

M22 - SÍNTESIS Y APLICACIÓN DE NUEVAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA BIOCOMPATIBLES PARA EL CONTROL DEL CRECIMIENTO DE BACTERIAS LÁCTICAS Y ACÉTICAS EN VINOS

A. García-Ruiz¹, J. Crespo², J.M. López-de-Luzuriaga², M.E. Olmos², M. Monge², M.P. Rodríguez-Alfaro¹, P.J. Martín-Álvarez¹, B. Bartolome¹, M.V. Moreno-Arribas¹
¹Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), CSIC-UAM, Departamento de Biotecnología y Microbiología de Alimentos, c/ Nicolás Cabrera 9, 28049, Madrid, ²Universidad de La Rioja, Departamento de Química, c/ Madre de Dios 51,26004, Logroño, La Rioja.
victoria.moreno@csic.es

RESUMEN:

Es bien conocido que la plata tiene propiedades antimicrobianas muy potentes. Actualmente, la nanoplata es el nanomaterial más utilizado, representando aproximadamente la cuarta parte de todos los nanomateriales comercializados en el mercado. El presente trabajo tiene por objetivo explorar la potencial utilización de nuevas nanopartículas de plata como agentes antimicrobianos en enología, como una alternativa al empleo de los sulfitos. En primer lugar, se ha llevado a cabo la síntesis y caracterización de dos materiales de plata: *PEG-Ag NPs 1*, nanopartículas sólidas soportadas sobre polietilenglicol, y *GSH-Ag NPs 2*, nanopartículas en solución soportadas sobre glutatión. A continuación, se ha evaluado su actividad antimicrobiana frente a un total de 11 especies, que incluyen bacterias lácticas y bacterias acéticas. Se han establecido los parámetros de inhibición bacteriana, comprobándose que los nanomateriales con recubrimientos a base de ambos polímeros solubles (polietilenglicol y glutatión), son capaces de inhibir el crecimiento de ambos tipos de bacterias, y en concreto, el efecto inhibidor sobre las bacterias acéticas, fue superior al del metabisulfito potásico. También se ha estudiado el mecanismo de acción antimicrobiano de las nanopartículas de plata, en el que parece que están implicados cambios en la membrana plasmática de la célula bacteriana con pérdida de la viabilidad celular y de las funciones vitales de la célula.

Palabras clave: Nanopartículas de plata biocompatibles, actividad antimicrobiana, bacterias lácticas, bacterias acéticas, alternativas al SO₂

1. Introducción

El anhídrido sulfuroso o dióxido de azufre (SO₂) presenta múltiples propiedades como conservante en la elaboración de los vinos, entre las que se pueden destacar los efectos antioxidante y antimicrobiano, éste último selectivo especialmente frente a bacterias lácticas (BAL). Por ello, hoy en día constituye un tratamiento indispensable en la tecnología de elaboración y conservación de los vinos. Sin embargo, el empleo de este aditivo está estrictamente regulado debido a que a dosis elevadas puede dar lugar a modificaciones organolépticas en el producto final, y fundamentalmente al potencial riesgo para la salud humana. Esto, ha promovido la investigación de nuevas alternativas en enología que puedan sustituir o complementar la acción del SO₂ [1].

El efecto antimicrobiano de la plata frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas se conoce desde la antigüedad, pero ha sido recientemente cuando se ha promovido el empleo de nanopartículas de plata (NP Ags) como agentes antimicrobianos en diferentes áreas, y en la

actualidad se considera que las NP Ag son el nanomaterial más utilizado en los productos de consumo, representando alrededor de una cuarta parte de todos los nanomateriales comercializados. A pesar del gran interés en las aplicaciones de estos nanomateriales en el campo de la enología, los estudios que han investigado el uso de NP Ag como agente antimicrobiano durante la vinificación son muy escasos [2,3], y no hay información disponible sobre el efecto de estas NP Ags sobre el crecimiento de diversos microorganismos del vino y su modo de acción. Es por ello, que el objetivo del presente trabajo es explorar la potencial utilización de nuevas NP Ags como agentes antimicrobianos en enología, específicamente para el control del crecimiento de las especies de bacterias lácticas y acéticas representativas del vino.

2. Material y métodos

2.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata

La síntesis de nanopartículas de plata estabilizadas con polietilenglicol (PEG-Ag NPs 1) se llevó a cabo mediante un proceso "in situ" del precursor de plata(I) [Ag(C6F5)] por reacción de $\text{NBu}_4[\text{Ag}(\text{C}_6\text{F}_5)_2]$ y AgClO_4 en relación molar 1:1 y empleando Et₂O como disolvente. La evaporación del disolvente a sequedad lleva la generación de PEG-Ag NPs 1 como un sólido negro. PEG-Ag NPs 1 tiene un contenido final de plata de 200 mg/g. Para la síntesis de nanopartículas de plata estabilizadas con glutatión (GSH-Ag NPs 2), se eligió un método clásico basado en la reducción de una disolución acuosa de tetrafluoroborato de plata (AgBF_4) de concentración 1.9×10^{-3} M con el agente reductor NaBH_4 y posterior estabilización con glutatión en su forma reducida, lo que dió lugar a la formación de una disolución coloidal amarilla de nanopartículas de plata muy estable en el tiempo, lo que las hace indicadas para su estudio en disolución. GSH-Ag NPs 2 tiene un contenido de plata de 0,197 mg/mL.

Estas muestras se han caracterizado mediante Plasma ICP y microscopía de transmisión electrónica (TEM). La técnica Plasma ICP ha permitido obtener el porcentaje en peso de plata en las muestras y compararlo con el teórico. Los espectros de absorción de las soluciones que contienen las NPs Ag (PEG-Ag NP 1 y GSH-Ag NP 2) se registraron en un espectrofotómetro de diodos UV-Visible Hewlett Packard 8453. Se recogieron las imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) en un microscopio JEOL JEM 1011 y JEOL JEM 2100.

2.2. Cepas bacterianas y medios de cultivo

Las BAL seleccionadas para este estudio (*Pediococcus pentosaceus* (n=4), *Lactobacillus casei* (n=3), *L. plantarum* (n=1) y *Oenococcus oeni* (n=3) pertenecen a la Colección de BAL del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), y han sido previamente aisladas de mostos y vinos. Las bacterias acéticas del estudio (*Acetobacter aceti* CECT-298 y *Gluconobacter oxydans* CECT-360) pertenecen a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Los medios de cultivo empleados fueron el medio MRS para las cepas BAL no *O. oeni*, el medio MRS málico-fructosa para las cepas de *O. oeni*, y el medio YG para las bacterias acéticas.

2.3. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los materiales frente a las distintas bacterias se ha evaluado siguiendo la metodología de García-Ruiz et al., [4, 5] como: a) inhibición del crecimiento bacteriano a través del parámetro IC₅₀ (concentración que inhibe el crecimiento bacteriano al 50%), y b) inactivación bacteriana a través del parámetro de supervivencia MBC (concentración mínima bactericida; concentración más baja que es capaz de inactivar al 99,9% de los microorganismos presentes en el inóculo inicial). Los estudios se han realizado en medios de

cultivo de laboratorio adicionados de etanol al 6%, con el objetivo de simular condiciones próximas a las del vino. Además se ha evaluado la actividad antimicrobiana del metabisulfito potásico (SO₂) frente a las mismas bacterias, para poder establecer una comparativa de la eficacia de los materiales de plata como alternativa al empleo de este agente antimicrobiano en enología.

2.4. Microscopía de fluorescencia

Se empleó un microscopio de epifluorescencia Leica DM2500 (Leica, Heerbrugg, Switzerland). El kit LIVE/DEAD BacLight de viabilidad bacteriana L7012 (Invitrogen, Oregon, EEUU) se utilizó para los ensayos de integridad de membrana por tinción selectiva del ácido nucleico.

3. Resultados

Se ha abordado la síntesis de nanomateriales basados en nanopartículas de plata y estabilizados por agentes químicos (polímeros o moléculas) que fueran biocompatibles. Así, se eligieron el polímero polietilenglicol y la molécula glutatión como agentes estabilizantes de las nanopartículas. Posteriormente estas muestras se han caracterizado mediante Plasma ICP y microscopía de transmisión electrónica (TEM). En las muestras de PEG-Ag NPs 1, la población principal consta de Ag NPs con un diámetro medio de entre 3 y 5 nm como se observa en las micrografías TEM (Figura 1A-1B). Por otro lado, las micrografías TEM de las muestras de GSH-Ag NPs 2 mostraron una amplia gama de diámetros entre 10 y 50 nm (Figura 1C-1D).

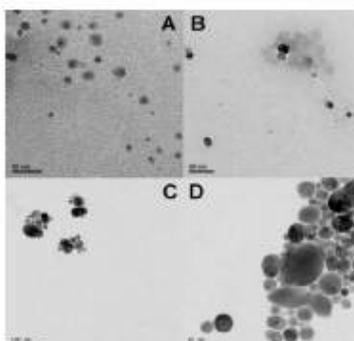


Figura 1. Imágenes de microscopía de transmisión electrónica de las nanopartículas PEG-Ag NPs 1 (A–B) y GLU-Ag NPs 2 (C–D). Barras de escala de 20 (A), 50 nm (B), 100 (C) y 50 (D).

A continuación se evaluó la actividad antimicrobiana de PEG-Ag NPs 1 y GSH-Ag NPs 2 frente a las principales especies de bacterias lácticas y acéticas presentes en el vino mediante la determinación del parámetro IC₅₀ (Tabla 1). Con el fin de facilitar la comparación entre las nanopartículas, la concentración se expresa en g de Ag por ml. Los valores de IC₅₀ para las bacterias lácticas oscilaron entre 86 mg Ag/ml (*P. pentosaceus* CIAL-49) y 470 g de Ag/ml (*P. pentosaceus* CIAL-85) para la nanopartícula PEG-Ag NP 1, mientras que para GSH-Ag NP 2, los valores de IC₅₀ oscilaron entre 1.2 µg Ag/ml (*O. oeni* CIAL-118) y 70 g de Ag/ml (*P. pentosaceus* CIAL-49). Para todas las cepas de LAB, la susceptibilidad bacteriana fue mayor (menores valores de IC₅₀) frente a GSH-Ag NP 2 que a PEG-Ag NP 1, destacando la alta susceptibilidad de las cepas de *O. oeni* a GSH-Ag NP 2 (IC₅₀ ~ 1 g / ml) (Tabla 1). Sin embargo, en los ensayos relativos a las cepas de bacterias acéticas, éstas mostraron una susceptibilidad similar a ambas nanopartículas (PEG-Ag NPs 1 y GSH-Ag NPs 2), con valores de IC₅₀ de alrededor de 30 mg/ml (Tabla 1). Para las bacterias acéticas (*A. aceti* y *G. oxydans*), los materiales de plata estudiados (PEG-Ag NPs 1 y GSH-Ag NPs 2) mostraron un efecto inhibitor -

expresado como IC50- superior al del metabisulfito potásico, si bien, en general, las bacterias lácticas, y especialmente la especie *O. oeni*, mostraron menor sensibilidad a los materiales de plata que al metabisulfito potásico. Mediante microscopía de epifluorescencia, se ha confirmado la capacidad de los nanomateriales de plata de inhibir el crecimiento y la viabilidad celular de cepas de bacterias lácticas y acéticas del vino, y se ha corroborado la mayor sensibilidad de las bacterias acéticas a la exposición de materiales de plata que de las bacterias lácticas, lo que puede explicarse por las diferencias en la estructura de la pared celular.

Tabla 1. Actividad antimicrobiana (IC₅₀, MBC) de los nanomateriales de plata y el metabisulfito potásico frente a las cepas de bacterias lácticas y acéticas estudiadas

	IC ₅₀ (Ag concentration, µg/mL)				IC ₅₀ (µg/mL)
	PEG-Ag NPs 1		GLU-Ag NPs 2		K ₂ S ₂ O ₅
	IC ₅₀	MBC	IC ₅₀	MBC	IC ₅₀
Bacterias Lácticas		400		> 100	
<i>P. pentosaceus</i> CIAL-16	120	400	62	> 100	590
<i>P. pentosaceus</i> CIAL-49	66	400	70	> 100	610
<i>P. pentosaceus</i> CIAL-65	470	400	50	> 100	550
<i>P. pentosaceus</i> CIAL-66	410	400	69	> 100	600
<i>L. casei</i> CIAL-51	232	400	65	> 100	540
<i>L. casei</i> CIAL-52	380	200	46	> 25	310
<i>L. casei</i> CIAL-92	370	200	17	> 25	620
<i>L. plantarum</i> CIAL-121	68	200	61	> 25	540
<i>O. oeni</i> CIAL-117	208		1.7		360
<i>O. oeni</i> CIAL-118	202	200	1.2	> 100	440
<i>O. oeni</i> CIAL-119	210	200	2.4	> 100	560
Bacterias Acéticas					
<i>A. aceti</i> CECT-296	30	200	29	> 100	480
<i>G. oxydans</i> CECT-360	32	200	30	> 100	470

4. Conclusiones

Estos resultados muestran la efectividad de los nanomateriales de plata específicamente sintetizados para este estudio, para inhibir el crecimiento de las principales especies de bacterias lácticas y acéticas del vino, como una alternativa al empleo de sulfitos en enología, aunque son necesarios más estudios para asegurar su aplicabilidad en bodega.

5. Bibliografía

1. Santos, M.C., Nunes, C., Saraiva, J.A., Coimbra, M.A. (2012). *Eur. Food Res. Technol.*, 234, 1-12
2. Izquierdo-Cañas, P.M., García-Romero, E., Huertas-Nebreda, B., Gómez-Alonso, S. (2012) *Food Control*, 23, 73-81
3. Garde-Cerdán, T.; López, R., Garijo, P., González-Arenzana, L., Gutiérrez, A. R., López-Alfaro, I., Santamaría, P. (2014) *Aust. J. Grape Wine Res.*, 20, 51-61
4. García-Ruiz, A., Moreno-Arribas, M.V., Martín-Álvarez, P.J., Bartolomé, B. (2011) *Int. J. Food Microbiol.*, 145, 426–431
5. García Ruiz A., Crespo, J. M. López-de-Luzuriaga, J. M; Olmos, M. E., Monge, M., Rodríguez-Álfaro; M.P., Martín-Álvarez, P.J., B.Bartolomé, B., Moreno-Arribas. M.V. (2015). *Food Control*, 50, 613-619

6. Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación recibida del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) a través de los proyectos PRI-PIBAR-2011-1358 y AGL2012-40172-C02-01.