



| | |
|----------------------------|--|
| 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 antifúngicos con materiales funcionalizados | 5 |
| 3.1. Ensayos comprobatorios de la actividad antifúngica de las nanopartículas metálicas de preparación propia | 5 |
| 3.2. Ensayos con metodologías propias y normalizadas. | 6 |
| 4. Resultados | 8 |

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°: | 5 |
| Título del entregable: | E5. Resultados de los ensayos antifúngicos con los diferentes materiales funcionalizados. |
| Periodo | 02/2017 – 12/2017 |
| Paquete de Trabajo: | PT5. Ensayos antifúngicos con los materiales funcionalizados. |
| Tareas: | <p>5.1. Ensayos comprobatorios de la actividad antifúngica de las nanopartículas metálicas de preparación propia.</p> <p>5.2. Ensayos con metodologías propias y normalizadas.</p> |
| Autor: | <p>Instituto Tecnológico del Calzado y Conexas</p>  <p>INESCOPE INSTITUTO TECNOLÓGICO DEL CALZADO Y CONEXAS</p> |
| Resumen: | En el presente informe se resumen los resultados obtenidos en los ensayos antifúngicos con las diferentes nanopartículas metálicas de preparación propia al largo del año 2017. |

3. PT 5. Ensayos antifúngicos con materiales funcionalizados.

Tareas:

T5.1. Ensayos comprobatorios de la actividad antifúngica de las nanopartículas metálicas de preparación propia.

T5.2. Ensayos con metodologías propias y normalizadas.

RESUMEN DE LA ACTIVIDAD:

En este paquete de trabajo se ha buscado determinar el efecto antifúngico que las diferentes nanopartículas metálicas sintetizadas en el PT2 presentaban sobre cepas de hongos que están presentes en la piel humana y que se encuentran presentes en muchas muestras de calzados o componentes de calzados.

El paquete de trabajo se ha dividido en dos tareas. La primera tenía como objetivo principal realizar un rápido screening de la capacidad antifúngica de las diferentes nanopartículas. La segunda tarea, y con base a los resultados obtenidos en los ensayos realizados en la tarea 5.1, emplearía las nanopartículas incorporadas en los diferentes materiales de estudio para la realización de ensayos normalizados que determinase la actividad antifúngica de cada material funcionalizado.

3.1 – T5.1 Ensayos comprobatorios de la actividad antifúngica de las nanopartículas metálicas de preparación propia.

Metodología empleada:

La metodología utilizada para los ensayos comprobatorios de la actividad antifúngica de las nanopartículas metálicas de preparación propia fue una adaptación de la metodología conocida como “mínima concentración de inhibición” o MIC. Se ha adaptado ya que esta tarea el principal objetivo fue apenas determinar cuáles formulaciones presentaban actividad antifúngica, o sea, realizar un screening de los materiales que se evaluarían en la tarea 5.2.

La metodología elegida ha sido una de las primeras en ser utilizada para determinar la eficiencia de un compuesto antimicrobiano. En nuestro caso, al envés de determinar el MIC para cada compuesto hemos introducido una cantidad elevada de nanopartículas inicial para que la acción

para matar o inhibir el crecimiento del microorganismo diana del ensayo fuese evidente y sin lugar a dudas.

Además se ha optado por realizar los ensayos en tubos de ensayo y no en placas Biolite de 48 pocillos ya que el crecimiento de hongos es distinto del crecimiento de bacterias. Se ha utilizado únicamente la cepa de *Aspergillus niger* ATCC 9642 y *Chaetomium globosum* ATCC 6205 en forma de esporas.

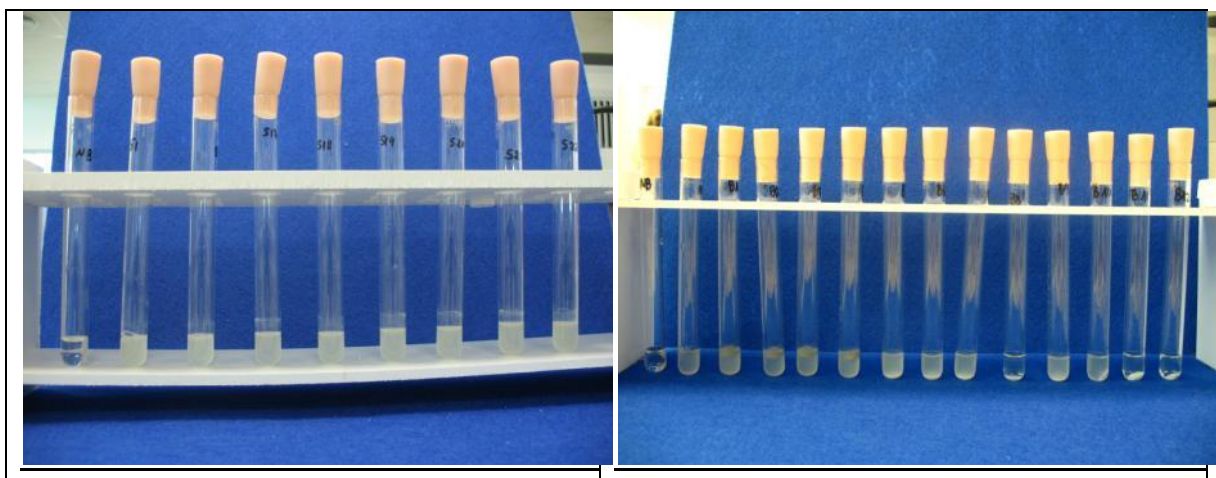


Figura. Ensayos de determinación de inhibición en medio líquido con esporas de *Aspergillus niger* ATCC 9642 y *Chaetomium globosum* ATCC 6205 en contacto con diferentes nanopartículas metálicas.

3.2 - T5.2. Ensayos con metodologías propias y normalizadas.

En general se puede decir que una de las principales funciones que desempeñan los hongos en la naturaleza es la de degradar materia orgánica. A estos hongos se denominan genéricamente de saprófitos.

Sin embargo existe una gran cantidad de materiales poliméricos que presentan resistencia al ataque de hongos. En calzado no es diferente pero los principales componentes que se utilizan en la elaboración de los calzados, casi siempre, vienen acompañados de otros materiales que llevan otros aditivos (estabilizantes, colorantes, grasas o plastificantes) que también favorece al ataque de hongos y por lo tanto puede producir el deterioro de estos materiales. De ahí la importancia de la utilización de materiales con agentes antifúngicos que prevengan la acción saprófita de los hongos.

En esta tarea se ha buscado determinar en los diferentes materiales de estudio (cuero, plástico y tejido) funcionalizados con las diferentes nanopartículas metálicas cuales son realmente efectiva contra diferentes cepas de hongos. Para esto se ha elegido la norma ASTM G21 “*Determinación de la resistencia de materiales poliméricos sintéticos a los hongos*”,

Esta metodología es una de las más ampliamente utilizadas para medir la actividad antifúngica en materiales poliméricos. Esta norma, inicialmente desarrollada para materiales plásticos, viene siendo empleada por muchos otros sectores de producción para evaluar la efectividad de un compuesto antifúngico en materiales, precisamente por la carencia de normas específicas para estos diferentes sectores.

En el ensayo un cóctel de esporas de un grupo de 5 especies de hongos es empleado como inóculo. Las cepas de hongos elegidas son consideradas representativas de acciones saprófitas en diferentes materiales, incluyendo la piel humana (desde hongos ambientales comunes hasta patógenos), cuya finalidad es aumentar las posibilidades de que el material a ser testado pueda presentar algún tipo de deterioro cuando es expuesto a estos microorganismos fúngicos.

Tabla. Cepas fúngicas empleadas en los ensayos normalizados ATSM G21.

| Hongos | ATCC | DSMZ |
|--|------------|-----------|
| <i>Aspergillus niger (A. brasiliensis)</i> | ATCC 9642 | DSM 63263 |
| <i>Penicillium pinophilum</i> | ATCC 11797 | DSM 0912 |
| <i>Chaetomium globosum</i> | ATCC 6205 | DSM1962 |
| <i>Gliocladium virens (Trichoderma virens)</i> | ATCC 9645 | DSM 1963 |
| <i>Aureobasidium pullulans</i> | ATCC 15233 | DSM 27152 |

La exposición de los materiales inoculados, en condiciones favorables al crecimiento fúngico, por un periodo tiempo dado, permite la determinación visual del efecto de los hongos en las propiedades de materiales poliméricos. La principal determinación que la norma incluye de valoración de los resultados es la determinación del efecto visual (crecimiento de los hongos sobre las muestras).

De un genérico se puede describir los pasos preparatorios que fueron realizados para la ejecución del ensayo.

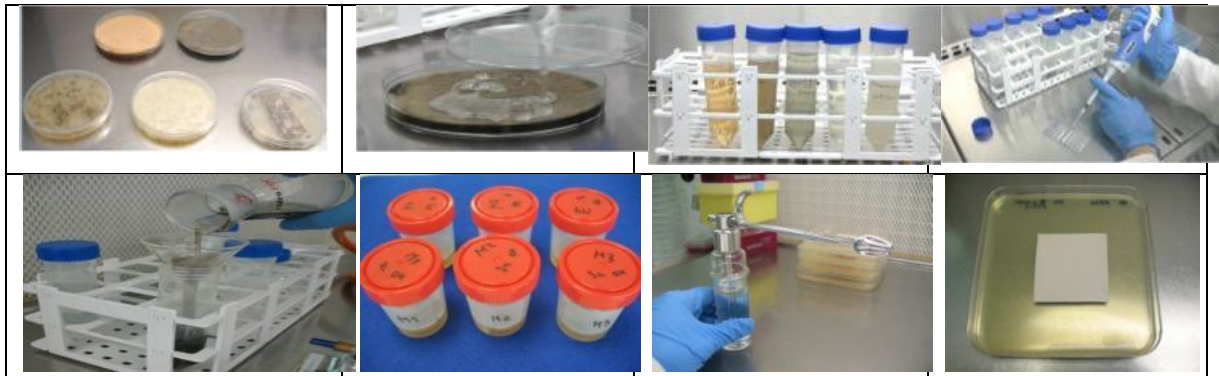
La norma ASTM G21 consiste en exponer el material antifúngico a un inóculo compuesto por una mezcla de 5 tipos diferentes de hongos, durante 28 días de incubación de las muestras de ensayo.

Las muestras son preparadas por triplicado en el interior de placas Petri estériles. Para los ensayos fueron utilizadas piezas de 50x50 mm. Como control positivo (del crecimiento fúngico) se ha utilizado muestras de papel celulósico de 25x25mm.

En primer lugar se ha procedido con la preparación de las esporas de las cinco cepas de hongos a una concentración de cada una de las cepas de $10^6 \pm 200.000$ esporas/mL,

La inoculación de las muestras de ensayo (incluidas las muestras de papel control) y posterior incubación fueron realizadas según el procedimiento:

1. Se prepararon placas con medio Nutriente Sal Agar (NSA) solidificado de 3-6 mm de espesor, donde fueron depositadas las muestras en la superficie del agar.
2. Se procede a la inoculación de la superficie de la placa, incluyendo la superficie de las muestras, con la suspensión de esporas, utilizando un atomizador estéril, de modo que toda la superficie quede humedecida.
3. Las placas se incuban a 28-30°C y a una humedad no menor del 85%. La duración estándar del ensayo es de un máximo de 28 días, con observaciones también a los 7, 14 y 21 días para observar el desarrollo del crecimiento o no de las esporas sobre el material testado.



4. Resultados obtenidos.

4.1 – T5.1 Ensayos comprobatorios de la actividad antifúngica de las nanopartículas metálicas de preparación propia.

Los resultados obtenidos en estos ensayos han demostrado que las nanopartículas de titanio no presentan efecto antifúngico, al menos en las concentraciones empleadas en el estudio, para las dos cepas de hongos estudiadas y por lo tanto esta nanopartícula no ha sido incluida en los ensayos realizados en la tarea T5.2.

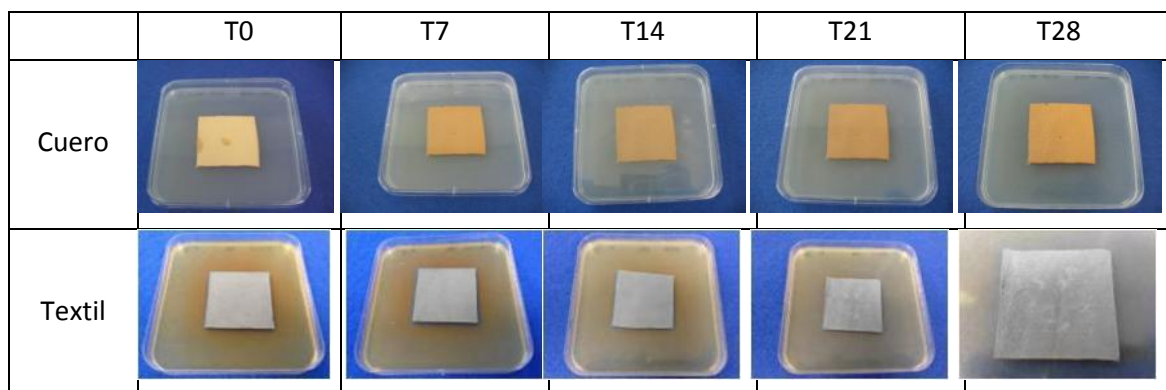
4.2 - T5.2. Ensayos con metodologías propias y normalizadas.

A seguir se describe los principales resultados obtenidos en el total d ensayos realizados durante el proyecto para esta tarea. Como descrito anteriormente la norma metodológica empleada en los ensayos ha sido la norma ASTM G21 “*Determinación de la resistencia de materiales poliméricos sintéticos a los hongos*”.

En esta norma la evaluación de los resultados se da por un “Rating” que va de Cero a Cuatro dependiendo del crecimiento que presenta la suspensión de hongos encima del material de estudio. Un Rating Cero implica ningún crecimiento lo que indica que el antifúngico es muy efectivo.

| Crecimiento observado en las muestras | Valor (Rating) |
|---|----------------|
| Ninguno | 0 |
| Trazas de crecimiento (<10%) | 1 |
| Crecimiento ligero (10-30%) | 2 |
| Crecimiento medio (30-60%) | 3 |
| Crecimiento abundante (60% hasta recubrimiento completo) | 4 |

En la figura abajo se muestra algunas muestras de los diferentes ensayos realizados con los diferentes materiales funcionariados con las nanopartículas metálicas. Como se puede observar el tiempo de ensayo es de 28 días y se hace además de las muestras un control con papel celulosa.



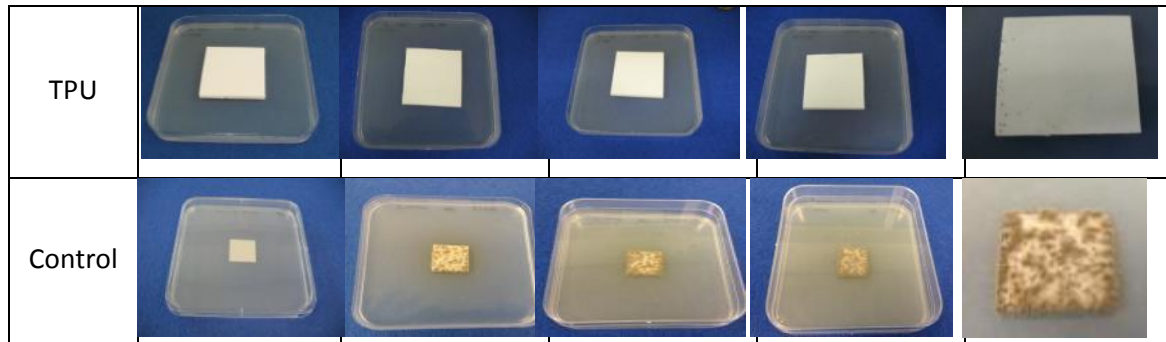


Figura ilustrativa de los ensayos realizados con la norma ASTM G21

Finalmente 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 antifúngica en las cinco cepas de hongos empleadas en el estudio. Los resultados obtenidos indican que cualquier uno de las nanopartículas metálicas utilizadas, con excepción del titanio, pueden ser considerados como un compuesto antimicrobiano para el sector del calzado. Sin embargo hay que considerar también los efectos de citotoxicidad que estas nanopartículas pueden ocasionar en la piel humana.

| NANOPARTÍCULAS | ENSAYO ANTIMICROBIANO HONGOS | | |
|---------------------------|---------------------------------|-------|--------|
| | 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.