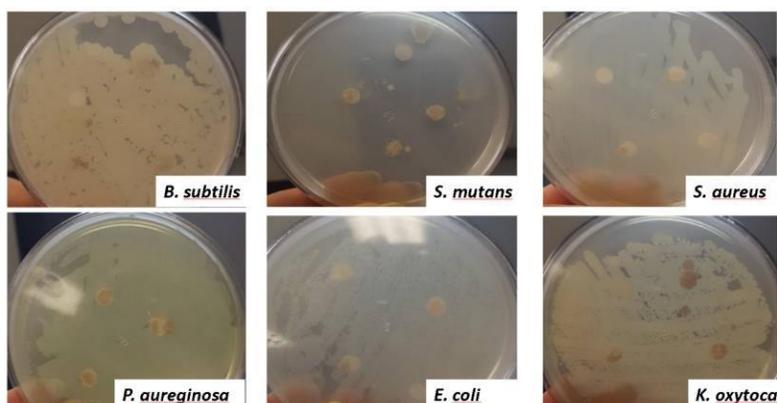


Figura 4. Halo de inhibición del nanopolvo de ceria, de fibras de PCL y PCL-CeO₂.

Por medio del método de turbidimetría se cuantificó el porcentaje de inhibición de bacterias por parte del nanopolvo de CeO₂ a distintas concentraciones tomando como control a la bacteria sin tratamiento. La concentración mínima inhibitoria (CMI) en *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, *S. mutans*, *S. aureus* y *B. subtilis* fue de 0.05%. El efecto inhibitorio del nanopolvo CeO₂ se observa en la Figura 11, en *E. coli* es de 64% a una concentración de 0.05% y de 96% a una concentración del 0.3%. En *P. aeruginosa* se inhibió 57% a una concentración de 0.05% y un 79% a una concentración de 0.3%. En *K. oxytoca* se inhibió 60% a una concentración de 0.05% indicando ser el porcentaje de inhibición más alto. En *S. mutans* se inhibió un 46% a una concentración de 0.05% y un 59% a una concentración de 0.3%. En *S. aureus* se inhibió un 66% a una concentración de 0.05% y un 83% a una concentración de 0.3%. En *B. subtilis* se inhibió un 10% a una concentración de 0.05% y un 85% a una concentración de 0.3%.

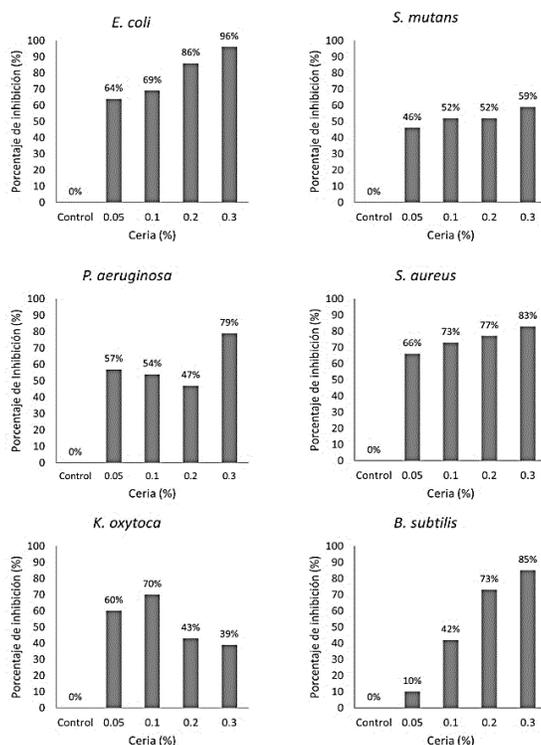


Figura-5. Porcentaje de inhibición bacteriana del compuesto a diferentes concentraciones de Nps CeO₂ en *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, *S. mutans*, *S. aureus* y *B. subtilis*.

La evaluación de la actividad antimicrobiana por medio de las técnicas de difusión en agar como método cualitativo, turbidimetría y Miles-Misra como método cuantitativo determinan la respuesta de cada una de las bacterias y su comportamiento respecto a cada concentración del nanopolvo CeO₂.

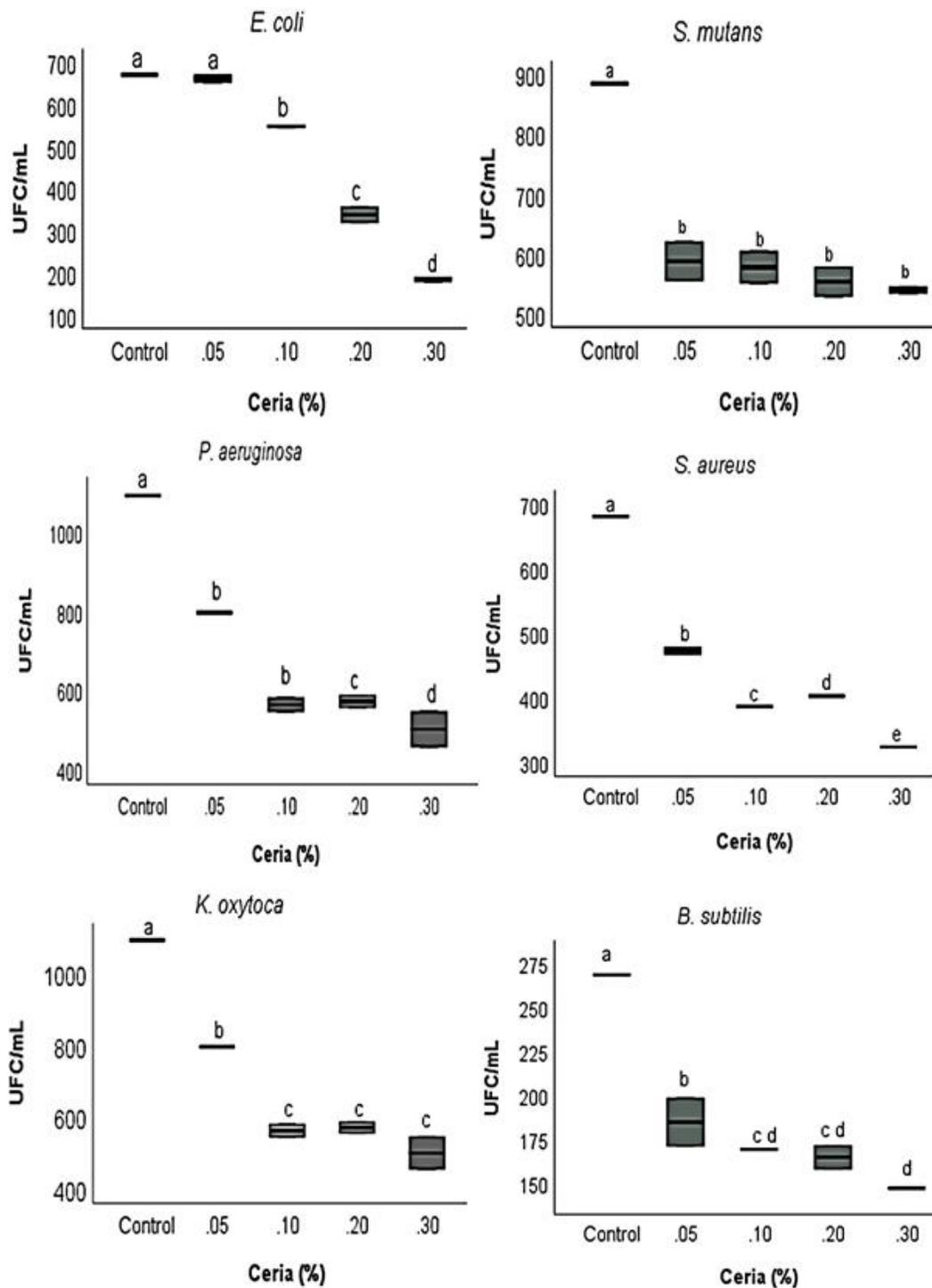


Figura-6. Efecto inhibitorio y unidades formadoras de colonias del compuesto a diferentes concentraciones del nanopolvo CeO₂ en *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. mutans*, *S. aureus* y *B. subtilis*.

Conclusiones.

Se logró elaborar el material compuesto de poli-épsilon-caprolactona-ceria. Las fibras resultantes de fueron de un diámetro de aproximadamente 660 ± 220 nm. Las técnicas de espectroscopia infrarroja y electrónica comprueban la existencia de las partículas de ceria dentro de las fibras de PCL. La técnica de difusión en agar no presentó inhibición debido a la poca interacción de la ceria en el medio de cultivo. La técnica de Miles-Misra se obtuvo una concentración mínima inhibitoria en todas las bacterias Gram positivas desde la concentración 0.05 g/mL, al igual en las bacterias Gram negativas excepción de *E. coli* la cual la concentración fue de 0.1 g/mL

Referencias.

1. Chigurupati, S., Mughal, M. R., Okun, E., Das, S., Kumar, A., McCaffery, M., ... Mattson, M. P. (2013). Effects of cerium oxide nanoparticles on the growth of keratinocytes, fibroblasts and vascular endothelial cells in cutaneous wound healing. *Biomaterials*, 34(9), 2194–2201.
2. Goh, Y.-F., Alshemary, A. Z., Akram, M., Abdul Kadir, M. R., & Hussain, R. (2014). In-vitro characterization of antibacterial bioactive glass containing ceria. *Ceramics International*, 40(1), 729–737.
3. Gomes, S. R., Rodrigues, G., Martins, G. G., Roberto, M. A., Mafra, M., Henriques, C. M. R., & Silva, J. C. (2015). In vitro and in vivo evaluation of electrospun nanofibers of PCL, chitosan and gelatin: A comparative study. *Materials Science and Engineering: C*, 46, 348–358.
4. Lu, Y.-C., & Chou, K.-S. (2008). A simple and effective route for the synthesis of nano-silver colloidal dispersions. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 39(6), 673–678.
5. Oromí Durich, J. (1980). Medicina integral: medicina preventiva y asistencial en el medio rural. *Medicina Integral*. IDEPSA. Retrieved from <http://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-resistencia-bacteriana-los-antibioticos-10022180>
6. Ramos Castellanos, P., Alvarez Oquina, C., & Ramos Criado, P. A. (2002). Medio ambiente: calidad ambiental. Universidad de Salamanca.
7. Vegas, J. (2017). Percepción del riesgo en investigadores por exposición a nanopartículas. Ediciones Universidad de Salamanca