

Hidrogeles antibacterianos a partir de xilanas del agave tequilero con nanopartículas de plata generadas in-situ



Colaboración

Alfredo Escalante; Patricia del Rosario Retamoza Vega; Emmanuel Franco López Velarde; Jesús Guadalupe Martínez Ponce de León; Guillermo Toriz, Universidad de Guadalajara

Fecha de recepción: 18 de mayo de 2021

Fecha de aceptación: 07 de septiembredel 2021

RESUMEN: Se reporta el aprovechamiento del bagazo de agave tequilero (*Agave tequilana* Weber var. azul) para la elaboración de biomateriales funcionales. El bagazo de agave (bagazo) se deslignificó con clorito de sodio y posteriormente se aisló la fracción de hemicelulosas tipo xilanas. Se encontró que el bagazo contiene 19% de xilanas. Las xilanas se modificaron para fabricar hidrogeles mediante funcionalización con anhídrido succínico para crear grupos carboxilo que posteriormente fueron conjugadas con tiramina a través de su activación con EDAC y NHS y entrecruzadas enzimáticamente con peroxidasa HRP. Las xilanas de agave, los productos succinilados y conjugados se analizaron por espectroscopía FT-IR para validar los cambios en su estructura molecular.

Los hidrogeles fueron cargados con diferentes concentraciones de nitrato de plata para la formación in-situ de nanopartículas de plata. El efecto antibacteriano contra *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* fue evaluado según el método de Kirby-Bauer. Se encontró que concentraciones de 10mM de AgNO_3 ofrecieron un efecto antibacterial contra *S. aureus* y *E. coli*.

PALABRAS CLAVE: Bagazo de agave tequilero, Xilanas, Biomateriales funcionales, Hidrogeles antibacterianos.

ABSTRACT: In this study we report on the utilization of agave bagasse (*Agave tequilana* Weber var. azul) for production of functional biomaterials. Agave bagasse was delignified with sodium chlorite and thereafter xylans were isolated (19 wt. %). Xylans were functionalized with succinic anhydride to create carboxyl groups. Succinilated xylans were conjugated with tyramine through activation with EDAC/NHS and thereafter enzymatically crosslinked with horse radish peroxidase to create hydrogels. Agave xylans, succinylated, and conjugated xylans were analyzed with FTIR spectroscopy to asses changes in their molecular structure.

Hydrogels were formed and loaded with various concentrations of silver nitrate in order to generate in situ silver nanoparticles. Antibacterial activity against *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* was evaluated according to the Kirby-Bauer method. It was found that addition of AgNO_3 10 mM had antibacterial effect against *S. aureus* and *E. coli*.

KEYWORDS: Tequila agave bagasse, Xylans, Functional biomaterials, Antibacterial Hydrogels.

INTRODUCCIÓN

El bagazo de agave constituye el 40% en peso del agave tequilero y es fuente de grandes volúmenes de desecho de la industria tequilera, lo que representa un grave problema ambiental [1, 2]. Sin embargo, el bagazo de agave puede ser aprovechado para obtener productos de alto valor agregado a partir de los materiales lignocelulósicos que lo conforman.

Los lignocelulósicos se componen de celulosa, hemicelulosas y lignina –los polímeros más abundantes en la naturaleza (3-5) y son de gran interés para ser utilizados industrialmente debido a su bajo costo y a su amplia disponibilidad [6, 7].

Las hemicelulosas son heteropolisacáridos cuya cadena principal se compone de pentosas y hexosas, que forman cadenas de 100 a 200 unidades, y en el caso concreto del bagazo de agave, se pueden obtener hasta 20% de este biopolímero [8]. En el presente trabajo se estudiaron las xilanas del bagazo de agave tequilero ya que es la hemicelulosa más abundante en este material. Se trata de moléculas de D-xilosa unidas a través de enlaces glucosídicos β -(1 \rightarrow 4), que puede presentar acetilaciones y ramificaciones de arabinosa (unida a ácido ferúlico o p-coumárico), ácido glucurónico y ácido 4-O-metil éter-glucurónico [3, 9]. Las xilanas de agave representan un biopolímero que puede ser utilizado en aplicaciones de alto valor agregado a través de la preparación de hidrogeles funcionales. Un hidrogel es una sustancia que puede retener varias veces su peso en agua y permite ser un vehículo para el envío de compuestos de interés como fármacos, biomoléculas activas [10-13], pesticidas, etc.

Para alcanzar esta propiedad las xilanas del bagazo de agave deben ser funcionalizadas con grupos reactivos que permitan obtener redes tridimensionales que retengan agua. Las xilanas contienen grupos hidroxilo que son sitios para realizar una esterificación con anhídrido acético, resultando en la implantación de grupos carboxilo que permiten la conjugación con tiramina a través de enlaces amida. El grupo fenólico de la tiramina es un grupo lábil que puede ser polimerizado/entrecruzado entre las cadenas de xilana para la formación de hidrogeles [14].

La combinación de xilanas en forma de hidrogeles con nanopartículas de plata, tiene gran potencial en aplicaciones biomédicas como agentes antimicrobiales contra bacterias y virus [15].

MATERIAL Y MÉTODOS

Materiales. El bagazo de agave se obtuvo de la compañía tequilera Cava de Oro ubicada en el municipio del Arenal, Jalisco, México. NaClO_2 (80%), CH_3COOH (99%), KOH (90%), NaOH (97%), H_3BO_3 (99.5%), DMF (99.9%), Anhídrido Succínico (97%), Tiramina (99%), EDAC (>98%), NHS (98%), AgNO_3 (99.9%), HRP (>250 unidades/mg) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Toluca, México).

Caracterización del bagazo de agave. La composición química del bagazo de agave se realizó utilizando los estándares TAPPI. Contenido de cenizas (TAPPI T211 om-02 2002), extraíbles en acetona (TAPPI T280 pm-99, 1999), Extraíbles en agua caliente (TAPPI T207 cm-99, 1999), contenido de lignina (TAPPI T222 om-02 2002), y α -celulosa (TAPPI T203 cm-99, 1999). El contenido de hemicelulosas se determinó por diferencia. El contenido de pentosanos se determinó con la TAPPI T223 cm-84. El contenido de Holocelulosa se determinó por el método usual WISE [16].

Deslignificación del bagazo de agave. El bagazo de agave se trató siguiendo el método de WISE con algunas modificaciones [9, 16]: 100 gr de bagazo base seca se colocan en un matraz Erlenmeyer de 5L, se le adiciona 2.5L de agua desionizada y se calienta a 70-80°C. Se le agrega 10mL de ácido acético glacial y 37.5 gr de NaClO_2 y se deja reaccionar por 12 horas. El proceso se repite hasta completar 60 horas de reacción. El contenido del matraz se filtra en malla 200 y se lava con abundante agua hasta obtener una pulpa blanca (holocelulosa) se deja secar al aire.

Aislamiento de α -celulosa y hemicelulosas. Este proceso se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Timell [17]: en un matraz Erlenmeyer de 2 L se agrega la holocelulosa obtenida (aprox 62 g) y se le añade KOH al 24% a temperatura ambiente por 24 horas con agitación manual ocasional. El contenido del matraz se filtra en papel. El Filtrado 1 se guarda para posterior uso. El producto sólido (α -celulosa) se lavó con abundante agua, se dejó secar al aire y se almacenó. El material líquido del lavado (Filtrado 2) se concentra en rotavapor, hasta obtener 100mL. Se mezclan ambos filtrados (aproximadamente 500 mL) y se agregan gota a gota en un vaso de precipitado de 5L con 2.2 L de una solución al 9.1% de ácido acético en etanol. El contenido del vaso de precipitado se filtra a vacío a través de papel filtro. El producto líquido se descartó. El producto sólido (24 g Hemicelulosas de Agave) se lavó con etanol y se secaron en un horno a vacío.

Obtención de xilanas. Las hemicelulosas de agave se colocaron en un vaso de precipitado de 1 L, se le agregan 170 mL de KOH al 10%, se agitó magnéticamente hasta disolver por completo las hemicelulosas y se le añadió gota a gota 340 mL de solución de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ al 5%. El contenido del vaso de precipitado se centrifugó a 4000 rpm, se decantó y se recuperaron ambas fracciones (líquida y precipitada). El material precipitado se lavó con etanol, se secó a vacío y se almacenó (0.6 gr). La fracción líquida (aproximadamente 510 mL), se agregó gota a gota en un vaso de precipitado de 5L con 2.2L de una solución al 9.1% de ácido acético en etanol. El contenido del vaso de precipitado se filtró a vacío a través de papel filtro. El producto líquido se descartó. El producto sólido (22.9 gr. Xilanas de Agave) se lavó con etanol y se secaron en un horno a vacío.

Modificación de xilanas con anhídrido succínico. Este proceso se realizó siguiendo a [18]: 1 gr. de AX se colocó en un matraz bola de 50 mL, se dispersa con 10 mL de DMF y se dejó en agitación magnética por 30 min. Se le añade 2.5 g de anhídrido succínico y 5 mg de acetato de sodio. El matraz de reacción se tapó, se usó nitrógeno para evacuar la humedad y se mantuvo en atmósfera de nitrógeno. El sistema se calentó a 70°C y se dejó reaccionar por 24 horas. El producto de la reacción se agregó gota a gota en vaso de precipitado con 30 mL de etanol frío (-15°C). El contenido del

vaso de precipitado se filtró a vacío a través de papel filtro. El producto líquido se descartó. El producto sólido (0.9 g. Xilanas de Agave Succiniladas) se lavó con etanol y se secó en un horno a vacío. La muestra se etiquetó como AX-S.

Conjugación con tiramina. La conjugación se realizó siguiendo el protocolo de Kuzmenko y colaboradores [14]: 500 mg de AX-S se colocaron en un matraz bola de 50 mL y se le agregaron 20 mL de agua desionizada (DI). El matraz de reacción se tapó y se agitó magnéticamente por 30 minutos. Se añadieron 87 mg de EDAC y 63 mg de NHS, el sistema se acondicionó para que la reacción se llevara a cabo en atmósfera de nitrógeno. Se preparó una solución de 63 mg de tiramina en 6 mL de DMF y se añadieron gota a gota, la reacción se dejó en atmósfera de N_2 a temperatura ambiente y en agitación por un periodo de 3 días. El contenido de la reacción se agregó gota a gota en un vaso de precipitado con 90 mL de etanol frío ($-15^{\circ}C$). El contenido del vaso de precipitado se filtró a vacío a través de papel filtro. El producto líquido se descartó. El producto sólido (460 mg de AX-S tiraminizadas) se lavó con etanol y se secaron en un horno a vacío. La muestra se etiquetó como AX-TA.

Formación de hidrogeles con nanopartículas de plata. La elaboración de los hidrogeles se llevó a cabo siguiendo la metodología reportada por (14): 25 mg de muestra del conjugado AX-TA se disolvieron en 350 μL de H_2O DI, se le adicionó 48 μL de solución de HRP en agua (600 $\mu g/mL$), se agitó por 1 min a 2500 rpm en un equipo vortex y posteriormente se le agregó 52 μL de H_2O_2 al 0.3%. El gel se formó inmediatamente al agregar el peróxido. Otras muestras se prepararon disolviendo 25 mg de conjugado AX-TA con 400 μL de soluciones de $AgNO_3$ con concentraciones de 0.125, 1.25 y 12.5 mM para lograr obtener tres concentraciones finales de 0.1, 1.0 y 10.0 mM de $AgNO_3$ respectivamente. Todos los procedimientos de formación de hidrogeles se llevaron a cabo dentro de tubos eppendorf a temperatura ambiente, obteniendo un volumen final del hidrogel de 500 μL .

Pruebas antibacterianas. El efecto antibacteriano de los hidrogeles de xilanas de agave cargados con AgNPs en distintas concentraciones fue evaluado mediante el método de Kirby-Bauer cuantificando el diámetro del halo de inhibición formado por las muestras de AX-TA y AgNPs. Primeramente, se procedió a ajustar las unidades formadoras de colonias (UFC) a 0.5 según la escala de McFarland (1.5×10^8 UFC) en tubos con medio de cultivo Müller-Hinton. Posteriormente se cortaron discos de 5 mm de diámetro por 2 mm de grosor de cada uno de los hidrogeles cargados con AgNPs en distintas concentraciones, así como también hidrogeles solo de AX-TA como referente control, y se colocaron sobre cajas Petri con agar y se colocaron en incubación a $37^{\circ}C$ durante 24 h. El diámetro resultante de cualquier zona

de inhibición (mm) fue medido. También se evaluaron discos impregnados con antibiótico SXT (sulfametoxazol/trimetoprima, 235 mg/mL) como control positivo. Todos los experimentos se realizaron por triplicado en condiciones con ambiente estéril.

RESULTADOS

Caracterización del bagazo de agave. En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en la caracterización del bagazo de agave. Es de destacarse que la fracción correspondiente a hemicelulosas, que representan el 18.6% en peso con respecto al bagazo de agave seco, está formada por pentosanos.

Tabla 1. Caracterización química de bagazo de agave

Componente	% en peso
Cenizas	3.3 \pm 0.2
Extraíbles en acetona	4.2 \pm 1.1
Extraíbles en agua caliente	4.2 \pm 0.8
Lignina	21.5 \pm 2.4
Holocelulosa (celulosa+hemicelulosas)*	66.8 \pm 0.6
Celulosa	48.2 \pm 2.8
Hemicelulosas	18.6 \pm 2.8
Pentosanos	18.7 \pm 0.5

Nota: todos los porcentajes están dados con respecto al peso del bagazo de agave seco. El porcentaje de hemicelulosas se obtuvo por diferencia entre holocelulosa y celulosa.

Análisis de infrarrojo. En la gráfica de la Figura 1 se muestran los espectros obtenidos mediante espectroscopía de FT-IR para las xilanas de agave (AX) sin modificar y modificadas. El espectro indicado con la línea negra corresponde a la muestra AX (xilana de agave sin modificar). Se observa su huella característica en los 1041 cm^{-1} además de la banda en 895 cm^{-1} característica del enlace β -(1 \rightarrow 4) [19, 20]. Por otro lado, en el espectro de la muestra AX-S (línea azul) se observa una banda en los 1735 cm^{-1} correspondiente a grupos carboxilos introducidos en las cadenas de las xilanas luego del proceso de succinilación. El espectro del material conjugado (AX-TA) se aprecia en la línea color rojo, donde se indica una banda en los 1518 cm^{-1} resultado de la conjugación con la tiramina. Estos resultados validan la eficiencia de la metodología para la realización de los procesos de purificación, funcionalización y conjugación de las xilanas de agave.

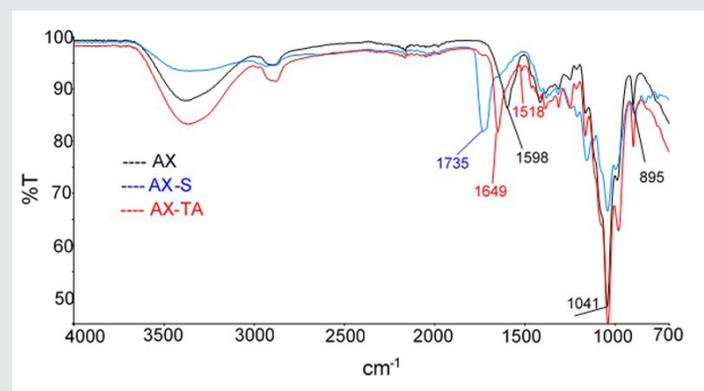


Figura 1.- Espectros FT-IR de las xilanas de agave. AX purificado (línea negra). AX-S succinilado (línea azul). AX-TA conjugado (línea roja).

Hidrogeles de agave con nanopartículas de plata. En la Figura 2 se muestran las características físicas del hidrogel de AX-TA. Los geles formados con y sin AgNO_3 no presentaron diferencias visuales. La Figura 2a es el hidrogel de AX-TA segundos después de agregar el peróxido para su entrecruzamiento. Todos los hidrogeles presentaron la misma coloración amarillosa al inicio. La Figura 2b es la imagen SEM de la sección transversal del gel después de haberlo liofilizado. Todos los geles (con y sin AgNO_3) presentaron las mismas características. Puede apreciarse una formación semejante a un panal de avispas.

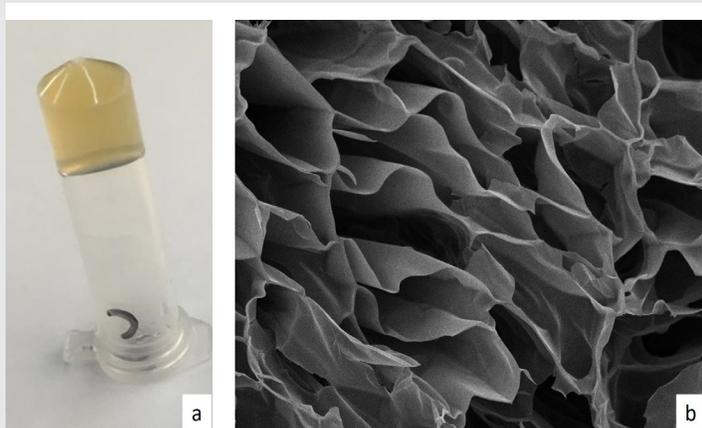


Figura 2.-Hidrogel de AX-TA (a) e Imágen SEM de la sección transversal del hidrogel AX-TA (b).

En la Figura 3 se muestran los hidrogeles cargados con diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (AgNPs). Las xilanas presentan un grupo reductor al final de la cadena, esto hace que el AgNO_3 reaccione, formando así las AgNPs. En la Figura 3 se observa claramente las diferentes coloraciones de los hidrogeles debido a la concentración de AgNPs. Estas coloraciones se obtuvieron a los 15 días de formado el hidrogel. Como confirmación de la presencia de AgNPs, se hizo un barrido por UV-Vis desde 300-1000 nm y se observó una banda entre 350 y 450 nm, característica de las AgNPs [15]. La banda fue muy pronunciada para los hidrogeles a 10mM mientras que para los de menor concentración apenas fue perceptible.

Pruebas antibacterianas. En la Figura 4 se muestran los discos de xilanas de agave con y sin AgNPs, se incluyó un disco más, cargado con SXT, como referencia (disco al centro del cultivo). En las Figuras 4a, 4b, 4c y 4d se muestran los cultivos con las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa* respectivamente.

En la Tabla 2 se muestran los diámetros de los halos formados alrededor de los diferentes discos en cada cultivo bacteriano. Se observó que los hidrogeles cargados con 10 mM de AgNPs mostraron efecto antibacteriano en los cultivos con *Staphylococcus aureus* y

Escherichia coli. Los halos formados por los diferentes discos fueron medidos en milímetros.

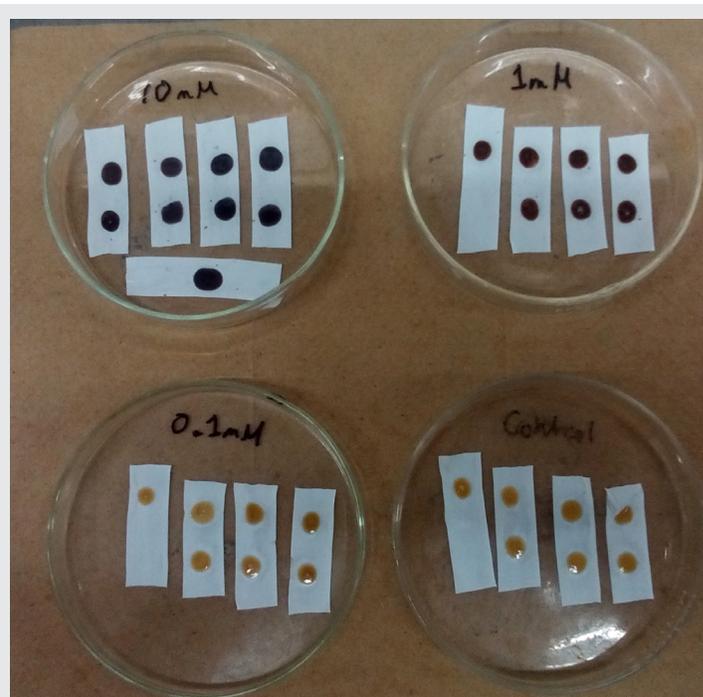


Figura 3.- Discos de hidrogeles cargados con diferentes concentraciones de AgNPs (0.1, 1.0 y 10.0 mM) y discos de hidrogeles solo con AX-TA como control negativo.

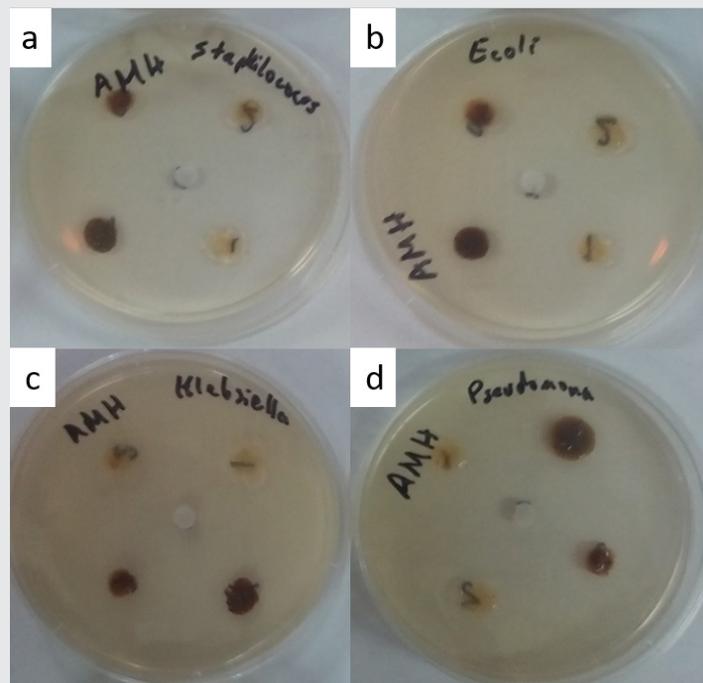


Figura 4.- Discos de hidrogeles en cultivos de bacterias a) *Staphylococcus aureus*, b) *Escherichia coli*, c) *Klebsiella pneumoniae* y d) *Pseudomona aeruginosa*.

Tabla 2. Zona de inhibición de los discos de hidrogeles en los cultivos bacterianos

Cultivo Bacteriano	Diámetro de halo (mm)				
	AgNPs (mM)				
	0	0.1	1	10	SXT
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	12	20	27
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	17	29
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	0	0	0
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	0	0	0	0	0

CONCLUSIONES

El alto contenido de xilanas del bagazo de agave tequilero (19%) es una potencial alternativa para promover el aprovechamiento de este tipo de residuos agroindustriales y promover así el cuidado al medio ambiente. Este residuo, es una fuente con un alto contenido de xilanas que pueden ser utilizados en áreas de la salud, como biomédica, a partir de la modificación química de las cadenas del biopolímero. La síntesis in situ de Ag-NPs se llevó a cabo aprovechando los carbohidratos terminales de las hemicelulosas del agave, los cuales hacen el efecto de reducir la sal de plata en plata metálica con tamaño nanométrico. Las AgNPs sintetizadas in situ mostraron efecto antibacterial, principalmente contra los microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Iñiguez, G., Acosta, N., Martinez, L., Parra, J., and González, O. (2005) Utilización de subproductos de la industria tequilera. Parte 7. Compostaje de bagazo de agave y vinazas tequileras. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 21, 14.
- [2] Palomo-Briones, R., López-Gutiérrez, I., Islas-Lugo, F., Galindo-Hernández, K. L., Munguía-Aguilar, D., Rincón-Pérez, J. A., Cortés-Carmona, M. Á., Alatríste-Mondragón, F., and Razo-Flores, E. (2017) Agave bagasse biorefinery: processing and perspectives. *Clean Technologies and Environmental Policy* 20, 1423-1441.
- [3] Sjöström, E., ed (1993) *Wood chemistry: Fundamentals and applications*, Academic Press, Inc., San Diego.
- [4] Yang, Y. C., Mei, X. W., Hu, Y. J., Su, L. Y., Bian, J., Li, M. F., Peng, F., and Sun, R. C. (2019) Fabrication of antimicrobial composite films based on xylan from pulping process for food packaging. *International journal of biological macromolecules* 134, 122-130.
- [5] Gao, C., Ren, J., Kong, W., Sun, R., and Chen, Q. (2015) Comparative study on temperature/pH sensitive xylan-based hydrogels: their properties and drug controlled release. *RSC Advances* 5, 90671-90681.
- [6] Luo, J., Huang, K., Zhou, X., and Xu, Y. (2020) Hybrid films based on holistic celery nanocellulose and lignin/hemicellulose with enhanced mechanical properties and dye removal. *International journal of biological macromolecules* 147, 699-705.
- [7] García, Y. G., Reynoso, O. G., and Arellano, J. N. (2005) Potencial del bagazo de Agave tequilero para la producción de biopolímeros y carbohidrasas por bacterias celulolíticas y para la obtención de compuestos fenólicos. *e-Gnosis* 3, 18.
- [8] Li, H., Foston, M. B., Kumar, R., Samuel, R., Gao, X., Hu, F., Ragauskas, A. J., and Wyman, C. E. (2012) Chemical composition and characterization of cellulose for Agave as a fast-growing, drought-tolerant biofuels feedstock. *RSC Advances* 2, 4951.
- [9] Escalante, A., Gonçalves, A., Bodin, A., Stepan, A., Sandström, C., Toriz, G., and Gatenholm, P. (2012) Flexible oxygen barrier films from spruce xylan. *Carbohydrate Polymers* 87, 2381-2387.
- [10] Gutierrez-Hernandez, J. M., Escobar-Garcia, D. M., Escalante, A., Flores, H., Gonzalez, F. J., Gatenholm, P., and Toriz, G. (2017) In vitro evaluation of osteoblastic cells on bacterial cellulose modified with multi-walled carbon nanotubes as scaffold for bone regeneration. *Materials science & engineering.C, Materials for biological applications* 75, 445-453
- [11] Liu, X., Song, T., Chang, M., Meng, L., Wang, X., Sun, R., and Ren, J. (2018) Carbon Nanotubes Reinforced Maleic Anhydride-Modified Xylan-g-Poly(N-isopropylacrylamide) Hydrogel with Multifunctional Properties. *Materials (Basel)* 11
- [12] Spasojevic, D., Prokopijevic, M., Prodanovic, O., Zelenovic, N., Polovic, N., Radotic, K., and Prodanovic, R. (2019) Peroxidase-Sensitive Tyramine Carboxymethyl Xylan Hydrogels for Enzyme Encapsulation. *Macromolecular Research* 27, 764-771
- [13] Sun, X.-F., Zhang, T., and Wang, H.-H. (2021) Chapter 6 - Hemicelluloses-based hydrogels. In *Plant and Algal Hydrogels for Drug Delivery and Regenerative Medicine* (Giri, T. K., and Ghosh, B., eds) pp. 181-216, Woodhead Publishing
- [14] Kuzmenko, V., Hagg, D., Toriz, G., and Gatenholm, P. (2014) In situ forming spruce xylan-based hydrogel for cell immobilization. *Carbohydr Polym* 102, 862-868.
- [15] Morales, J., Morán, J., Quintana, M., and Estrada, W. (2009) Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por la ruta Sol-Gel a partir de nitrato de plata *Revista de la Sociedad Química del Perú* 75, 8.
- [16] Wise, L. E., Murphy, Maxine., and D Addieco, Alfred A. (1946) Chlorite holocellulose, its fractionation and beating on summative wood analysis and on studies on the hemicelluloses. *Paper Trade* 122, 210-218.
- [17] Timell, T. E. (1961) Isolation of galactoglucomannans from the wood of gymnosperms. *Tappi* 44, 88-96
- [18] Wu, X. Y., and Lee, P. I. (2000) Preparation and characterization of inulin ester microspheres as

drug carriers. *Applied Polymer Science* 77, 833-840
[19] Xu, F., Yu, J., Tesso, T., Dowell, F., and Wang, D. (2013) Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. *Applied Energy* 104, 801-809.

[20] Fu, G. Q., Zhang, S. C., Chen, G. G., Hao, X., Bian, J., and Peng, F. (2020) Xylan-based hydrogels for potential skin care application. *International journal of biological macromolecules* 158, 244-250.