



Síntesis y Caracterización de un Nanocompuesto de Cobre-Quitósano/Ácido Hialurónico y su Actividad Antimicrobiana

Synthesis and Characterization of a Copper-Chitosan/Hyaluronic Acid Nanocomposite and its Antimicrobial Activity

JOSÉ D. TOVAR^{*,1}, MARÍA RODRÍGUEZ^{*,2}, JACOBUS DE WAARD^{**,3}, FRANKLIN CLARO^{**,4}

Resumen

Se preparó un nanocompuesto con actividad bactericida a partir de nanopartículas de cobre en una matriz de complejos de polielectrolitos (PEC) de quitosano y ácido hialurónico. Las nanopartículas, los PEC y el nanocompuesto fueron caracterizados empleando técnicas de UV-Vis, IR, AFM, DLS y microscopía óptica. La actividad antimicrobiana del compuesto fue ensayada frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium abscessus* tipo II, en condiciones limpias y sucias mediante una modificación de la prueba cuantitativa en suspensión de acuerdo con la norma europea EN 1276. Se encontró que la matriz de PEC permite la estabilización de las nanopartículas de cobre, evitando su aglomeración en el tiempo. Por otro lado, el ensayo de actividad antimicrobiana permitió determinar que el nanocompuesto es efectivo sobre *P. aeruginosa* con reducción de viabilidad de 7-Log₁₀ en 5 minutos en condiciones limpias y sucias; sobre *S. aureus* con reducción de 3,85-Log₁₀ en 120 minutos en condiciones limpias y 6-Log₁₀ en 5 minutos en condiciones sucias y sobre *M. abscessus* con una reducción de 7-Log₁₀ en 120 minutos en condiciones limpias y 2,34-Log₁₀ en 120 minutos en condiciones sucias. Este estudio es un aporte hacia el entendimiento y mejoramiento del diseño de nanocompuestos con potencial actividad antimicrobiana.

Palabras clave: Nanopartículas metálicas, complejos de polielectrolitos, nanocompuesto, antimicrobiano

Abstract

A nanocomposite with bactericidal activity was prepared from copper nanoparticles in a matrix of polyelectrolyte complexes (PEC) of chitosan and hyaluronic acid. The nanoparticles, PECs, and nanocomposite were characterized using UV-Vis, IR, AFM, DLS, and optical microscopy techniques. The antimicrobial activity of the composite was assayed against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Mycobacterium abscessus* type II under clean and dirty conditions by a modification of the quantitative suspension test according to the European Standard EN 1276. It was found that the PEC matrix stabilizes copper nanoparticles, avoiding their agglomeration over time. On the other hand, the antimicrobial activity test showed that the nanocomposite is effective on *P. aeruginosa* with a viability reduction of 7-Log₁₀ in 5 minutes in clean and dirty conditions; on *S. aureus* with a decrease of 3.85-Log₁₀ in 120 minutes in clean conditions and 6-Log₁₀ in 5 minutes in dirty conditions and *M. abscessus* with a reduction of 7-Log₁₀ in 120 minutes in clean conditions and 2.34-Log₁₀ in 120 minutes in dirty conditions. This study contributes to understanding and improving the design of nanocomposites with potential antimicrobial activity.

Keywords: Metallic nanoparticles, polyelectrolyte complexes, nanocomposite, antimicrobial

* Laboratorio de Productos Naturales, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. ** Laboratorio de Tuberculosis, Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Correspondencia: jdtovarb07@gmail.com

Orcid: [10009-0003-1747-7526](https://orcid.org/0009-0003-1747-7526)

[20000-0002-7242-1109](https://orcid.org/0000-0002-7242-1109)

[30000-0003-4118-1015](https://orcid.org/0000-0003-4118-1015)

[40000-0003-0937-7616](https://orcid.org/0000-0003-0937-7616)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2024.87.3.9](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.3.9)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 02/07/2024

Aprobación: 14/09/2024

Rev. Fac. Farmacia 87(3): 223-235. 2024

Introducción

La nanotecnología se basa en la manipulación de la materia a una escala casi atómica y molecular para producir materiales con características fisicoquímicas mejoradas. Esta tecnología promete avances científicos en muchos sectores (Adams y Barbante, 2013). Muchos aspectos de la nanotecnología se basan en el hecho que las propiedades de los materiales cambian cuando alcanzan la escala nanométrica. A medida que disminuyen las escalas de longitud de los materiales (por debajo de los 100 nm), los efectos producto del incremento del área superficial se vuelven importantes y aparecen efectos cuánticos que conducen a cambios profundos en las propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales (Adams y Barbante, 2013; Gómez Garzón, 2018).

Entre los nanomateriales más representativos se encuentran las nanopartículas (Nps), que son estructuras con tamaños en el rango de entre 1 y 100 nm, generalmente clasificadas de acuerdo con su material de composición en orgánicas, inorgánicas o a base de carbono. Las Nps exhiben propiedades físicas, químicas y biológicas únicas en comparación con las propiedades de los materiales de las que están compuestas a escala microscópica (Ealias y Saravanakumar, 2017).

En las últimas décadas, las Nps metálicas (MNps) han sido ampliamente utilizadas en diversas industrias debido a su amplia gama de propiedades eléctricas, físicas, químicas y ópticas (Khodashenas y Ghorbani, 2014). Entre los metales, el cobre (Cu) es de particular interés ya que los iones de cobre, solos o en complejos de cobre, se han utilizado durante siglos para desinfectar líquidos, sólidos y tejidos

humanos. Hoy en día, el cobre se utiliza como purificador de agua, alguicida, fungicida, nematocida, molusquicida y agente antibacteriano y antiincrustante (Borlow y Gabbay, 2004).

Más recientemente se ha determinado que la supervivencia del virus SARS-CoV-2 disminuye en superficies de cobre en comparación con superficies de cartón, acero inoxidable y plástico (van Doremalen y col., 2020). Se ha considerado que el efecto del cobre depende del tiempo y la concentración, lo que da como resultado un daño irreversible al virus y la destrucción de las paredes celulares (Warnes y col., 2015).

En vista de la gran variedad de aplicaciones del cobre, la síntesis de nanopartículas de cobre (CuNps) es muy apreciada. Generalmente, las MNps se sintetizan a través de tres tipos diferentes de métodos: químicos, físicos y biológicos. Sin embargo, solo algunos de los métodos de síntesis reportados son capaces de producir CuNps estables, debido a la alta tasa de oxidación de las CuNps (Borlow y Gabbay, 2004; Khodashenas y Ghorbani, 2014).

La estabilización de MNps puede alcanzarse a través de dos métodos: estabilización estérica o estabilización electrostática (Schmid, 1994). Una estabilización combinada de tipo electrostática puede lograrse a través del empleo de un tipo de nanoestructura que ha ganado popularidad recientemente, los complejos de polielectrolitos. Los complejos de polielectrolitos (PEC) se forman espontáneamente cuando dos polielectrolitos (PEL) con cargas opuestas interactúan a través de atracciones electrostáticas al mezclarse en una solución acuosa (Yang y col., 2015).

El autoensamblaje de los PEC es un proceso reversible donde los complejos coexisten en equilibrio con los PEL libres en solución. Esta naturaleza dinámica de los PEC inevitablemente compromete su integridad por la dilución o adición de otras especies cargadas. Como resultado, la estabilidad de los PEC puede verse seriamente comprometida en entornos biológicos, donde se pueden encontrar elevadas concentraciones de pequeños electrolitos y proteínas cargadas (IWu y Delair, 2015; Insua y col., 2016).

Para solventar este problema, los PEC se pueden estabilizar fácilmente mediante el entrecruzamiento iónico de los componentes del PEC, minimizando de esta manera el intercambio con los polímeros libres en solución. En relación con esto último, se sabe que las propiedades de unión de los PEL a otras especies cargadas muestran una fuerte dependencia de la densidad de carga y el número de grupos cargados en la estructura del PEL. Como resultado de la naturaleza cooperativa de la unión de los PEL, los polímeros con densidades de carga más elevadas muestran una mayor afinidad por los sustratos cargados (Insua y col., 2016). La forma más sencilla de aumentar la densidad de carga es aumentar el peso molecular del PEL, y una manera de lograr este fin es reticulando o entrecruzando los polímeros en el PEC, aumentando así drásticamente el peso molecular general del polímero y, en consecuencia, su afinidad de unión (Insua y col., 2016).

La formación de los PEC pasa por la escogencia de dos polielectrolitos de carga opuesta. Son de interés el quitosano (poliación) y ácido hialurónico (polianión), por su biocompatibilidad y porque se ha encontrado que los PEC formados a partir

de estos biopolímeros poseen propiedades de liberación controlada de fármacos y protección de la carga útil encapsulada contra la degradación química (Yang y col., 2015), además del hecho que estos biopolímeros, especialmente el quitosano, pueden actuar como estabilizadores de MNps, previniendo su aglomeración y oxidación.

La nanotecnología y la creación de nuevos materiales con propiedades antimicrobianas potenciadas reciben cada vez más atención en vista de la creciente preocupación por la resistencia antimicrobiana como uno de los tres problemas más importantes de salud pública del siglo XXI (*World Health Organization*, 2014). En este contexto, y de acuerdo con lo expuesto anteriormente, se propuso formular nanocompuestos de CuNps en matrices de PEC de quitosano/ácido hialurónico, que puedan incrementar sus propiedades fisicoquímicas y antibacterianas, manteniendo la biocompatibilidad del biopolímero y reduciendo la posible toxicidad de las Nps. Esto con el fin de obtener un nanocompuesto con potencial actividad antibacteriana y con aplicación en el área biomédica.

Materiales y Métodos

NANOPARTÍCULAS DE COBRE

La metodología se basó en la aplicada por Phul y col. (2018) para la obtención de CuNps.

COMPLEJOS DE POLIELECTROLITOS

Se prepararon volúmenes iguales de soluciones de quitosano (Q) en ácido láctico (AL) y ácido hialurónico (AH) en agua. En

agitación vigorosa, se adicionó gota a gota la solución de ácido hialurónico sobre la de quitosano, a temperatura ambiente. La aparición de opalescencia evidenció la formación de una suspensión de los PEC. Adicionalmente se estudió el efecto que tiene la adición de tripolifosfato (TPP) en un rango de valores entre 0,1 y 0,001% m/v en la estabilidad de las suspensiones de PEC.

NANOCOMPUESTO DE CuNPS-PEC

La obtención del nanocompuesto se realizó por la adición del sólido de CuNps a la suspensión de PEC previamente preparada, en agitación vigorosa, para asegurar la formación de una suspensión uniforme. La suspensión opalescente de PEC pasó de una coloración blanca lechosa a una rosa por la presencia de las CuNPs.

Se siguieron las siguientes metodologías para la caracterización de las CuNps y del nanocompuesto:

1. Estudio cualitativo de propiedades ópticas

Se estudió de manera cualitativa el comportamiento óptico de una suspensión de CuNps empleando un espectrofotómetro de UV-Visible modelo Nicolet Evolution 300, marca Thermo Electron Corporation. El medio dispersivo fue agua destilada.

2. Estimación del radio hidrodinámico

Se evaluó el diámetro hidrodinámico de las suspensiones de CuNps y PEC empleando un montaje experimental para Dispersión Dinámica de Luz. El montaje hizo uso de un láser de longitud de onda (λ) 635 nm con un ángulo de dispersión de 90°. Para las CuNps, el medio dispersivo fue

agua destilada previamente filtrada. Los PEC se evaluaron directamente.

3. Análisis de las interacciones en el PEC

Las interacciones entre el Q, AH y TPP fueron estudiadas empleando espectroscopía de IR haciendo uso de un espectrofotómetro de infrarrojo modelo 1310, marca PerkinElmer. La suspensión de PEC se centrifugó y posteriormente el residuo se secó por liofilización. La pastilla de KBr fue realizada a partir del sólido seco resultante empleando una prensa hidráulica para pastillas de IR marca PerkinElmer.

4. Estudio de la morfología

Para obtener las imágenes de AFM se hizo uso de un microscopio de fuerza atómica modelo Dimension Edge, marca Bruker. Las muestras se prepararon colocando una gota de la suspensión de PEC sobre una lámina de mica de sílice pulida y dejándola secar al vacío por espacio de 96 horas.

5. Análisis por microscopía óptica

El análisis por microscopía óptica se realizó directamente a la suspensión, colocando suficiente cantidad del líquido sobre una lámina de vidrio para microscopio. La imagen se tomó empleando un microscopio óptico modelo DMRXA con ajuste del zoom con montura C ajustable HC VARIO de aumento 0,33X-1,6X, marca Leica.

6. Ensayos de actividad antimicrobiana

El nanocompuesto fue ensayado mediante una modificación de la prueba cuantitativa para la determinación de la eficacia antimicrobiana de desinfectantes y antisépticos químicos de acuerdo con la

norma europea EN 1276 en circunstancias limpias y sucias a una temperatura de 25 °C. Las cepas empleadas fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, cepa multiresistente de *Pseudomonas aeruginosa* de aislamiento clínico, y cepa de *Mycobacterium abscessus* tipo II de aislamiento clínico. Las cepas se obtuvieron de la colección del Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina «Dr. Jacinto Convit» de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela.

Resultados y Discusión

ESTUDIO CUALITATIVO DE LAS PROPIEDADES ÓPTICAS

Los nanomateriales de los metales nobles como el Cu, Ag y Au exhiben un fenómeno óptico conocido como resonancia de plasmón superficial localizado (LSPR) que se manifiesta como una banda de absorción en las regiones del UV-Vis. En la Figura 1 se muestra el espectro de UV-Vis de una dispersión en agua de las CuNPs obtenidas. El máximo de LSPR para el cobre está reportado a alrededor de 580

nm (Xiong y col., 2011), sin embargo, factores como el tamaño y morfología de las nanopartículas tienen un impacto importante en el desplazamiento del máximo de la banda de LSPR. En este caso el máximo para las CuNPs preparadas se alcanza a 652 nm (Figura 1). Sería necesaria más información acerca de la morfología de las CuNPs obtenidas para explicar la posición del máximo de la banda.

ESTIMACIÓN DEL RADIO HIDRODINÁMICO

En la Figura 2 se muestra el histograma de frecuencia en función de la distribución de tamaños de una suspensión de CuNps. De entrada, puede observarse que el diámetro hidrodinámico de las Nps obtenidas se encuentra dentro del rango de tamaño nanométrico, con una cota superior en aproximadamente 50 nm. Dado que la distribución se encuentra sesgada a la derecha, la media se encuentra desplazada hacia la derecha del máximo, por lo tanto, el diámetro hidrodinámico promedio para las CuNps preparadas se encuentran alrededor de los 20 nm.

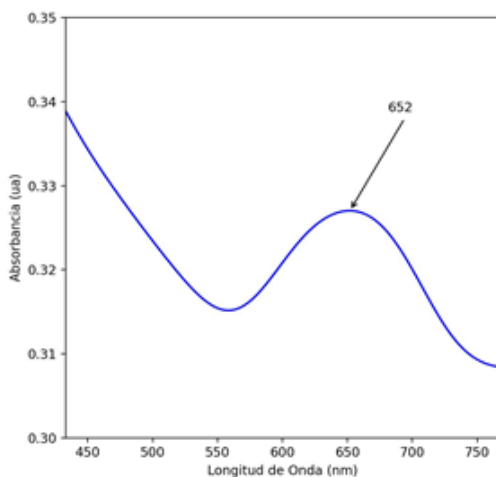


Figura 1. Espectro de UV-Vis de una suspensión acuosa de CuNPs

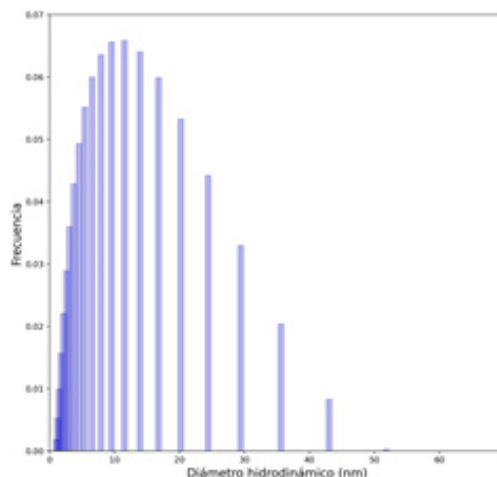


Figura 2. Histograma de frecuencia en función del diámetro hidrodinámico de una suspensión acuosa de CuNps

Por otro lado, en las Figuras 3 y 4 se muestran los histogramas de frecuencia en función de la distribución de tamaños de las suspensiones de PEC de Q/AH con y sin TPP, respectivamente. Los histogramas son muy similares con ligeras diferencias en las frecuencias. Los PEC que solo contenían Q/AH resultaron tener un tamaño ligeramente mayor al de los PEC que contenían TPP. Esto puede deberse al entrecruzamiento iónico con el TPP, lo que causaría que el PEC fuera más compacto. El radio hidrodinámico promedio para los PEC fue de aproximadamente 7 nm, mientras que para los que contenían TPP resultó ser de aproximadamente 5 nm.

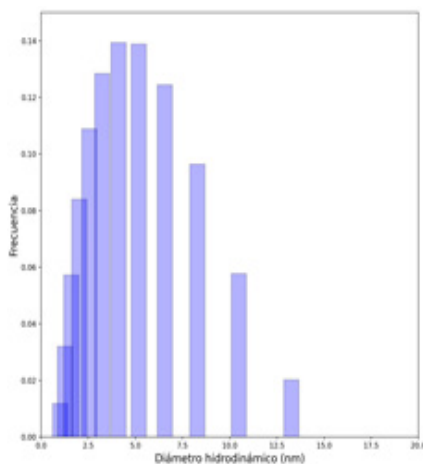


Figura 3. Histograma de frecuencia en función del diámetro hidrodinámico de una suspensión de PEC de Q/AH

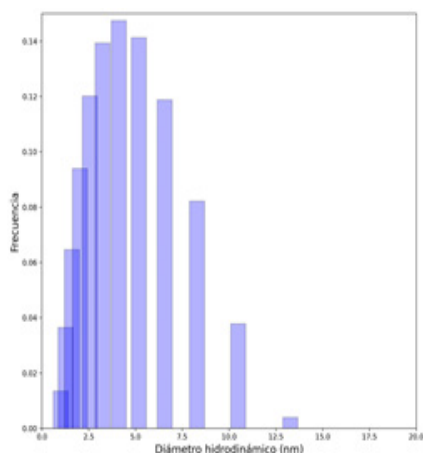


Figura 4. Histograma de frecuencia en función del diámetro hidrodinámico de una suspensión de PEC de Q/AH con TPP

ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES EN EL PEC

En la Figura 5 se muestran los espectros de infrarrojo por TFIR (*Fourier transform infrared spectroscopy*, FTIR), de quitosano (Q), ácido hialurónico (AH), tripolifosfato (TPP), complejos de polielectrolitos de quitosano-ácido hialurónico entrecruzados con tripolifosfato (Q/AH-TPP). Así, se observa que el quitosano (Q) exhibe una banda característica intensa y amplia en la región de $3800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, atribuible a las vibraciones de estiramiento solapadas de O-H y N-H participando en puentes de hidrógeno (Tomaz y col., 2018). Se observa además una banda ancha en la zona entre 2880 cm^{-1} atribuible a las vibraciones de estiramiento de C-H (Pretsch y col., 2020). La banda en 1651 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de estiramiento de C=O de amida (vibración de amida I) como un "hombro" característico del quitosano en el pico de flexión de N-H en 1599 cm^{-1} (vibración de amida II) (Knaut y col., 1999; Sacco y col., 2014; Tomaz y col., 2018). Las bandas de absorción en 1156 cm^{-1} (estiramiento antisimétrico del puente C-O-C) y 1088 cm^{-1} (vibraciones que involucran el estiramiento C-O de los carbohidratos) son picos característicos de la estructura del quitosano (Sacco y col., 2014; Tomaz y col., 2018).

Para el ácido hialurónico (HA), se observa la banda característica intensa y amplia en la región de $3800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, atribuible a las vibraciones de estiramiento solapadas de O-H y N-H de los grupos acetilo de las unidades de N-acetil-glucosamina participando en puentes de hidrógeno (Mohammed y Niamah, 2022). La vibración de estiramiento característica de C=O en amida (vibración amida I) se presenta en 1622 cm^{-1} y la vibración de flexión de N-H (vibración de amida II) en 1565 cm^{-1} .

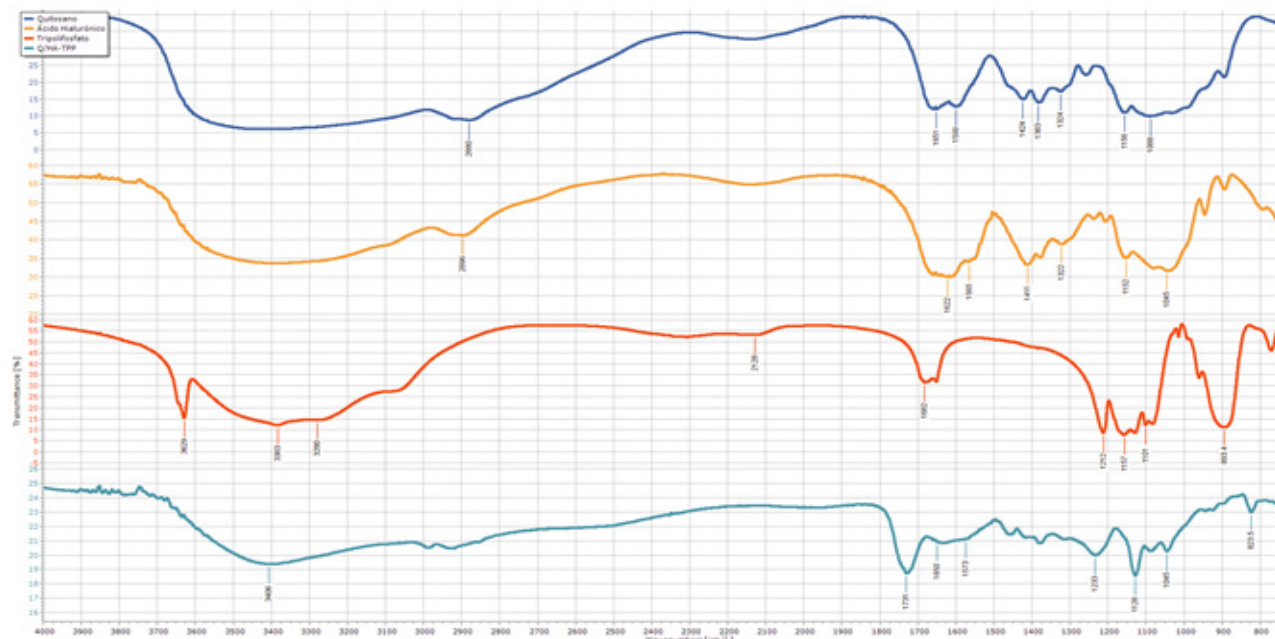


Figura 5. Espectros de infrarrojo por TFF (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR). De arriba hacia abajo: quitosano (Q), ácido hialurónico (AH), tripolifosfato (TPP), complejos de polielectrolitos de quitosano-ácido hialurónico entrecruzados con tripolifosfato (Q/AH-TPP)

Las vibraciones de estiramiento C-N se observan en 1411 cm^{-1} y finalmente en 1152 cm^{-1} y 1045 cm^{-1} las vibraciones de estiramiento C-O (Mohammed y Niamah, 2022).

El Tripolifosfato (TPP) muestra los siguientes picos característicos: estiramiento P=O en éster fosfato en 1682 cm^{-1} ; estiramiento P=O en 1212 cm^{-1} ; vibraciones de estiramiento simétrico y antisimétrico del grupo O-P=O en 1157 cm^{-1} ; vibraciones de estiramiento simétrico y antisimétrico del grupo PO_3 en 1101 cm^{-1} y vibraciones de estiramiento antisimétrico del puente P-O-P en 893 cm^{-1} (Sacco y col., 2014; Tomaz y col., 2018).

Por su parte, para los PEC de Q/AH-TPP, una de las diferencias significativas es la aparición de una banda intensa en 1128 cm^{-1} que se atribuye al estiramiento C-O. Se sabe que el número de grupos idénticos en una

molécula altera las intensidades relativas de las bandas de absorción en un espectro de IR (Fessenden y Fessenden, 1983), por lo que el aumento en la intensidad de esta banda respecto al Q y al AH puede deberse a la contribución tanto del Q como del AH en el PEC. Por otro lado, alteraciones en la vibración del enlace por efecto de grupos polarizantes produce cambios importantes en el momento de enlace, generando un aumento en la intensidad de la banda (Fessenden y Fessenden, 1983), en este caso por la presencia del TPP. Todo esto supone una interacción conjunta entre el Q/AH-TPP en el PEC. Se observa además una atenuación de las bandas de amida I y II por la interacción de los grupos amino cargados del Q y los grupos carboxilato del AH (Nath y col., 2015) y la aparición de una banda de intensidad relativa elevada en 1731 cm^{-1} correspondiente al estiramiento P=O en éster fosfato.

ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA

La topografía de los PEC se estudió mediante AFM en modo tapping. En las imágenes en 2D pueden observarse estructuras, en ambos casos, de entre 100 y más de 200 nm. Sin embargo, la imagen 3D muestra que la altura máxima en la zona estudiada era de alrededor de 7,7 nm para los PEC de Q/AH (Figura 6.A) y de 6,2 nm para los PEC de Q/AH-TPP (Figura 6.B). Esto puede sugerir la formación de agregados que conservan la altura media de la nanoestructura durante la evaporación en el proceso de preparación de las muestras. Alteraciones en la muestra como esta se han documentado para diferentes técnicas empleadas en la caracterización de materiales poliméricos en solución (Patterson y col., 2014; Insua y col., 2016).

Tomando este hecho en consideración, los tamaños concordarían con los obtenidos

por DLS. Además, se observa igualmente en este caso que la presencia del TPP en el PEC genera una reducción en el tamaño de la nanoestructura, también en concordancia con los datos obtenidos por DLS.

ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Las imágenes mostraron que las CuNps se encontraban dispersas en la matriz de los PEC de Q/AH-TPP, evidenciando que la matriz es capaz de estabilizar las CuNps y evitar la formación de agregados (Figura 7).

ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Los resultados de la actividad bactericida se resumen en la Tabla I. La tabla muestra el promedio de dos ensayos realizados. Se ensayó el nanocompuesto empleando *Staphylococcus aureus*, como organismo modelo de las bacterias Gram-positivas;

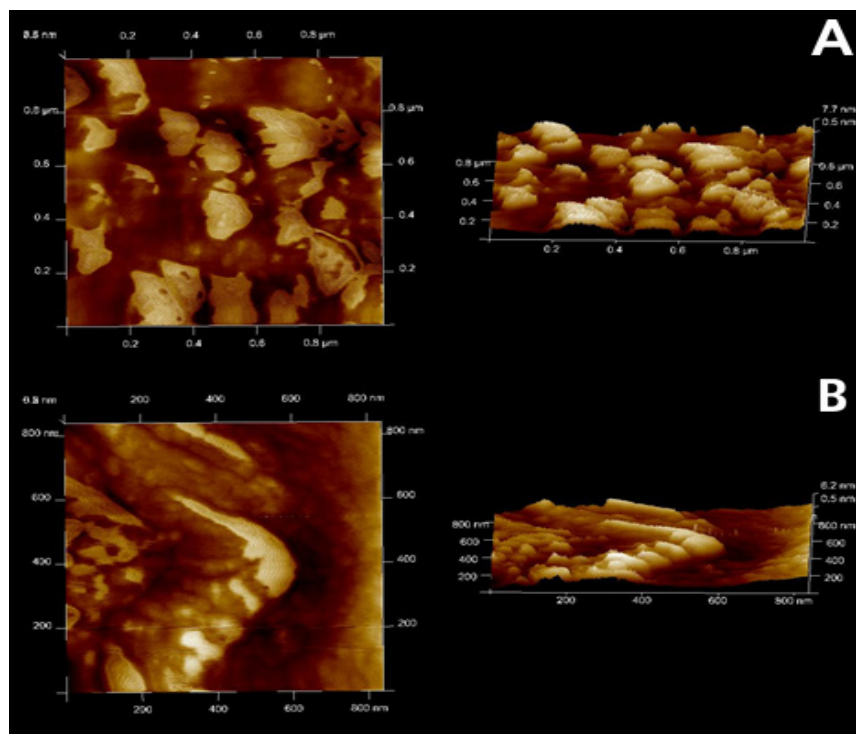


Figura 6. A) Imágenes de AFM 2D (izq.) y 3D (der.) de PEC de Q/AH. B) Imágenes de AFM 2D (izq.) y 3D (der.) de PEC de Q/AH con TPP

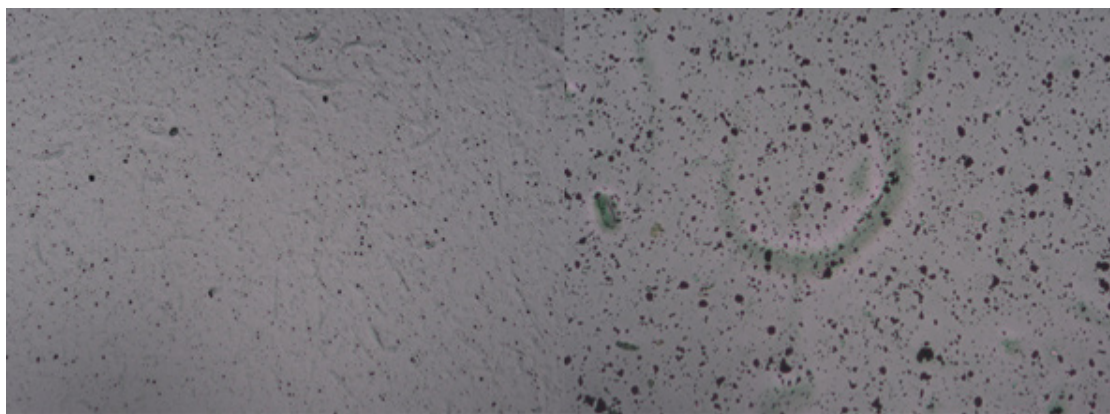


Figura 7. Imagen de microscopio óptico del nanocompuesto de PEC de Q/AH-TPP y CuNPs. A) Magnificación: 5X. Aumento: 0,33X. B) Magnificación: 5X. Aumento: 1,6X.

Tabla I.

Efecto bactericida del nanocompuesto con 200 $\mu\text{g/mL}$ de CuNps con aumento en el tiempo de exposición en condiciones limpias y sucias

| Microorganismo | Tiempo de exposición (min) | Condiciones limpias | | Condiciones sucias | |
|----------------------|----------------------------|---------------------|-------------|--------------------|-------------|
| | | Log (η) | % Reducción | Log (η) | % Reducción |
| <i>S. aureus</i> | 5 | - | - | 6,00* | 100,00 |
| | 15 | - | - | 6,00* | 100,00 |
| | 30 | - | - | 6,00* | 100,00 |
| | 60 | 2,87 | 99,86 | 6,00* | 100,00 |
| | 120 | 3,85 | 99,98 | 6,00* | 100,00 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 5 | 7,00* | 100,00 | 7,00* | 100,00 |
| | 15 | 7,00* | 100,00 | 7,00* | 100,00 |
| | 30 | 7,00* | 100,00 | 7,00* | 100,00 |
| | 60 | 7,00* | 100,00 | 7,00* | 100,00 |
| | 120 | 7,00* | 100,00 | 7,00* | 100,00 |
| <i>M. abscessus</i> | 5 | 0,88 | 86,92 | 1,03 | 90,77 |
| | 15 | 1,48 | 96,69 | 1,23 | 94,07 |
| | 30 | 1,75 | 98,23 | 1,68 | 97,92 |
| | 60 | 2,33 | 99,54 | 2,11 | 99,23 |
| | 120 | 7,00* | 100,00 | 2,34 | 99,54 |

Pseudomonas aeruginosa para el caso de las bacterias Gram-negativas y *Mycobacterium abscessus* tipo II como representativa del género *Mycobacterium*, conocido por su elevada resistencia a la desinfección (Bello y col., 2006).

Los resultados muestran que el nanocompuesto fue eficaz frente a estas tres bacterias; sin embargo, hay dos factores a destacar: el primero fue la efectividad del nanocompuesto, a pesar de que la concentración de CuNps empleada fue de apenas 200 $\mu\text{g/mL}$ y segundo, el hecho de que *S. aureus* presentó mayor resistencia respecto a *P. aeruginosa*.

En general, las bacterias Gram-positivas muestran una mayor susceptibilidad a las Nps de cobre y sus óxidos (Ren y col., 2009; Ma y col., 2022) por lo que se requeriría una menor cantidad de Nps para lograr el efecto bactericida. De acuerdo a la literatura, la mayor resistencia de las bacterias Gram-negativas está relacionada con la pared celular característica de estas bacterias (Azam y col., 2012; Betancourt-Galindo y col., 2014; Wang y col., 2017). La pared celular de las bacterias Gram-negativas está compuesta por lipopolisacáridos, lipoproteínas y fosfolípidos, que forman una barrera que sólo permite la entrada de macromoléculas (Wang y col., 2017; Gupta y col., 2019). En cambio, la pared celular de las bacterias Gram-positivas incluye una fina capa de peptidoglicano, así como ácido teicoico y abundantes poros que permiten el ingreso de moléculas extrañas, provocando daños en la membrana celular y la muerte de las células. Además, en comparación con las bacterias Gram-negativas, las bacterias Gram-positivas tienen una elevada carga negativa en la superficie de la pared celular, que puede atraer a las Nps (Wang y col., 2017; Gupta y col., 2019).

Se requerirían otros estudios para explicar de la mayor susceptibilidad de las bacterias Gram-negativas a pesar de lo anteriormente expuesto, sin embargo, puede inferirse que los demás componentes del nanomaterial juegan un papel importante. La presencia de un exceso de quitosano en relación al ácido hialurónico, generaría un exceso de carga positiva en la superficie de los complejos de polielectrolitos, potenciando el efecto sobre la pared celular Gram-positiva. En relación a esto, Qi y col. (2004) sugieren que la actividad antimicrobiana del quitosano se debe a la disrupción de la pared celular, dada la densidad de carga positiva del polímero respecto a la densidad de carga negativa característica de las paredes celulares bacterianas. El aumento en la densidad de carga superficial en el pequeño tamaño de las Nps podría causar la lisis de la membrana externa Gram-negativa, exponiendo la membrana interna de menor grosor que en el caso de las bacterias Gram-positivas.

Por otro lado, se sabe que el ácido láctico también posee actividad antimicrobiana. Pasricha y col. (1979) encontraron que ácido láctico 0,1, 1 y 2% causa inhibición en el crecimiento de diversas cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Para el caso de *M. abscessus*, la evidencia en relación a este tipo de ensayos de susceptibilidad es escasa. Sin embargo, Cortesia y col. (2014) encontraron que el ácido acético al 6% eliminó eficazmente *M. abscessus* en 30 minutos. Además, el ácido propiónico al 6% también produjo una reducción importante de la viabilidad. Por lo tanto, podría esperarse una actividad similar para el ácido láctico.

Otro factor importante es la distribución de tamaños de las Nps. Se conoce que el tamaño y forma de las Nps contribuyen con su

rendimiento como agentes antimicrobianos (Dolai y col., 2021; Ma y col., 2022). Se ha sugerido que, debido a su pequeño tamaño y a su elevada relación superficie/volumen, las Nps pueden ejercer una mejor actividad antimicrobiana que los metales ordinarios y esta actividad mejora con la disminución del tamaño (Ma y col., 2022). Las Nps preparadas para la formulación del nanocompuesto presentaron tamaños menores a 50 nm con un promedio de 20 nm; Betancourt-Galindo y col. (2014) reportan tamaños menores a 20 nm y Ren y col. (2009) reportan tamaños de entre 20 y 95 nm. La cercanía entre los valores reportados y lo encontrado en esta investigación sugiere que debe haber otros factores influyendo en la actividad del nanocompuesto, debido a la reducción de los tiempos de actividad del nanocompuesto en relación con lo reportado. Betancourt-Galindo y col. (2014) y Ren y col. (2009), determinaron valores de concentración mínima inhibitoria de entre 250-3600 $\mu\text{g/mL}$ de CuNps para lograr el efecto bactericida en experimentos de 4 horas (Ren y col., 2009) y 16 horas (Betancourt-Galindo y col., 2014). Sin embargo, el nanocompuesto preparado en esta investigación reduce la viabilidad entre 6- Log_{10} y 7- Log_{10} empleando 200 $\mu\text{g/mL}$ de CuNps en el nanocompuesto en un tiempo de exposición de 2 horas.

Lo anterior podría sugerir que la mayor susceptibilidad de las bacterias Gram-negativas respecto a las Gram-positivas se debe al efecto combinado de las nanoestructuras presentes en la formulación, a saber las CuNps y los PEC de Q/AH.

Conclusiones

Esta investigación representa un aporte al entendimiento del diseño de nanomateriales y su aplicación en el área biomédica. El

estudio mostró una posible sinergia entre los componentes del nanomaterial, lo que contribuyó a incrementar la acción antimicrobiana frente a organismos como *S. aureus* y *P. aeruginosa* respecto a la acción de los componentes individuales del nanomaterial, de acuerdo con la literatura. Por otro lado, dada la limitada literatura disponible acerca de la acción de nanomateriales frente a bacterias de elevada resistencia, como las del género *Mycobacterium*, este estudio muestra el potencial que tiene el empleo de nanocompuestos como potenciales agentes antimicrobianos con acción prolongada en el tiempo.

Agradecimientos

Al Laboratorio de Productos Naturales y al Laboratorio de Espectroscopía Láser de la Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela por permitir el uso de sus espacios e instrumentación y al Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina «Dr. Jacinto Convit», Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela donde se realizaron los ensayos de cuantificación de la actividad antimicrobiana.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

Referencias Bibliográficas

- Adams FC, Barbante C. 2013. Nanoscience, nanotechnology and spectrometry. *Spectrochim Acta B* 86: 3-13.
- Azam A, Ahmed AS, Oves M, Khan MS, Habib SS, Memić A. 2012. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against gram-positive and

- gram-negative bacteria: a comparative study. *Int J Nanomed* 2012;6003-6009.
- Bello T, Rivera-Olivero IA, De Waard JH. 2006. Inactivación de micobacterias con desinfectantes registrados como tuberculicidas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24(5): 319-321.
- Betancourt-Galindo R, Reyes-Rodríguez PY, Puente-Urbina B, Ávila-Orta CA, Rodríguez-Fernández O, Cadenas-Pliego G, Lira-Saldívar RH, García-Cerda L. 2014. Synthesis of copper nanoparticles by thermal decomposition and their antimicrobial properties. *J Nanomater* 2014: 1-5.
- Borlow G, Gabbay J. 2004. Putting copper into action: copper-impregnated products with potent biocidal activities. *FASEB J* 18(14): 1728-1730.
- Cortesia C, Vilchèze C, Bermut A, Contreras W, Gómez K, De Waard J, Jacobs Jr WR, Kremer L, Takiff H. 2014. Acetic acid, the active component of vinegar, is an effective tuberculocidal disinfectant. *mBio* 5(2).
- Dolai J, Mandal K, Jana NR. 2021. Nanoparticle Size Effects in Biomedical Applications. *ACS Appl Nano Mater* 4(7): 6471-6496.
- Ealias AM, y Saravanakumar MP. 2017. A review on the classification, characterization, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conf Ser: Mater Sci Eng* 263.
- Fessenden RJ, Fessenden JS. *Química orgánica*. Grupo Editorial Iberoamérica: México D.F., México, 1983.
- Gómez Garzón M. 2018. Nanomateriales, nanopartículas y síntesis verde. *Repert Med Cir* 27(2): 75-80.
- Insua I, Wilkinson A, Fernandez-Trillo F. 2016. Polyion complex (PIC) particles: Preparation and biomedical applications. *Eur Polym J* 81: 198-215.
- Khodashenas B, Ghorbani HR. 2014. Synthesis of copper nanoparticles: An overview of the various methods. *Korean J Chem Eng* 31(7): 1105-1109.
- Knaul JZ, Hudson SM, Creber KAM. 1999. Improved Mechanical Properties of Chitosan Fibers. *J Appl Polym Sci* 72(13): 1721-1732.
- Ma X, Zhou S, Xu X, Du Q. 2022. Copper-containing nanoparticles: Mechanism of antimicrobial effect and application in dentistry-a narrative review. *Front Surg* 9.
- Mohammed AA, Niamah AK. 2022. Identification and antioxidant activity of hyaluronic acid extracted from local isolates of *Streptococcus thermophilus*. *Mater Today: Proc* 60: 1523-1529.
- Nath SD, Abueva C, Kim B, Lee BT. 2015. Chitosan-hyaluronic acid polyelectrolyte complex scaffold crosslinked with genipin for immobilization and controlled release of BMP-2. *Carb Pol* 115: 160-169.
- Patterson JP, Robin MP, Chassenieux C, Colombani O, O'Reilly RK. 2014. The analysis of solution self-assembled polymeric nanomaterials. *Chem Soc Rev* 43(8): 2412-2425.
- Phul R, Kaur C, Farooq U, Ahmad T. 2018. Ascorbic acid assisted synthesis, characterization and catalytic application of copper nanoparticles. *Mater Sci Eng Int J* 2(4): 90-94.
- Pretsch E, Bühlmann P, Badertscher M. 2020. Structure determination of organic compounds. Springer-Verlag GmbH Germany: Heidelberg, Alemania.
- Qi L, Xu Z, Xia J, Hu C, Zou X. 2004. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydr Res* 339(16): 2693-2700.
- Ren G, Hu D, Cheng EW, Vargas-Reus MA, Reip P, Allaker RP. 2009. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *Int J Antimicrob Agents* 33(6): 587-590.
- Sacco P, Borgogna M, Travan A, Marsich E, Paoletti S, Asaro F, Grassi M, Donati I. 2014. Polysaccharide-Based networks from homogeneous Chitosan-Tripolyphosphate hydrogels: Synthesis and characterization. *Biomacromolecules* 15(9): 3396-3405.
- Schmid G (Ed.). *Clusters and Colloids: From Theory to Applications*. VCH Verlagsgesellschaft mbH: Weinheim, República Federal de Alemania, 1994.
- Tomaz AF, De Carvalho SMS, Barbosa RC, De Lima Silva SM, Gutiérrez MS, Lima AGB, Fook MVL. 2018. Ionically crosslinked chitosan membranes used as drug carriers for cancer therapy application. *Materials* 11(10): 2051.
- Van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, Tamin A, Harcourt JL, Thornburg NJ, Gerber SI, Lloyd-Smith JO, de Wit E, Munster VJ. 2020. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med* 382(16): 1564-1567.
- Wang L, Hu C, Shao L. 2017. The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and Prospects for the future. *Int J Nanomedicine* 12: 1227-1249.
- Warnes SL, Little ZR, Keevil CW. 2015. Human Coronavirus 229E Remains Infectious on

-
- Common Touch Surface Materials. *mBio* 6(6).
- World Health Organization. 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Recuperado 2022, de <https://www.who.int/publications/i/item/9789241564748>.
- Wu D, Delair T. 2015. Stabilization of chitosan/hyaluronan colloidal polyelectrolyte complexes in physiological conditions. *Carbohydr Polym* 119: 149-158.
- Xiong J, Wang Y, Xue Q, Wu X. 2011. Synthesis of highly stable dispersions of nanosized copper particles using L-ascorbic acid. *Green Chem* 13: 900-904.
- Yang L, Gao S, Asghar S, Liu G, Song J, Wang X, Ping Q, Zhang C, Xiao Y. 2015. Hyaluronic acid/chitosan nanoparticles for delivery of curcuminoid and its *in vitro* evaluation in glioma cells. *Int J Biol Macromol* 72: 1391-1401.