



Actividad antibacteriana de nanopartículas de quitosano modificado, hidrofobizado con ácido octanoico, cargadas con carvacrol

Mariangel Luna¹, Osvaldo Beltran¹, David A. Encinas-Basurto², Pablo Mendez-Pfeiffer³, Manuel G. Ballesteros-Monreal³, Dora Valencia³, Antonio Topete⁴, Marco A. López-Mata⁵, Miguel A. Valdez¹, Josué Juárez^{1*}

1. Posgrado en Nanotecnología, Departamento de Física, Universidad de Sonora, Unidad Centro, C.P. 83000 Hermosillo, Sonora, México

2. Departamento de Física Matemáticas e Ingeniería, Universidad de Sonora, Campus Navojoa, C.P. 83000 Hermosillo, Sonora, México

3. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora, Campus Caborca, C.P. 83000 Hermosillo, Sonora, México

4. Departamento de Fisiología, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Sierra Mojada 950, Apdo. Postal 44340, Guadalajara, Jalisco, México

5. Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora, Campus Cajeme, Blvd. Bordo Nuevo s/n, Antiguo Providencia, C.P. 85040, Cd. Obregón, Sonora, México

josue.juarez@unison.mx

Resumen

El quitosano (Qs) es ampliamente utilizado en el desarrollo de nanosistemas de liberación de componentes bioactivos en áreas de la biomedicina, debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja toxicidad. En el presente trabajo se reporta la obtención de nanopartículas de quitosano modificado con ácido octanoico (QsH) y la encapsulación y transporte de un compuesto bioactivo. Se seleccionó el carvacrol (CAR), compuesto monoterpenoide principal del aceite esencial de orégano y tomillo, debido a sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes. La estructura química del

Qs se modificó mediante una reacción de amidación, injertando cadenas hidrocarbonadas de 8 carbonos a lo largo del esqueleto químico del Qs (grado de sustitución 15 %), por medio de la unión del ácido carboxílico del ácido octanoico y los grupos amino del Qs. El éxito de la reacción se monitorizó por espectroscopía de infrarrojo (FTIR). Las nanopartículas (NPs) de QsH se obtuvieron por el método de gelificación iónica usando tripolifosfato pentasódico (TPP) como agente reticulante. Para favorecer la encapsulación del CAR en las NPs de QsH, se preparó una emulsión de Tween 80:CAR la cual se utilizó en diferentes proporciones de

QsH/CAR (25.0, 50.0 y 75.0 % (p/p)) para la obtención de las NPs de QsH/CAR. Una vez obtenidas las NPs de QsH con y sin CAR se les determinó el tamaño hidrodinámico y el potencial Z. En particular, las NPs de QsH/CAR preparadas a la proporción del 50 % (p/p) mostraron un tamaño de promedio de 200 nm y un potencial Z de 13.44 mV, las cuales muestran una forma ovoide, según las imágenes de Microscopía de Fuerza Atómica (AFM). Los ensayos de viabilidad bacteriana muestran que tanto *E. coli* como *S. aureus* son susceptibles a la actividad de las NPs de QsH/CAR, observándose una drástica disminución de la viabilidad bacteriana, más para la bacteria Gram (+). Estos resultados sugieren que las NPs de QsH/CAR son biomateriales nanoestructurados novedosos con posibles aplicaciones en el área de la biomedicina.

Palabras clave

Nanopartículas basadas en quitosano, quitosano, actividad antibacteriana, aceites esenciales, carvacrol.

Introducción

Las bacterias forman parte de la microbiota; algunas son incluso de beneficio para el hospedero, ya que estas desempeñan funciones importantes en diversos procesos biológicos, como la regulación del proceso de digestión, modular el sistema inmunitario, evitar la colonización de patógenos oportunistas, entre otros [1, 2]. Sin embargo, una infección bacteriana puede ocurrir debido a un desequilibrio entre el hospedero y las bacterias. Además, el problema de infección puede agravarse cuando esta es ocasionada por bacterias resistentes a múltiples fármacos (BRMF) [1]. Al respecto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha publicado una lista de (BRMF), tales como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y

Escherichia coli (*E. coli*), bacterias a las que se les busca, de manera prioritaria, novedosas estrategias terapéuticas utilizando antibióticos existentes o nuevos compuestos con capacidad antibacteriana [3,4].

Los aceites esenciales han generado gran interés en el área de la medicina debido a su alta bioactividad, por lo que grandes esfuerzos se han realizado para utilizarlos en el tratamiento de infecciones ocasionadas por BRMF [5]. Por ejemplo, se ha comprobado la actividad bactericida de diferentes aceites esenciales como el carvacrol [6], clavo [7], canela [8], entre otros. La naturaleza lipofílica de los componentes de los aceites esenciales permite interactuar fácilmente con ácidos grasos de la densa membrana celular microbiana [9, 10], afectando la permeabilidad y propiedades mecánicas de estas, conduciendo a la muerte de las bacterias. Por ejemplo, el carvacrol (CAR, 2-metil-5-(1-metiletil) fenol, Figura 1a) aceite esencial del orégano (entre 60-70 %) y tomillo (en un 45 %) [11] ha generado interés para combatir infecciones bacterianas, ya que es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram (-), afectando la integridad de la membrana citoplasmática [12] y provocando con ello la salida del ATP, la inhibición de la actividad de las ATPasas y disminución de la fuerza motriz de los protones [13]. Sin embargo, el potencial uso del CAR en prácticas clínicas está limitado por su volatilidad y labilidad a la temperatura, luz y aire [14] y baja solubilidad en agua. La nanotecnología aplicada ofrece una solución a estos inconvenientes mediante el diseño y fabricación de dispositivos poliméricos de escala nanométrica (nanopartículas, nanoacarreadores, nanoplataformas, nanosistemas) que sirvan como matrices de carga, transporte y liberación de estos com-

ponentes bioactivos. Estos nanomateriales poliméricos pueden proteger al CAR de la actividad del agua, evitar que se volatilice, se oxide o se descomponga por efecto de la temperatura y la luz, aumentando la eficiencia bactericida del CAR.

Los materiales más utilizados en el diseño de este tipo de nanodispositivos de carga, protección, transporte y liberación de compuestos bioactivos son de origen biológico, como carbohidratos, lípidos, proteínas y polisacáridos, con los cuales se fabrican micelas, liposomas y nanopartículas poliméricas [15]. De estos biopolímeros, los polisacáridos son los más utilizados para este propósito, debido a que son altamente abundantes en la naturaleza y su obtención es de bajo costo. Además de que los polisacáridos son materiales seguros, no tóxicos, biodegradables y biocompatibles [16]. Por otra parte, la bioadhesividad y la alta capacidad de asociación que tienen los polisacáridos con otros componentes permite diseñar dispositivos de liberación controlada de componentes bioactivos a través de las barreras epiteliales [17].

En particular, el quitosano (Qs) es un polisacárido obtenido a partir de la desacetilación parcial o total de la quitina, el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza (el segundo después de la celulosa) [18, 19]. La quitina es un heteropolímero conformado por unidades de N-acetil-D-glucosamina (Figura 1b) y N-glucosamina (Figura 1c) unidas por un enlace glucosídico β -(1-4). Debido a la alta proporción de la unidad N-acetil-D-glucosamina (>90 %) la quitina es un polisacárido insoluble en agua y en solventes orgánicos. Por otra parte, el Qs, al ser un derivado de la quitina, su estructura también está conformada por unidades de

N-acetil-D-glucosamina y N-glucosamina, sin embargo, la proporción de glucosaminas (>50 %) es mayor que la unidad acetilada, por lo que el Qs es soluble en medios acuosos ligeramente ácidos debido a la proporción [18, 19]. En adición, este biopolímero se caracteriza por ser biodegradable, biocompatible, mucoadhesivo, modulador del sistema inmune, hemostático antibacteriano, antifúngico y cicatrizante [18-21], propiedades que han permitido que el Qs sea ampliamente utilizado en diferentes campos de ciencia, industria y tecnología. Se han desarrollado diversos materiales funcionales a base de quitosano, tales como hidrogeles, membranas de diálisis, suturas biodegradables, producción de gasas, cremas bactericidas, apósitos para tratamiento de quemaduras y nanopartículas de liberación de fármacos.

Las nanopartículas de Qs tiene particular interés para la biomedicina, debido a su capacidad de encapsular, transportar y liberar un fármaco en un sitio blanco. Ohya y col. [22] fueron los primeros en proponer un nanosistema de liberación de fármacos (con 5-fluoroacilo) a base de Qs. Las NPs de Qs fueron sintetizadas por emulsión simple utilizando glutaraldehído como agente entrecruzante. Sin embargo, el potencial efecto tóxico del glutaraldehído limita su aplicación en el área de la medicina. Posteriormente, Calvo y col. [23] prepararon NPs de Qs por gelificación ionotrópica usando tripolifosfato pentasódico (TPP) como agente entrecruzante. Las NPs de Qs obtenidas por este método es un proceso más gentil, conservando las propiedades de biodegradabilidad y biocompatibilidad del material resultante. Además, el TPP tiene menor grado de toxicidad que el glutaraldehído, lo que lo hace un candidato importante para

su aplicación en el área biomédica. Este proceso de síntesis se ha popularizado para obtener nanosistemas poliméricos basadas en quitosano para el transporte de macromoléculas (proteínas, ADN y ARN) [24, 25], así como para encapsular quimiofármacos tradicionales y otras moléculas de origen biológico con potencial terapéutico, como son los aceites esenciales.

En el presente trabajo, se diseñó y fabricó una nanopartícula a base de quitosano la cual fue cargada con CAR como componente bactericida. Para esto, la estructura química del quitosano se modificó con ácido octa-noico, mediante una reacción de amidación con la finalidad de modular las propiedades de agregación del quitosano y aumentar la capacidad de carga del CAR. Las NPs de Qs se obtuvieron por el método de gelificación iónica, ajustando el pH de la disolución de quitosano a 4.2, la cantidad de TPP utilizado y la proporción de CAR adicionado durante el proceso de gelificación. Las NPs de Qs tienen una morfología esférica y se encuentran en el rango de la escala nanométrica con una carga superficial de aproximadamen-

te 30 mV. Una vez obtenida la NP de QsH cargada con carvacrol (QsH/CAR) se evaluó su potencial antibactericida usando cepas Gram (-) y Gram (+) modelos, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente.

Metodología

Determinación de número de grupos ionizables del Qs

El número de grupos aminos presentes en la molécula del Qs se determinó por valoración potenciométrica, añadiendo cantidades de disolución de HCl 0.1 M y registrando los cambios de los valores del pH y la conductividad. Brevemente, 0.1 g de Qs de bajo peso molecular (120 000 g/mol), proporcionado por Sigma-Aldrich (Toluca, Estado de México, México), se agregó a 50 mL de agua desionizada. A la suspensión acuosa, la cual se colocó bajo agitación magnética suave y constante, se le agregaron 200 μ L de una disolución de HCl (0.1 M) y el valor de pH y conductividad se registró una vez que estos valores variaban por 0.01. Los valores de pH y conductividad obtenidos se graficaron contra la concentración de HCl añadida a la suspensión de Qs.

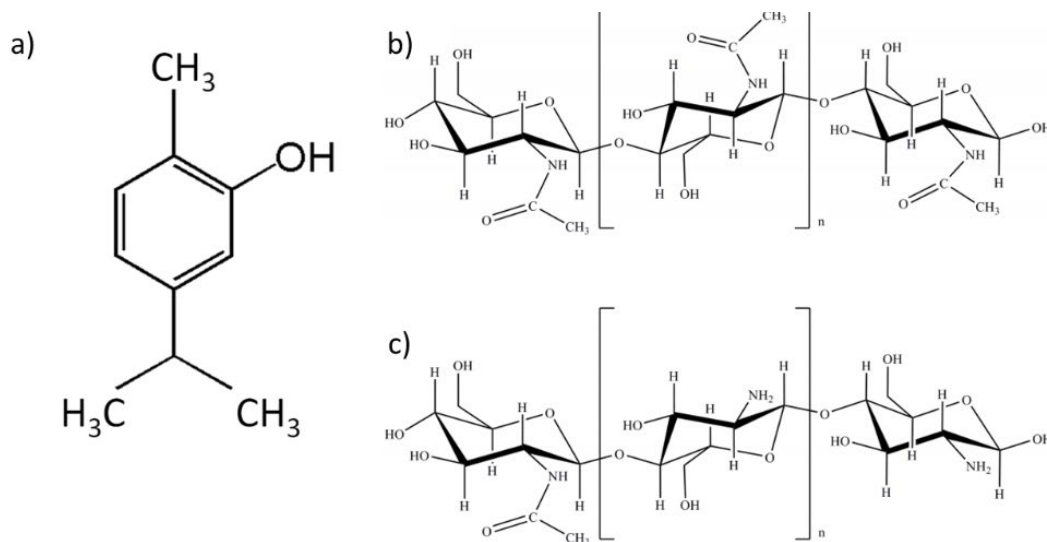


Figura 1. Estructura del a) carvacrol, b) la quitina y c) del Qs

Hidrofobización del Qs con ácido octanoico

La hidrofobización del Qs se obtuvo uniendo químicamente ácido octanoico a la estructura química del Qs, con un grado de modificación del 15 % [26]. Brevemente, se pesaron 1.5 g de Qs, los cuales se disolvieron en 150 mL de HCl (0.1 M) para formar una solución de Qs al 1.0 % p/p, ajustando inmediatamente el pH de la disolución a 3.0 con NaOH (1 M). Por separado, se preparó una solución de ácido octanoico (0.58 M), N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDAC) (0.6 M) y N-Hidroxysuccinimida (NHS) (0.6 M) en 15 mL de dimetilformamida (DMF). Finalmente, 4.5 mL de esta solución fue adicionada a la solución de Qs al 1.0 %, ajustando el pH a 5.0 con NaOH (0.2 M). Durante el experimento, el pH se mantuvo entre 4.9 a 5.0, y se dejó reaccionar durante 24 horas. Una vez pasado este tiempo, el quitosano hidrofobizado (QsH) se recuperó por un proceso de diálisis para eliminar los reactantes en exceso. Posteriormente, QsH fue liofilizado y almacenado a temperatura ambiente para posteriores análisis.

Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)

El éxito de la reacción se corroboró por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)-ATR, (espectrómetro Perkin-Elmer, Connecticut, USA). Los espectros de FT-IR fueron obtenidos usando 64 escaneos a una resolución de 4 cm^{-1} de 4000 a 400 cm^{-1} .

Preparación de NPs de QsH Cargadas con CAR

Antes de cargar las NP de QsH con CAR, se preparó una emulsión de CAR con Tween 80 (1 % p/p), en agua destilada a temperatura ambiente. Posteriormente, la emulsión de

CAR fue agregado a la suspensión de QsH para obtener relaciones de Qs/CAR al 25, 50 y 75 % p/p. La emulsión se mezcló en un sonicador Q500 a una amplitud del 50 % durante 2 minutos. Las NPs de QsH fueron obtenidas por gelificación iónica usando TPP como agente entrecruzante [23], con pequeñas modificaciones; se preparó una disolución de QsH (50 mg/mL) en ácido acético (0.050 M). Después de dejar toda la noche en agitación magnética el pH de la disolución se ajustó a 4.2. Por otra parte, se preparó una solución de TPP (2 mg/mL) en agua desionizada. A la disolución de QsH se le añadieron por separado 512, 1024, 1536 μL de la emulsión con CAR, para tener una relación de QsH/CAR al 75, 50 y 25 % p/p, respectivamente y se colocaron en un baño de agua a $60\text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 minutos, para inmediatamente después pasar la disolución a un baño de agua a $4\text{ }^\circ\text{C}$, añadiendo inmediatamente la solución de TPP (relación TPP/QsH 1.2, 1, 0.8, 0.6 % p/p), dejando agitar durante 20 minutos. Las NPs de QsH-CAR se recuperaron y lavaron por centrifugación a 9 000 rpm durante 30 minutos y resuspendidas en 5 mL agua desionizada, como se muestra en la Figura 2.

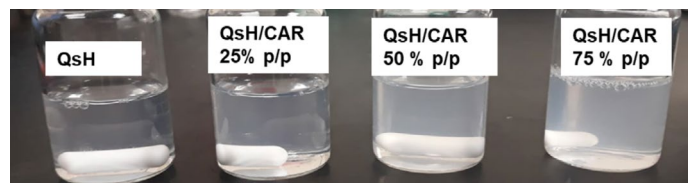


Figura 2. Resuspensión en agua desionizada de NPs de QsH cargadas con CAR

La Figura 3 muestra un esquema del proceso de fabricación de la NP de QsH-CAR. La partícula de quitosano muestra que el CAR se encuentra adentro de la red de la NP de QsH con carga positiva externa. Estas características pueden representar una gran ventaja, porque los sistemas con carga

superficial positiva suelen mostrar una alta adherencia a las membranas celulares, las cuales normalmente representan una carga negativa [27].

Análisis del Tamaño de las NPs y Potencial Z

El tamaño de NPs se determinó por dispersión dinámica de luz (DDL), usando un sistema digital ALV-5000 (ALV 5000 / E, ALV GmbH, Alemania) equipado con un control de temperatura ajustado a 25 °C, provisto de un láser de longitud de onda de 633 nm y 30 mW de potencia. Los experimentos se realizaron a un ángulo de 90 ° y el radio hidrodinámico (RH) se obtuvo utilizando el algoritmo CONTIN desarrollado por Provencher y Stepanak35 y aplicando la ecuación de Stokes-Einstein, $R_H = kT/6\pi\eta D$ (ecuación 1), donde k es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta, η la viscosidad de la solución y D el coeficiente de difusión de las partículas en solución diluida. Las mediciones se realizaron por triplicado con un tiempo de muestreo de 120 segundos para cada medición. El radio se obtuvo promediando las tres mediciones.

El valor del potencial zeta o carga superficial de las NPs se midieron utilizando un Nano ZS (Nanoseries, Malvern Instruments, Reino Unido). El instrumento mide la movilidad electroforética de las partículas y el valor del potencial zeta se obtiene usando la expresión clásica de Smoluchowski, $\alpha = \epsilon \zeta / \eta$ (ecuación 2), donde α , ϵ , ζ , y η denotan la movilidad electroforética, permisividad de los medios, potencial zeta de las partículas y viscosidad de los medios, respectivamente. Cada muestra se alimentó a un capilar plegado, célula zeta clara y desechable. Las mediciones se iniciaron después de alcanzar el equilibrio térmico a 25 °C. El número de cargas en cada medida fue determinado automáticamente por el equipo, los cuales fueron reportados en milivolts (mV).

Microscopía de fuerza atómica

La morfología de las NPs de QsH cargadas con CAR fue observada por Microscopía de Fuerza atómica (AFM) JSPM-4210 (JEOL, Japón). Una gota de suspensión NPs fue depositada en la mica y se secó al aire durante 60 minutos. Las imágenes fueron observadas en el modo no-contacto usando una punta

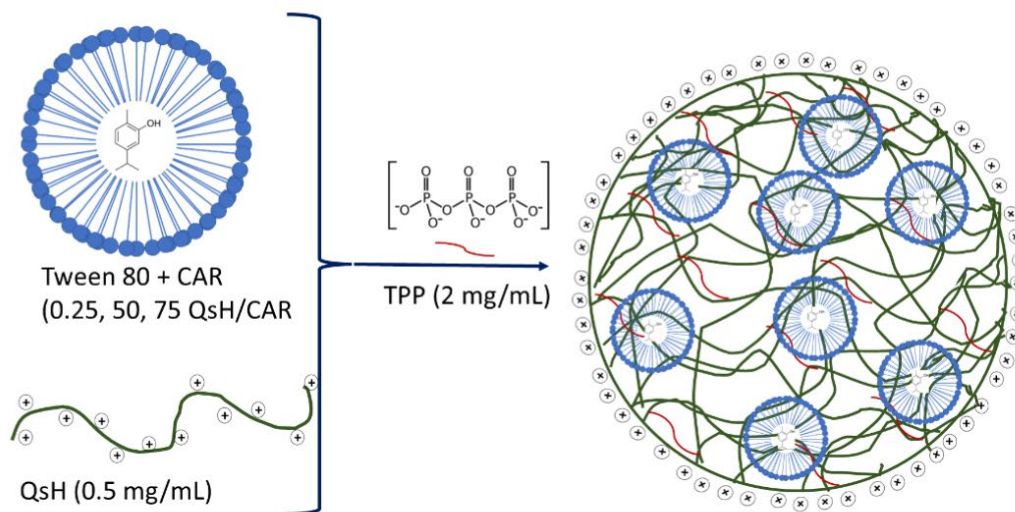


Figura 3. Representación de la NP de QsH-CAR obtenidas por gelificación iónica

de silicio NSC15 (MikroMasch, Oregon, USA). Las imágenes (AFM) se analizaron con el software WSxM [28].

Análisis estadístico

Para el presente trabajo se realizó un análisis de varianza (ANOVA), asignando como factores la relación las NPs nativas, modificadas y cargadas con CAR a diversas concentraciones y se asignó al radio hidrodinámico (nm) como variable de respuesta. Las diferencias de las variables fueron asumidas a través de la prueba de comparación múltiple de Duncan ($\alpha=0.05$). Las demás variables fueron presentadas de manera categórica y descriptiva. El análisis estadístico se realizó con un paquete estadístico NCSS, 2000.

Resultados y discusión Número de grupos ionizables y grado de desacetilación

El número de grupos aminos (grado de desacetilación) presente en el Qs se puede determinar por varios métodos analíticos tales como curva de titulación de pH y conductividad, espectroscopía UV [29], espectroscopía infrarroja [30], análisis elemental [31], espectroscopía ^1H NMR y ^{13}C NMR [32]. En este trabajo, el número de grupos aminos en el Qs se realizó por medio de un análisis potenciométrico (conductividad y pH) [24]. La Figura 4 muestra la curva de titulación de pH y conductividad para Qs usando HCl. Esta se construyó graficando los valores de la conductividad y pH contra la cantidad de HCl que se adicionó a la disolución de Qs, presentándose tres fases: I) a bajas concentraciones de HCl se observa que la conductividad de la disolución de Qs se incrementa progresivamente de -50 mV a 90 mV, mientras que el valor de pH disminuye de 7.6 a 5.4; esto se debe al incremento en la concentración de iones H^+ , en cada adición

de HCl. II) En la segunda fase, se puede observar una zona pseudoplana, en donde los valores de conductividad y pH se mantienen prácticamente constantes. En esta fase, los iones H^+ presentes en la suspensión del Qs protonan a los grupos aminos presentes en la molécula del Qs, razón por la cual los valores de la conductividad y pH prácticamente no varían. Conforme el número de grupos aminos protonados aumenta con cada alícuota de HCl añadido, el quitosano empieza a hidratarse hasta solubilizarse, observándose que a un pH de 4.7 la suspensión polimérica se observa transparente. III) la fase III se identifica cuando se observa un incremento en la conductividad y una disminución en pH, debido a que todos los grupos aminos se han protonado, dando como resultado un exceso de iones H^+ presentes en la solución. El número de grupos aminos presentes en el Qs se determinó en el punto de intersección de dos líneas rectas entre la fase II y III, indicando que 0.00053 moles de HCl fueron necesarios para neutralizar la misma cantidad de grupos amino. Por lo tanto, la cantidad de grupos aminos para un mol de Qs (120 000 g/mol) es de 627 moles, lo cual corresponde a un grado de desacetilación del 84 %. De los 627 moles de NH_2 , se modificó el 15 % con ácido octanoico.

Espectroscopía de infrarrojo (FTIR-ATR)

El grado de la modificación del Qs se determinó por espectroscopía de infrarrojo (los espectros FTIR-ATR representados en la Figura 5). Los espectros de FTIR-ATR muestran las señales características de los grupos funcionales presentes en el Qs nativo [33], primeramente, se observa una banda ancha a 3421 cm^{-1} , la cual se asocia al estiramiento de los grupos $-\text{NH}_2$ y $-\text{OH}$, un pico situado a 1661 cm^{-1} que corresponde al enlace $\text{C}=\text{O}$

de las amidas secundarias, así como una banda a 1073 cm^{-1} correspondiente al enlace C-O-C del anillo de piranosa. Por otro lado, el espectro de infrarrojo del QsH muestra diferencias significativas con respecto al espectro FTIR-ATR del Qs nativo. La amplitud de la banda de los grupos $-\text{NH}_2$ y $-\text{OH}$ a 3421 cm^{-1} disminuye, indicando una reducción del número de puentes de hidrógeno entre las cadenas del biopolímero, debido al impedimento estérico provocado por la presencia de cadenas alifáticas de 8 carbonos del ácido octanoico. Además, se observa que la intensidad de los picos a 1661 cm^{-1} y 1519 cm^{-1} corresponden al estiramiento C=O y $-\text{NH}$, correspondientemente, del grupo amida, confirmando el éxito de la reacción de amidación [34, 35], determinando un grado de modificación del 12 %.

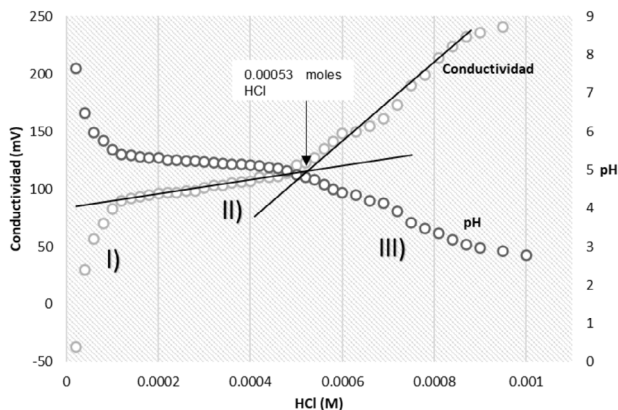


Figura 4. Curva de titulación de pH y conductividad para Qs usando HCl

NPs de Aoc-Qs Cargadas con CAR

Las NPs de QsH se obtuvieron por la técnica de gelificación iónica. Este proceso de fabricación se basa en las interacciones electrostáticas entre los grupos amino del Qs protonados (catión) y el TPP con carga negativa (polianión). En medio acuoso, el TPP ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) se disocia en iones tripolifosfatos e iones hidroxilos, lo cual aumenta el pH de disolución a pH 9.0. Al añadir la

solución de TPP a la solución de QsH (pH ácido), los iones tripolifosfóricos se enlazan a los grupos $-\text{NH}_3^+$ del Qs, originándose el entrecruzamiento iónico y esta interacción se favorece a un pH ácido.

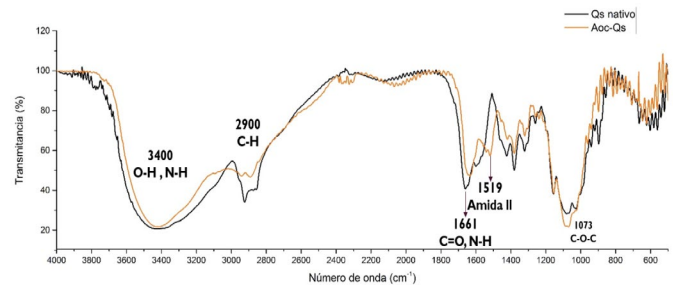


Figura 5. Espectros FT-IR de Qs nativo y Aoc-Qs ($\approx 15\%$ de sustitución)

Análisis del tamaño y medición del potencial Z

El tamaño y la carga superficial de las NPs pueden manipularse variando ciertas condiciones experimentales del proceso de obtención, como la concentración de Qs, la proporción TPP/Qs y el pH de la disolución. Además de que la proporción de TPP/Qs es crucial para la formación de las NPs [36, 37]. Por tanto, para optimizar el proceso de fabricación de NPs basadas en QsH, se prepararon disoluciones de QsH a la concentración de 0.5 mg/mL , la proporción TPP/Qs utilizada fue de 0.8% p/p y el pH de la disolución de QsH se ajustó a 4.2, para así obtener un sistema nanoparticulado estable en medio acuoso. Bajo estas condiciones experimentales, las NPs de Qs nativo muestran una forma esférica con una carga superficial de 36.5 mV , contrastando con el valor de la carga superficial obtenido para las NPs de QsH, 13.56 mV (Tabla 1). Esta disminución en el valor del potencial zeta indica una disminución del número de grupos $-\text{NH}_3$ expuestos en la superficie de la NP obtenida con QsH, debido a la unión química del ácido octanoico a la estructura

del Qs. Cuando se agregó la emulsión de CAR en el proceso de síntesis de nanopartículas, se observó que para las proporciones de QsH/CAR 25 % p/p y 50 % p/p el valor de potencial Z prácticamente se mantiene constante, sin embargo, a la proporción de QsH/CAR al 75 % p/p se observa una disminución de la carga superficial (7.09 mV) de las NPs de QsH, indicando un exceso de surfactante en el sistema, los cuales provocan un efecto de apantallamiento de los grupos aminos cargados.

El diámetro hidrodinámico de las NPs tanto de Qs nativo como de QsH y NPs de Qs cargadas con CAR medidas por DLS se muestra en la Tabla 1. Se puede observar que las NPs elaboradas con QsH son significativamente más pequeñas que las NPs de Qs nativo (239 nm), excepto para las NPs QsH/CAR obtenidas al 75 % p/p. La reducción en el tamaño de la NP se debe a las interacciones hidrofóbicas intra e intercadena mediadas por las cadenas alifáticas de los residuos del ácido octanoico. Este mismo comportamiento fue observado por Robles y col. [38] para NPs de Qs derivatizado con aldehídos de cadenas largas. Los autores concluyeron que los tamaños promedio de las NPs de Qs derivatizado son menores a

los tamaños observado para las NPs de Qs sin modificar, concluyendo que el tamaño es dependiente del grado de sustitución, probablemente debido a la compactación del núcleo de la NPs a un proceso de autoensamblaje de los Qs derivatizados, que por efecto del disolvente las interacciones hidrofóbicas se favorecen, resultando en la compactación de la NP. Por otra parte, el diámetro hidrodinámico para NPs QsH/CAR cambia según la proporción de CAR añadida. Las NPs QsH/CAR de menor tamaño fueron obtenidas a la proporción del 25 % p/p (146 nm), mientras que para las NPs obtenidas a la proporción de QsH/CAR al 50 % p/p, el tamaño de las NPs aumenta a 181 nm. Resultados similares fueron reportados por Keawchaon y Yoksan [39], quienes reportaron que el tamaño de las NPs de Qs aumenta de manera proporcional a la cantidad de carga del compuesto bioactivo. Además, es importante recalcar que las suspensiones de NPs obtenidas a estas proporciones de QsH/CAR no sedimentan en medio acuoso, indicando que la carga superficial de las NPs es suficiente para mantener la estabilidad de nanosistema de quitosano. Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos por DDL, las NPs QsH/CAR obtenidas al 75 % p/p muestran

Tabla 1. Radio Hidrodinámico (RH) y potencial Z (mV) de NPs de Qs (modificado y nativo) y cargadas con CAR

	DDL (nm)	ζ potencial (mV)	Eficiencia Carga %	Capacidad Carga %	Diámetro AFM (nm)
NP Qs	239 ± 12	36.5 ± 0.5	-	-	220 ± 20
NP QsH	181 ± 1	13.1 ± 0.2	-	-	180 ± 10
QsH/CAR 25 % p/p	146 ± 1	12.3 ± 0.2	36.8 ± 9	8.7 ± 0.2	134 ± 5
QsH/CAR 50 % p/p	200 ± 1	10.4 ± 0.2	56.4 ± 0.58	21.9 ± 0.3	187 ± 12
QsH/CAR 75 % p/p	578 ± 18	9.1 ± 0.3	19.3 ± 4.28	12.4 ± 0.11	385 ± 30

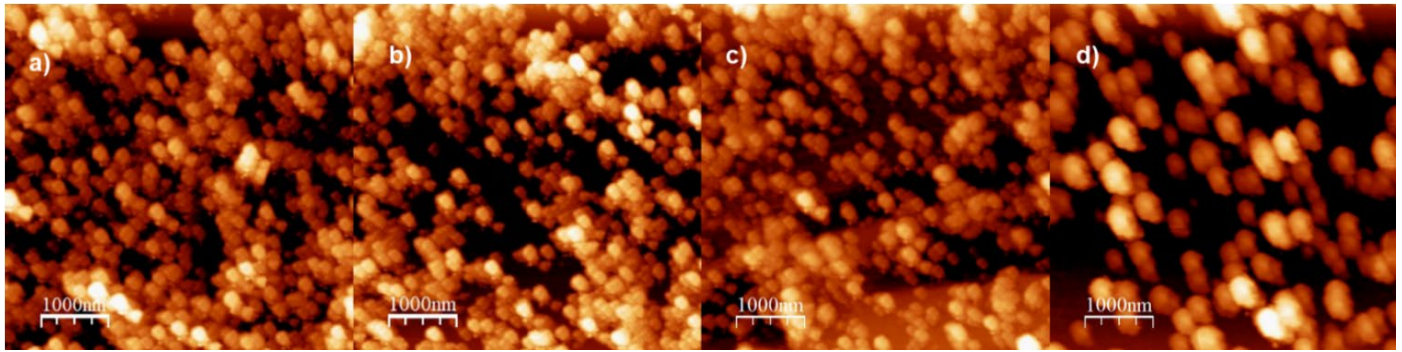


Figura 6. Imágenes de AFM de a) NPs de QsH y b) QsH/CAR 25 %, 50 % y 75 % QsH/car (p/p)

un tamaño de 578 nm, además de que las NPs sedimentan en un periodo de tiempo muy corto, resultado que se espera para un sistema con valores del potencial Z bajos.

Microscopía de fuerza atómica

La Figura 6 corresponde a las imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM) de las NPs de QsH (Figura 5a) y QsH/CAR preparadas a las distintas proporciones de CAR (Figura 6b-d), para las cuales se observa una morfología esférica. Los tamaños observados por esta técnica son similares a los observados por DLS. El tamaño de las NPs de QsH, QsH/CAR al 25 % p/p, 50 % p/p y 75 % p/p son 180 nm, 134 nm, 187 nm y 385 nm, respectivamente.

Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de CAR

La cantidad de CAR capturado de las NPs de QsH fue determinada por espectroscopía de UV-visible y se reportó en términos de eficiencia de carga (EC %) y capacidad de carga (CC %), la cual se calculó con la ecuación 3 y 4.

$$\text{Ecuación 3: } EE\% = \left(\frac{[CAR_{\text{Total}} - CAR_{\text{sobrenadante}}]}{CAR_{\text{Total}}} \right) \times 100$$

$$\text{Ecuación 4: } CC\% = \left(\frac{[CAR_{\text{Total}} - CAR_{\text{sobrenadante}}]}{[CsH + [CAR_{\text{Total}} - CAR_{\text{sobrenadante}}]]} \right) \times 100$$

Las NPs de QsH tienen la capacidad de encapsular CAR en la matriz polimérica. La Tabla 1 muestra los valores de EC % y CC

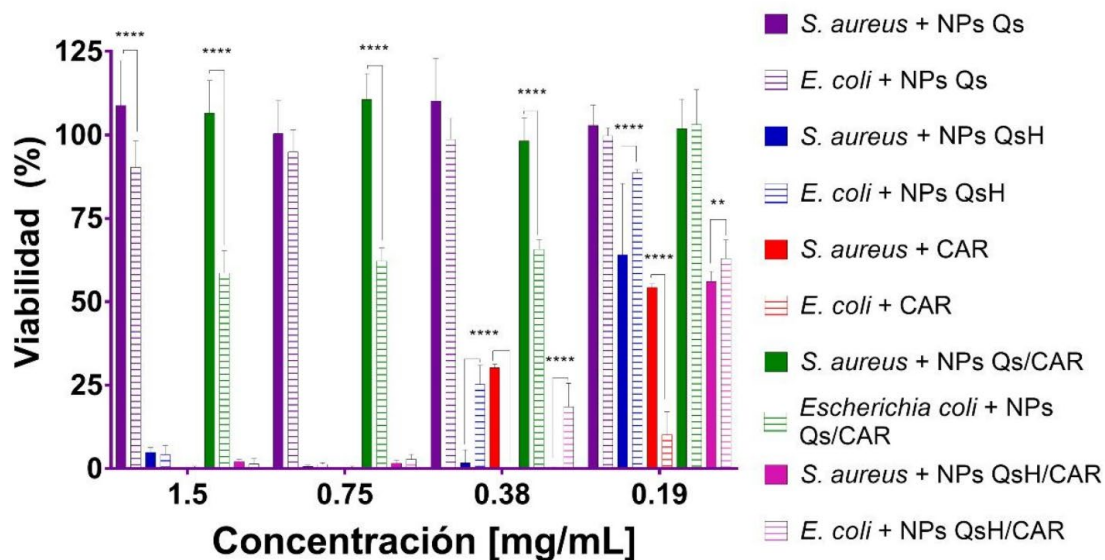


Figura 7. Efecto de las NPs de Qs y QsH sin y cargadas con CAR sobre la viabilidad de E. coli y S. aureus

% para cada formulación preparada (QsH/CAR 25 %, 50% y 75 % p/p), observándose valores máximos de EC (56.4) y CC % (21.9) para las NPs QsH/CAR 50 %. Con base a la estabilidad de la suspensión, tamaño y altos valores de EC % y CC %, se decidió seleccionar el sistema de NPs QsH/CAR 50 % para evaluar el potencial bactericida contra bacterias de interés, tales como *E. coli* y *S. aureus*.

Actividad antibacteriana de las NPs QsH/CAR

La actividad antibacteriana de las NPs de QsH/CAR se evaluó en bacterias modelo Gram (-) y Gram (+), *E. coli* y *S. aureus*. La Figura 7 muestra el efecto de las NPs preparadas con Qs y QsH sin CAR y cargadas con CAR (Qs/CAR) sobre la viabilidad de ambas cepas bacterianas. Como punto de partida, se observa que las NPs de QsH (barras color azul) presentan un mayor efecto antibacteriano sobre *S. Aureus* y *E. coli* comparado con el efecto bactericida provocada por las NPs Qs. (NPs Qs barra color morado), observándose que a la concentración de 0.38 mg/mL de NPs de Qs y QsH hay una reducción próxima al 2 % y 20 % para *S. Aureus* y *E. coli* respectivamente. Es importante recordar que la pared bacteriana de *S. aureus* consta de una capa gruesa de peptidoglicano, la cual está compuesta por ácido teicoico, un glicopolímero constituido por numerosos grupos aniónicos de fosfatos los cuales pueden interaccionar fuertemente con la superficie catiónica de las NPs de QsH, lo cual provoca la interrupción de mecanismos celulares vitales para la bacteria Gram (+) y, eventualmente, conduciendo a la muerte la bacteria [41]. Por otra parte, en la Figura 7 se puede observar que el CAR reduce la viabilidad de *E. coli* hasta el 8 % para la concentración de 0.19 mg/mL, mientras

que la viabilidad para *S. aureus* se redujo a 53 %, para la misma concentración de CAR. Esto se debe a las diferencias que existen en la composición y arquitectura entre las membranas de las bacterias, *E. coli* que para *S. aureus*. La membrana bacteriana de *E. coli* consiste en una membrana fosfolipídica, la cual es susceptible a la acción del CAR el cual interacciona ávidamente con las moléculas fosfolipídicas de la membrana bacteriana, afectando la permeabilidad y propiedades mecánicas de la membrana [40]. Finalmente, se evaluó el efecto de las NPs Qs y QsH cargadas con CAR sobre la viabilidad de *S. aureus* y *E. coli*. Es de sorprender las NPs de Qs/CAR no son tóxicas para *S. aureus*, mientras que para *E. coli* la viabilidad se reduce a al 55 %. Sin embargo, cuando las cepas bacterianas son tratadas con NPs preparadas con QsH/CAR (barra color rosa), se observa una drástica disminución de la viabilidad de *S. aureus* y *E. coli*, siendo más susceptible la bacteria Gram (+). Por lo que al considerar la actividad antibacteriana de las NPs QsH y de las NPs QsH/CAR se puede concluir que existe una sinergia entre la acción bactericida del CAR y la acción bactericida del QsH, debido a la asociación de las NPs QsH con la pared celular *S. aureus*.

Conclusión

En este trabajo se reporta la hidrofobización del quitosano uniendo residuos de ácido octanoico mediante una reacción de amidación mediada por EDAC/NHS. El éxito de la reacción se confirmó por espectroscopia de FTIR-ATR, observándose cambios en la amplitud de la banda a 3421 cm^{-1} y el incremento en la intensidad del pico a 1519 cm^{-1} , asociado con el estiramiento de los grupos metilo y metileno, confirmando la presencia de las cadenas alifáticas provenientes del

ácido octanoico. Las NPs de QsH se obtuvieron por la técnica de gelificación iónica, proceso que se optimizó con el objetivo de obtener una suspensión de NPs de QsH estable y con capacidad de ser cargadas con CAR (pH de 4.20, con una concentración de TPP de 2 mg/mL y de QsH de 0.5 mg/mL y una relación TPP/QsH de 0.8 % p/p). El tamaño promedio de dichas NPs QsH/CAR mostraron un tamaño de 181 nm para la relación del 50 % p/p y una reducción de la carga superficial (potencial Z de 13.06 mV), con capacidad de atrapar CAR con alta eficiencia (EC % (56.4) y CC % (21.9)). Con base a los resultados de viabilidad bacteriana, este sistema nanoparticulado afecta la viabilidad tanto de *E. coli* como de *S. aureus*, afectando en mayor proporción a la cepa bacteriana Gram (+). Por lo que el sistema nanoparticulado NPs QsH/CAR puede considerarse como un biomaterial con capacidad bactericida, representando una alternativa en el tratamiento de infecciones bacterianas.

Referencias bibliográficas

- [1] C. Deussenberg, Y. Wang, A. Shukla, Recent Innovations in Bacterial Infection Detection and Treatment, ACS Infectious Diseases. 7 (2021). <https://doi.org/10.1021/acscinfecdis.0c00890>.
- [2] B. Wang, M. Yao, L. Lv, Z. Ling, L. Li, The Human Microbiota in Health and Disease, Engineering. 3, 2017, 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2017.01.008>.
- [3] OMS, Resistencia a los antimicrobianos, OMS. (2015). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>.
- [4] WHO | Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics, WHO. 2017. <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>.
- [5] M. Rai, P. Paralikar, P. Jogee, G. Agarkar, A.P. Ingle, M. Derita, S. Zacchino, Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives, International Journal of Pharmaceutics. 519 (2017) 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.013>.
- [6] A. Wattanasatcha, S. Rengpipat, S. Wanichwecharungruang, Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent, International Journal of Pharmaceutics. 434 (2012) 360–365. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.017>.
- [7] B.S. Fazly Bazzaz, B. Khameneh, N. Namazi, M. Iranshahi, D. Davoodi, S. Golmohammadzadeh, Solid lipid nanoparticles carrying Eugenia caryophyllata essential oil: the novel nanoparticulate systems with broad-spectrum antimicrobial activity, Letters in Applied Microbiology. 66 (2018) 506–513. <https://doi.org/10.1111/lam.12886>.
- [8] N. Vahedikia, F. Garavand, B. Tajeddin, I. Cacciotti, S.M. Jafari, T. Omid, Z. Zahedi, Biodegradable zein film composites reinforced with chitosan nanoparticles and cinnamon essential oil: Physical, mechanical, structural and antimicrobial attributes, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 177 (2019) 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.045>.
- [9] Blaszyk M, Holley RA. 1998. Interaction of monolaurin, eugenol and sodium citrate on growth of common meat spoilage and pathogenic organisms. International Journal of Food Microbiology. 39: 175–183. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00134-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00134-7).
- [10] Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., Wright, A.V., 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. J. Agri. Food Chem. 46, 3590–3595. <https://doi.org/10.1021/jf980154m>.
- [11] Ultee A, Bennik MH, Moezelaar R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus. Appl. Environ. Microbiol. 68:1561–1568. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002>.
- [12] Lambert C, Fattal E, Couvreur P. 2001 Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides, Adv. Drug Deliv. Rev. 47(1):99–112. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00116-2](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00116-2).
- [13] Burt SA, Van der Zee R, Koets P, De Graaff AM, Van Knapen F, Gaastra W, Haagsman H, Veldhuizen JA. 2007. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in Escherichia coli O157:H7. Applied and Environmental Microbiology. 73(14):4484–4490. <https://doi.org/10.1128/AEM.00340-07>.
- [14] A.R. Bilia, C. Guccione, B. Isacchi, C. Righeschi, F. Firenzuoli, M.C. Bergonzi, Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2014 (2014) 1–14. <https://doi.org/10.1155/2014/651593>.
- [15] Patra, J.K., Das, G., Fraceto, L.F. et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. J Nanobiotechnol 16, 71, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>.
- [16] Shukla S, Mishra A, Arotiba O, Mamba B. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. International Journal of Biological Macromolecules, 59, 2013 46–58.
- [17] Pichyangkura R, Chadchawan S. Biostimulant activity of chitosan in horticulture. Scientia Horticulturae, 196, 2015, 49–65. <https://doi.org/10.1016/j.sci.2013.04.043>.
- [18] Majeti N.V Ravi Kumar. A review of chitin and chitosan applications, Reactive and Functional Polymers, Volume 46, Issue 1, 2000, 1–27, [https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(00\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(00)00038-9).
- [19] A. Verlee, S. Mincke, C. V. Stevens, Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives, Carbohydrate Polymers. 164, 2017, 268–283. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.001>.

- [20] J.P. Quiñones, H. Peniche, C. Peniche, Chitosan Based Self-Assembled Nanoparticles in Drug Delivery, *Polymers*, 10, 2018, 235. <https://doi.org/10.3390/polym10030235>.
- [21] Helander I, Nurmiäho-Lassila E, Ahvenainen R, Rhoades J, Roller S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int. J. Food*, 17, 2001, 235-244. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00609-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00609-2).
- [22] Bingren Tian, Shiyao Hua, Jiayue Liu. Multi-functional chitosan-based nanoparticles for drug delivery: Recent advanced insight into cancer therapy, *Carbohydrate Polymers*, Volume 315, 2023, 120972, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120972>.
- [23] Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers, *Journal of Applied Polymer Science*. 63, 1997,125-132. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628).
- [24] S. Farris, L. Mora, G. Capretti, L. Piergiovanni, Charge Density Quantification of Polyelectrolyte Polysaccharides by Conductometric Titration: An Analytical Chemistry Experiment, *Journal of Chemical Education*. 89, 2012, 121-124. <https://doi.org/10.1021/ed200261w>.
- [25] P. Calvo, C. Remuñán-López, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers, *Journal of Applied Polymer Science*. 63 1997, 125-132. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19970103\)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19970103)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4).
- [26] E. Bobu, R. Nicu, M. Lupei, F.L. Ciolacu, J. Desbrières, Synthesis and characterization of n-alkyl chitosan for papermaking applications, 45, 2011, 619-625. <https://hal.science/hal-01585404>.
- [27] Jayakumar R, Prabakaran M, Nair SV, Tokura S, Tamura H, Selvamurugan N. Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications. *Progress in Materials Science*. 55, 2010, 675-709. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2010.03.001>.
- [28] I. Horcas, R. Fernández, J.M. Gómez-Rodríguez, J. Colchero, J. Gómez-Herrero, A.M. Baro, WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology, *Review of Scientific Instruments*. 78, 2007. <https://doi.org/10.1063/1.2432410>.
- [29] Muzarelli RAA, Rochetti R. Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry. *Carbohydr Polym* 5, 1985, 461-472. }
- [30] Miya M, Iwamoto R, Yoshikawa S, Mima S. IR spectroscopic determination of CONH content in highly deacetylated chitosan. *Int J Biol Macromol* 2, 1980, 323-324. <https://doi.org/10.1007/BF02879541>.
- [31] Pelletier A, Lemire I, Syguch J, Chornet B, Overend RP. Chitin/chitosan transformation by thermo-mechano-chemical treatment including characterization by enzymatic depolymerization. *Biotechnol Bioeng* 36, 1990, 310-315. <https://doi.org/10.1002/bit.260360313>.
- [32] Heux L, Brugnerotto J, Desbrieres J, Versali MF, Rinaudo M; Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan, *Biomacromolecules* 1, 2000, 746-751. <https://doi.org/10.1021/bm000070y>.
- [33] E.V.R. Campos, P.L.F. Proença, J.L. Oliveira, A.E.S. Pereira, L.N. de M. Ribeiro, F.O. Fernandes, K.C. Gonçalves, R.A. Polanczyk, T. Pasquoto-Stigliani, R. Lima, C.C. Melville, J.F. della Vecchia, D.J. Andrade, L.F. Fraceto, Carvacrol and linalool co-loaded in β -cyclodextrin-grafted chitosan nanoparticles as sustainable biopesticide aiming pest control, *Scientific Reports*, 8, 2018, 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26043-x>.
- [34] F. Chen, Z. Shi, K.G. Neoh, E.T. Kang, Antioxidant and antibacterial activities of eugenol and carvacrol-grafted chitosan nanoparticles, *Biotechnology and Bioengineering*. 104 (2009) 30-39. <https://doi.org/10.1002/bit.22363>.
- [35] M. C. V. V. A. V. T. A. C. C. P. D. F. M. S. R. M. I., Mathematical Modeling of Release Kinetics from Supramolecular Drug Delivery Systems, *Pharmaceutics*. 11, 2019. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS11030140>.
- [36] A. Giacometti, O. Cirioni, F. Barchiesi, M.S. del Prete, M. Fortuna, F. Caselli, G. Scalise, In vitro susceptibility tests for cationic peptides: Comparison of broth microdilution methods for bacteria that grow aerobically, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44 (2000) 1694-1696. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.6.1694-1696.2000>.
- [37] R.A. Mauricio-Sánchez, R. Salazar, J.G. Luna-Bárceñas, A. Mendoza-Galván, FTIR spectroscopy studies on the spontaneous neutralization of chitosan acetate films by moisture conditioning, *Vibrational Spectroscopy*. 94 (2018) 1-6. <https://doi.org/10.1016/J.VIBSPEC.2017.10.005>.
- [38] Robles E, Villar E, Alatorre-Meda M, Burboa MG, Valdez MA, Taboada P, Mosquera. 2012. Effects of the Hydrophobization on Chitosan-Insulin Nanoparticles Obtained by an Alkylation Reaction on Chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.* 129, 822-834. <https://doi.org/10.1002/app.38870>.
- [39] Keawchaon L, Yoksan R. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloid. Surf B Biointerfaces* 84, 2011, 163171. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.12.031>.
- [40] T.L. Lin, C.C. Shu, Y.M. Chen, J.J. Lu, T.S. Wu, W.F. Lai, C.M. Tzeng, H.C. Lai, C.C. Lu, Like Cures Like: Pharmacological Activity of Anti-Inflammatory Lipopolysaccharides From Gut Microbiome, *Frontiers in Pharmacology*. 11, 2020. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00554>.
- [41] J.G. Swoboda, J. Campbell, T.C. Meredith, S. Walker, Wall teichoic acid function, biosynthesis, and inhibition, *ChemBioChem*. 11, 2010, 35-45. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900557>.