

INCORPORACIÓN DE AGENTES ANTI-INFECCIOSOS EN NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE ORO Y CHITOSAN

Incorporation of Anti-infectious Agents on Metallic Nanoparticles of Gold and Chitosan

Salomé DÍAZ SÁNCHEZ; José MARTÍNEZ LANAO; Clara Isabel COLINO GANDARILLAS

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno, Calle Ldo. Méndez Nieto, s/n, 37007 Salamanca

Correo-e: ganda@usal.es

RESUMEN: La resistencia a agentes antimicrobianos es un grave problema de salud, que provoca una gran mortalidad en la población. Por ello, hay un gran interés en la búsqueda de alternativas para el tratamiento de estas infecciones provocadas por bacterias multirresistentes. Una de ellas podría ser el uso de nanopartículas metálicas de oro (NPs) incorporando un agente anti-infeccioso como el ciprofloxacino, que es un fármaco antibacteriano de amplio espectro de acción. Por ello, el objetivo del estudio fue evaluar el comportamiento de las NPs de oro-chitosan (Au-chitosan) respecto a las de oro-citrato (Au-citrato) en la captación de ciprofloxacino para distintas condiciones de incubación. Para ello, se sintetizaron las NPs y se pusieron en contacto con el agente anti-infeccioso a distintas concentraciones de estudio. Mediante cromatografía líquida de ultra-alta eficacia (UHPLC), se estimaron las concentraciones de ciprofloxacino incorporadas a las nanopartículas. El porcentaje de incorporación de ciprofloxacino fue mayor para las nanopartículas de Au-citrato que para las nanopartículas de Au-chitosan. Sin embargo, las NPs de Au-citrato presentan el inconveniente de que se forman grandes agregados que dificultan su manejo. Las de Au-chitosan son más estables y además el chitosan posee actividad antibacteriana. Por ello, podrían

ser un buen vehículo para la incorporación de agentes anti-infecciosos e incluso potenciar la actividad antimicrobiana del mismo.

Palabras clave: nanopartículas; ciprofloxacino; chitosan.

ABSTRACT: Resistance to antimicrobial agents is a serious health problem, causing great mortality in the population. This makes very interesting the search for alternatives for the treatment of these infections caused by multiresistant bacteria. One of them could be the use of gold metallic nanoparticles (NPs) together with an anti-infectious agent such as ciprofloxacin which is a broad-spectrum antibacterial drug. The objective of the study was to evaluate the behavior of gold-chitosan (Au-chitosan) NPs compared to gold-citrate (Au-citrate) NPs in the uptake of ciprofloxacin for different incubation conditions. The nanoparticles were synthesized and the anti-infectious agent incorporated at different study concentrations. By ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC), the concentrations of ciprofloxacin incorporated into the nanoparticles were estimated. The percentage incorporation of ciprofloxacin was higher for Au-citrate nanoparticles compared to Au-chitosan nanoparticles. However, Au-citrate disadvantage form large aggregates, difficulting its good management. Au-chitosan NPs are more stable and chitosan has antibacterial activities. Thus, gold and chitosan nanoparticles could be a good vehicle for the incorporation of anti-infective agents and may even have the potential to enhance their antimicrobial activity.

Key words: nanoparticles; ciprofloxacin; chitosan.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las numerosas resistencias a los agentes antimicrobianos constituyen un grave problema de salud, que está provocando una gran morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Regiel-Futyra *et al.*, 2015). Esto se debe a que algunas bacterias han desarrollado distintos mecanismos para evitar la acción del fármaco como la producción de enzimas que lo inactiven (Fernández *et al.*, 2003).

Una posible solución es la utilización de nanosistemas como son las nanopartículas de oro (AuNPs), que están adquiriendo una gran importancia debido a sus propiedades físicas y químicas. Una de ellas son las propiedades ópticas de las nanopartículas (NPs), que les confieren color, lo que permite su fácil caracterización (Monge, 2009).

Además, se han atribuido a las nanopartículas de oro propiedades antimicrobianas, aunque el mecanismo no está claro. Se ha postulado que podría ser debido a la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS); aunque otra hipótesis es que generen daño a la pared bacteriana. Esta capacidad antimicrobiana depende del tamaño de las AuNPs (Zhoy *et al.*, 2012).

Otra de sus ventajas es que pueden también modificarse para su uso en distintas aplicaciones terapéuticas (Al-Qadi, Remuñán-López, 2009); (Le *et al.*, 2014); (Mukherjee *et al.*, 2007). Así, se han incorporado diferentes fármacos a las AuNPs, como pueden ser vancomicina, amoxicilina (Kalita *et al.*, 2016), antibacterianos carbapenémicos (Shaker, Shaaban, 2017) y se postula que hay una mejora en la actividad de los antibióticos unidos a las AuNPs, incluso frente a las cepas multi-resistentes (Kalita *et al.*, 2016).

Las NPs de oro se producen por reducción de iones de oro [Au (III) → Au (0)] generalmente mediante el método de Turkevitch, que incluye la reducción de ácido cloroáurico con citrato sódico (Al-Qadi, Remuñán-López, 2009). También se han utilizado otros agentes reductores, entre los que se encuentra el chitosan.

El chitosan es un biopolímero catiónico lineal compuesto por unidades N-acetilglucosamina que destaca por su biocompatibilidad y, además, tiene propiedades antimicrobianas gracias a los grupos amino de su estructura que interaccionan con la membrana de la bacteria (León, Santiago, 2007). El chitosan es insoluble en agua y soluble en disoluciones ácidas.

Ciprofloxacino es un antibacteriano perteneciente al grupo de las fluoroquinolonas que tiene un amplio espectro de acción y muy buena absorción oral. Su mecanismo de acción consiste en impedir la división celular de la bacteria provocando su muerte. Se utiliza ampliamente en infecciones de bacterias Gram + y Gram -, si bien se han desarrollado resistencias a este tipo de fármacos, sobre todo a nivel hospitalario.

La combinación de NPs de oro-chitosan y un antibiótico como ciprofloxacino podría tener un efecto sinérgico de interés para conseguir una mejora en la actividad antibacteriana frente a las cepas resistentes.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el comportamiento de las NPs de oro-chitosan (Au-chitosan) respecto a las de oro-citrato (Au-citrato) en la captación de ciprofloxacino para distintas condiciones de incubación.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Preparación de las nanopartículas (NPs)

- Método de preparación de las NPs de oro-citrato.

Se mezclaron 0,4 mL de clorhidrato de Au (III) (Sigma – Aldrich CAS 27988-77-8), de concentración 4g/mL y 14,5 mL de agua, y se mantuvieron en agitación a 150 °C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo se incorporaron 0,4 mL de citrato trisódico (Sigma – Aldrich; CAS 6132-04-3) al 2% y se mantuvieron a la misma temperatura y con agitación otros 20 minutos, hasta la aparición de un color burdeos, que indica la presencia de nanopartículas de oro.

- Método de preparación de NPs de oro-chitosan.

Se calentaron 14,5 mL de chitosan de bajo peso molecular (Sigma- Aldrich; CAS 9012-76-4) al 0.4% en acético 1M a 150 °C durante 5 minutos con agitación. Después se incorporaron 0,3 mL de sal de Au, de concentración 4g/mL y se mantuvieron en las condiciones anteriormente descritas durante una hora.

En ambos casos, una vez preparado el lote, las NPs se centrifugaron a 14.000 rpm durante 20 minutos y a 20 °C y se redisolvió el pellet obtenido en la mitad del volumen de agua.

2.2. Incorporación de ciprofloxacino en las nanopartículas

Se incubaron en un baño termostatzado con agitación UNITRONIC-ORBITAL, 0,25 ml de solución de NPs con 0,25 mL de disolución de ciprofloxacino (ciprofloxacino HCl Sigma – Aldrich; CAS 86393-32-0). Se utilizaron tres concentraciones: 500 µg/mL, 1000 µg/mL y 2000 µg/mL; dos temperaturas 4° C y 20° C y tres tiempos: 3h, 6h y 24h.

A los tiempos establecidos se centrifugaron las muestras y se separaron los sobrenadantes de los pellets. Los sobrenadantes se congelaron a -20 °C y posteriormente se cuantificó la concentración de ciprofloxacino.

- Caracterización de las nanopartículas

Se han caracterizado las nanopartículas tanto de oro-citrato como de oro-chitosan, antes y después de la captación de ciprofloxacino mediante espectrofotometría UV-visible, realizándose un barrido desde 200 a 800 nm.

Las nanopartículas sintetizadas fueron observadas al microscopio electrónico de transmisión Tecnai Spirit Twin del Servicio de Microscopía de la USAL para

evaluar su forma y el tamaño medio. Para ello, una gota de la muestra fue depositada en una rejilla de cobre y se dejó secar lentamente a temperatura ambiente.

- Estimación de la eficacia de incorporación a las NPs

Se analizaron las concentraciones de ciprofloxacino en el sobrenadante mediante un método de UHPLC, utilizando un cromatógrafo Shimadzu UHPLC (Tokyo, Japan) con un detector de ultravioleta PDA SPD-M20A (Shimadzu, Tokyo, Japan) a una longitud de onda de 274 nm. La separación cromatográfica se realizó en una columna Kinetex® C18 column (50mm×2,10mm, con un tamaño de partícula de 1,7µm, Phenomenex® y a T=25°C. La fase móvil fue agua-metanol en una proporción 80:20 y a un flujo de 0,5 mL/min.

El porcentaje de fármaco asociado a las NPs se estimó mediante un método indirecto, a partir de las concentraciones iniciales y las concentraciones determinadas en el sobrenadante.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respecto al aspecto de la solución de nanopartículas sin el fármaco y al incorporar ciprofloxacino, se puede observar que el color de las nanopartículas de oro-citrato cambia de una tonalidad burdeos a un color azul debido a que las NPs se agregan al añadirle ciprofloxacino. Esto no sucede en las NPs de chitosan.

En cuanto a los resultados del análisis espectrofotométrico, las NPs Au-citrato y Au-chitosan presentaron el máximo de absorción a 524 y 526 nm respectivamente. Después de la incubación se puede observar en ambos casos el máximo característico del fármaco a 270 nm lo que indica la asociación de ciprofloxacino a las NPs. En las NPs de Au-chitosan la longitud de onda de máxima absorción es de 531 nm, mientras que en las NPs de Au-citrato con ciprofloxacino se produce un desplazamiento a 579 nm, lo que refleja la formación de agregados.

Las NPs sintetizadas presentaron forma redondeada, como se puede observar en las imágenes obtenidas por microscopía electrónica (figura 1). El tamaño medio estimado de las AuNPs de citrato fue $13,06 \pm 1,64$ nm y de las AuNPs de chitosan fue $15,69 \pm 3,49$ nm.

En las figuras 1A y 1B se reflejan, asimismo, los grandes agregados de las nanopartículas de oro-citrato tras añadirle ciprofloxacino que no aparecen cuando este se incorpora a las nanopartículas de oro y chitosan (figura 1B)

Se han propuesto dos mecanismos por los cuales las moléculas pueden unirse a la superficie de las NPs de oro. El primero implica el desplazamiento de la molécula presente en la superficie de la NPs, que se intercambia con la nueva molécula (Nirmala, Pandian, 2007). El segundo método sería la conjugación, es decir, la formación de enlaces químicos entre la nueva molécula y el estabilizante unido a la superficie de las NPs de oro (Sperling *et al.*, 2008).

En el caso de ciprofloxacino, se ha descrito una interacción mediante enlaces electrostáticos entre el grupo amino del anillo de piperazina con los grupos citrato de las nanopartículas de oro, dando lugar a su agregación (Tom *et al.*, 2004). Esta agregación se observa también con la incorporación de otros antibióticos a las NPs de Au-citrato como los aminoglucósidos (Nirmala, Pandian, 2008). Se ha propuesto que, incluso con agregación, la asociación de antibiótico con AuNPs presenta una mayor actividad antibacteriana que el antibiótico solo, aunque esto ha sido puesto en duda por otros autores (Borygin *et al.*, 2009).

El mecanismo de asociación entre las NPs de Au-chitosan y ciprofloxacino no está claro, si bien podría haber una interacción entre el grupo carboxilo de la quinolona con los grupos amino del chitosan.

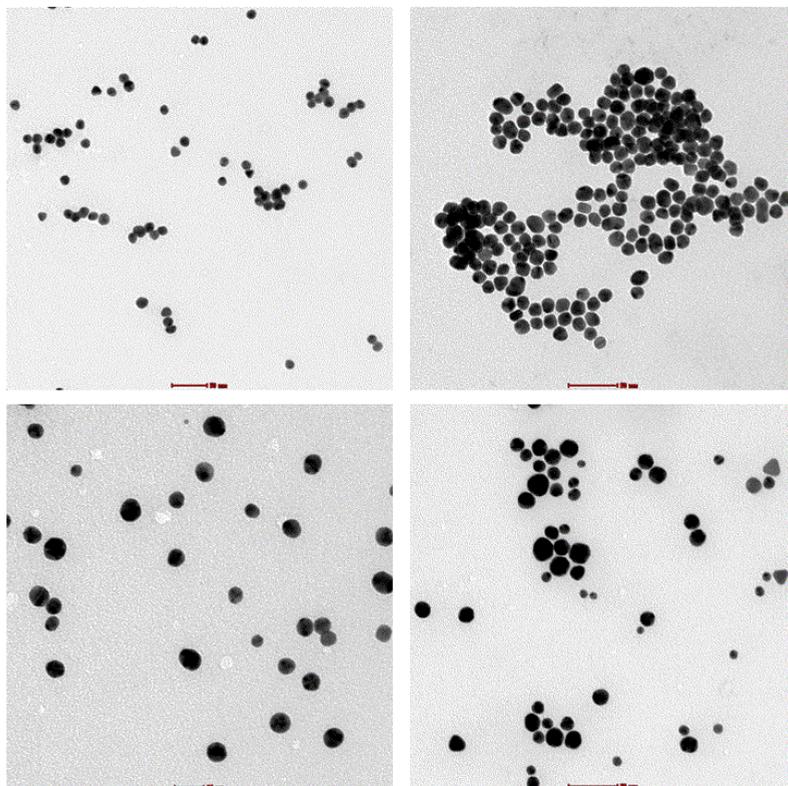


FIGURA 1. Análisis por microscopía electrónica de las nanopartículas:
A- NPs Au-citrato; B- NPs Au-citrato con ciprofloxacino; C- NPs Au-chitosan;
D- NPs Au-chitosan con ciprofloxacino.

Los porcentajes de incorporación de ciprofloxacino a las AuNPs fueron superiores a una temperatura de 20 °C en todos los casos (figura 2).

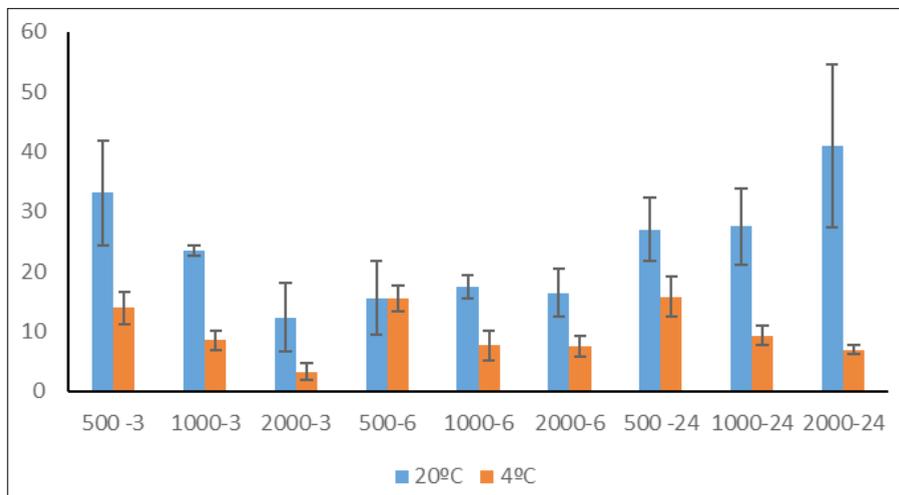


FIGURA 2. Comparación de los porcentajes de incorporación de fármaco en las AuNPs de chitosan a distintos tiempos y temperaturas.

No se ha encontrado correlación entre el tiempo de incubación y el porcentaje de incorporación de ciprofloxacino a las NPs. En cuanto a la concentración, la cantidad de fármaco unido a las NPs se incrementa cuando lo hace la cantidad inicial de ciprofloxacino.

Comparando las cantidades unidas entre los dos tipos de nanopartículas, se puede apreciar una mayor cantidad incorporada a las NPs de Au-citrato que en las nanopartículas de Au-chitosan (figura 3), si bien las AuNPs de citrato tienen el inconveniente de que forman grandes agregados cuando se ponen en contacto con el antibiótico. Las NPs de Au-chitosan son más estables y además el chitosan tiene propiedades antimicrobianas, por lo que podría también potenciar la actividad del agente antiinfeccioso.

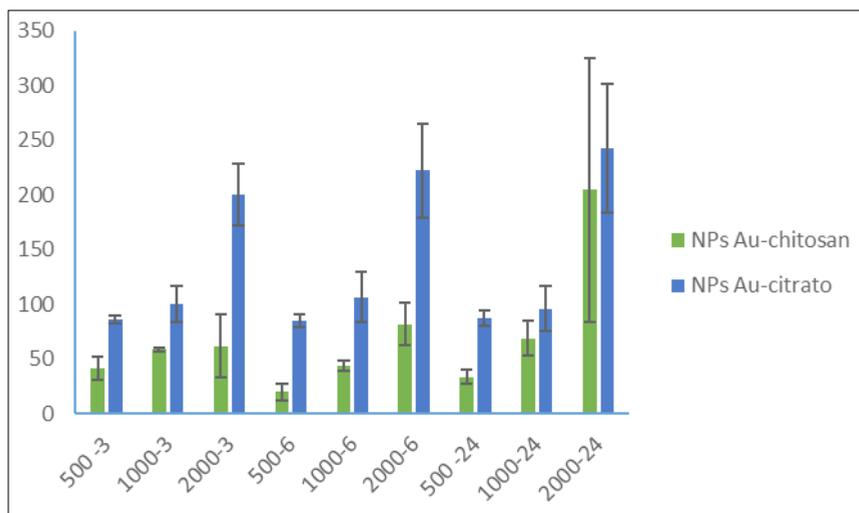


FIGURA 3. Comparación de las cantidades unidas en AuNPs de citrato y AuNPs de chitosan.

4. CONCLUSIONES

- Las NPs de oro sintetizadas son capaces de incorporar ciprofloxacino; las de Au-citrato incorporan un mayor porcentaje de fármaco que las de Au-chitosan, pero presentan el inconveniente de que se forman grandes agregados.
- En todos los casos y para ambos tipos de NPs, se observa una mayor eficacia de incorporación del fármaco a una temperatura de 20 °C que a 4° C.
- Para los dos tipos de NPs la cantidad unida a las NPs de ciprofloxacino aumenta cuando es mayor la cantidad de fármaco inicial.
- Las NPs de Au-chitosan son capaces de incorporar ciprofloxacino sin que se produzca su agregación, por lo que podrían ser un vehículo adecuado para conseguir la potenciación de la actividad antimicrobiana de las NPs de oro, de chitosan y de ciprofloxacino.

5. BIBLIOGRAFÍA

Al-Qadi S, Remuñán-López C. Nanopartículas metálicas: oro. [Santiago de Compostela]: Universidad de Santiago de Compostela. 2009 [acceso 25 abr 2017] Monografías de

- la Real Academia Nacional de Farmacia. Disponible en: <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/994/0>
- Burygin G, Khlebtsov B, Shantrokha A, Dykman L, Bogatyrev V, Khlebtsov N. On the Enhanced Antibacterial Activity of Antibiotics Mixed with Gold Nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*. 2009;4(8):794-801.
- Fernández Riverón F, López Hernández J, Ponce Martínez LM, Machado Betarte C. Resistencia bacteriana. *Rev Cub Med Mil* [Internet]. 2003[acceso 25 abr 2017]; 32(1): Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S013865572003000100007
- Kalita S, Kandimalla R, Sharma K, Katakai A, Deka M, Kotoky J. Amoxicillin functionalized gold nanoparticles reverts MRSA resistance. *Materials Science and Engineering: C*. 2016;61:720-727.
- Lee J, Chatterjee D, Lee M, Krishnan S. Gold nanoparticles in breast cancer treatment: Promise and potential pitfalls. *Cancer Letters*. 2014;347(1):46-53.
- León K, Santiago J. Propiedades antimicrobianas de películas de quitosano-alcohol polivinílico embebidas en extracto de sangre de grado. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 2007;173(3):158-165.
- Monge M. Nanopartículas de plata: método de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *An. Quím.* 2009;105(1):33-41.
- Mukherjee P, Bhattacharya R, Bone N, Lee Y, Patra C, Wang S et al. Potential therapeutic application of gold nanoparticles in B-chronic lymphocytic leukemia (BCLL): enhancing apoptosis. *Journal of Nanobiotechnology*. 2007;5(1):4.
- Nirmala Grace A, Pandian K. Antibacterial efficacy of aminoglycosidic antibiotics protected gold nanoparticles—A brief study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2007;297(1-3):63-70.
- Regiel-Futyra A, Kus-Liśkiewicz M, Sebastian V, Irusta S, Arruebo M, Stochel G et al. Development of Noncytotoxic Chitosan–Gold Nanocomposites as Efficient Antibacterial Materials. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2015;7(2):1087-1099.
- Shaker M, Shaaban M. Formulation of carbapenems loaded gold nanoparticles to combat multi-antibiotic bacterial resistance: In vitro antibacterial study. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017;525(1):71-84.
- Sperling R, Rivera Gil P, Zhang F, Zanella M, Parak W. Biological applications of gold nanoparticles. *Chemical Society Reviews*. 2008;37(9):1896.
- Tom R, Suryanarayanan V, Reddy P, Baskaran S, Pradeep T. Ciprofloxacin-Protected Gold Nanoparticles. *Langmuir*. 2004;20(5):1909-1914.
- Zhou Y, Kong Y, Kundu S, Cirillo J, Liang H. Antibacterial activities of gold and silver nanoparticles against *Escherichia coli* and *Bacillus Calmette-Guérin*. *Journal of Nanobiotechnology*. 2012;10(1):19.

