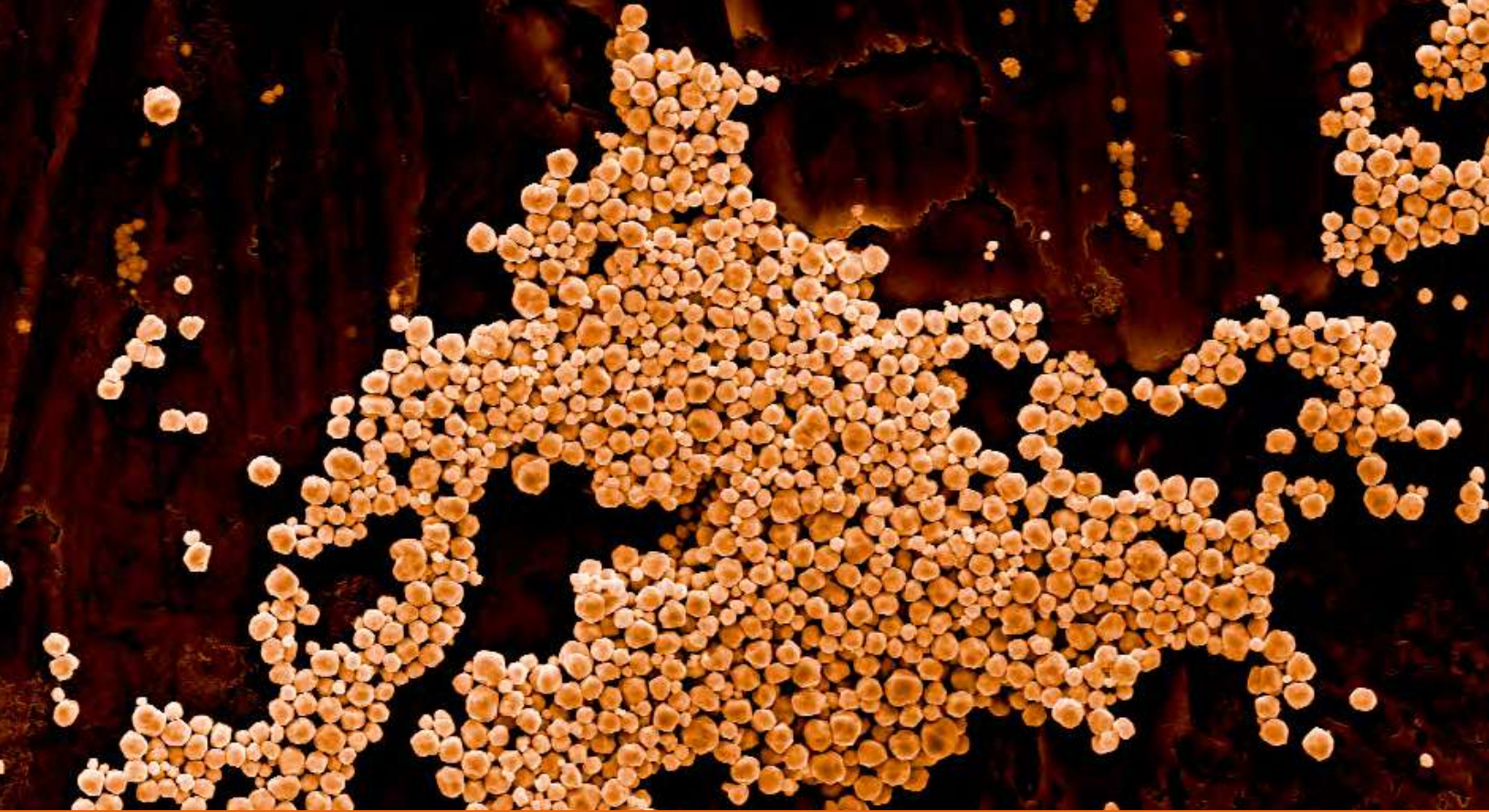


A scanning electron micrograph (SEM) showing a large number of small, spherical copper nanoparticles. The particles are densely packed in some areas, forming a large, irregular cluster, and more sparsely distributed in others. The background is dark, highlighting the bright, metallic appearance of the nanoparticles.

EXPERIMENTO N°4

VALIDACIÓN DE LAS CAPACIDADES ANTIMICROBIANAS DE UN COLOIDE DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE EN DISTINTOS MÉTODOS DE APLICACIÓN A MATERIALES.



I. BREVE DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

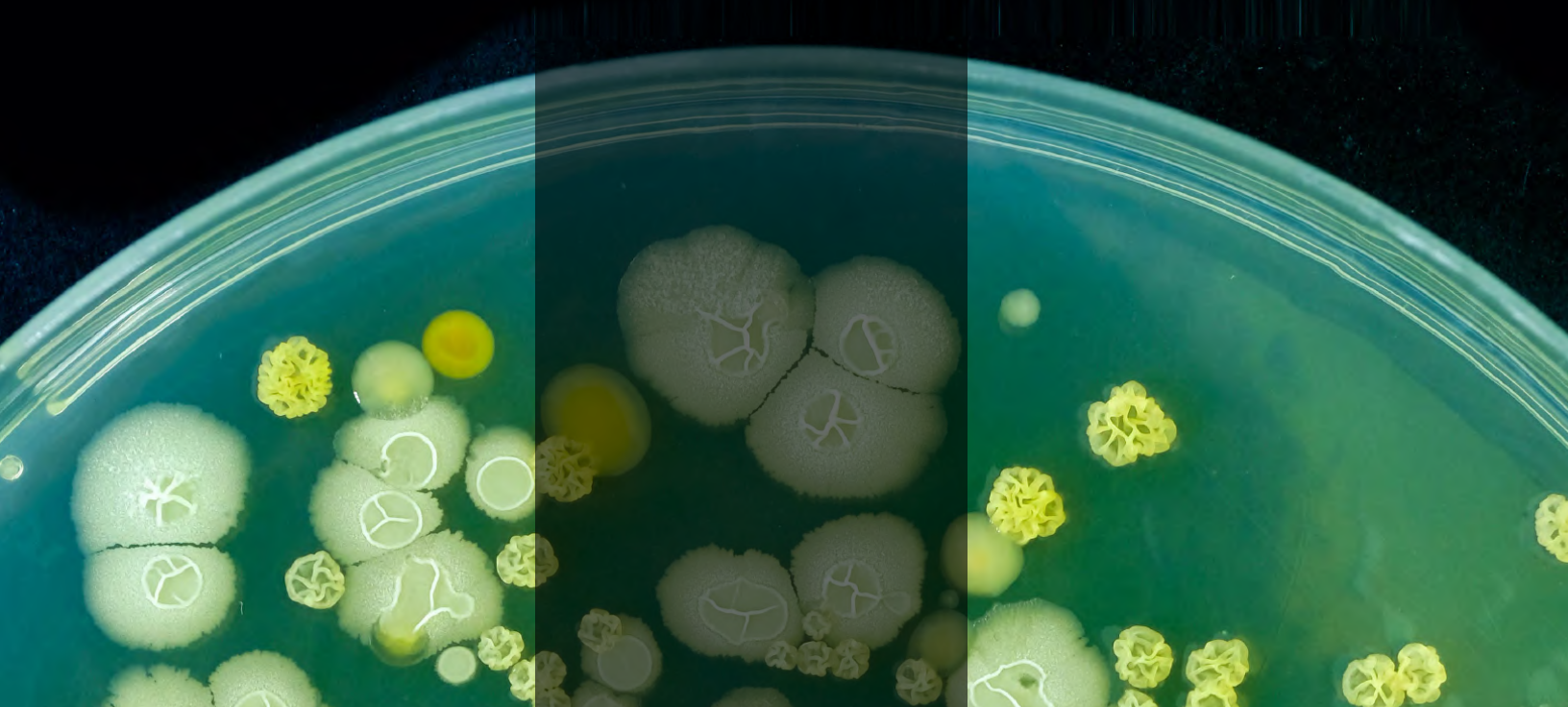
- Habiendo determinado las capacidades antimicrobianas intrínsecas de las nanopartículas y sus excipientes, se procedió a investigar el potencial en aplicaciones comerciales. Se buscó determinar las capacidades antimicrobianas del coloide de nanopartículas de cobre con un tamaño aproximado de 3nm producido en Aintech y validar la efectividad de un método de aplicación en telas por spray utilizando una máquina de lavado con vapor. Para este experimento se utilizaron las mismas 2 cepas de bacterias, *E. coli* (Gram -) y *S. aureus* (Gram +), para evaluar la efectividad de las nanopartículas en las 2 configuraciones de membrana citoplasmática que distinguen a grandes rasgos a las distintas especies bacterianas. Se probó distintas condiciones para el análisis de capacidad antimicrobiana: Sensidiscos, telas funcionalizadas y cultivo líquido sometido a contacto con telas funcionalizadas.



METODOLOGÍA

PREPARACIÓN DE BACTERIAS.

- Se tomó una suspensión de cepa criopreservada y se cultivó en 10mL de caldo LB durante 20 a 24 hrs.
- Se realizó un segundo pasaje de cultivo en caldo Luria-Bertani (LB) de 20 a 24 hrs.
- Es caso no de especificarse en la descripción de método por norma general, todas las bacterias se incubaron durante 16 a 24 horas a 37°C a humedad ambiental.



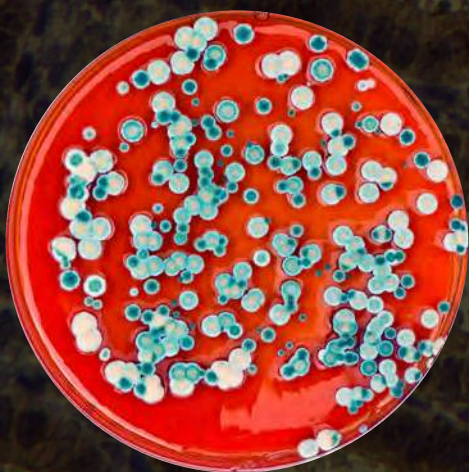
PREPARACIONES DE MUESTRAS ANTIMICROBIANAS

- Se utilizó suspensión coloide de nanopartículas de cobre, en factores de dilución 1:40, 1:20 y 1:10, y se aplicó en las muestras de superficie con una maquina vaporizadora industrial destinada al lavado de vehiculos.

- Se realizó una aplicación de vapor por un periodo de 5 minutos, las muestras fueron secadas 72 horas a ambiente antes de hacer análisis de su actividad antimicrobiana.

- Los materiales de las muestras tratadas fueron superficies de caucho y alfombra, ambos representativos de las superficies encontradas en medios de transporte público.

- Las muestras NO fueron esterilizadas antes de ser analizadas, con el objeto de analizar la influencia del tratamiento en la presencia de carga biótica en su superficie.



ANALISIS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANAS

- Las muestras de coloide de nanopartículas de cobre fueron utilizadas en distintos métodos:

MÉTODO DE SENSIDISCOS.

- Utilizando papel whatman N°1 autoclavado se preparó sensidiscos cargando 10ul de diluciones 1:5, 1:10 y 1:20.

- 500uL de cultivos frescos de E. coli y S. aureus fueron sembrados directamente en placas de agar LB sin aditivos. Estos se dejaron reposar durante 60 min. a temperatura ambiente.

- Los discos fueron colocados sobre el césped

MÉTODO DE TRAZADO DE LÍNEA.

- Se utilizó el método AATCC 147 con cepas de *E. coli* y *S. aureus*.
- Un cultivo de bacterias fresco de cada cepa fue inoculado, como se menciona anteriormente, en caldo LB.
- Los cultivos se incubaron durante 24 horas a 37°C. Tras esto, utilizando un asa metálica se tomó una fracción y se esparció en 5 líneas consecutivas paralelas separadas por una distancia de 10 mm, sin volver a inocular el asa.
- Luego de reposar por 15 minutos a temperatura ambiente, en cada placa se colocó un rectángulo de muestra de material tratado o no tratado, de forma que atravesase las 5 líneas.
- Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C y luego observadas para determinar la presencia de zonas de inhibición.

MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIMICROBIANA POR CONTACTO CON CULTIVO LÍQUIDO.

- Se tomó 20ul de cultivo líquido saturado de *E. coli* y *S. aureus*, y se inoculó 50mL de medio líquido caldo LB.
- Se tomó una muestra de 250ul de cada cultivo y se plaqueó en medio agar LB.
- 25ml de cada cultivo se separó como control experimental de cada cepa bacteriana.
- Los 25ml restantes fueron sometidos a 0,1gr de tela, tratada previamente como se describió con una solución 1:10 de sobrenadante.
- Todas las muestras se incubaron durante 18 horas a 37°C.
- Posteriormente los cultivos líquidos se plaquearon en diluciones 1:1.000 y 1:1.000.000 para determinar CFU/mL, utilizando 250ul como volumen de plaqueo.
- El conteo de colonias se realizó con el programa "OpenCFU".

III. RESULTADOS

SENSIDISCOS

Ambas cepas bacterianas mostraron fronteras de inhibición.

- *S. aureus* mostró una sensibilidad mayor por la formulación de nanopartículas que varió de forma no proporcional a lo largo de todas las diluciones, mostrando mayor inhibición en la concentración 1:10

- *E. coli* mostró menor sensibilidad por la formulación de nanopartículas, que varió de forma proporcional al incremento de concentración de nanopartículas en el sensidisco (Figura 1) (Tabla 1).

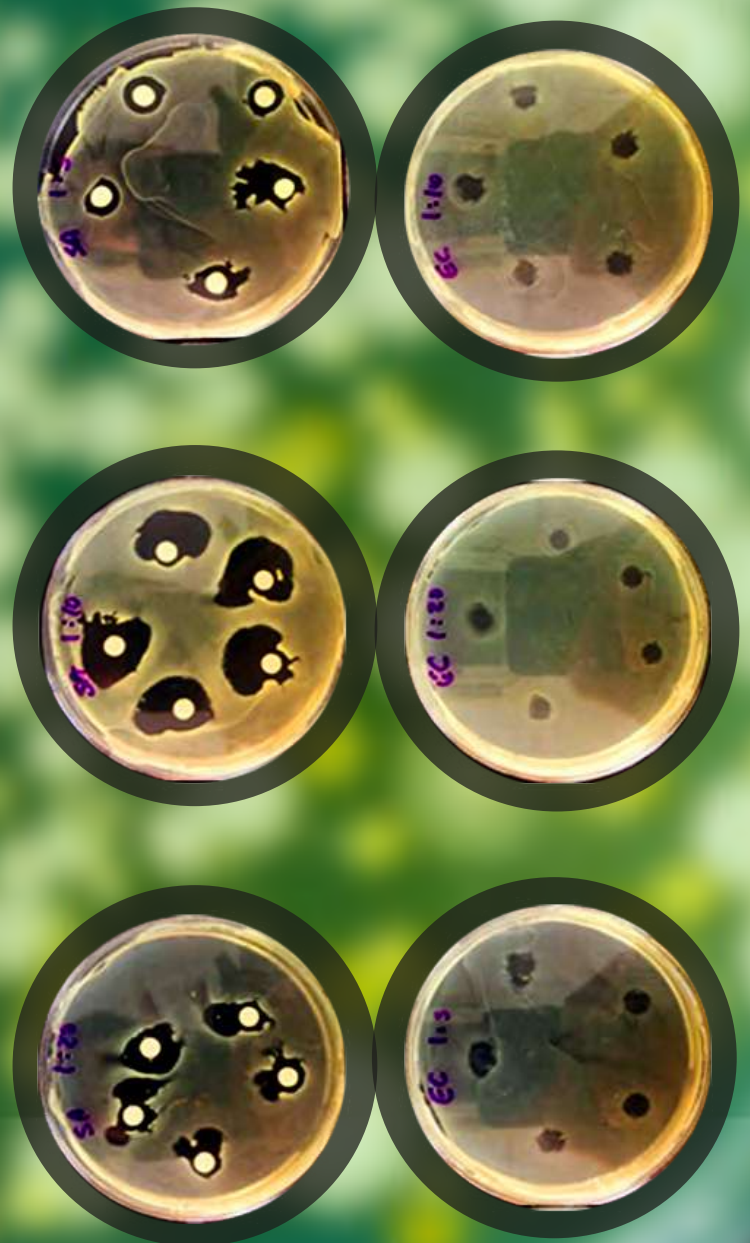


Figura 1. Sensidiscos con diluciones de izq. a der: 1:20; 1:10, 1:5. En césped bacteriano de *S. aureus*. (fila superior) y *E. coli* (fila inferior).

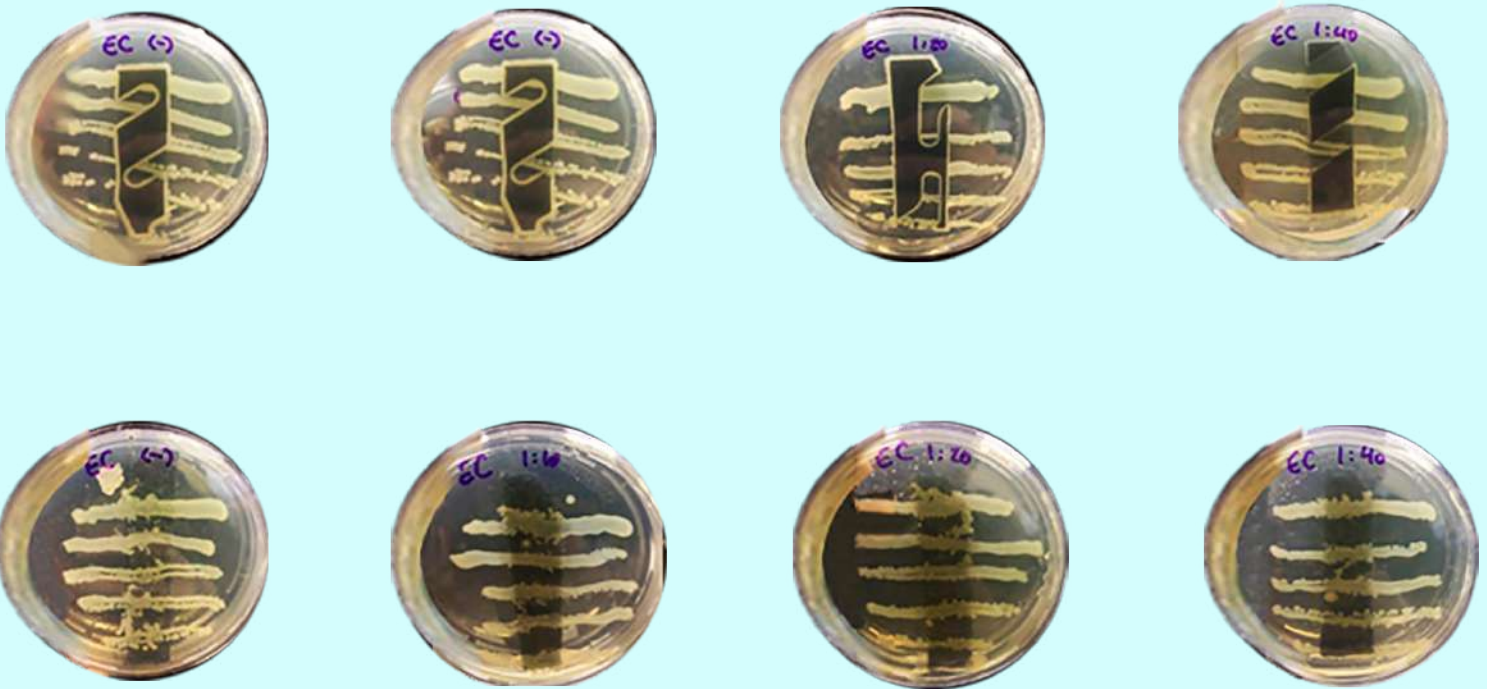
S.aureus

n°	1:20	1:10	1:05
1	1.427	2.970	1,067
2	1.386	3.720	0.861
3	1.593	3.144	1.998
4	2.038	3.369	1.317
5	1.999	3.515	0,920
prom	1.689	3.344	1.233

E.coli

n°	1:20	1:10	1:05
1	0.316	0.459	0.826
2	0.313	0.528	0.473
3	0.346	0.516	0.490
4	0.433	0.433	0.558
5	0.387	0.498	0.814
prom	0.359	0.487	0.632

Tabla 1. Area en centímetros cuadrados de los halos de inhibición de sensidiscos, calculado por "circle fitting".



- *S. aureus* mostró una marcada inhibición de crecimiento en el material de caucho tratado con nanopartículas (Figura 3, Fila superior), y una inhibición modesta en material de alfombra tratado con nanopartículas (Figura 3, Fila inferior).



Figura 3. Método trazado de línea con diluciones de izq. a der: (-); 1:20; 1:10, 1:5. En césped bacteriano de *S. aureus*. Materiales tratados: Caucho (fila superior) y alfombra

CONTACTO CON CULTIVO LÍQUIDO

- *S. aureus* demostró cualitativamente una evidente reducción en el crecimiento de bacterias al ser expuesto a la muestra de tela tratada. (Figura 4, Izq.)

- *E. coli* no mostró la misma capacidad de inhibición de crecimiento cualitativos (Figura 4, Der.)

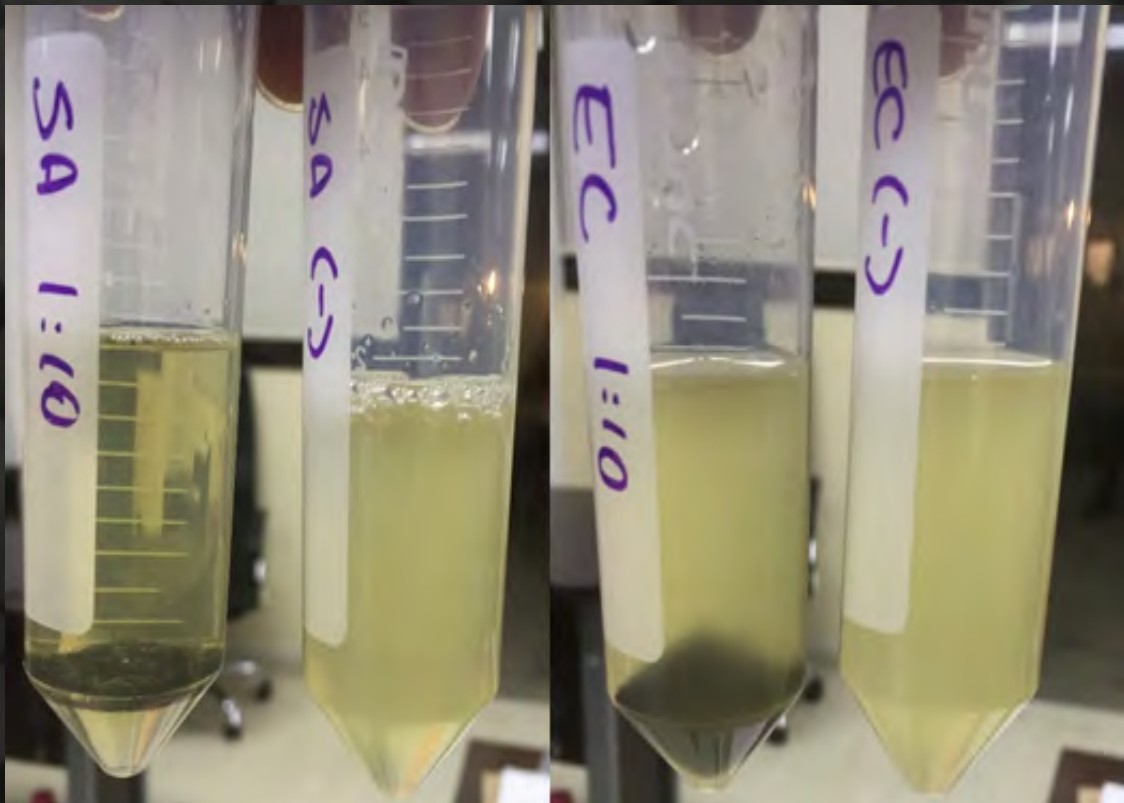


Figura 4. Cultivos líquidos de *S. aureus* (izq.) y *E. coli* (der.) expuestos a tela de alfombra tratada con formulación de nanopartículas dilución 1:10, versus su control sin tratar marcado (-).

-En el caso del sembrado y conteo de colonias, ambas cepas mostraron una disminución en la cantidad de unidades formadoras de colonias (CFU) presentes, *S. aureus* disminuyó su carga bacteriana en un 99,6% con respecto al control, en el caso de *E. coli* la disminución fue de un 91,0%. (Figura 5) (Tabla 2).

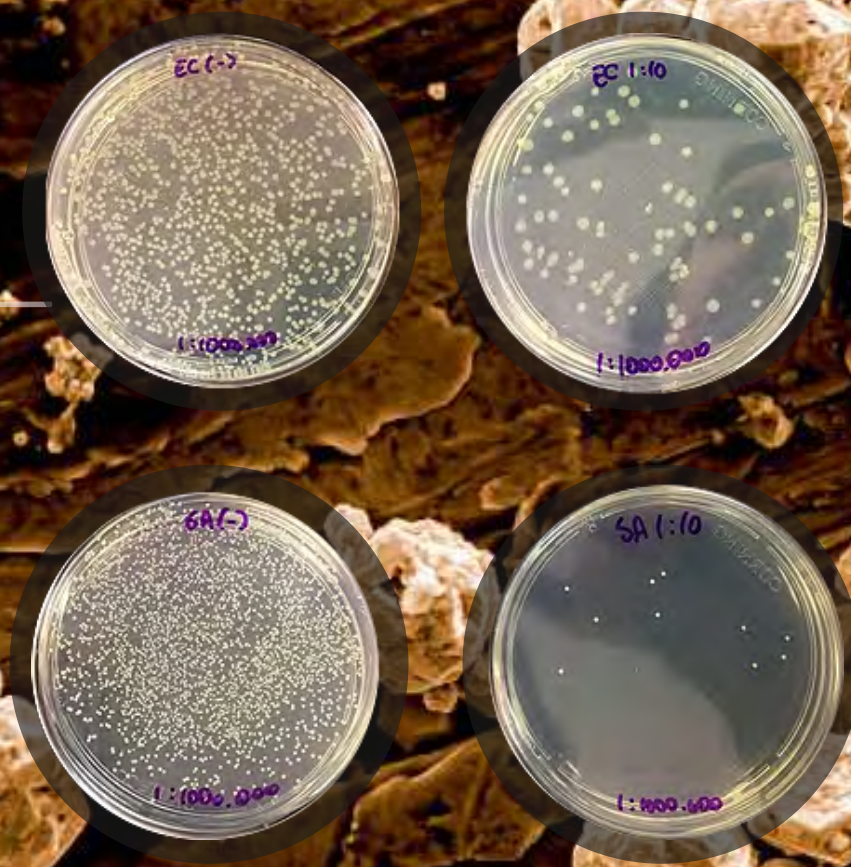


Figura 5. Sembrado dilución 1:1.000.000 de cultivos líquidos de *S. aureus* y *E. coli*. expuestos a tela de alfombra tratada con formulación de nanopartículas dilución 1:10 (fila inferior), versus su control sin tratar marcado (-) (fila superior).

	1:10	(-) Sin tratar	(-) Sin tratar
S.aureus	40.000.000	9.476.000.000	99,6%
E.coli	320.000.000	3.548.000.000	91,0%

Tabla 2. Concentración de bacterias, en CFUs/mL, calculados a partir de las colonias contadas en el sembrado de los cultivos líquidos.



IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

- Al igual que en experimentos anteriores, se observó actividad bacteriostática en la formulación coloide de nanopartículas de cobre en discos de celulosa, siendo más efectiva en *S. aureus* en comparación con *E. coli*. Esta actividad bacteriostática intrínseca del coloide, pudo ser debidamente transmitida y medida en las muestras de superficies tratadas con la formulación de nanopartículas. Las telas tratadas mantuvieron sus capacidades antimicrobianas tras 3 días (72 horas) de reposo en condiciones ambientales, sin precauciones adicionales, ni esterilización. Existe la posibilidad de que el período de efectividad sea más prolongado que lo probado en este estudio.

- Los resultados experimentales sugieren una mayor efectividad del tratamiento antimicrobiano, cuando el contacto entre la tela y el germen ocurre en un ambiente húmedo. Esto se condice con la evidencia bibliográfica, que sugiere el actuar de las nanopartículas mediado por la liberación de iones. Este hallazgo no parece ser contraproducente con el objetivo del tratamiento, puesto que la mayoría de los vectores de contagio, son secreciones húmedas (Ej.: mucosa, aerosol de estornudos, vomito).

- Existe un efecto de halo que impide el avance de la bacteria en regiones de tela tratadas, como se evidencia en el experimento de trazado de líneas. Este efecto puede ayudar a disminuir la contaminación de superficies en contacto directo con la piel.