

Elaboración y caracterización de nanopartículas de quitosano como acarreador de péptidos bioactivos

Preparation and characterization of chitosan nanoparticles as a carrier of bioactive peptides

Ricardo Antonio García-García¹, Tomás Jesús Madera-Santana², Claudia Grijalva-Verdugo¹ y Jesús Rubén Rodríguez-Núñez^{1*}

¹Programa de Ingeniería en Biotecnología, Universidad de Guanajuato. Mutualismo #303, Colonia la Suiza, Celaya, C.P. 38060, Guanajuato, México.

²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. CTAOV, Carretera Gustavo Enrique Astiazaran Rosas, No. 46. C.P. 83304, Hermosillo, Sonora, México.

jesus.rodriguez@ugto.mx¹

Resumen

El biopolímero quitosano actualmente es utilizado ampliamente por su versatilidad para obtener materiales como geles, biopelículas, micropartículas, nanopartículas y en todas estas matrices se pueden cargar compuestos bioactivos para generar una liberación controlada. El objetivo del presente trabajo fue elaborar y caracterizar nanopartículas de quitosano cargadas con nisina. Las nanopartículas se realizaron con el método de gelificación ionotrópica y la caracterización parcial se realizó mediante microscopía electrónica de barrido acoplada a espectroscopia de dispersión de energía (SEM-EDS). Se obtuvieron nanopartículas de quitosano-nisina de alta pureza con tamaños de 100 a 150 μm y con una liberación de nisina de 0.21 mg/ml. Los resultados son de importancia ya que la nisina es un péptido antimicrobiano de interés en la industria de alimentos, en este sentido, sería recomendable probar esta tecnología en alimentos como queso/lácteos para evaluar su efecto como agente antimicrobiano.

Palabras clave: Nanopartículas, micropartículas, quitosano, nisina

Abstract

Chitosan biopolymer is currently widely used for its versatility to obtain materials such as gels, biofilms, microparticles, nanoparticles and in all these matrices bioactive compounds can be loaded to generate a controlled release. The objective of the present work was to develop and characterize chitosan nanoparticles loaded with nisin. The nanoparticles were made with the ionotropic gelation method and the partial characterization was performed by scanning electron microscopy coupled with energy dispersive spectroscopy (SEM-EDS). High purity chitosan-nisin nanoparticles were obtained with sizes from 100 to 150 μm and with a nisin release of 0.21 mg/ml. The results are important since nisin is an antimicrobial peptide of interest in the food industry, in this sense, it would be advisable to test this technology in foods such as cheese/dairy products to evaluate its effect as an antimicrobial agent.

Keywords: Nanoparticles, microparticles, chitosan, nisin

Introducción

El quitosano es un polisacárido obtenido de la quitina presente en las cáscaras de camarón, producto del desecho de la industria camaronera y que por sus propiedades físicas y químicas confiere una gran capacidad de biocompatibilidad y biodegradabilidad lo que permite su aplicación en diferentes industrias tales como: farmacéutica, alimentaria, cosmética y agrícola (Torres-Badajoz et al. 2022).

Debido a la versatilidad estructural del quitosano, es posible obtener nanopartículas como resultado de procesos de autoasociación o entrecruzamiento donde, las cadenas poliméricas se ordenan en estructuras nanométricas por interacciones intramoleculares, existen distintas maneras de obtener nanopartículas, entre una de ellas es la gelificación ionotrópica (Goycoolea, 2009).

La matriz de la nanopartícula tiene la capacidad de atrapar compuestos activos, un ejemplo de dichos compuestos son los de origen peptídico como la nisina. La nisina es un antibiótico policíclico, se utiliza habitualmente como bioconservante en la elaboración de quesos y puede inhibir microorganismos de gran importancia alimentaria como: *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* y *Bacillus cereus* (Sánchez-Martín et al., 2019). En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue elaborar y caracterizar nanopartículas de quitosano cargadas con nisina.

Metodología

Elaboración de nanopartículas de quitosano

Las nanopartículas de quitosano fueron obtenidas mediante el método de gelificación ionotrópica. En un vaso de precipitado de 500 ml se agregaron 15 ml de ácido acético al 5%, 135 ml de agua, 0.3 g de quitosano en polvo y 500 mg de nisina, se mantuvo en agitación constante durante 30 minutos a 100 rpm. Paso seguido, se preparó una solución de tripolifosfato de sodio (TPP) (100 ml de agua y 0.140 g de TPP). Para la formación de las nanopartículas se añadió la solución de TPP a la solución de quitosano a una velocidad de 1 gota por segundo manteniendo la agitación constante. Finalmente, se procedió a centrifugar en tubos Falcon de 15 ml a 6000 rpm durante 30 minutos y se decantaron las muestras para eliminar el agua (Goycoolea, 2009).

Caracterización morfológica y de composición SEM-EDS

Las pruebas morfológicas y de composición de las nanopartículas de quitosano se realizaron mediante microscopia electrónica de barrido acoplado a espectroscopia de rayos X de dispersión de energía (SEM-EDS) (Marca PHILIPS ESEM XL30). Específicamente, la SEM se realizó con aumentos de 200x y 5000x, para ello se aplicó previamente Au-Pd obtenida por el método de pulverización catódica. Para la composición elemental se usó el detector EDS (Montoya-Anaya, 2023).

Nanopartículas como acarreador de péptidos activos

Para la estimación de la concentración de proteína (nisina) presente en las nanopartículas se empleó la metodología de Bradford. Específicamente, se realizó una curva de calibración (figura 1) utilizando seroalbúmina de bovino como patrón (0.5 mg/ml BSA), en la figura 1 se muestra la curva de calibración obtenida. Posteriormente, se leyó la muestra tomando 100 µl de la solución de nanopartículas de quitosano con nisina y se le agregó 1 ml del reactivo de Bradford, se dejó reposar durante 10 minutos y se leyó en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan Go Microplate, USA) a 595 nm.

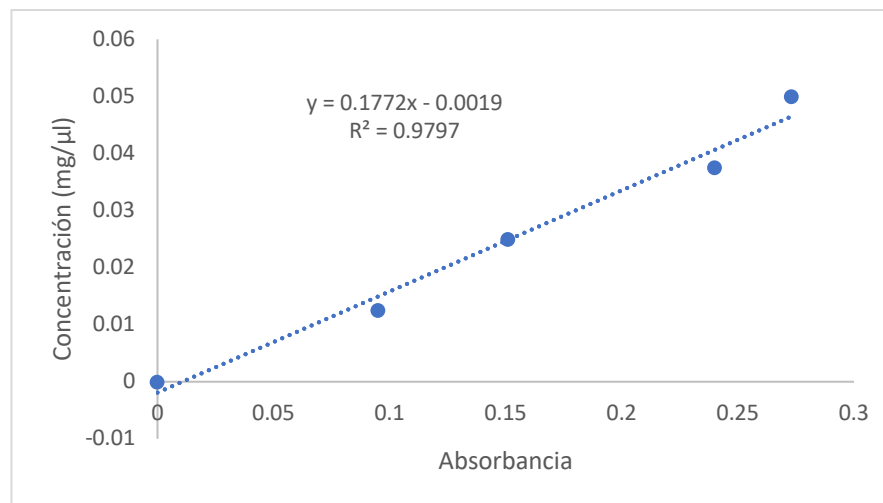


Figura 1. Curva de calibración para la determinación de proteínas por el método Bradford

Fuente: autoría propia

Resultados y discusión

Obtención de nanopartículas de quitosano por gelificación ionotrópica

En la figura 2 se observa las nanopartículas de quitosano en solución y en polvo obtenidas. El alto contenido de espuma indica que tiene un alto contenido de nanopartículas disueltas en la solución, en la última imagen se observa la solución centrifugada y decantada, quedando un gel en el fondo del tubo Falcon, dando por hecho que se realizó de manera eficaz la gelificación ionotrópica, se hizo una comparación de acuerdo con la metodología y resultados de Goycoolea, (2009) y se obtuvieron resultados similares en el polvo obtenido, lo que demuestra que el método de gelificación ionotrópica es eficaz para obtener nanopartículas de quitosano.



Figura 2. Proceso de gelificación ionotrópica para la obtención de nanopartículas de quitosano
Fuente: autoría propia

Microscopia electrónica de barrido (SEM) de nanopartículas de quitosano

En la figura 3 se muestra la morfología de las nanopartículas de quitosano en polvo obtenidas. Es posible observar que las nanopartículas no son homogéneas en forma y además presentan estructuras porosas y rugosas, además fue posible calcular su tamaño promedio el cual oscila entre 100 μm a 150 μm .

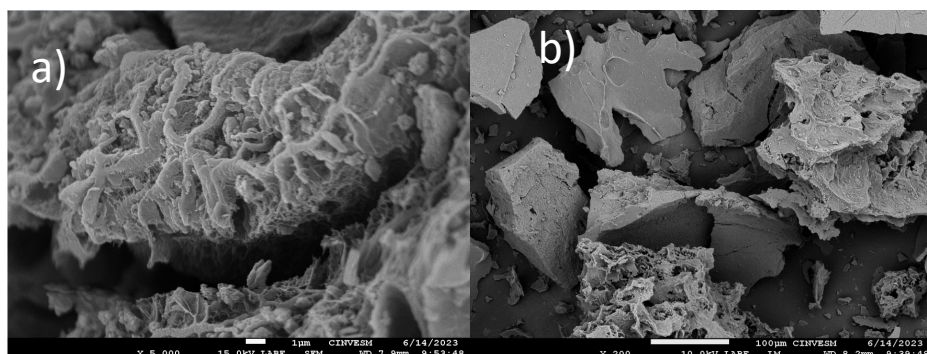


Figura 3. Microscopia electrónica de barrido (SEM) de las nanopartículas de quitosano a) x5000 y b) x200
Fuente: autoría propia

Los resultados de composición elemental por EDS de las nanopartículas se muestran en la figura 4 y tabla 1. Se puede observar que los elementos son carbono, oxígeno y nitrógeno provenientes de su carácter orgánico y el alto contenido de fósforo se debe a la adición de TPP para la gelificación ionotrópica. No se muestran elementos adicionales que no deberían estar presentes, por lo cual podemos comprobar que la composición no presenta impurezas por metales pesados o cualquier otro tipo de minerales o compuestos orgánicos.

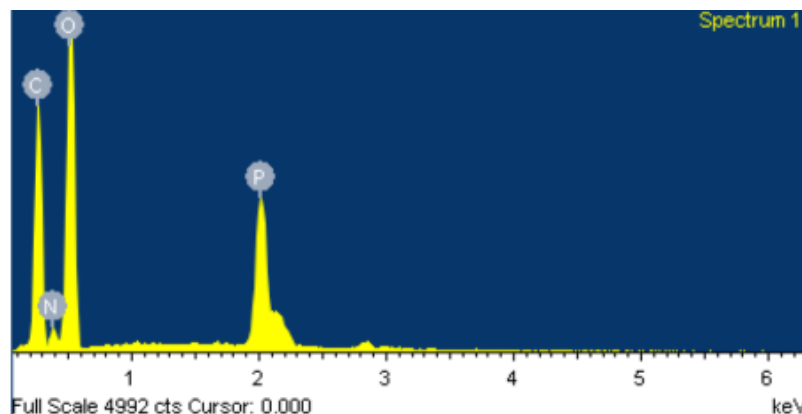


Figura 4. Espectro EDS con minerales identificados en nanopartículas de quitosano.
Fuente: autoría propia

Tabla 1. Composición elemental de nanopartículas de quitosano

Elemento	% peso	% atómico
C _K	35.67	43.28
N _K	8.66	9.01
O _K	48.84	44.49
P _K	6.83	3.21

Liberación de nisina cargada en las nanopartículas de quitosano

Para la cuantificación de la nisina liberada se utilizó el método Bradford y se determinó que es efectiva la carga y liberación del péptido a concentraciones de 0.21 mg/ml. Lo que demuestra que las nanopartículas son buenos acarreadores de péptidos activos, resultados que concuerdan con investigaciones recientes que reportan la capacidad de las nanopartículas de quitosano con proteína de soya para liberar compuestos activos como la diosmina (Li et al., 2024).

Conclusión

Los resultados obtenidos demuestran que es posible obtener nanopartículas de quitosano mediante la gelificación ionotrópica lo cual resulta en un método rápido y barato para generar nanopartículas. Además, la estructura física y química de estos materiales permite que funcionen como acarreador de compuestos bioactivos de péptidos (nisina), así como su liberación en medio acuoso. El avance en estas tecnologías nos permite proponer para estudios futuros su aplicación en la industria alimentaria de lácteos como un conservador de liberación prolongada.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad de Guanajuato por su apoyo, con el proyecto Institucional de Investigación Científica 2024 (CIIC 2024).

Referencias

- Caro-León, F. J., López-Martínez, L. M., Lizardi-Mendoza, J., Argüelles-Monal, W., Goycoolea-Valencia, F. M., Carvajal-Millán, E., y López-Franco, Y. L. (2019). Métodos de preparación de nanopartículas de quitosano: una revisión. *Biotecnia*, 21(3), 13-25.
- Goycoolea, F. (2009). Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.
- Hernández Cicoletzi, H., Águila Almanza, E., Flores Agustín, O., Viveros Nava, E. L., y Ramos Cassellis, E. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y vacío*, 22(3), 57-60.
- Li, S., Guan, T., Lv, H., Cai, Y., Cao, W., Zhang, Z., Song, H., Cao, H y Guan X. (2024). Fabrication of diosmin loaded food-grade bilayer nanoparticles with modified chitosan and soy peptides and antioxidant properties examination. *Food Chemistry: X*, 21, 101237.
- Montoya-Anaya, D.G., Rodríguez-Núñez, J.R., Aguirre-Mancilla, C.L., Grijalva-Verdugo, C., Quintana-Owen, P. y Madera-Santana, T.M. (2023). Films made of potato starch from industrial potato stragglers and polyethylene: physicochemical, thermal, and mechanical properties. *Iranian Polymer Journal*, 32, 1321-1333.
- Sánchez-Martín, M. A., Salgado-Calvo, M. T., San-Miguel-Hernández, Á., Pachón-Julián, J., Rodríguez-Barbero, E., Pastor-Martín, M. R., y Cabrero-Lobato, P. (2019). Nisina (N 234), aditivo utilizado como conservante en alimentos. *Gaceta Médica de Bilbao*, 116(4), 166-173.
- Serna, D. C., Marín, A. G., Gallego, V. O., y Osorio, L. A. R. (2015). Nisina como conservante de alimentos: revisión sistemática de la literatura. *Hechos microbiológicos*, 6(1-2), 52-64.

- Torres-Badajoz, S.G., Rodríguez-Núñez, J.R., Lopez-Ramirez, E., Pena-Caballero,V., Villa-Lerma, A.G., Madera-Santana, T.J., Rodríguez-Carrillo, M.G. y Castillo, O.S. (2022). Kinetic and equilibrium studies of Cr (VI) adsorption using glutaraldehyde-crosslinked chitosan beads. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 46, 147-160.
- Valencia, G. A. (2015). Efecto antimicrobiano del quitosano: una revisión de la literatura. *Scientia Agroalimentaria*, 2.
- Velásquez, C. L. (2015). Quitosano y nanopartículas. *En Nanopartículas: fundamentos y aplicaciones. Chitosan and nanoparticles. In Nanoparticles: fundamentals and applications*, 203-223.