

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE NANOPARTICULAS DE PLATA

Miguel A. Aguilar Méndez^a, Eduardo San Martín Martínez^a, Lesli Ortega Arroyo^a, Georgina Cobián Portillo^b

^a Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, Instituto Politécnico Nacional, Legaria 694, Colonia Irrigación, México D.F. 11500, México. e-mails: maguilarme@ipn.mx (Aguilar Méndez), esanmartin@ipn.mx (San Martín Martínez), jvales_55@yahoo.com.mx (Ortega Arroyo).

^b Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Instituto Politécnico Nacional, Hornos 1003, Colonia Noche Buena, Oaxaca 71230, México. e-mail: geocobian@hotmail.com

Resumen

Nanopartículas de plata fueron sintetizadas y caracterizadas mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) y espectroscopia de infrarrojo (FTIR). La información obtenida por MET fue analizada a través de la metodología de superficie de respuesta (MSR), para determinar la influencia de las variables de síntesis en el tamaño de las partículas. La actividad antifúngica fue evaluada in vitro, empleando el fitopatógeno *Colletotrichum gloesporioides*. Los resultados mostraron la formación de nanopartículas de plata de forma esférica, con una distribución de tamaño entre 5-25nm. Las variables de síntesis utilizadas tuvieron una influencia importante en el tamaño de las partículas. FTIR evidenció que las nanopartículas interaccionaron con los grupos amida e hidroxilo libres de la gelatina. El crecimiento del hongo fue significativamente retrasado por la presencia de nanopartículas de plata.

Palabras clave: nanopartículas de plata; actividad antifúngica; *Colletotrichum gloesporioides*.

1. Introducción

Debido a su gran área superficial, varios metales a escala nanométrica presentan propiedades biocidas, las cuales han impulsado el estudio de nanopartículas metálicas con la finalidad de utilizarlas como nuevos agentes antimicrobianos [1]. Entre los agentes antimicrobianos inorgánicos, la plata ha sido ampliamente utilizada desde tiempos remotos para combatir infecciones y controlar la contaminación microbiana. La plata en su estado metálico es inerte, pero ésta reacciona con el agua provocando su ionización de manera inmediata. En este estado la plata es altamente reactiva, y su efecto bactericida se debe principalmente a los cambios estructurales que provoca en la membrana bacteriana y a su interacción con los grupos fosforilados y azufrados de varios compuestos [2]. Aunque el mecanismo de acción de la plata en forma nanométrica no es bien conocido, se plantea que éste puede ser similar al de la plata iónica [3]. Mucho se ha reportado de la actividad biocida contra varios tipos de bacterias, sin embargo investigaciones donde se evalúe el efecto antifúngico han sido poco desarrolladas.

Las enfermedades postcosecha causan considerables pérdidas en frutas y vegetales durante su transporte y almacenamiento. Varias de esas enfermedades son producidas por hongos que no solo

Memorias del XXXI Encuentro Nacional de la AMIDIQ

4 al 7 de Mayo de 2010, Huatulco Oaxaca

atacan al fruto, sino que también pueden afectar hojas, flores y tallos de plantas [4]. En frutos como papaya y mango, la antracnosis es una enfermedad comúnmente producida por *Colletotrichum gloesporioides*. Este hongo es capaz de penetrar la piel y mantenerse latente hasta la maduración del fruto. Los síntomas de la enfermedad llegan a ser evidentes solo durante el periodo postcosecha. El combate de la antracnosis se realiza principalmente con la aplicación poscosecha de prochloraz y propiconazol o tratamientos con agua caliente en combinación con fungicidas. Sin embargo en frutos como papaya, el agua caliente afecta el proceso de maduración [5]. Por otro lado, el uso indiscriminado de fungicidas puede provocar la aparición de cepas resistentes a ellos. Además los residuos tóxicos presentes en las frutas pueden representar un riesgo para la salud de los consumidores [6].

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la influencia de las variables de síntesis en la morfología y tamaño de nanopartículas de plata. Además se determinó el efecto que provocan sobre el crecimiento del fitopatógeno *Colletotrichum gloesporioides*.

2. Metodología

2.1. Síntesis de nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata fueron elaboradas de acuerdo con la siguiente metodología: Una solución acuosa de gelatina-glucosa fue preparada de acuerdo a las concentraciones establecidas en el diseño de experimentos (Tabla 1). La solución fue sometida a un tratamiento térmico, bajo agitación constante. Al alcanzar la temperatura requerida, se procedió a agregar, gota a gota, 10mL de una solución 0.1M de AgNO_3 . La solución final fue mantenida por 30 minutos más bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación. El pH (10) fue constante para todos los experimentos.

2.2. Microscopía electrónica de transmisión (MET)

El tamaño y la morfología de los nanomateriales fueron examinados empleando un microscopio electrónico de transmisión JEOL-JEM1010 (JEOL, Japón). Las muestras fueron preparadas colocando una gota de las soluciones coloidales sobre una rejilla de cobre, con recubrimiento de carbono (200 mesh). Las imágenes se obtuvieron utilizando una potencia de 60kV.

2.3. Espectroscopia infrarrojo (FTIR)

Los espectros FTIR fueron obtenidos en un equipo Spectrum One (Perkin Elmer, EUA). Previo al análisis, las nanopartículas de plata fueron separadas por centrifugación a 13,000 rpm y secadas. Pequeñas cantidades de gelatina, AgNO_3 y nanopartículas fueron mezcladas por separado con KBr para formar una pastilla compacta y transparente. Los espectros fueron registrados en un rango de frecuencia de $4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$.

2.4. Diseño experimental y análisis estadístico

La síntesis de las nanopartículas de plata se realizó acorde a un diseño experimental y teniendo como variables de estudio las relaciones (Glu/Ag), (Gel/Ag) y temperatura de síntesis. Los datos obtenidos por MET fueron analizados a través de MSR (Design-Expert 5, Stat-Ease Inc., EUA), para determinar la influencia de las variables de síntesis en el tamaño de las partículas. Las pruebas microbiológicas se realizaron por quintuplicado y los resultados fueron evaluados por análisis de varianza (ANOVA). Diferencias significativas entre medias de tratamientos fueron identificadas mediante Tukey ($p < 0.05$).

Memorias del XXXI Encuentro Nacional de la AMIDIQ

4 al 7 de Mayo de 2010, Huatulco Oaxaca

Tabla 1. Diseño experimental para la síntesis de nanopartículas de plata

<i>Experimento</i>	<i>Relación Glu/Ag</i>	<i>Relación Gel/Ag</i>	<i>Temperatura (°C)</i>
1	1.5	1.0	65
2	1.5	1.0	85
3	1.5	2.0	65
4	1.5	2.0	85
5	2.5	1.0	65
6	2.5	1.0	85
7	2.5	2.0	65
8	2.5	2.0	85
9	2.8	1.5	75
10	2.0	2.3	75
11	2.0	1.5	92
12	1.2	1.5	75
13	2.0	0.7	75
14	2.0	1.5	58
15	2.0	1.5	75
16	2.0	1.5	75
17	2.0	1.5	75
18	2.0	1.5	75
19	2.0	1.5	75
20	2.0	1.5	75

2.5. Evaluación de la actividad antifúngica

En la evaluación de la actividad antifúngica se emplearon nanopartículas de 5 y 24nm de diámetro promedio, a diferentes concentraciones (0, 13, 26 y 52µg Ag/mL PDA, las cuales fueron codificadas como C₁, C₂ C₃ y C₄ respectivamente). Las nanopartículas de plata fueron incorporadas al medio de cultivo previo al vaciado en cajas petri. Un disco de 5mm de agar+micelio fue tomado del cultivo puro y colocado en el centro de la placa con los distintos tratamientos. Las placas fueron incubadas a 25°C y se realizaron mediciones del diámetro de la colonia cada 24 horas, hasta que el micelio del hongo alcanzó los bordes de la placa C₁. El índice antifúngico (IA) fue calculado mediante la ecuación 1.

$$IA = \left(1 - \frac{D_1}{D_2}\right) \times 100 \quad (1)$$

Donde:

D₁: diámetro del micelio en los tratamientos con nanopartículas

D₂: diámetro del micelio en el control

3. Resultados y Discusión

3.1. Microscopía electrónica de transmisión (MET)

En este trabajo fue posible sintetizar nanopartículas de plata monodispersas, en un rango de diámetro promedio de 5-25nm. Asimismo se pudo observar una prevalencia de nanopartículas de forma esferoidal bajo todas las condiciones de síntesis. La figura 1 muestra imágenes de MET de nanopartículas de plata obtenidas bajo las condiciones de las corridas 6 y 10.

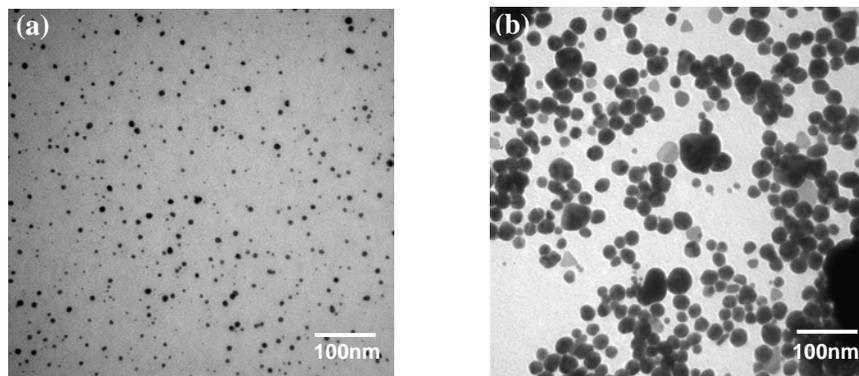


Figura 1. Imágenes de MET de nanopartículas de plata obtenidas bajo las condiciones de las corridas 6 (a) y 10 (b)

Con la finalidad de establecer la influencia de las variables de síntesis en el tamaño de las nanopartículas de plata, los valores de tamaño promedio fueron analizados mediante la MSR (Figura 2). De acuerdo con la Figura 2a, nanopartículas de tamaño pequeño (3.5nm) pueden ser obtenidas al aumentar proporcionalmente las relaciones Gel/Ag (desde 0.66 hasta 2.34) y Glu/Ag (desde 1.20 hasta 2.80), esto bajo condiciones de temperatura de síntesis de 58°C. Al aumentar la temperatura hasta 92°C, la tendencia de la superficie de respuesta se modifica (Figura 2b), lo que nos indica una influencia de la temperatura en el tamaño de las nanopartículas de plata. Es posible observar que nanopartículas de tamaño relativamente pequeño (7.2) podrían ser obtenidas en rangos de Gel/Ag: 1.08-1.5 y Glu/Ag: 1.6-2.0. De acuerdo con Sun y Luo [7], al aumentar la relación pasivante/plata se puede conseguir una disminución del tamaño de partícula. Sin embargo en esta investigación, este suceso solo se observa si se utilizan temperaturas de síntesis de 92°C, ya que a bajas temperaturas (58°C), el aumento en la relación Gel/Ag favorece la formación de partículas de mayor tamaño.

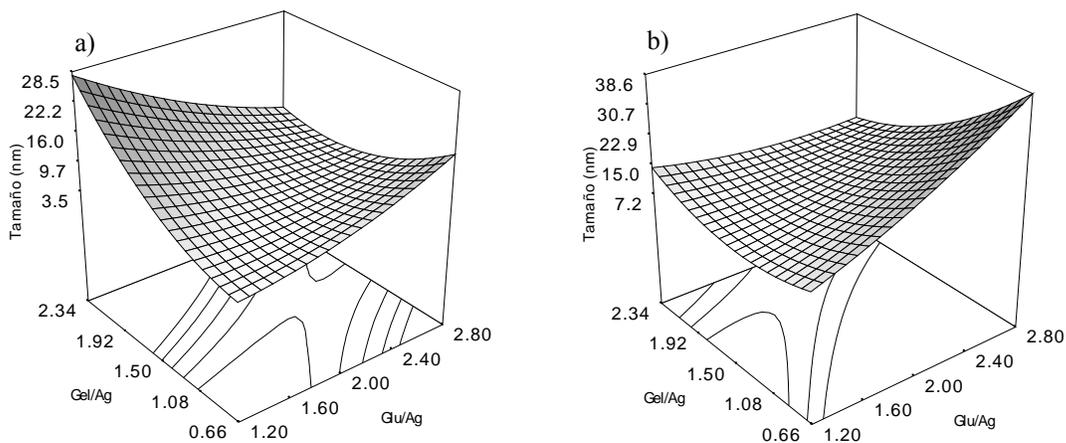


Figura 2. Superficies de respuesta para la caracterización por MET: a) 58°C, b) 92°C.

3.2. Espectroscopia de infrarrojo (FTIR)

La Figura 3 muestra los espectros FTIR de los precursores (gelatina y AgNO_3) y de las nanopartículas de plata sintetizadas. El espectro de la gelatina reveló bandas de absorción características a 3417cm^{-1} , correspondiente a la Amida A y grupos OH (vibraciones de tensión del enlace N-H y tensión y flexión

Memorias del XXXI Encuentro Nacional de la AMIDIQ

4 al 7 de Mayo de 2010, Huatulco Oaxaca

del enlace O-H, respectivamente), 1648cm^{-1} perteneciente a la amida I (vibraciones de tensión del enlace C=O), 1535cm^{-1} correspondiente a la amida II (vibraciones de flexión del enlace N-H y de tensión del enlace C-N) y finalmente a 1240cm^{-1} , la cual es característica de la amida III (vibraciones de flexión del enlace N-H) [8]. El espectro del AgNO_3 mostró una banda de absorción muy intensa a 1376cm^{-1} , la cual es propia del par ión Ag^+NO_3^- . Por otro lado, en el espectro de las nanopartículas de plata, las bandas de absorción correspondientes a los grupos amida de la gelatina, se desplazaron a menores valores de número de onda. Estos cambios en las posiciones de las bandas pueden ser debido a la interacción con las nanopartículas. En el espectro del AgNO_3 , la banda antes localizada a 1376cm^{-1} , aparece ahora a un mayor valor de número de onda y con una disminución en su intensidad. Este pico, ubicado a 1385cm^{-1} , es característico del ión NO_3^- en forma libre, y el desplazamiento es provocado por un cambio en el entorno electrónico del anión, producto de la separación de su contraparte Ag^+ [9]. Con estos resultados se puede deducir que las nanopartículas de plata se encuentran interaccionando con los distintos grupos amida e hidroxilo libres de la proteína. Se puede asumir que estas interacciones son las responsables, en gran medida, de la estabilidad presentada por las soluciones coloidales.

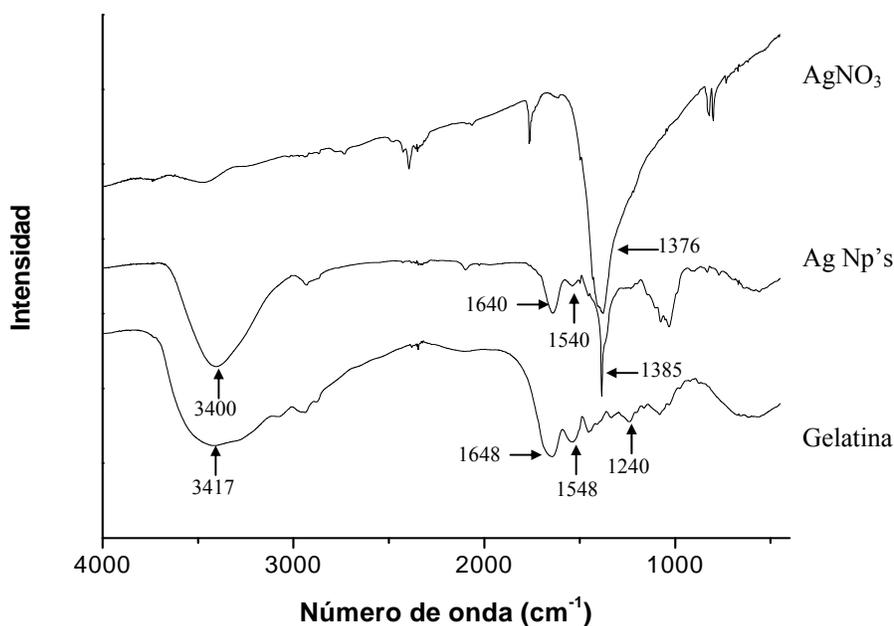


Figura 3. Espectros FTIR de los precursores empleados (AgNO_3 y gelatina) y de las nanopartículas de plata (Ag Np's)

3.3. Evaluación de la actividad antifúngica de nanopartículas de plata

La figura 4 muestra el efecto de la incorporación y concentración de nanopartículas de plata en el crecimiento de *Colletotrichum gloesporioides*. Es evidente que la adición de nanopartículas de plata al medio de cultivo, provocó una disminución importante en la velocidad de crecimiento del hongo, la cual estuvo en función de la concentración de nanopartículas de plata. De acuerdo con el ANOVA, diferencias entre tratamientos con y sin nanopartículas fueron estadísticamente significativas ($P < 0.001$). Empleando una concentración de $52\text{ }\mu\text{g}$ de plata/mL de medio de cultivo, fue posible inhibir el crecimiento del fitopatógeno en casi 90%. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en la reducción del crecimiento por efecto del tamaño de partícula. Petica y col. [10]

Memorias del XXXI Encuentro Nacional de la AMIDIQ

4 al 7 de Mayo de 2010, Huatulco Oaxaca

reportaron también efectos fungistáticos de nanopartículas de plata, sobre varias especies de hongos (*Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma*).



Figura 4. Efecto de la adición de nanopartículas de plata en el crecimiento de *Colletotrichum gloesporioides*: a) C₁, b) C₂, c) C₃ y d) C₄

4. Conclusiones

En este trabajo se sintetizaron nanopartículas de plata mediante el método de reducción química. Las variables de síntesis influyeron de una manera importante en el tamaño de partícula. Las nanopartículas de plata interaccionaron con los grupos amida e hidroxilo libres de la gelatina, impartiendo estabilidad a las soluciones coloidales. La velocidad de crecimiento de *Colletotrichum gloesporioides* disminuyó a medida que la concentración de nanopartículas de plata aumentó en el medio de cultivo. Sin embargo no se observó una completa inhibición del hongo bajo las condiciones utilizadas en los tratamientos. No hubo una influencia en la actividad antifúngica por efecto de la variación del tamaño de partícula.

Referencias

1. Rai, M., Yadav, A. y Gade, A. (2008). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* 7, 76-83.
2. Pal, S., Tak, Y.K. y Song, J.M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 1712-1720.
3. Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Tapia-Ramirez, J. y Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16, 2346-2353.
4. Agrios, G. N. (2005). *Fitopatología* (2ª Edición). Editorial Limusa, México, D. F.
5. Gamagae, S.U., Sivakumar, D., Wilson Wijeratnam, R. S. y Wijesundera, R.L.C. (2003). Use of sodium bicarbonate and *Candida oleophila* to control anthracnose in papaya during storage. *Crop Protection* 22, 775-779
6. Muñoz, Z., Moret, A. y Garcés, S. (2009). Assessment of chitosan for inhibition of *Colletotrichum* sp. on tomatoes and grapes. *Crop Protection* 28, 36-40.
7. Sun, X. y Luo, Y. (2005). Preparation and size control of silver nanoparticles by a thermal method. *Materials Letters* 59, 3847-3850.
8. Hayashi, T. y Mukamel, S. (2008). Two-dimensional vibrational lineshapes of amide III, II, I and A bands in a helical peptide. *Journal of Molecular Liquids* 141, 149-154.
9. Cho, J.W. y So, J.H. (2006). Polyurethane-silver fibers prepared by infiltration and reduction of silver nitrate. *Materials Letters* 60, 2653-2656.
10. Petica, A., Graviliu, S., Lungu, M., Buruntea, N. y Panzaru, C. (2008). Colloidal silver solutions with antimicrobial properties. *Materials Science and Engineering B* 152, 22-27.