



EXPEDIENTE	IMDEEA/2017/47
ACRÓNIMO	ANTIMICROBIAL II
PROGRAMA	Proyectos de I+D de carácter no económico realizados en cooperación con empresas
TÍTULO DEL PROYECTO	ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA EVALUACIÓN DE NUEVOS AGENTES, PRODUCTOS Y MATERIALES CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

ENTREGABLE 4. Ensayos antibacterianos con los materiales funcionalizados.
Informe sobre los resultados de los ensayos antibacterianos con los diferentes materiales funcionalizados.

ÍNDICE

1.	Información del Proyecto	3
2.	Detalles del Entregable.....	4
3.	Ensayos antibacterianos con materiales funcionalizados.....	5
3.1.	Ensayos comprobatorios de la actividad antibacteriana de las nanopartículas metálicas de preparación propia	5
3.2.	Ensayos con metodologías propias y normalizadas.	7
4.	Resultados	11

1. Información del Proyecto

Título del Proyecto: Estrategias biotecnológicas para la evaluación de nuevos agentes, productos y materiales con actividad antimicrobiana. (IMDEEA/2017/47).

Acrónimo: Antimicrobial II

Programa de trabajo: IVACE. Proyectos de I+D de carácter no económico realizados en cooperación con empresas.


Fecha de comienzo: 1 de Enero de 2017

Duración: 12 meses

Lista de Participantes:

Participante	Nombre organización	Nombre abreviado	Lugar
1.	Instituto Español de Calzado y Conexas	INESCOP	Elda

2. Detalles del Entregable.

Entregable N°:	4
Título del entregable:	Ensayos antibacterianos con los materiales funcionalizados. Informe sobre los resultados de los ensayos antibacterianos con los diferentes materiales funcionalizados.
Periodo	02/2017 – 12/2017
Paquete de Trabajo:	PT4. Ensayos antibacterianos con los materiales funcionalizados.
Tareas:	4.1. Ensayos comprobatorios de la actividad antibacteriana de las nanopartículas metálicas de preparación propia. 4.2. Ensayos con metodologías propias y normalizadas.
Autor:	<p>Instituto Tecnológico del Calzado y Conexas</p>  <p>INESCOP INSTITUTO TECNOLÓGICO DEL CALZADO Y CONEXAS</p>
Resumen:	En el presente informe se resumen los resultados obtenidos en los ensayos antibacterianos con las diferentes nanopartículas metálicas de preparación propia al largo del año 2017.

3. PT 4. Ensayos antibacterianos con materiales funcionalizados.

Tareas:

T4.1. Ensayos comprobatorios de la actividad antibacteriana de las nanopartículas metálicas de preparación propia.

T4.2. Ensayos con metodologías propias y normalizadas.

RESUMEN DE LA ACTIVIDAD:

Aunque la actividad antimicrobiana de nanopartículas metálicas es una realidad hecho comprobado en la literatura científica, se ha buscado en esta tarea asegurarse que las nanopartículas metálicas que se han preparado al largo del año, tienen la actividad antimicrobactericida necesaria para que tal actividad pudiera ser valorada de forma objetiva en los ensayos de funcionalización de los materiales. Para esto se ha realizado una serie de ensayos antimicrobactericida comprobatorios: ensayos de difusión en agar; ensayo en medio líquido. Estos ensayos se han presentado bastante apropiados para una determinación cualitativa y/o semicuantitativa de la actividad antimicrobactericida de los agentes preparados.

3.1 - T4.1. Ensayos comprobatorios de la actividad antibacteriana de las nanopartículas metálicas de preparación propia.

Metodología empleada:

Una de las metodologías más rápidas y de fácil realización para la comprobación de ensayos antimicrobianos se refiere a los ensayos de difusión en agar (INESCOP 6853 - Determinación actividad antibacteriana ensayo difusión agar y EN ISO 20645 – Textile fabrics – Determination of the antibacterial activity – Agar diffusion test). También si obtiene valiosa información a partir de ensayos en medio líquido (INESCOP 6852 - Efecto inhibitorio de biocidas en calzado y componentes medio líquido).

Técnica de difusión en agar:

A seguir se describe la metodología en difusión en agar que está indicada para evaluar la actividad antimicrobiana de compuestos siendo la única condición necesaria para la realización del test, que el compuesto pueda difundir sobre la superficie del agar que está inoculado con el microorganismo diana. Es un método cualitativo/semi cuantitativo. Hay una serie de normas internacionales que se utilizan para realizar este ensayo. En nuestro caso hemos utilizado la norma EN ISO 20645 y la interna INESCOP 6853 que de una forma genérica se presentan en la figura abajo, variando algunos parámetros y condiciones de cultivo entre ellas.

En la siguiente figura se detalla el procedimiento del ensayo en difusión en agar.

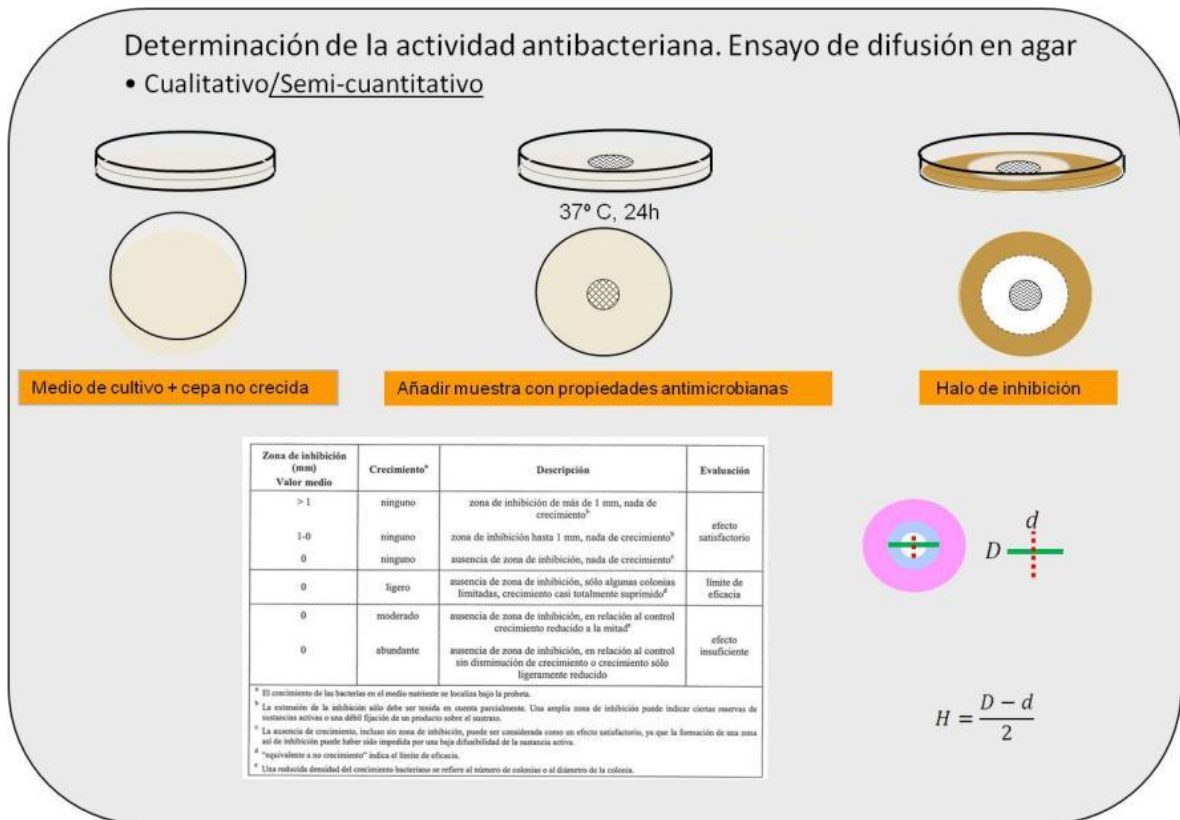


Figura. Ensayo de difusión en agar

Técnica de ensayos en medio líquido:

Esta metodología ha sido una de las primeras en ser utilizada para determinar la eficiencia de un compuesto antimicrobiano. De un modo genérico, se emplea diferentes concentraciones del antibacteriano a ser testado y se determina cual es la concentración mínima inhibitoria que tiene que presentar un compuesto para matar o inhibir el crecimiento del microorganismo diana del ensayo.

El método consiste en diluir un compuesto biocida de una mayor a una menor concentración y, cada una de estas diluciones, se pone en contacto con el microorganismo/s diana y un medio de cultivo líquido o sólido. Como resultado, se observará crecimiento bacteriano únicamente en aquel tubo/placa donde la concentración del compuesto biocida ya no es efectiva contra el microorganismo.

A lo largo de los años, la metodología ha sufrido modificaciones y adaptaciones para abarcar un mayor número de muestras y condiciones. Actualmente, se puede emplear esta técnica, por ejemplo, con materiales sólidos (plásticos, cueros, textiles, metales) que tienen incorporado antimicrobianos y variar la cantidad de antimicrobiano añadida hasta encontrar la cantidad mínima necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano.

Metodología empleada:

Después de determinar cuáles las nanopartículas con mayor actividad antibacteriana se ha procedido la realización de los ensayos antibacterianos con las muestras de los materiales funcionalizados con estas nanopartículas. Para estos ensayos, además de los ensayos mencionados anteriormente se ha realizado ensayos de determinación de la actividad bacteriana empleando metodología normalizada (EN ISO 16187:2013 - Calzado y componentes de calzado. Método de ensayo para evaluar la actividad antibacteriana).

3.2 - T4.2. Ensayos con metodologías propias y normalizadas.

Evaluación antibacteriana de materiales con antimicrobianos incorporados:

Para realización de los ensayos con las diferentes muestras de materiales que han sido funcionalizadas con nanopartículas se ha optado por una norma representativa de la mayoría de las metodologías empleadas en este tipo de ensayo como es la norma ISO 16187:2013: “Calzado y componentes de calzado. Método de ensayo para evaluar la actividad antibacteriana”. Esta norma permite evaluar materiales de diferentes características, como cuero, plástico o tejidos, ya que presenta 3 tipos distintos de métodos de ensayo: materiales absorbentes y no absorbentes y un gran número de materiales de diferentes composiciones, incluyendo plásticos, textiles, cueros.

Además, otro punto determinante para su elección fue que es una norma que tiene, como principal campo de aplicación, materiales de sector calzado y sus componentes, lo que la convierte en un buen ejemplo para definir la evaluación antibacteriana de materiales con antimicrobianos incorporados, en general. Estos tests tienen, como característica principal, su carácter cuantitativo, es decir, la posibilidad de determinar un porcentaje de inhibición del crecimiento o muerte del microorganismo diana testado.

En la tabla abajo se especifica los puntos relevantes de cada metodología.

	Tipo de Material	Método de ensayo	Materiales
A	Absorbente	Estático	Cuero y textiles.
B	No absorbente	Film de Contacto	Materiales sintéticos/artificiales, de espuma EVA, espuma de PU y materiales compactados, es decir, materiales plásticos o recubiertos.
C	Absorbente y no absorbente	Dinámico	Componentes de diferentes materiales; materiales moldeados; materiales con un agente antibacteriano fijado.

Figura. Criterios norma ISO 16187:2013

De forma resumida, en las 3 metodologías, se utilizan siempre seis muestras de ensayo y seis muestras controles. Cada uno de estas 12 probetas son inoculadas con uno de los dos microorganismos diana especificados en la norma, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352^(*).

La suspensión bacteriana utilizada en el ensayo, independientemente de la metodología utilizada, debe tener una concentración inicial de bacterias de $2,5 \times 10^5$ hasta $1,0 \times 10^6$ unidades formadoras de colonias por mililitro (CFU/ml). El volumen de inóculo puesto en contacto con cada uno de los materiales antimicrobianos a testar depende del método de ensayo..

(*) El microorganismo alternativo a *K. pneumoniae* en el resto de normas de evaluación de materiales antibacterianos es *Escherichia coli* ATCC 8739 (también bacteria gram negativa)

Después de la inoculación de las muestras con el microorganismo diana en cuestión, éstas son divididas en 2 bloques de 3 muestras y 3 controles. En un primer bloque, llamado tiempo cero, a las muestras y controles con la suspensión bacteriana se añade una cantidad determinada de solución neutralizante del efecto del compuesto antimicrobiano a fin de frenar la acción bactericida del compuesto sobre las bacterias.

La segunda tanda de 3 muestras del material antimicrobiano y 3 muestras control, son dejadas durante 24 horas (tiempo 24) a 37°C en contacto con el microorganismo diana, para que la acción del antimicrobiano sea lo más efectiva posible y permita que este compuesto inhiba o elimine el crecimiento bacteriano.

Después de 24 horas de contacto entre la suspensión bacteriana y el material antimicrobiano, se repite el procedimiento de neutralización de la suspensión bacteriana exactamente igual que se ha realizado con las muestras a tiempo cero.

Con cada una de las alícuotas obtenidas en el tiempo cero y el tiempo 24 horas, se procede a la determinación del número de bacterias viables (figura 8-D). Para ello, se realizan diluciones seriadas de cada una de las suspensiones bacterianas obtenidas a tiempo cero y tiempo 24 horas.



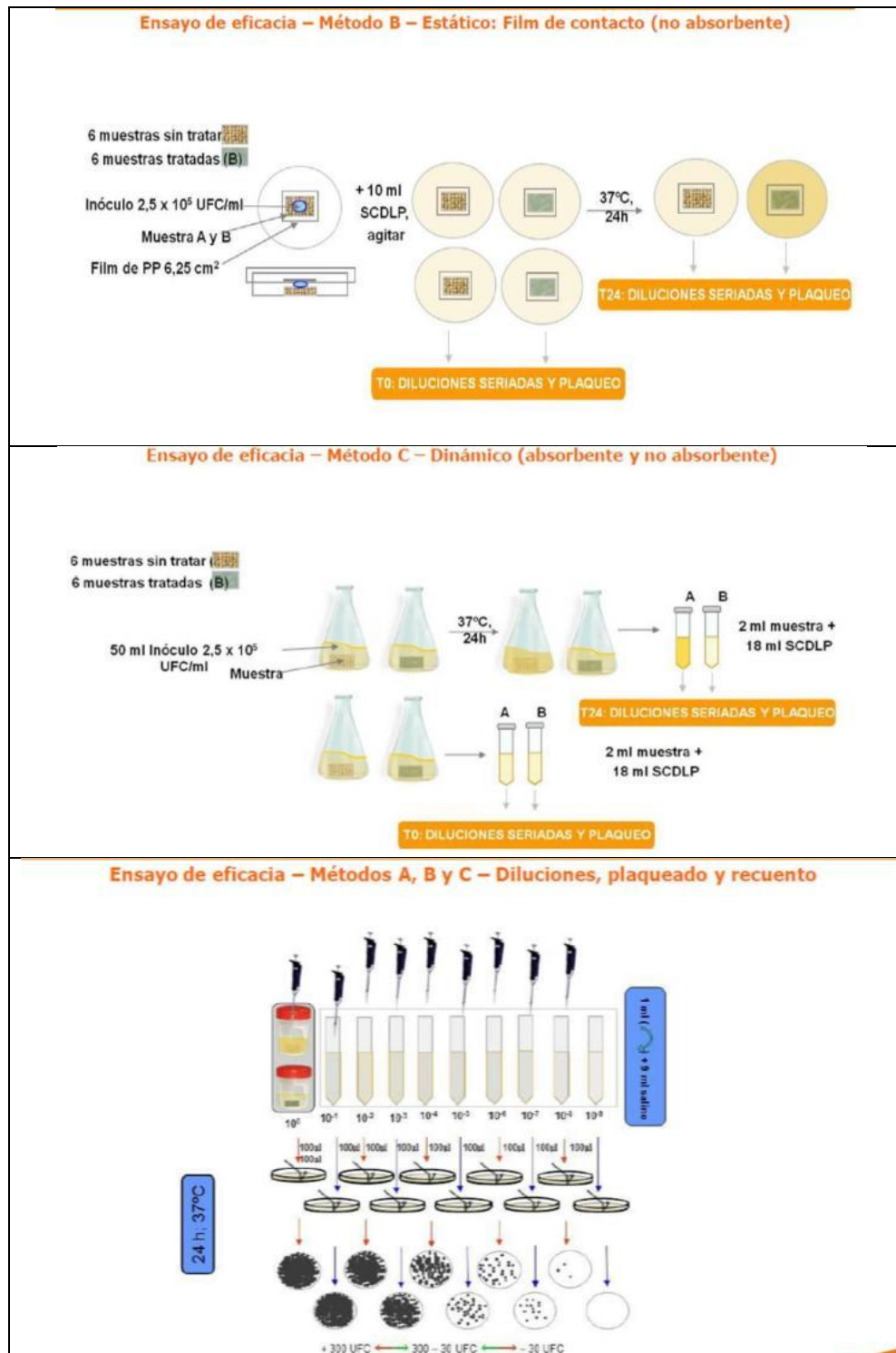


Figura. Métodos de ensayo de la Norma ISO 16187 (A, B y C). D. Secuencia de diluciones seriadas para cada muestra seguida de su plaqueo y recuento de colonias.

Finalmente, a partir de una serie de cálculos matemáticos se determinará el número de bacterias viables en el tiempo cero y en el tiempo 24 horas y se calcula la efectividad del material antimicrobiano (Figura 9).

Cálculos de Rendimiento

Nº	Ensayo	Validación de los Resultados	Expresión de los Resultados
A	Estático	$M = Z \times B \times 20$ $F = \lg C_t - \lg C_0$	$R = \frac{C_t - T_t}{C_t} \times 100 (\%)$ $R^* = \frac{T_0 - T_t}{C_t} \times 100 (\%)$
B	Contacto (Film)	$M = Z \times B \times 20$ $\frac{L_{\max} - L_{\min}}{L_{\text{medio}}} \leq 0,2$	
C	Dinámico (shake flask test)	$M = Z \times B \times 20$ $F = \lg C_t - \lg C_0$	

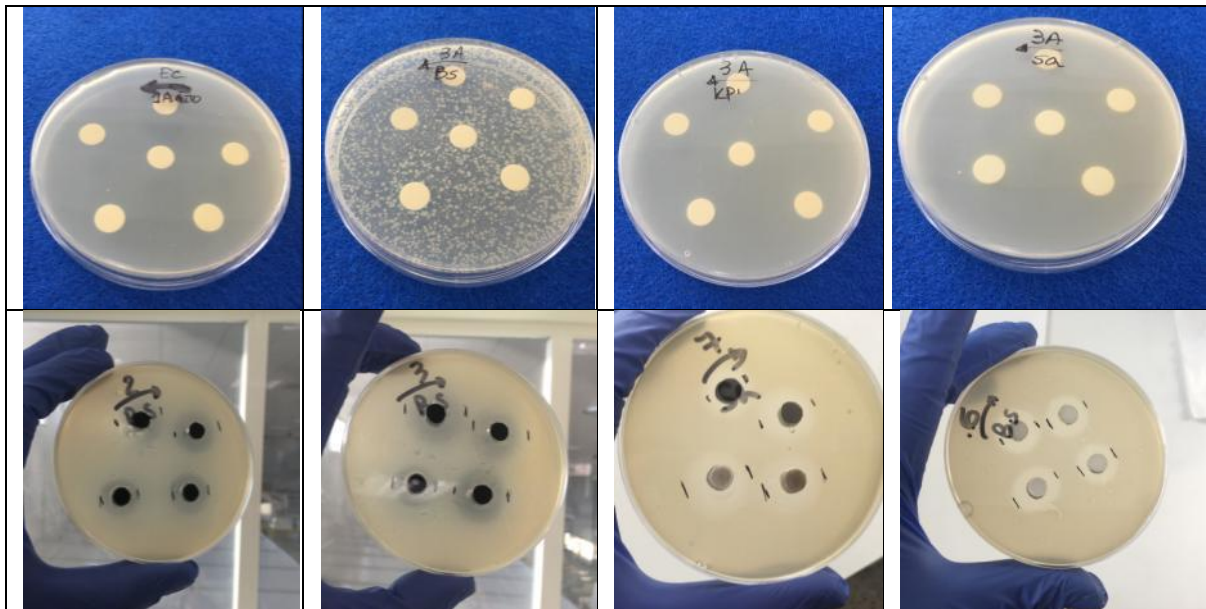
Figura. Cálculos matemáticos para la expresión de los resultados de cada una de las metodologías de la norma 16187:2013.

4. Resultados obtenidos.

Técnica de difusión en agar:

A seguir se describe los principales resultados obtenidos en el total d ensayos realizados durante el proyecto. Como descrito anteriormente la norma metodologica empleada ha sido utilizado la norma EN ISO 20645 y la interna INESCOP 6853 que son métodos cualitativos/semi cuantitativo. Esto significa que el principal resultado obtenido es saber si determinado compuesto, en nuestro caso, nanopartícula metálica inhibe o no una determinada cepa bacteriana.

En la figura abajo se puede observar algunas placas de ensayos donde se aprecian la presencia o no de los halos de inhibición generados por la acción de las diferentes nanopartículas.



En la figura abajo los principales resultados obtenidos de los ensayos de halo de inhibición que se han observado algún tipo de inhibición en al menos una de las diferentes cepas bacterianas testadas.

Nº muestra	Muestra	Bacterias			
		E. coli	B. subtilis	S. aureus	K. pneumoneae
1	Cobre MD31	24	23	17	-
2	Cobre MD32	19	18	17	-
3	Cobre MD33	22	24	17	30
4	Hierro MD28	17	16	17	19
5	Hierro MD30	16	-	17	16
6	Titanio MD6	17	-	15	20
7	Titanio MD11	-	18	18	19
8	Titanio MD	-	-	-	15
9	Plata MP48	17	17	18	19
10	Plata MP49	23	21	19	20
11	Zinc MX66	17	19	17	17

Figura. Resultados de los ensayos de halo de inhibición.

En la figura arriba se visualizan apenas las nanoparticulas sintetizadas que presentarán algún tipo de inhibición en alguna de las cepas bacterianas empleadas para los ensayos. Como se puede ver las diferentes nanoparticulas metalicas del estudio presentan inhibición como mínimo en 2 de las 4 cepas lo que se puede concluir que estos compuestos son muy prometedores para su utilización como antimicrobianos.

Técnica de ensayos en medio líquido:

A seguir se describe los principales resultados obtenidos en los ensayos de inhibición por medio líquido. Como descrito anteriormente, este método consiste en diluir un compuesto biocida de una mayor a una menor concentración y, cada una de estas diluciones, se pone en contacto con el microorganismo/s diana y un medio de cultivo líquido. Como resultado, se observará crecimiento bacteriano únicamente en aquel tubo/placa donde la concentración del compuesto biocida ya no es efectiva contra el microorganismo.

En la figura abajo se observa algunas de las placas 48 pocillos empleadas para los ensayos y el equipo que que posibilita la medición de todos los 48 pocillos a la vez.

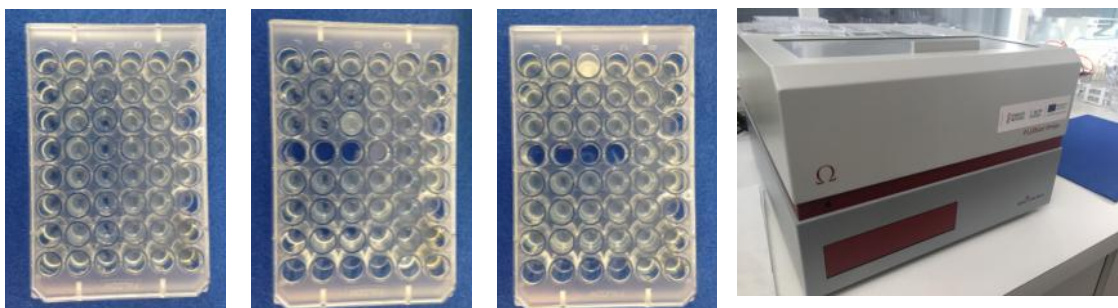


Figura. Equipo de fluorescencia y placas con muestras de ensayo.

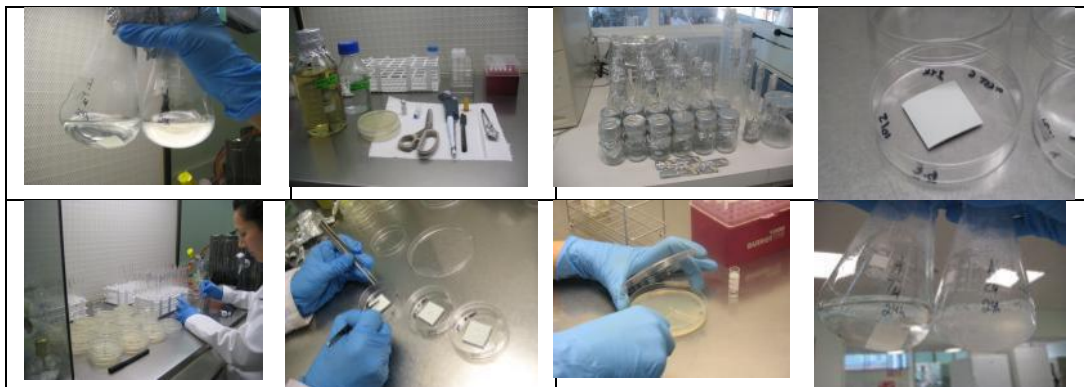
En la tabla abajo se puede observar los principales resultados obtenidos. En algunos casos la concentración de inhibición ha sido superior a los 1000µg/ml y en otros casos la concentración mínima ha sido inferior a los 33 µg/ml.

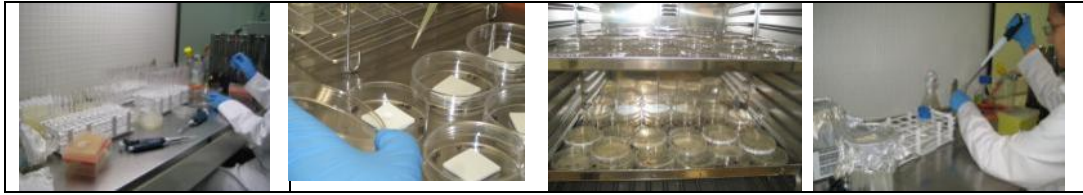
Nº muestra	Muestra	Concentración (µg/ml)			
		E. coli	B. subtilis	S. aureus	K. pneumoneae
1	Cobre MD31	33	33	33	500
2	Cobre MD32	33	33	62,5	>1000
3	Cobre MD33	33	33	62,5	33
4	Hierro MD28	62,5	62,5	33	33
5	Hierro MD30	125	>1000	62,5	125
6	Titanio MD6	-	500	125	62,5
7	Titanio MD11	>1000	-	-	1000
8	Titanio MD	-	-	-	
9	Plata MP48	33	33	33	33
10	Plata MP49	33	33	33	33
11	Zinc MX66	62,5	33	33	33

Evaluación antibacteriana de materiales con antimicrobianos incorporados:

Con los resultados obtenidos en los ensayos anteriores se han seleccionado las nanopartículas que han dado los mejores valores de inhibición, tanto para halo de inhibición como para el ensayo en medio líquido. Dependiendo de la naturaleza del material (absorbentes y no absorbentes) se emplea la técnica más adecuada para realización de los ensayos con las diferentes muestras de materiales que han sido funcionalizadas con nanopartículas. La norma empleada ha sido la ISO 16187:2013: *“Calzado y componentes de calzado. Método de ensayo para evaluar la actividad antibacteriana”*.

En la figura abajo se representa, a modo ilustrativo, los diferentes procedimientos que se deben proceder para la realización de los ensayos de la norma ISO 16187:2013: *“Calzado y componentes de calzado. Método de ensayo para evaluar la actividad antibacteriana”*.





Los resultados de todos estos ensayos con los diferentes materiales funcionalizados se puede observar en la figura abajo. Como se puede observar la mayor parte de todas las nanopartículas, a excepción de las nanopartículas de titanio, han dado resultados positivos en relación a la actividad antibacteriana en las dos cepas empleadas en el estudio, lo que demostrad el enorme potencial que estos materiales funcionalizados pueden ofrecer para la industria del calzado.

NANOPARTÍCULAS	ENSAYO ANTIMICROBIANO		
	BACTERIAS		
	TPU	CUERO	TEXTIL
Nanopartículas de plata	✓	✓	✓
Nanopartículas de zinc	✓	✓	✓
Nanopartículas de cobre	✓	✓	✓
Nanopartículas de hierro	✓	✓	✓
Nanopartículas de titanio	✗	✗	✗

Figura. Resultados de los ensayos con diferentes materiales y nanopartículas funcionalizadas.