



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA METROPOLITANA DE PUEBLA**

**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA**

**Evaluación del efecto de nanopartículas de plata (AgNP's) contra bacterias patógenas causantes de enfermedades transmitidas por alimentos**

Tesis presentada para obtener el título de:

**Licenciatura en Químico Farmacobiólogo**

Presenta:

**p.QFB. Yasmín Perlita Muñíz Soperáñez**

**DIRECTOR:**

M.C. Enrique Rodríguez Zitlalpopoca

**ASESOR:**

M.C. Gloria León Tello

Julio 2018

## DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a todos los seres que pasaron por mi vida  
y me dieron su apoyo y palabra de aliento,  
su abrazo, cariño y fuerza para el logro de este proyecto.

## AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a mi Padre amado por darme la vida y por brindarme no solo una oportunidad, sino muchas para poner a prueba mis capacidades llenando de amor mi corazón para no desistir en la conclusión de una etapa más.

Expreso mi profunda gratitud a mis padres por apoyarme en todo momento de forma incondicional, a quienes dedico de forma especial este trabajo. Muchas gracias por creer en mí y apoyarme en todas las circunstancias.

Agradezco de manera incondicional al M.C. Enrique Rodríguez, mi Director de tesis por su siempre disposición para guiarme a lo largo de todo este trabajo. Le agradezco profundamente por brindarme sus consejos, llenarme de motivación y persistencia para ser cada vez mejor. Es usted una persona que admiro mucho y siempre tendré presente su apoyo incondicional.

Agradezco de todo corazón a la M.C. Gloria León, mi Asesora de tesis, por estar siempre pendiente de mi, por brindarme su confianza, teniendo mucha bondad conmigo, ha sido una experiencia muy bonita trabajar con usted y un trato que no puedo describir pero que siempre le agradeceré. Es usted una persona excepcional.

Doy gracias a mis profesores M.S.P. Carlos Cabrera, M.C. Edith Díaz y M.C. Laura, antes que todo estoy muy feliz de que hayan sido mi Comisión revisora, guardo un profundo afecto para cada uno de ustedes.

Externo mi más profunda gratitud a la Doctora Ale Tovar, por abrirme las puertas y financiar en gran medida este proyecto, usted es una persona a la cual admiro mucho.

Agradezco a todos y cada uno de mis amigos, tanto profesores como alumnos que conocí en la UPMP, guardo para cada uno de ustedes un cariño muy especial, me han enseñado muchas cosas, siendo personas muy amables, talentosas y admiro su desarrollo profesional.

Agradezco inmensamente a mis hermanos, ellos siempre fueron mi motivación. Los quiero infinitamente y así como ustedes creyeron en mí, yo siempre creo en ustedes.

Por último pero no menos importante agradezco a todos mis amigos y seres queridos, que siempre han estado conmigo y sin importar la distancia, el lugar y el tiempo, permanecen en mi corazón.

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>X</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1. Enfermedades transmitidas por alimentos</b> .....	<b>2</b>
<b>2.2. Bacterias patógenas transmitidas por alimentos</b> .....	<b>3</b>
<b>2.3. Listeria monocytogenes</b> .....	<b>3</b>
2.3.1.Mecanismo de patogenicidad .....	4
2.3.2.Fuentes de aislamiento de <i>L. monocytogenes</i> .....	4
2.3.3.Brotes de Listeria.....	4
<b>2.4. Escherichia coli</b> .....	<b>5</b>
<b>2.5. Escherichia coli enterohemorrágica</b> .....	<b>5</b>
2.5.1.Fuente de aislamiento de EHEC.....	6
2.5.2.Brotes de EHEC .....	6
<b>2.6. Importancia de la inocuidad alimentaria</b> .....	<b>6</b>
2.6.1.Operaciones sanitarias básicas .....	7
<b>2.7. Desinfectantes de uso común</b> .....	<b>8</b>
2.7.1.Resistencia microbiana a los desinfectantes.....	9
<b>2.8. Nanotecnología y nanopartículas</b> .....	<b>10</b>
<b>2.9. AgNP's</b> .....	<b>11</b>
2.9.1.Mecanismo de acción de las AgNP's .....	12
2.9.2.Síntesis de AgNP's .....	12
2.9.3.Síntesis biotecnológica de AgNP's con <i>Agave potatorum</i> .....	13
2.9.4.Las AgNP's en la industria alimentaria.....	14
2.9.5.Alcances y limitaciones del uso de las AgNP's como agentes desinfectantes.....	14
<b>2.10. Métodos para la evaluación de la actividad antimicrobiana</b> .....	<b>15</b>
2.10.1. Métodos cualitativos .....	15
2.10.2. Métodos cuantitativos .....	16
<b>3. MARCO DE REFERENCIA</b> .....	<b>18</b>
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>22</b>
<b>5. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>23</b>
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
<b>7. HIPÓTESIS</b> .....	<b>25</b>
<b>8. DISEÑO DE ESTUDIO</b> .....	<b>26</b>
<b>9. MATERIALES Y METODOLOGÍA</b> .....	<b>28</b>
<b>9.1. Descripción de las AgNP's</b> .....	<b>28</b>
<b>9.2. Identificación de las cepas</b> .....	<b>28</b>

<b>9.3. Comparación del efecto antibacteriano de las AgNP's y sus precursores .....</b>	<b>29</b>
<b>9.4. Determinación de la CMI de las AgNP's.....</b>	<b>29</b>
<b>9.5. Determinación de la CBM de las AgNP's .....</b>	<b>29</b>
<b>9.6. Determinación del tiempo mínimo de contacto de las AgNP's .....</b>	<b>30</b>
<b>10. RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
<b>10.1. Identificación de las cepas .....</b>	<b>35</b>
<b>10.2. Ensayos del efecto antibacteriano de las AgNP's y sus precursores.....</b>	<b>35</b>
<b>10.3. CMI.....</b>	<b>36</b>
<b>10.4. CBM.....</b>	<b>37</b>
<b>10.5. TMC.....</b>	<b>39</b>
<b>10.6. Análisis estadístico.....</b>	<b>41</b>
<b>10.7. Discusión.....</b>	<b>42</b>
<b>11. CONCLUSIONES.....</b>	<b>45</b>
<b>11.1. Perspectivas: .....</b>	<b>46</b>
<b>12. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>47</b>

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b><i>A. potatorum</i></b>	<i>Agave potatorum</i>
<b>AgNP's</b>	Nanopartículas de plata
<b>AgNP'sAc</b>	Nanopartículas de plata en medio acuoso
<b>AgNP'sEt</b>	Nanopartículas de plata en medio etanólico
<b><i>B. cereus</i></b>	<i>Bacillus cereus</i>
<b><i>B. subtilis</i></b>	<i>Bacillus subtilis</i>
<b>CAMP</b>	Christie–Atkins–Munch–Petersen
<b>CLSI</b>	Clinical & Laboratory Standards Institute
<b>CBM</b>	Concentración bactericida mínima
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b><i>E. faecium</i></b>	<i>Enterococcus faecium</i>
<b>EFSA</b>	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
<b>EHEC O157:H7</b>	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica serotipo O157:H7
<b>ETA's</b>	Enfermedades transmitidas por alimentos
<b>APPCC</b>	Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico
<b><i>K. pneumoniae</i></b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>LIA</b>	Lysine Iron Agar ; Lisina-hierro-agar
<b>McF</b>	MacFarland
<b>MET</b>	Microscopía electrónica de transmisión
<b>MIO</b>	Motility Indol Ornithine; Movilidad-indol-ornitina
<b><i>M. luteus</i></b>	<i>Micrococcus luteus</i>
<b>MTCC</b>	Microbial Type Culture Collection
<b>MTT</b>	Methyl Tetrazolium; Sales de tetrazolio
<b>NCIM</b>	National Collection of Industrial Microorganisms
<b>NP's</b>	Nanopartículas
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud

<b>OPS</b>	Organización Panamericana de la Salud
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. fragi</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>
<i>P. vulgaris</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<b>QACs</b>	Compuestos de amonio cuaternario
<i>S. agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<b>SIM</b>	Sulfide Indol Motility; Movilidad-indol-sulfuro
<b>SUH</b>	Síndrome urémico hemolítico
<b>TMC</b>	Tiempo mínimo de contacto
<b>TSI</b>	Triple Sugar Iron; Triple azúcar hierro
<b>UFC/mL</b>	Unidades formadoras de colonias por mililitro
<i>V. cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<b>VT1</b>	Verotoxina 1
<b>VT2</b>	Verotoxina 2
<b>µg/mL</b>	Microgramos por mililitro

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Mecanismo de acción de los desinfectantes sobre la estructura bacteriana.....	9
<b>Tabla 2.</b> Bacterias Gram positivas y Gram negativas resistentes a los desinfectantes .....	10
<b>Tabla 3.</b> CBM de AgNP's acuosas en <i>L. monocytogenes</i> y EHEC O157:H7 .....	37
<b>Tabla 4.</b> CBM de AgNP's etanólicas en <i>L. monocytogenes</i> y EHEC O157:H7 .....	37
<b>Tabla 5.</b> Radio CBM/CMI de AgNP'sAc y AgNP'sAgNP'sEt en <i>L. monocytogenes</i> y EHEC O157:H7 .....	38
<b>Tabla 6.</b> TMC de AgNP'sAc y AgNP'sEt en <i>L. monocytogenes</i> y EHEC O157:H7, <sup>a</sup> valor no determinado .....	41



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> . Mecanismo de patogenicidad de <i>L. monocytogenes</i> . .....	4
<b>Figura 2.</b> Sistema APPCC.....	7
<b>Figura 3.</b> Tipos de nanopartículas metálicas y sus aplicaciones biotecnológicas.....	11
<b>Figura 4.</b> Comparativa del crecimiento bacteriano (UFC/mL) contra los precursores de las AgNP's.....	36
<b>Figura 5.</b> Determinación de la CMI de AgNP'sAc y AgNP's Et en <i>L. monocytogenes</i> y EHEC O157:H7 .....	36
<b>Figura 6.</b> Determinación de la CBM de AgNP'sAc y AgNP's Et en <i>L. monocytogenes</i> y EHEC O157:H7 .....	38
<b>Figura 7.</b> Viabilidad de <i>L. monocytogenes</i> y EHEC O157:H7 en contacto con AgNP'sAc a lo largo del tiempo. ....	39
<b>Figura 8.</b> Viabilidad de <i>L. monocytogenes</i> y EHEC O157:H7 en contacto con AgNP'sEt a lo largo del tiempo. ....	40
<b>Figura 9.</b> Diagrama de cajas simple con relación al crecimiento de EHEC O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i> en contacto con AgNP'sAc y AgNP'sEt a la CBM determinada. ....	41

## RESUMEN

Las ETA's son un problema de salud pública que afecta cada año a casi 1 de cada 10 habitantes a nivel mundial. Un proceso indispensable para la prevención de las ETA's es la desinfección; sin embargo, se han reportado casos de resistencia bacteriana a desinfectantes de uso común, por lo que es necesario desarrollar nuevos agentes antimicrobianos para su empleo en superficies en contacto con los alimentos. La nanotecnología es una herramienta útil para la obtención de nuevos materiales como las AgNP's cuyas propiedades antimicrobianas están siendo ampliamente estudiadas.

Para comprobar el posible efecto bacteriostático o bactericida de las AgNP's sobre *L. monocytogenes* y EHEC O157:H7, se comparó el efecto antibacteriano de las AgNP's y sus precursores AgNO<sub>3</sub> y extracto de *A. potatorum* en solución acuosa y etanólica por el método de macrodilución y vertido en placa. Posteriormente, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI), la concentración bactericida mínima (CBM) y el tiempo mínimo de contacto (TMC) de soluciones de AgNP's en extractos de *A. potatorum* acuoso y etanólico por el método de macrodilución y vertido en placa. La CMI se obtuvo por macrodilución, mientras que la CBM y el TMC se determinaron por vertido en placa, utilizando un inóculo inicial de  $5 \times 10^5$  UFC/mL de *L. monocytogenes* y EHEC O157:H7. Los resultados obtenidos mostraron que las AgNP'sAc tuvieron un efecto bacteriostático contra *L. monocytogenes* y un efecto bactericida en EHEC O157:H7, mientras que las AgNP'sEt presentaron un efecto bactericida en ambas bacterias, contribuyendo a su potencial desarrollo como agente desinfectante en superficies en contacto con los alimentos.

## 1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, las enfermedades transmitidas por alimentos representan un serio problema de salud pública. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que cada año enferman 600 millones de personas (casi 1 de cada 10 habitantes) por ingerir alimentos contaminados y 420 000 mueren por esta misma causa. En el año 2010, en México se registraron casi 5 millones de casos de infecciones intestinales, siendo la población infantil el grupo con mayor incidencia. Ante esta situación, es de suma importancia llevar a cabo medidas de higiene que garanticen la inocuidad de los alimentos. La higiene de los alimentos comprende las condiciones y medidas necesarias para la producción, elaboración, almacenamiento y distribución de los alimentos, destinadas a garantizar un producto inocuo, en buen estado y comestible, apto para el consumo humano. Por tanto, la inocuidad de los alimentos es un elemento prioritario que involucra la salud pública, el bienestar de la población y la economía de todos los países.

Desde hace algunos años, se ha generado una preocupación de carácter epidemiológico debido a la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos. Investigaciones recientes indican que algunas bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) han adquirido resistencia a los desinfectantes de uso común, tales como triclosán y compuestos de amonio cuaternario. Ante esta situación, ha surgido un interés hacia la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos que sean amigables con el medio ambiente y no tóxicos para su uso potencial como desinfectantes. Una herramienta útil para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos es la nanotecnología, cuyo objetivo es el diseño de materiales a escala nanométrica. Debido a esta característica en sus dimensiones, los nanomateriales poseen propiedades electrónicas, magnéticas, químicas, ópticas y catalíticas significativamente mejores que los materiales macroscópicos a partir de los cuales son diseñados. A través de la síntesis de nanopartículas, ha surgido una gran variedad de aplicaciones como biosensores, catalizadores, anticancerígenos, agentes antimicrobianos y como medios para la administración dirigida de fármacos. En los últimos años, se ha reportado la propiedad antimicrobiana de una diversidad de nanopartículas metálicas, tales como oro, zinc, platino y otros elementos. Dentro de estos metales, la plata es la mayormente conocida por sus propiedades antimicrobianas desde la antigüedad. Por ello, resulta de gran interés evaluar la actividad antibacteriana de estas nanopartículas.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Enfermedades transmitidas por alimentos

La OMS en conjunto con la OPS definen a las ETA's como un conjunto de síntomas causados por la ingestión de agua y/o alimentos que estén contaminados con agentes biológicos (bacterias, virus y parásitos) o no biológicos (plaguicidas o metales pesados) en dosis tales que afectan la salud del consumidor en forma aguda o crónica, a nivel individual o colectivo (OPS/OMS, 2001). Sus síntomas más comunes son diarrea y vómito, pero también se pueden presentar otros como choque séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble, entre otros. A largo plazo, algunas de estas enfermedades pueden conducir a otros padecimientos crónicos como daños renales, artritis, meningitis, aborto y en casos extremos, la muerte (Kopper *et al.*, 2009). Hasta la fecha se han descrito más de 250 ETA's, la mayoría son infecciones ocasionadas por bacterias como *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter* y *Escherichia coli* O157:H7 (Ebel *et al.*, 2016).

De acuerdo a informes recientes de la OMS, se estima que cada año enferman 600 millones de personas (casi 1 de cada 10 habitantes) por ingerir alimentos contaminados y dentro de este grupo 420 000 mueren por esta misma causa (OMS, 2015).

En México, las enfermedades diarreicas son una de las principales causas de morbimortalidad, desnutrición y por lo general, son consecuencia de la exposición a alimentos o agua contaminados. De acuerdo a la **Secretaría de Salud, en 2010** se registraron casi 5 millones de casos de infecciones intestinales, siendo la población infantil el grupo con mayor incidencia en el rango correspondiente entre 1 a 9 años y menores de un año. Según datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, la prevalencia más alta de diarreas fue en niños menores de cinco años (ENSANUT, 2012; Secretaría de Salud, 2015).

Las ETA's constituyen un importante problema de salud pública debido al incremento en el número de casos, al surgimiento de nuevas formas de transmisión, la aparición de grupos de población vulnerables, el aumento en la resistencia de microorganismos patógenos a los compuestos antimicrobianos y el impacto socioeconómico que ocasionan (Flores y Herrera, 2005).

Por otra parte, la presencia de ETA's es un indicador directo de la falta de inocuidad de los alimentos y se ha demostrado que la contaminación de éstos puede ocurrir durante su procesamiento o por el empleo de materia prima contaminada, pues algunas bacterias patógenas para el hombre constituyen la microbiota de aves, cerdos y ganado. Por ello, el

sector que se ocupa de la producción, elaboración, manipulación y distribución de los alimentos cumple un papel fundamental en el aseguramiento de la inocuidad alimentaria (Millemann *et al.*, 2000; Flores y Herrera, 2005; Kopper *et al.*, 2009).

## **2.2. Bacterias patógenas transmitidas por alimentos**

En la actualidad, existe una lista de microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) que se han identificado como causantes de ETA's; sin embargo, las bacterias son los agentes etiológicos más frecuentes (Fernández, 2000). Además, se ha observado que las bacterias patógenas emergentes como *Listeria monocytogenes*, algunos serovares de *Salmonella* (*S. typhimurium* y *S. enteritidis*), *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* y *Escherichia coli* O157:H7 han prevalecido durante los últimos veinte años, por lo que resulta de gran importancia su estudio (Fernández, 2000).

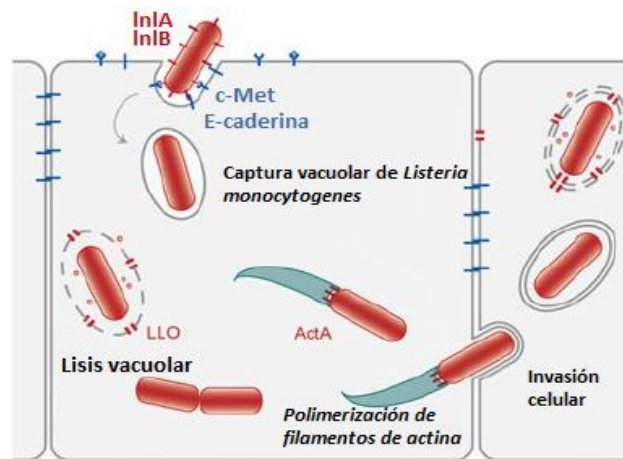
## **2.3. *Listeria monocytogenes***

Son bacilos cortos Gram positivos de 0.4-0.5  $\mu\text{m}$  x 0.5-2  $\mu\text{m}$  no esporulados, se presentan aislados o en cadenas cortas y con menor frecuencia en filamentos largos. Su temperatura óptima de crecimiento es a 37 °C, pero posee movilidad a temperaturas entre 20-25°C. Son anaerobios facultativos, quimioorganotróficos, oxidasa negativos y positivos a las pruebas de catalasa, urea, hipurato de sodio e hidrólisis de esculina. También es positivo a la prueba de CAMP (beta-hemolítico) y fermenta manitol, xilosa y ramnosa (Ferreira *et al.*, 2014). En agar soya tripticaseína con extracto de levadura se observan colonias iridiscentes al hacer incidir luz blanca a 45° (iluminación de Henry). En agar Oxford modificado se observan colonias negras con halo negro sobre la superficie clara del medio, el ennegrecimiento del medio es debido a la hidrólisis de esculina. En medio SIM, *Listeria monocytogenes* presentan movilidad con forma de paraguas (MacFaddin, 2003).

*Listeria monocytogenes* es un patógeno oportunista causante de listeriosis humana y animal. Afecta principalmente a personas inmunosuprimidas como embarazadas, recién nacidos y ancianos, causando los siguientes síntomas: fiebre, cefaleas, náuseas, diarrea, vómito y fotofobia, y en casos severos puede causar meningitis, septicemia, endocarditis, encefalitis y en embarazadas es muy probable el aborto. Por otra parte, la listeriosis animal afecta comúnmente a borregos, cabras, bovinos, porcinos y aves. Los síntomas de éstos, incluye encefalitis, mastitis, parálisis muscular y aborto en hembras preñadas (Fernández, 2000).

### 2.3.1. Mecanismo de patogenicidad

Su mecanismo de patogenicidad es de tipo intracelular, migrando de una célula huésped a otra mediante la polimerización de la actina (Apurba y Sandhya, 2015). Tal como se observa en la figura 1, la bacteria produce una toxina hemolítica y citotóxica, la listeriolisina O, la cual le permite sobrevivir dentro de los macrófagos. Esta hemolisina rompe las membranas de los fagolisosomas e inhibe el procesamiento del antígeno mediado por los macrófagos (Forbes *et al.*, 2004; Madigan *et al.*, 2012).



**Figura 1.** Mecanismo de patogenicidad de *L. monocytogenes* (Modificado de Cabrita *et al.*, 2014).

El mecanismo de patogenicidad de *Listeria monocytogenes* se divide en cuatro etapas: internalización, evasión de la vacuola intracelular, nucleación de filamentos de actina y expansión de célula a célula (Cabrita *et al.*, 2014).

### 2.3.2. Fuentes de aislamiento de *L. monocytogenes*

*L. monocytogenes* es una bacteria omnipresente y común en el medio ambiente. Se aísla de ecosistemas relacionados con el procesado de alimentos, de animales terrestres o acuáticos y de animales para el consumo humano. Se encuentra en los productos lácteos no pasteurizados, así como vegetales, carnes y pescado y en diversos alimentos preparados, siendo capaz de crecer a temperaturas de refrigeración. Aparentemente, su hábitat primario es la tierra y la materia vegetal, en donde persiste como saprófito (Fernández, 2000).

### 2.3.3. Brotes de *Listeria*

La mayoría de los brotes de *Listeria* se han registrado en Estados Unidos y gran parte de los países europeos (Fernández, 2000). El brote más reciente fue en 27 estados europeos en el 2013, de acuerdo a la EFSA (Buchanan *et al.*, 2017). En México no existen datos exactos sobre la incidencia de la listeriosis ya que la información con la que se cuenta es insuficiente.

Al respecto, en una revisión de 1982 a 2006 se notificaron 14 casos. Entre los pacientes afectados se incluían neonatos, niños inmunocomprometidos y adultos con cirrosis hepática y enfermedad del tejido conectivo (Castañeda-Ruelas, 2014).

#### **2.4. Escherichia coli**

Es una bacteria comensal predominante en la microbiota de los seres humanos. Son bacilos Gram negativos cuyas dimensiones son de 1.1-1.5  $\mu\text{m}$  x 2.0-6.0  $\mu\text{m}$ , presente en parejas o aislada. Su temperatura óptima de crecimiento es 37 °C. Muchas cepas poseen cápsulas o microcápsulas. Su movilidad es por flagelos peritricos o pueden ser inmóviles. Son anaerobios facultativos, quimioorganotróficos y fermentadores de lactosa. Son positivos a las pruebas de catalasa, indol y rojo de metilo, pero son negativos a la oxidasa, citrato, urea y producción de ácido sulfhídrico. Además, presentan la enzima ornitina descarboxilasa y lisina descarboxilasa (MacFaddin, 2003).

Aunque *E. coli* está identificada como una bacteria comensal, existen cepas patógenas, las cuales se clasifican en varias categorías, basándose en la toxina que producen y en la enfermedad que causan, ya sea a nivel intestinal o extraintestinal (Madigan *et al.*, 2012; Kaper *et al.*, 2004). Actualmente, las cepas patógenas entéricas de *E. coli* se dividen en siete patotipos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* adherente invasiva (AIEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Croxen *et al.*, 2013). De forma específica, el patotipo EHEC se caracteriza por causar diarrea con sangre a nivel del intestino grueso (colitis hemorrágica) y en casos más graves produce SUH, el cual se caracteriza por la presencia de anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda (Kaper *et al.*, 2004).

#### **2.5. Escherichia coli enterohemorrágica**

EHEC es productora de dos potentes citotoxinas conocidas como verotoxinas (VT1 y VT2), las cuales son liberadas en el colon e inducen la respuesta inflamatoria del huésped mediante una lesión de adherencia/borrado (lesión A/E) a las células del epitelio intestinal. Además, estas toxinas dañan las células endoteliales del glomérulo al producir la vasoconstricción de los capilares glomerulares debido a la oclusión por plaquetas y fibrina, desencadenando insuficiencia renal en el SUH (Tang *et al.*, 2015).

Existen cerca de 400 serotipos identificados; sin embargo, el serotipo O157:H7 es el más comúnmente identificado. Este serotipo es similar a *E. coli* comensal, a excepción de que no fermenta el sorbitol, no produce la enzima  $\beta$ -glucuronidasa y es incapaz de desarrollarse a una temperatura superior a 42 °C (Fernández, 2000).

### **2.5.1. Fuente de aislamiento de EHEC**

La fuente de aislamiento más frecuente son las muestras fecales de pacientes con diarrea (Fernández, 2000). Dentro de la industria láctea y cárnica es de importancia debido a que el ganado bovino es el principal reservorio y, por lo tanto, EHEC puede estar presente en la carne y leche cruda. *E. coli* O157:H7 está frecuentemente asociada con el consumo de carne de res y sus derivados, como carne molida y salchichas, vegetales crudos (alfalfa, rábanos, espinacas, lechuga, zanahoria) así como jugos de frutas pasteurizados de forma inadecuada (Croxen *et al.*, 2013; Fernández, 2000).

### **2.5.2. Brotes de EHEC**

Los brotes más frecuentes por cepas patógenas de *E. coli* se reportan en países desarrollados como Estados Unidos, Canadá y países de Europa (Fernández, 2000). En el 2011, se reportó un brote por EHEC serotipo O104:H4 en Alemania relacionado con el consumo de germen de cereal (Radosavljevic *et al.*, 2014). Hasta el momento, no existen reportes en México de cuadros de colitis hemorrágica o SUH relacionados con el aislamiento de EHEC O157: H7, o algún otro serotipo; sin embargo, se ha visto relacionada con diarrea de tipo secretor leve o moderada (UNAM, 2011).

## **2.6. Importancia de la inocuidad alimentaria**

La inocuidad de los alimentos constituye un aspecto fundamental de salud pública y calidad a nivel mundial, debido a las ETA's, así como la creciente demanda en el abastecimiento de productos alimentarios (OMS, 2015).

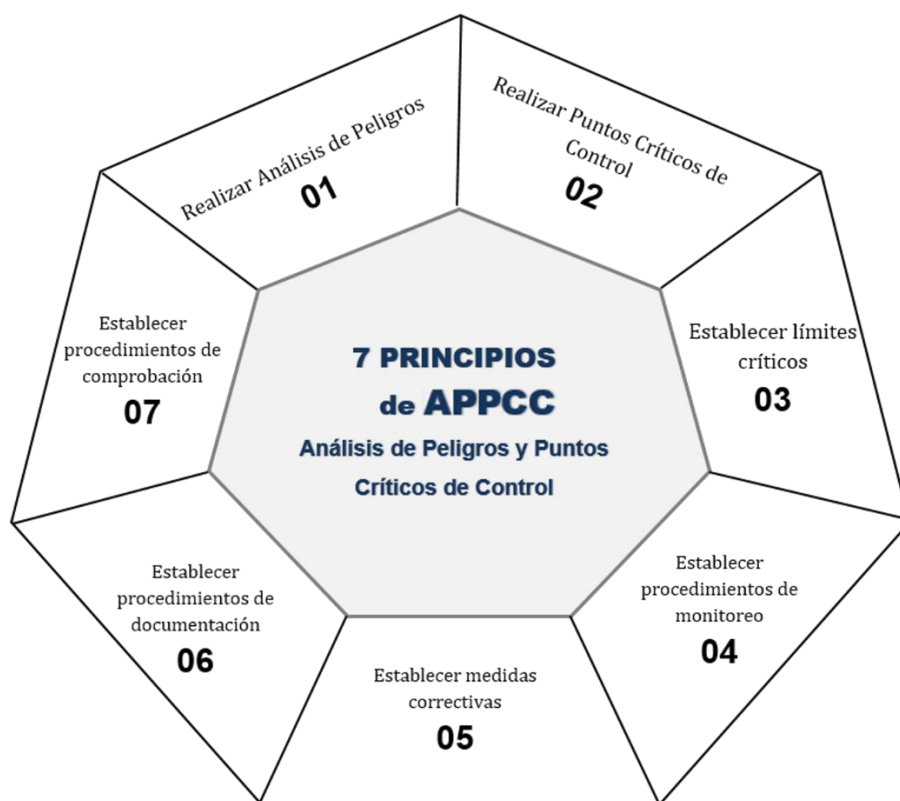
La inocuidad alimentaria se define como la ausencia de agentes nocivos a la salud o a la integridad de las personas, sean físicos, químicos o biológicos en el alimento (Fernández, 2000). Asimismo, se concibe como un atributo fundamental de la calidad que debe estar presente a lo largo de toda la cadena de producción, puesto que, muchos de los problemas de inocuidad de los alimentos tienen su origen desde la producción primaria y se transfiere a otras fases como el procesamiento, el empaque, el transporte y aún la preparación del producto y su consumo (Kopper *et al.*, 2009; Colombia, 2013).



El suministro de alimentos inocuos no sólo contribuye a la seguridad alimentaria y nutricional, al bienestar social y a la preservación de la salud, además fortalece las economías nacionales, el comercio, el turismo y sirve de fundamento para el desarrollo sostenible (OMS, 2015).

### 2.6.1. Operaciones sanitarias básicas

La higiene es un aspecto básico en cualquier sector de producción alimentaria. El propósito de la implementación de un sistema de higiene es eliminar cualquier microorganismo patógeno sobre las superficies de contacto con el alimento. Las Buenas Prácticas de Fabricación y el sistema APPCC se han establecido para controlar la calidad y la inocuidad de los alimentos (ver figura 2). Este sistema debe basarse en un plan de acción con varias etapas que incluyen operaciones de limpieza y desinfección (Hui *et al.*, 2003).



**Figura 2.** Sistema APPCC. Cualquier empresa involucrada en la manufactura, procesamiento o manejo de productos alimenticios puede usar este sistema para minimizar o eliminar peligros de seguridad alimentaria en sus productos (Tomado de Seguridad Alimentaria Global, 2017).

#### 2.6.1.1. Limpieza y desinfección

La limpieza consiste en la remoción física de materia orgánica o extraña de una superficie, usualmente con agua y detergente (Marriot y Gravani, 2006).

Es necesario llevar a cabo un adecuado proceso de limpieza para asegurar una desinfección eficaz, debido a que algunos productos residuales podrían inactivar el agente desinfectante eliminando su efecto biocida (Lelieveld *et al.*, 2016). La mayoría de los productos químicos limpiadores empleados en la industria alimentaria son los compuestos alcalinos, actuando como detergentes capaces de romper las proteínas por su acción saponificadora debido a la presencia de los grupos hidroxilo (Marriott y Gravani, 2006).

La desinfección consiste en la destrucción de microorganismos patógenos, por medios físicos o químicos, aunque no garantiza la eliminación de las esporas bacterianas (US FDA, 2012). La acción biocida de los productos desinfectantes depende del tipo de superficie, las sustancias interferentes, la temperatura, la carga microbiana, el tipo de microorganismo, la concentración del desinfectante, el tiempo de contacto y el pH del desinfectante; sin embargo, la limpieza previa de las superficies facilita el contacto directo de los desinfectantes con los microorganismos (Marriott y Gravani, 2006).

### **2.7. Desinfectantes de uso común**

Los desinfectantes se clasifican de acuerdo a su grupo químico en alcoholes, aldehídos, compuestos de amonio cuaternario, compuestos halogenados, derivados de metales pesados y biguanidas (ver tabla 1) (Sánchez y Sáenz, 2015). Los desinfectantes utilizados en la industria alimentaria y establecimientos de comida varían en su eficacia debido a factores como tiempo de exposición, temperatura, concentración, pH, limpieza del equipo, dureza del agua y capacidad de adherencia bacteriana (formación de biopelículas). De acuerdo con Marriott y Gravani, 2006 y Fontecha y Rodríguez, 2015, un desinfectante ideal debe tener las siguientes propiedades:

- Capacidad de destrucción microbiana (amplio espectro antimicrobiano).
- No debe transmitir olores ni sabores extraños a los alimentos.
- Amplia acción bactericida de efecto prolongado a las condiciones de uso (tiempo de contacto, pH, temperatura, carga bacteriana).
- Estable frente a residuos orgánicos y aguas duras.
- Propiedades no tóxicas y no irritantes.
- No alterar las superficies a tratar (no corrosivo).
- Respetar el medio ambiente, facilidad de manejo, bajo costo y
- No generar resistencia.

**Tabla 1.** Mecanismo de acción de los desinfectantes sobre la estructura bacteriana

Estructura bacteriana	Desinfectante utilizado	Mecanismo de acción
Pared celular	Aldehídos Compuestos aniónicos	Interactúa con grupos $-NH_2$ Produce lisis celular a concentraciones altas
Membrana externa	Alcoholes	Produce daño a la membrana mediante la desnaturalización de proteínas.
Membrana externa	Aldehídos	Produce entrecruzamiento de proteínas, ARN y ADN.
Membrana interna	Biguanidas	Daño a la membrana y desnaturalización de proteínas.
Membrana interna	Compuestos de amonio cuaternario	Daño a la membrana
Enzimas de unión a la membrana, proteínas	Derivados de metales pesados	Interacción con los grupos tiol.
ADN	Halogenados	Inhibición de la síntesis de ADN Oxidación de los grupos tiol a disulfuros, sulfóxidos y disulfóxidos.
Enzimas y proteínas	Peroxígenos	Oxidación de grupos tiol en enzimas y proteínas.

Fuente: Sánchez-Saldaña y Sáenz, 2015

### 2.7.1. Resistencia microbiana a los desinfectantes

El efecto antimicrobiano frente a los desinfectantes es distinto debido a que los microorganismos poseen estructuras celulares diferentes. Como resultado, la resistencia a los agentes antimicrobianos puede ser una propiedad natural del microorganismo, denominada resistencia intrínseca. De forma comparativa, la resistencia adquirida por la mutación o transmisión de plásmidos (ADN extracromosómico, autorreplicable) o transposones (cassettes de ADN transmisibles) se conoce como resistencia extrínseca (Andreoletti *et al.*, 2008). A continuación, se muestran los casos de resistencia hasta ahora reportados de *E. coli*

O157:H7 y *L. monocytogenes* contra desinfectantes de uso en la industria alimentaria (ver tabla 2).

**Tabla 2.** Bacterias Gram positivas y Gram negativas resistentes a los desinfectantes

<b>Bacteria</b>	<b>Desinfectante</b>	<b>Tipo de Resistencia</b>	<b>Mecanismo de resistencia</b>	<b>Fuente</b>
<i>E. coli</i> O157:H7	Hipoclorito de sodio	Extrínseca	Producción de proteínas de choque térmico ( <i>dnaK</i> , <i>grpE</i> y <i>lon</i> )	Lisle <i>et al.</i> , 1998
<i>E. coli</i> O157:H7	Oxicloro	Extrínseca	Formación de biopelícula por expresión del plásmido pO157.	Wang <i>et al.</i> , 2016
<i>L. monocytogenes</i>	QAC*	Extrínseca	Expresión del plásmido pLM80	Elhanafi <i>et al.</i> , 2010

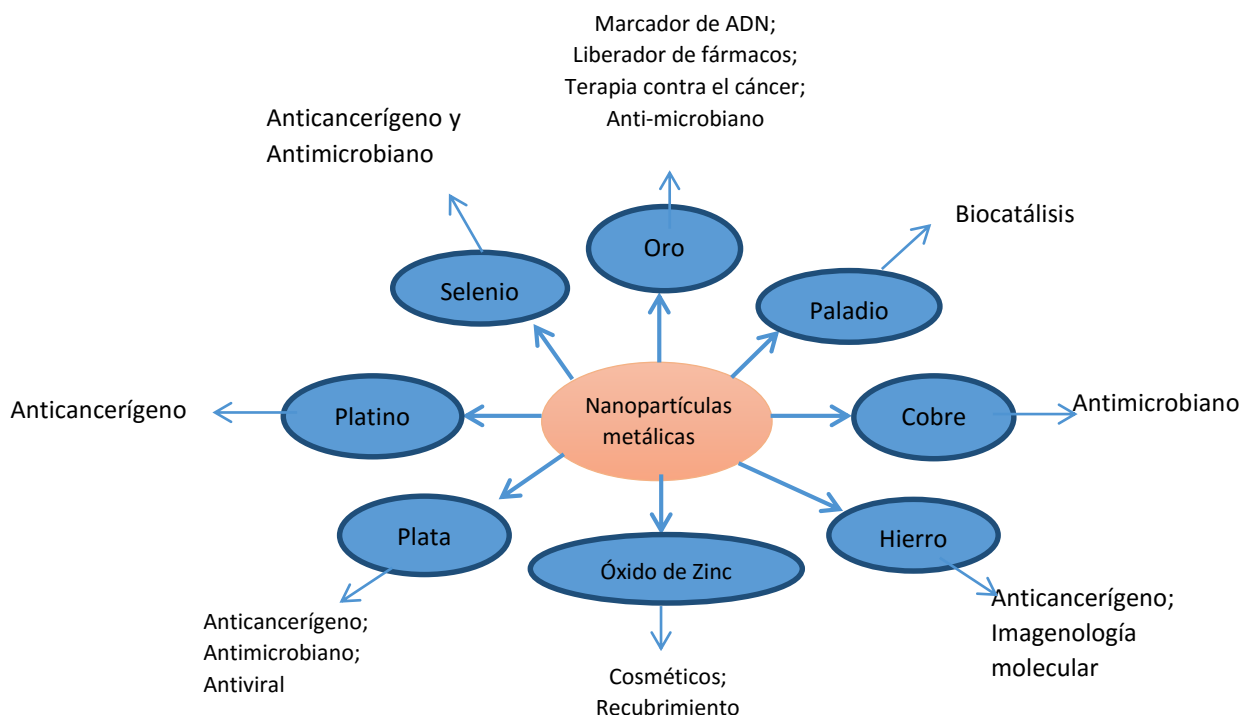
Algunos autores han reportado resistencia contra *P. aeruginosa*, *S. aureus* y diferentes serotipos de *Salmonella* spp, por mencionar algunos (Bragg *et al.*, 2014; Beier *et al.*, 2011; Meyer y Cookson, 2010; Braoudaki y Hilton, 2005). \*Compuestos de amonio cuaternario

## 2.8. Nanotecnología y nanopartículas

La nanotecnología se define como un área multidisciplinaria dedicada al diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas a escala nanométrica (Royal Society, 2004). Se denominan nanomateriales a aquellos materiales que miden entre 1 y 100 nm en al menos una de sus dimensiones (Schmid, 2011). En específico, NP's son nanomateriales que poseen menos de 100 nm en todas sus dimensiones y es debido a esta característica que presentan una extensa variedad de aplicaciones, ya que las nanopartículas poseen propiedades electrónicas, magnéticas, químicas, ópticas y catalíticas

significativamente mejores que los materiales macroscópicos a partir de los cuales son diseñados (Zhang *et al.*, 2013).

A través de la síntesis de nanopartículas, ha surgido una gran variedad de aplicaciones como biosensores, catalizadores, anticancerígenos, agentes antimicrobianos y como medios para la administración dirigida de fármacos (ver figura 3) (Zhang *et al.*, 2013).



**Figura 3.** . Tipos de nanopartículas metálicas y sus aplicaciones biotecnológicas (Mittal *et al.*, 2013)

Actualmente, se ha logrado la síntesis de nanopartículas metálicas a partir de elementos como el oro, plata, cobre, plomo, titanio, zinc, paladio, platino y otros metales pesados (Mittal *et al.*, 2013; Nath y Banerjee, 2013). El principal interés de las nanopartículas metálicas se les atribuye a las propiedades antimicrobianas que poseen (Pal *et al.*, 2007; Dizaj *et al.*, 2014).

### 2.9. AgNP's

La plata ha sido utilizada como agente antimicrobiano desde tiempos antiguos. En la Antigua Roma y Grecia, la plata era empleada para el control de las infecciones, heridas y potabilización del agua (Mikhalovsky y Khajibaev, 2011). Se ha documentado que la plata posee un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos y virus (Li *et al.*, 2008). Debido a las propiedades conocidas de este metal, las AgNP's han sido las más estudiadas y las mayormente conocidas por sus aplicaciones en el área médica y en la

industria alimentaria y textil. Actualmente, se ha observado que las AgNP's presentan una fuerte actividad bactericida contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo bacterias multirresistentes (Panáček *et al.*, 2009). En estudios recientes, se ha comprobado que las nanopartículas de plata eliminan bacterias a bajas concentraciones ( $\mu\text{g/mL}$ ) sin causar toxicidad en el ser humano (Panáček *et al.*, 2009).

### **2.9.1. Mecanismo de acción de las AgNP's**

Las nanopartículas de plata tienen mayor afinidad hacia las proteínas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas que contienen azufre y fósforo, alterando funciones celulares importantes como la permeabilidad, osmoregulación, respiración celular y la cadena de transporte de electrones (Durán *et al.*, 2016). Se han postulado diferentes mecanismos de acción para la propiedad antimicrobiana de las nanopartículas de plata. Se ha sugerido que la adhesión de las nanopartículas a la superficie de la membrana celular altera la permeabilidad de ésta, mediante la degradación de las moléculas de lipopolisacárido, la acumulación de las nanopartículas de plata en el interior de la membrana y la formación de "orificios" (Li *et al.*, 2008). Además, se ha propuesto que los iones plata ( $\text{Ag}^+$ ) interaccionan con los puentes disulfuro y se unen fuertemente al grupo sulfhidrilo de las enzimas y proteínas bacterianas, causando la alteración de los procesos metabólicos y finalmente, la muerte celular (Dizaj *et al.*, 2014). Asimismo, se sugiere que las nanopartículas de plata liberan cationes, con lo cual se incrementa su efecto biocida (Liu *et al.*, 2010).

### **2.9.2. Síntesis de AgNP's**

Existe una diversidad de métodos físicos, químicos y biotecnológicos para la obtención de AgNP's. Los métodos físicos más utilizados son ablación con láser y condensación de gas inerte. Ambas técnicas se consideran una alternativa de "técnica verde" ya que se emplea energía para la obtención de AgNP's; sin embargo, los principales inconvenientes es que son métodos de alto costo, se requieren de una cantidad alta de energía por unidad de AgNP's producidas y existe un escaso control sobre la tasa de crecimiento de las mismas (Nath y Banerjee, 2013).

Hay una variedad de métodos químicos como síntesis hidrotérmal y solvotérmal, método sol-gel, método coloidal y reducción química, los cuales son ampliamente utilizados por la obtención de AgNP's homogéneas, estables y en un tiempo relativamente corto, pero, por

otra parte, el uso de solventes orgánicos conlleva a la generación de residuos tóxicos (Romero-Blázquez *et al*, 2016; Zanella, 2012)

La síntesis biotecnológica de nanopartículas consiste en una reacción de óxido-reducción donde los agentes biológicos reductores son enzimas microbianas o compuestos fotoquímicos de plantas y algas con propiedades antioxidantes o reductoras. La síntesis microbiológica de nanopartículas tiene la facilidad de producir nanopartículas a macroescala sin causar un impacto ambiental nocivo; sin embargo, la producción de microorganismos a menudo es más costosa que la producción mediante extractos de plantas, además requieren de un tiempo más largo debido al proceso de incubación al cual deben ser sometidos, esto con la finalidad de una mayor eficiencia en la reducción de iones metálicos. (Mittal *et al.*, 2013; Romero-Blázquez *et al*, 2016).

Las características más relevantes para el empleo de plantas en la síntesis de nanopartículas radican en la fácil disponibilidad, además de ser consideradas por ser grandes acumuladoras de metales (como el lirio acuático, que es empleado para el tratamiento de aguas contaminadas), son seguras de manejar y además poseen una amplia variedad de metabolitos que pueden ayudar a la conformación de las AgNP's, algunos de estos compuestos son terpenoides, flavonoides, cetonas, aldehídos, amidas y ácidos carboxílicos según los estudios de espectroscopia infrarroja (IR). Para la producción de AgNP's utilizando extractos de plantas, el extracto vegetal es puesto en agitación con una solución de sal metálica a temperatura ambiente. La reacción se completa en minutos. La naturaleza del extracto de la planta, la concentración del extracto, la concentración de la sal metálica, el pH, la temperatura y el tiempo de contacto se sabe que afectan la tasa de producción de las nanopartículas, su estabilidad y otras características (Mittal *et al.*, 2013; Romero-Blázquez *et al*, 2016).

### **2.9.3. Síntesis biotecnológica de AgNP's con *Agave potatorum***

El extracto de *A. potatorum* posee propiedades antioxidantes que le permiten actuar como un bioreductor natural de los iones de plata  $Ag^+$  para formar nanopartículas metálicas  $Ag^0$ . Para obtención de los extractos vegetales se emplean hojas basales de *A. potatorum* cultivadas de 6 años de edad, éstas son lavadas, cortadas y trituradas. El triturado vegetal es sometido a una reacción de reflujo con solventes no tóxicos como agua y etanol. Posteriormente el extracto es filtrado, almacenado y se realiza el análisis fitoquímico para la identificación de los metabolitos presentes. Para la síntesis de AgNP's se emplea una solución de  $AgNO_3$  a

una concentración de 1 mM, posteriormente se agrega el extracto de *A. potatorum* y se mantienen en agitación constante, a 65°C en oscuridad. La muestra es sometida a un tratamiento térmico de 65 °C, con agitación constante y en oscuridad. Se toman alícuotas en diferentes tiempos para la cinética de formación de las nanopartículas, tomando en cuenta el vire de color en el momento de la reacción (iniciando con un color verde a un color marrón) y los volúmenes del extracto. El cambio de color de verde a marrón es debido a la interacción con los metabolitos bioreductores presentes en el extracto acuoso y etanólico, durante la reacción, este vire se intensifica al pasar el tiempo. El cambio de color evidencia la reducción de los iones de  $Ag^+$  a  $Ag^0$ , generando la nucleación y la consecuente formación de AgNP's. La presencia de AgNP's obtenidas a partir de extractos de *A. potatorum* en medio acuoso y etanólico, se puede corroborar por espectrofotometría UV-Vis, MET en donde se observa la presencia de partículas aproximadamente esféricas de un tamaño entre 1-40 nm (Romero-Blázquez *et al.*, 2016; Tovar-Corona *et al.*, 2017; Moreno-Luna *et al.*, 2016).

#### **2.9.4. Las AgNP's en la industria alimentaria**

Se han encontrado diversas aplicaciones de las nanopartículas de plata en paneles de refrigeradores y frigoríficos, así como en recipientes de almacenamiento, líneas de envasado y otras superficies destinadas a estar en contacto con los alimentos como tablas de cortar, bajo el sustento de conservar los alimentos por más tiempo mediante la inhibición del crecimiento microbiano (Esparza *et al.*, 2015; Chaudhry *et al.*, 2008).

#### **2.9.5. Alcances y limitaciones del uso de las AgNP's como agentes desinfectantes**

La fabricación de AgNP's puede ser por métodos físicos, químicos o biológicos. En el caso de los métodos químicos, se llevan a cabo procesos de reducción química, técnicas electroquímicas y fotoquímicas. La ventaja de este método es que se obtienen dispersiones coloidales estables de la forma y el tamaño deseados; sin embargo, el empleo de productos químicos como agentes reductores o agentes estabilizantes, resultan potencialmente tóxicos para el medio ambiente y los sistemas biológicos (Das y Velusamy, 2013; Flores, 2014).

En vista de la sostenibilidad ambiental, existe una necesidad urgente de desarrollar procesos de síntesis verde de nanopartículas. La síntesis verde de AgNP's implica tres pasos principales, que incluyen (a) la selección del medio disolvente, (b) la selección de agentes reductores ecoamigables, y (c) la selección de sustancias no tóxicas para la estabilidad de las AgNP's. A diferencia de los métodos químicos y físicos, la síntesis verde de AgNP's tiene



la ventaja de su obtención a partir de materia prima renovable, en un tiempo relativamente corto y con un costo de producción económico, haciendo su desarrollo sustentable y viable. Por lo tanto, la síntesis biológica de AgNP's ha tenido mayor relevancia en los últimos años (Das y Velusamy, 2013).

Otra de las características de mayor interés en la aplicación de AgNP's, es la baja probabilidad para desarrollar resistencia bacteriana en comparación con otros agentes antimicrobianos (QAC's, triclosán) (Flores, 2014).

Dentro de las limitaciones para el uso y desarrollo de las AgNP's está su relación con la toxicidad propia de las sales de plata. A este respecto, se ha reportado la aparición de argiria, enfermedad caracterizada por una coloración gris en piel y ojos, en heridas abiertas tratadas con concentraciones excesivas de Ag. Por otra parte, en investigaciones que involucran estudio de cultivos celulares como células hepáticas humana, células HeLa y fibroblastos, se considera que las AgNP's son tóxicas ya que provocan daños en la respiración celular y ciclos de división celular. En otros estudios se sugiere que, por sus dimensiones y propiedades físicas y químicas, las AgNP's pueden generar daños en el medioambiente debido a su acumulación; sin embargo, debido a la variabilidad en su concentración, tiempo de exposición, tamaño y forma de las AgNP's, este tema continúa en debate (Flores, 2014).

## **2.10. Métodos para la evaluación de la actividad antimicrobiana**

El manual de CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) establece procedimientos estándar para determinar la sensibilidad bacteriana de agentes antimicrobianos. Los métodos de evaluación se clasifican en cualitativos, como la técnica de difusión en disco y cuantitativos como la dilución en caldo o agar (CLSI M100-S22, 2012). Para la adición del inóculo bacteriano, el CLSI recomienda la preparación de un estándar 0.5 McFarland ( $1-2 \times 10^8$  UFC/mL) para la técnica de difusión en disco y un estándar equivalente a  $5 \times 10^5$  UFC/mL para la dilución en caldo o agar (Henry, 2005).

### **2.10.1. Métodos cualitativos**

Se denominan métodos cualitativos a aquellos procedimientos que permiten clasificar directamente a un organismo como sensible o resistente (Taroco *et al.*, 2006).

### **2.10.1.1. Método de difusión en disco**

Esta técnica consiste en colocar discos de papel filtro que contienen una concentración conocida del agente antimicrobiano sobre una placa de agar previamente inoculada con una suspensión de bacterias de aproximadamente  $1-2 \times 10^8$  UFC/mL. De acuerdo con el diámetro de inhibición alrededor del disco, se determina si la bacteria es sensible o resistente (CLSI M02-A11, 2012). La ventaja de este método es la posibilidad de evaluar múltiples agentes antimicrobianos y concentraciones a la vez frente a uno o varios microorganismos; sin embargo, la utilización de la técnica dependerá siempre de la difusión del agente en el medio (Flores, 2014).

### **2.10.2. Métodos cuantitativos**

Los métodos cuantitativos son aquellos procedimientos que permiten determinar la CMI y la CBM (Taroco *et al.*, 2006).

#### **2.10.2.1. Concentración mínima inhibitoria**

Se denomina CMI a la concentración más baja de un agente antimicrobiano que impide el crecimiento visible de un microorganismo en una prueba de sensibilidad de dilución en agar o caldo (CLSI M07-A9, 2012).

La metodología más común para la determinación de la CMI es la que utiliza diluciones seriadas al medio (por Ej. 1, 2, 4, 8, 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , etc.). También existen otros esquemas de dilución, que utilizan hasta dos concentraciones, concentraciones "Breakpoint" o que agregan concentraciones entre las que se ensayan normalmente (por Ej. 4, 6, 8, 12, 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Cuando se produce inhibición del crecimiento con la menor concentración utilizada, el verdadero valor de la CMI no se puede determinar exactamente y debe informarse como igual o menor que dicha concentración. Cuando se ensayan concentraciones adicionales entre las usuales y la CMI es una de esas concentraciones intermedias, la interpretación de la prueba se debe hacer después de redondear el valor a la próxima superior dilución al medio del esquema normal (por Ej. una CMI de 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se debe redondear a 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y luego interpretar) (CLSI M07-A9, 2012).

### **2.10.2.2. Concentración bactericida mínima**

Se define como CBM a la mínima concentración de un agente antimicrobiano que, en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inducir la muerte in vitro del 99.9% de una población bacteriana previamente estandarizada (Taroco *et al.*, 2006).

### **2.10.2.3. Método de dilución del agar**

Esta técnica se utiliza para determinar la sensibilidad antimicrobiana. El agente antimicrobiano se incorpora dentro del medio con agar, de tal manera que cada placa contenga distintas concentraciones del agente antimicrobiano. Los inóculos de los distintos microorganismos se aplican rápida y simultáneamente sobre la superficie del agar utilizando replicadores. La mayoría de los replicadores transfieren de 32 a 36 inóculos por placa (CLSI M07-A9, 2012).

### **2.10.2.4. Macrodilución**

La técnica de macrodilución se basa en la determinación del crecimiento del microorganismo a distintas concentraciones del agente antimicrobiano, el cual se diluye en tubos de ensayo con caldo. En cada tubo se obtiene un volumen final de 2 mL que corresponde a 1 mL de la dilución de agente antimicrobiano y 1 mL de la suspensión bacteriana estandarizada (CLSI M07-A9, 2012).

Para el caso de la microdilución, se adicionan volúmenes pequeños de caldo en una microplaca de 96 pocillos, ya que cada pocillo tiene un volumen final de 100  $\mu$ L (CLSI M07-A9, 2012).

### **2.10.2.5. Vertido en placa**

Este método se utiliza para cuantificar microorganismos viables o UFC presentes en un gramo o mililitro de muestra. A partir de la muestra, se preparan diluciones decimales seriadas, después se deposita un volumen de cada dilución en diferentes placas con agar fundido, se homogeneizan y se dejan gelificar. Posterior al tiempo de incubación, se cuentan las colonias visibles y el valor se reporta en unidades formadoras de colonias por volumen de muestra (UFC/mL) (Jay *et al.*, 2005). Después de la incubación, se observan el crecimiento de las placas y se seleccionan las que sean representativas. Se consideran placas representativas aquellas que tienen un número de colonias dentro del rango de sensibilidad del método (25-200 UFC/g, UFC/mL) (Yousef y Carlstrom, 2006).

### 3. MARCO DE REFERENCIA

Panáček *et al.*, 2006 reportaron estudios de AgNP's contra varias cepas resistentes a antibióticos: *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* resistente a meticilina, *S. aureus* resistente a meticilina, *E. faecium* resistente a vancomicina y *K. pneumoniae* productora de BLEE. En este trabajo se determinó la CMI y la CBM de las AgNP's por la técnica de microdilución y se observó que a concentraciones de 1.69 µg/mL se logró presentar un efecto bacteriostático y bactericida.

Ruparelia *et al.*, 2008, utilizaron la técnica de difusión en disco para evaluar la actividad antibacteriana de AgNP's entre *E. coli*, *B.subtilis* y *S. aureus* y además determinaron la CMI y la CBM de las AgNP's por cultivo discontinuo (culture-batch). En el ensayo de difusión en disco, se observaron diámetros de inhibición de 15 mm, 11 mm y 16 mm para *E. coli*, *B.subtilis* y *S. aureus*, respectivamente. Por otra parte, en la determinación de la CMI, *E.coli* presentó la mayor sensibilidad (40 µg/mL) a las AgNP's a comparación de *B.subtilis* (120 µg/mL) y *S. aureus* (120 µg/mL). De igual manera, para la CBM se obtuvieron resultados similares (*E.coli*, 60 µg/mL, *B.subtilis*160 µg/mL y *S.aureus*160 µg/mL). De esta manera, los autores concluyeron que las AgNP's presentaron actividad antimicrobiana.

En 2010, Krishnaraj *et al.*, reportaron la CMI de AgNP's sintetizadas a partir de extracto de hojas de cupamení de la India (*Acalypha indica*) contra *E. coli* y *V. cholerae* a través del método de viabilidad celular MTT. Este mismo ensayo se realizó y se comparó con el nitrato de plata. La CMI para *E. coli* y *V. cholerae* fue de 10 µg/mL para las AgNP's y de 20 µg/mL para el nitrato de plata, por lo que se demostró que las AgNP's presentaron mayor actividad antimicrobiana que el nitrato de plata.

También, Lara *et al.*, 2010, determinaron la CMI y la CBM de las AgNP's contra las siguientes cepas resistentes: *S. aureus* resistente a meticilina, *E. coli* O157:H7 resistente a ampicilina y *P. aeruginosa* multirresistente, así como, cepas sensibles (*S.aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*) utilizando la técnica de microdilución. La CMI para las seis cepas probadas fue de 30 mM y la CBM de 100 mM. De acuerdo a los resultados obtenidos, no hubo una diferencia significativa de la CMI y CBM entre las cepas resistentes y sensibles, por lo cual las AgNP's probadas mostraron una actividad antimicrobiana eficaz.

Greulich *et al.*, 2012, compararon el efecto antimicrobiano de AgNP's contra *E. coli* y *S. aureus* utilizando la técnica de macrodilución. Este mismo ensayo se realizó y se comparó con el acetato de plata; sin embargo, debido a la turbidez de las AgNP's solo fue posible

determinar las CMI y CBM del acetato de plata (CMI, 0.5 ppm y CBM, 1.25 ppm; para *E. coli* y *S. aureus*).

Nabikhan et al, 2010, utilizaron la técnica de difusión en disco para evaluar la actividad antibacteriana de AgNP's obtenidas a partir de extracto de verdolaga de playa (*Sesuvium portulacastrum*) entre *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *M. luteus* y *K. pneumoniae*. En el ensayo de difusión en disco, se observaron diámetros de inhibición de 18 mm, 22 mm, 20 mm, 13 mm y 12 mm e forma respectiva para las bacterias evaluadas.

De manera similar, Petrus et al, 2011 realizaron por macrodilución la CMI y la CBM de AgNP's frente a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhi*, *S. aureus*, *B. cereus*, EHEC O157:H7, *V. parahaemolyticus* y *Vibrio cholerae*. De acuerdo a los resultados, la CMI fue de 7.74-24.58 µg/mL, mientras que la CBM fue mayor a 100 µg/mL para las siete cepas evaluadas.

Para el año 2013, Das y Velusamy determinaron la actividad antimicrobiana de AgNP's sintetizadas a partir de extracto de hojas de romero (*Rosmarinus officinalis*) contra cepas de *P. aeruginosa* y *S. aureus* por el método de dilución en caldo. Los autores reportaron que las AgNP's inhibieron el crecimiento de *P. aeruginosa* en un 95.52% y *S. aureus* en un 62.73% a una concentración de 20 µg/mL. A partir de estos resultados, fue posible concluir que las AgNP's poseen un efecto antimicrobiano contra patógenos de interés clínico.

De forma similar, Zhang et al., 2013 reportaron estudios de la capacidad inhibitoria de AgNP's sintetizadas a partir de extracto de hojas de sábila (*Aloe vera*) contra cepas de *E. coli* y *S. aureus* por el método de difusión en disco. Para este ensayo se utilizó extracto de *Aloe vera* y gentamicina (40 UI/mL) como control positivo. En los resultados no se reporta el diámetro de inhibición de la gentamicina, pero al comparar el diámetro de inhibición de las AgNP's (7.5 mm para *S. aureus* y 8.0 mm para *E. coli*) con el extracto de *Aloe vera* (6.1 mm para *S. aureus* y 8.0 mm para *E. coli*) Zhang et al., demostraron que las AgNP's presentaban una mayor actividad antimicrobiana sobre *S. aureus* y *E. coli* con respecto al extracto de *Aloe vera*.

En 2014, Agnihotri et al., utilizaron la técnica de difusión en disco para comparar la actividad antibacteriana de AgNP's entre las cepas *E. coli* MTCC 443 y *S. aureus* NCIM 5201. Además, realizaron curvas de cinética de muerte bacteriana para la obtención de la CMI y la CBM, utilizando un control positivo (medio de cultivo + AgNP's sin inóculo) y un control negativo (medio de cultivo + inóculo sin AgNP's). En dicho estudio, se observó que el

diámetro de inhibición máximo fue de 12.4 mm para *E. coli*, los resultados para *S. aureus* no se reportaron. Respecto al ensayo de cinética de muerte, los autores obtuvieron la CMI y la CBM para *E. coli* MTCC 443 (30 y 40 µg/mL) y para *S. aureus* (80 y 100µg/mL). Con esto, se concluyó que la actividad antibacteriana de las AgNP's es dependiente del tiempo, forma y tamaño de las nanopartículas.

Zarei *et al.*, 2014 determinó la CMI, la CBM y el TMC de AgNP's de la marca comercial NanoCid L200® para *S. typhimurium*, *V. parahaemolyticus*, *L. monocytogenes* y EHEC O157:H7, reportando la CMI en un rango de 3.12-6.25 µg/mL, mientras que la CBM fue la misma para las 4 bacterias evaluadas (6.25 µg/mL). Por otra parte, el TMC obtenido fue de 5 horas para *Vibrio parahaemolyticus*, de 6 horas para *S. typhimurium* y EHEC O157:H7 y de 7 horas para *L. monocytogenes*.

Ibrahim, 2015 comparó la actividad antibacteriana de AgNP's sintetizadas con extracto de cáscara de plátano (*Musa paradisiaca*) entre *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli* utilizando la técnica de difusión en capilar en placas con agar nutritivo. El autor utilizó como control positivo nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>) a las mismas concentraciones que las AgNP's. Los resultados obtenidos mostraron que el diámetro de inhibición de las AgNP's (12-20 mm) fue significativamente mayor que el del AgNO<sub>3</sub> (10-17 mm), por lo que Ibrahim concluyó que las AgNP's presentaban una mayor actividad antibacteriana con respecto a la sal de plata.

Ravichandran *et al.*, 2016 investigaron la actividad antimicrobiana de AgNP's sintetizadas con extracto de hojas del árbol del pan (*Atrocarpus altilis*) contra *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* por la técnica de difusión en capilar utilizando estreptomicina (20 µg/mL) y extracto de *Atrocarpus altilis* (50 µg/mL) como controles. De acuerdo a los resultados, los diámetros de inhibición en promedio para las tres cepas fueron: 5 mm, 7 mm y 9 mm para el extracto de *Atrocarpus altilis*, AgNP's y la estreptomicina respectivamente, por lo que se demostró la capacidad inhibitoria de las AgNP's.

Recientemente, Lekshmi *et al.*, 2017, reportaron el efecto antimicrobiano de AgNP's sintetizadas con extracto de ajo y cebolla (*Allium* sp.) por la técnica de difusión en disco contra *E.coli*, *Proteus* sp., *Klebsiella* sp., *Staphylococcus* sp., *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp. Y *Pseudomonas* sp. El diámetro promedio de inhibición de las AgNP's fue de 12 mm, observándose una buena actividad antimicrobiana frente a las siete cepas.

Asimismo, Sarsar *et al.*, 2017, compararon la eficacia antimicrobiana de AgNP's sintetizadas con extracto de hojas de mango (*Mangifera indica*) contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. fragi*, *B. subtilis*, *S. agalactiae* y *P. vulgaris* por la técnica de difusión en capilar. En este estudio se observó que el diámetro de inhibición de las AgNP's para las seis cepas probadas fue de 14 mm, por lo cual se logró comprobar que las AgNP's presentaban capacidad inhibitoria frente a bacterias Gram positivas y negativas, así como géneros bacterianos diferentes.

De manera similar, Shivakumar *et al.*, 2017, evaluaron la actividad antimicrobiana de AgNP's sintetizadas con extracto de madera de eucalipto (*Eucalyptus*) por la técnica de difusión en capilar contra cepas resistentes de *S. aureus* (MTCC-7443), *E. coli* (MTCC-7410) y *P. aeruginosa* (MTCC-7903) utilizando amoxicilina como control. El diámetro de inhibición de las AgNP's para las tres cepas probadas fue de 17 mm y el de la amoxicilina fue de 18 mm. A partir de estos resultados, fue posible concluir que las AgNP's poseen un efecto antimicrobiano y además un posible uso terapéutico.

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La desinfección de superficies en contacto con los alimentos es indispensable para el control de la inocuidad alimentaria y prevención de las ETA's; sin embargo, se ha observado que algunas bacterias patógenas aisladas de superficies alimentarias han adquirido resistencia al desinfectante utilizado después del proceso de desinfección. Al mismo tiempo, se ha reportado la presencia de bacterias con mecanismos de resistencia cruzada entre antibióticos y desinfectantes. Ante este problema emergente, surge la necesidad de estudiar nuevos compuestos con propiedades antimicrobianas para su aplicación como desinfectantes en superficies de contacto con los alimentos. Un posible agente desinfectante son las AgNP's, ya que se ha descrito en diversos estudios que las nanopartículas metálicas poseen propiedades antimicrobianas. Por todo lo anterior, se plantean la siguientes pregunta:

- 1) ¿Las AgNP's poseerán actividad antimicrobiana contra EHEC O157:H7 y *L. monocytogenes* y cuál será la CMI, la CBM y el TMC requerido para estas dos bacterias?



## 5. JUSTIFICACIÓN

Ante la aparición de bacterias resistentes a los desinfectantes de uso común, surge la necesidad de buscar nuevos compuestos antimicrobianos capaces de eliminar cepas patógenas en superficies inertes que además cumpla con las características de ser un desinfectante ideal, esto es, no tóxico, económico y sin impacto ambiental.

El uso de desinfectantes con base de plata es muy frecuente, puesto que se conocen las propiedades antimicrobianas de la plata desde la antigüedad. Además, este metal posee un amplio espectro contra bacterias, hongos y levaduras, virus y protozoos y es poco común la aparición de microorganismos resistentes.

El desarrollo de un desinfectante a base de nanopartículas de plata es una alternativa para la desinfección de superficies alimentarias, ya que sería posible la destrucción de microorganismos sin causar efectos tóxicos en los seres vivos y en el ambiente y, además, se ha observado que las nanopartículas de plata actúan como mecanismos de liberación continua de iones plata.

La presente investigación servirá para evaluar la actividad antimicrobiana de nanopartículas de plata contra dos de las principales bacterias patógenas asociadas a ETA's y cuantificar su dosis de aplicación mediante la obtención de la CMI para determinar si es posible su aplicación como desinfectante en superficies de contacto con alimentos.

## 6. OBJETIVOS

### General

Evaluar la actividad antibacteriana de las AgNP'sAc y AgNP'sEt obtenidas de *A. potatorum* contra *L. monocytogenes* y EHEC O157:H7 mediante la cuantificación del crecimiento bacteriano (UFC/mL) para su posible uso como desinfectante de superficies alimentarias.

### Específicos

- Comparar el efecto antibacteriano de las AgNP's con sus precursores (AgNO<sub>3</sub> y extractos de *A. potatorum* en solución acuosa y etanólica) mediante la técnica macrodilución y vertido en placa para comprobar el efecto antibacteriano de las AgNP's.
- Determinar la CMI de las AgNP's mediante las técnicas de macrodilución para evaluar la actividad bacteriostática de las nanopartículas de plata.
- Determinar la CBM de las AgNP's mediante las técnicas de vertido en placa para evaluar la actividad bactericida de las nanopartículas de plata.
- Determinar el TMC de las AgNP's para actuar como bacteriostático y bactericida a través de las técnicas de macrodilución y vertido en placa.

## 7. HIPÓTESIS

**Hipótesis nula:** Las AgNP's de extracto *A. potatorum* en solución acuosa y etanólica, no poseen actividad bactericida contra EHEC O157:H7 y *L. monocytogenes*.

**Hipótesis alternativa:** Las AgNP's de extracto *A. potatorum* en solución acuosa y etanólica poseen actividad bactericida contra EHEC O157:H7 y *L. monocytogenes*.

## 8. DISEÑO DE ESTUDIO

### a) Tipo de estudio:

Estudio transversal, prospectivo, comparativo y descriptivo

### b) Universo de estudio:

Cepas de *L. monocytogenes* ATCC 7644 y EHEC O157:H7 aislada de muestra clínica

### c) Tamaño de la muestra:

Nanopartículas de plata obtenidas de *A. potatorum* en solución acuosa y solución etanólica a una concentración de 107 µg/mL.

### d) Sede y Lugar de estudio:

Laboratorio de Microbiología de la UPMP y Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP.

### e) Criterios de selección:

**Criterios de inclusión:** Cepas de *L. monocytogenes* ATCC 7644 y EHEC O157:H7 aislada de muestra clínica, AgNP's en obtenidas de *A. potatorum* en solución acuosa (AgNP'sAc) y solución etanólica (AgNP'sEt).

**Criterios de exclusión:** Cepas que no son *L. monocytogenes* ATCC 7644 o EHEC O157:H7 aislada de muestra clínica, nanopartículas de otro metal diferente a la plata (nanopartículas de cobre, zinc, platino, etc.) que no son obtenidas de *A. potatorum*, nanopartículas en estado sólido o liofilizadas.

### f) Recursos humanos:

- 1) Director: M.C. Enrique Rodríguez Zitlalpopoca
- 2) Asesor: M.C. Gloria León Tello
- 3) Tesista: pQFB. Yasmín Perlita Muñiz Soperáñez

### g) Recursos financieros:

Los recursos para la presente investigación serán proporcionados por la D.C. Alejandra Tovar Corona, responsable del Laboratorio de Investigación de Nanobiotecnología Aplicada de la UPMP, así como por el M.C. Gloria León Tello, responsable del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas, BUAP.

**h) Diseño de estudio:**

Se utilizará estadística descriptiva y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para la comparación de los valores de la CMI, CBM y tiempo mínimo de contacto de las cepas de *L. monocytogenes* y EHEC O157:H7.

## 9. MATERIALES Y METODOLOGÍA

Para la realización de este estudio se utilizaron AgNP's con una concentración de 107 µg/mL en solución acuosa y etanólica. Se emplearon cepas de EHEC O157:H7 y *L. monocytogenes*. Las soluciones de AgNP's fueron proporcionadas por el Laboratorio de Investigación de Nanobiotecnología Aplicada, las cepas bacterianas fueron otorgadas por el cepario del Laboratorio de Microbiología de la UPMP y caracterizadas en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas BUAP. La metodología que se llevó a cabo se describe a continuación y está resumida en el diagrama general de trabajo (Jay *et al.*, 2005).

### 9.1. Descripción de las AgNP's

Las AgNP's utilizadas para este trabajo fueron obtenidas a partir de *A. potatorum* y AgNO<sub>3</sub>, las cuales se encuentran en una solución acuosa y etanólica, tienen un color marrón oscuro, el cual es atribuido a la reacción de reducción de los iones de Ag<sup>+</sup> a Ag<sup>0</sup>. El tamaño de las nanopartículas oscila entre los 10-40 nm y presentan una morfología aproximadamente esférica. Asimismo, se ha reportado que los extractos acuosos y etanólicos de *A. potatorum*, caracterizados por análisis fitoquímico, contienen metabolitos que funcionan a la vez como agentes reductores y estabilizantes, encontrándose que las AgNP'sAc contienen fenoles, saponinas, carbohidratos y esteroides y las AgNP'sEt poseen flavonoides, fenoles, saponinas, carbohidratos y esteroides (Romero-Blázquez *et al.*, 2016; Tovar-Corona *et al.*, 2017; Moreno-Luna *et al.*, 2016).

### 9.2. Identificación de las cepas

Para la identificación fenotípica de las cepas se hizo tinción de Gram, prueba de catalasa y oxidasa, en el caso de *L. monocytogenes*, ésta se cultivó en los medios Oxford, PALCAM, cromogénico, bilis esculina, gelosa sangre carnero, se realizó la prueba de CAMP y se inoculó por picadura en medio TSI y en medio SIM. Para la identificación bioquímica de EHEC O157:H7 se hizo siembra en medio MacConkey con lactosa, MacConkey con sorbitol, agar cromogénico y se inoculó por picadura en medio TSI, MIO, LIA, citrato y urea. Posteriormente se hizo una resiembra de las cepas en medios nutritivos para la obtención de cultivos puros. Para la conservación de las cepas se utilizó caldo adicionado con glicerol al 20% y se mantuvo a -20°C.

### **9.3. Comparación del efecto antibacteriano de las AgNP's y sus precursores**

Para demostrar el efecto de AgNP's y descartar la acción de los precursores, se comparó el efecto antibacteriano de la sal de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), los extractos vegetales de *A. potatorum* en solución acuosa y etanólica y las AgNP's obtenidas por dichos precursores. Las cepas de prueba (*L. monocytogenes* y EHEC O157:H7) se cultivaron en caldo infusión cerebro corazón a 37°C, 24 horas antes de los ensayos. Se preparó un estándar 0.5 McFarland ( $1.0 \times 10^8$  UFC/mL) de las cepas y se mantuvo en contacto 30 minutos con los precursores:  $\text{AgNO}_3$  (107  $\mu\text{g/mL}$ ), extracto acuoso y etanólico de *A. potatorum*, AgNP'sAc (107  $\mu\text{g/mL}$ ) y AgNP'sEt (107  $\mu\text{g/mL}$ ). Posteriormente se realizaron 6 diluciones decimales seriadas. De cada dilución se tomó un mililitro y se sembró en agar Mueller-Hinton por vertido en placa, se incubó a 37 °C durante 24 horas. Se realizó el mismo procedimiento para el control de crecimiento de *L. monocytogenes* y EHEC O157:H7. Después de la incubación se hizo el recuento bacteriano (UFC/mL).

### **9.4. Determinación de la CMI de las AgNP's**

Previo al ensayo, se hizo una resiembra de las cepas en agar soya tripticaseína y se mantuvo en incubación a 37 °C, 24 horas. Para la obtener la CMI se hicieron diluciones seriadas a la mitad del agente antimicrobiano de prueba (AgNP's107  $\mu\text{g/mL}$ ) y se preparó un estándar bacteriano equivalente a  $5 \times 10^5$  UFC/mL para cada cepa bacteriana. La metodología está basada en la técnica de macrodilución o dilución en tubo. El valor de la CMI corresponde al tubo con la concentración más baja de AgNP's donde no se haya observado crecimiento visible, es decir, ausencia de turbidez debido a la inhibición completa de las bacterias (CLSI M07-A9, 2012) (Esquemas 1 y 2).

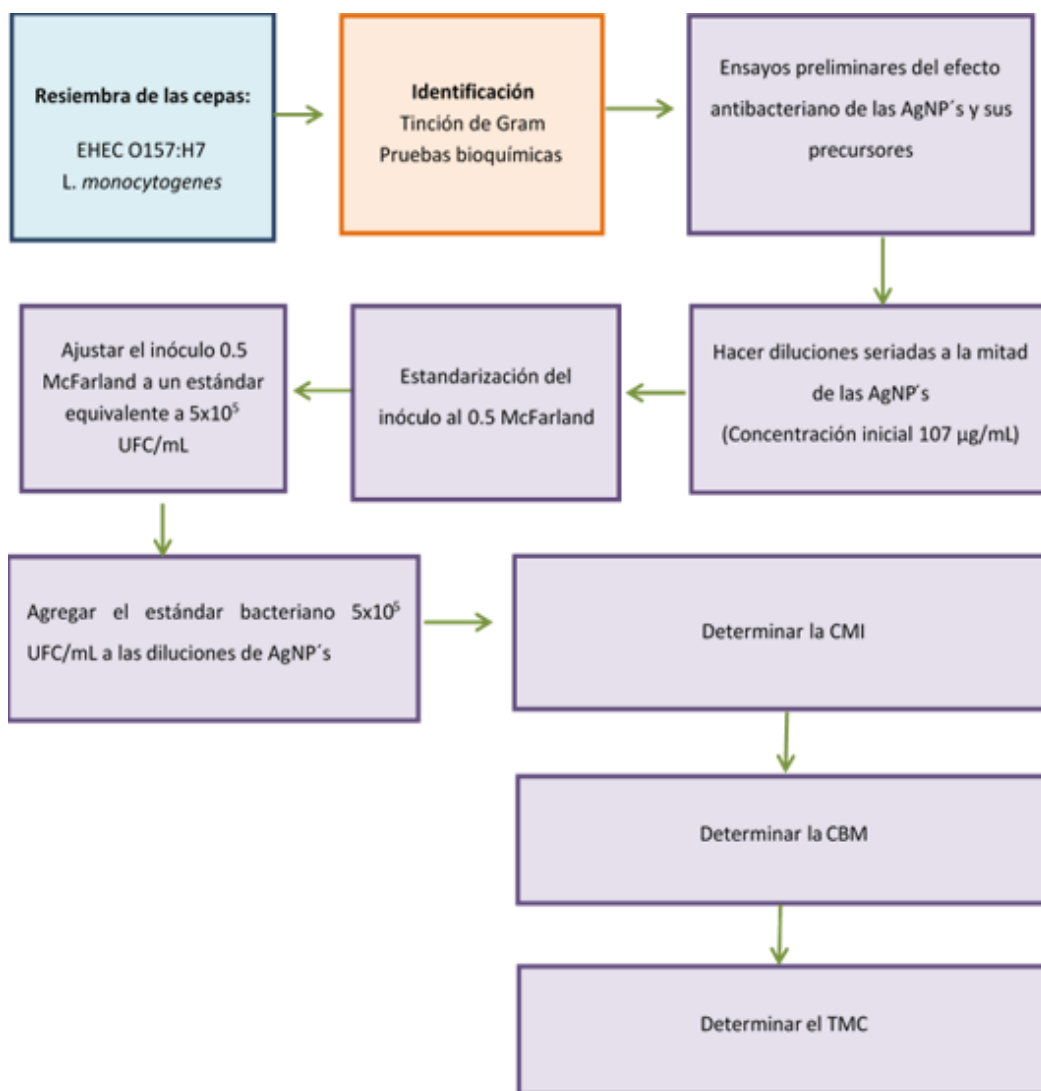
### **9.5. Determinación de la CBM de las AgNP's**

Para la determinación de la CBM se utilizaron las diluciones de los tubos realizadas para la CMI y se hizo el vertido en placa de los tubos que no presentaron crecimiento visible. La metodología que se utilizó fue la continuación de la técnica de macrodilución. El valor de la CBM corresponde a la placa donde se haya adicionado el contenido del tubo con la concentración más baja de AgNP's y en la cual no se observe crecimiento visible de colonias (CLSI M07-A9, 2012). Si se observa crecimiento se procede a realizar el recuento colonias de acuerdo con los criterios del esquema 3 (Yousef y Carlstrom, 2006) (Esquemas 1 y 2).

### 9.6. Determinación del tiempo mínimo de contacto de las AgNP's

Se preparó una solución stock de AgNP's a la CBM obtenida y un estándar bacteriano equivalente a  $5 \times 10^5$  UFC/mL como se indicó en el procedimiento. A continuación, se realizaron los ensayos de contacto en los siguientes intervalos de tiempo: 0.5 min, 2 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2h, 3 h, 4 h, 5 h y 6 h. Al término de este lapso se hizo el vertido en placa, se incubó 24 horas y posteriormente se hizo el recuento de colonias (Esquemas 3 y 4).

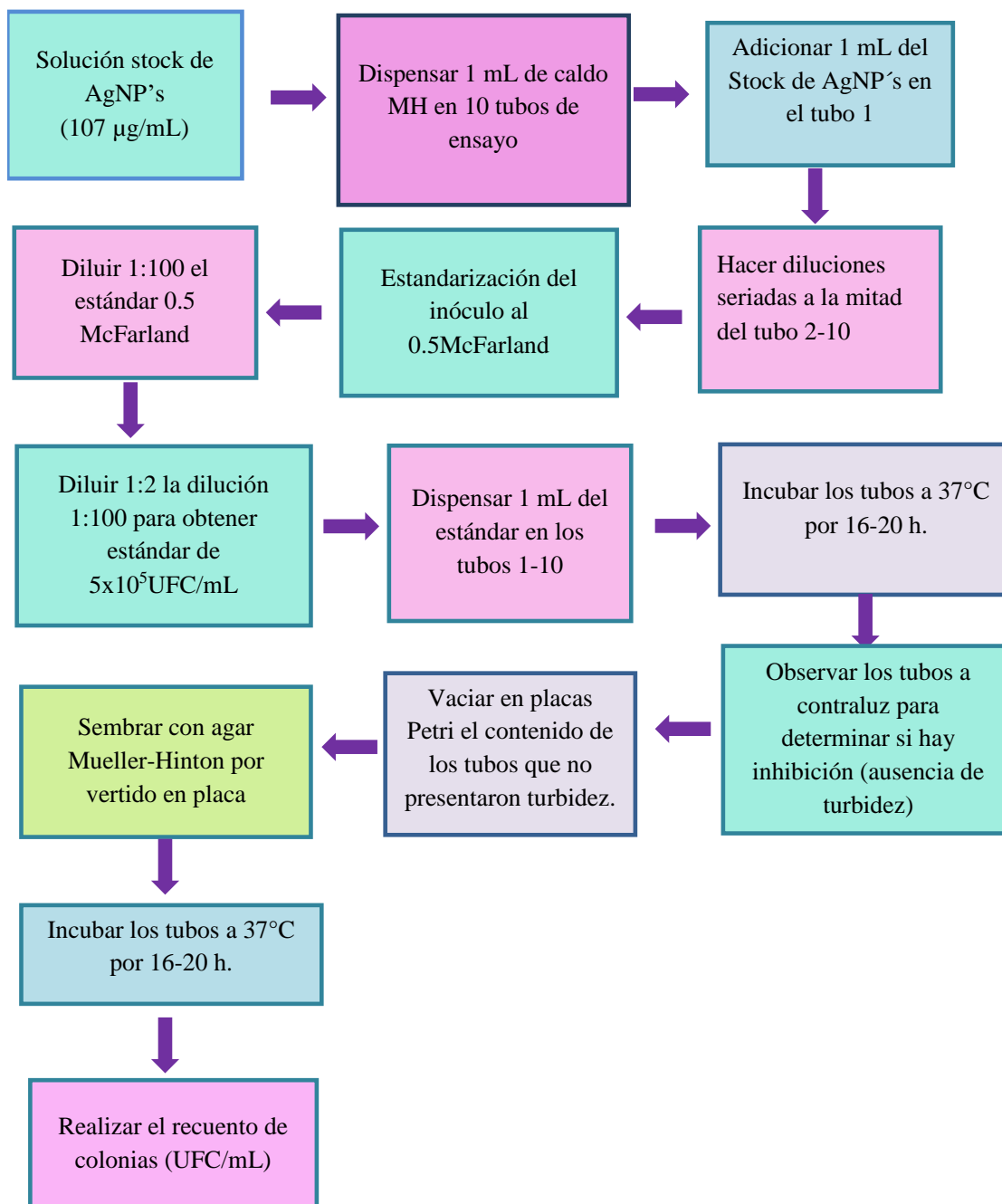
Diagrama general de trabajo



Fuente: CLSI M07-A9, 2012

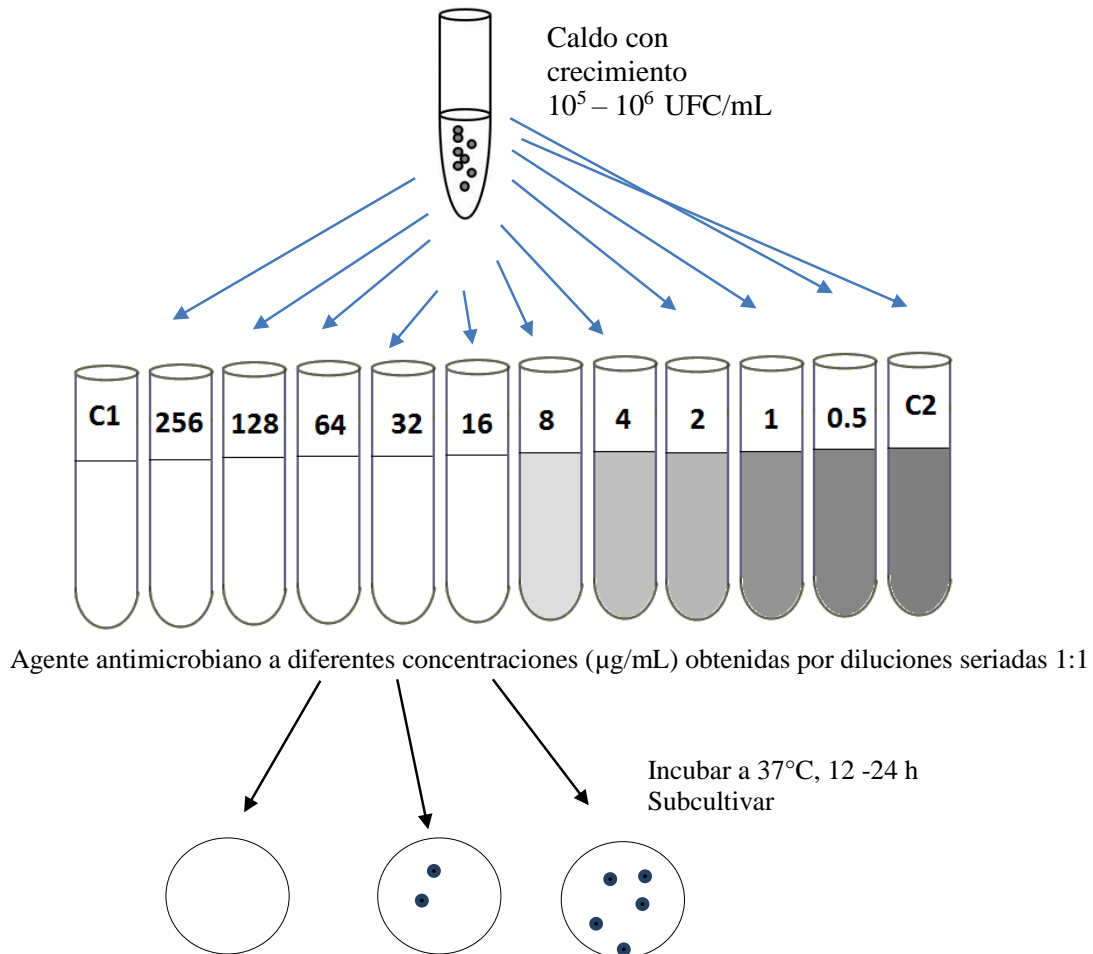


### Esquema 1. Técnica de macrodilución



Fuente: CLSI M07-A9, 2012

## Esquema 2. Determinación de la CMI y la CBM



**Concentración inicial Agente antimicrobiano =  $256 \mu\text{g/mL}$**

Concentración mínima inhibitoria (CMI)=  $16 \mu\text{g/mL}$

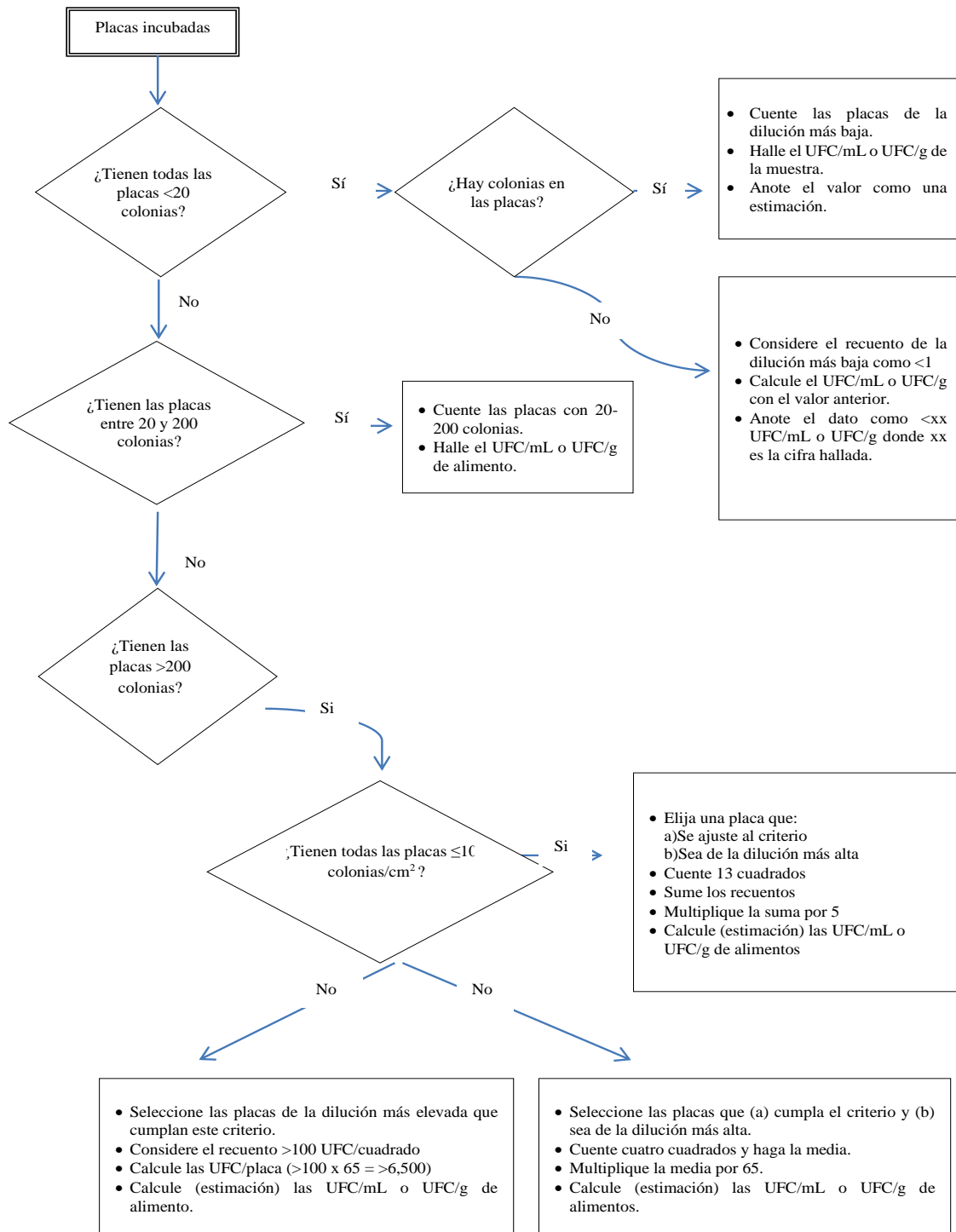
Concentración bactericida mínima (CBM)=  $64 \mu\text{g/mL}$

C1 = Control positivo (Inhibición del crecimiento bacteriano)

C2 = Control negativo (Crecimiento bacteriano)

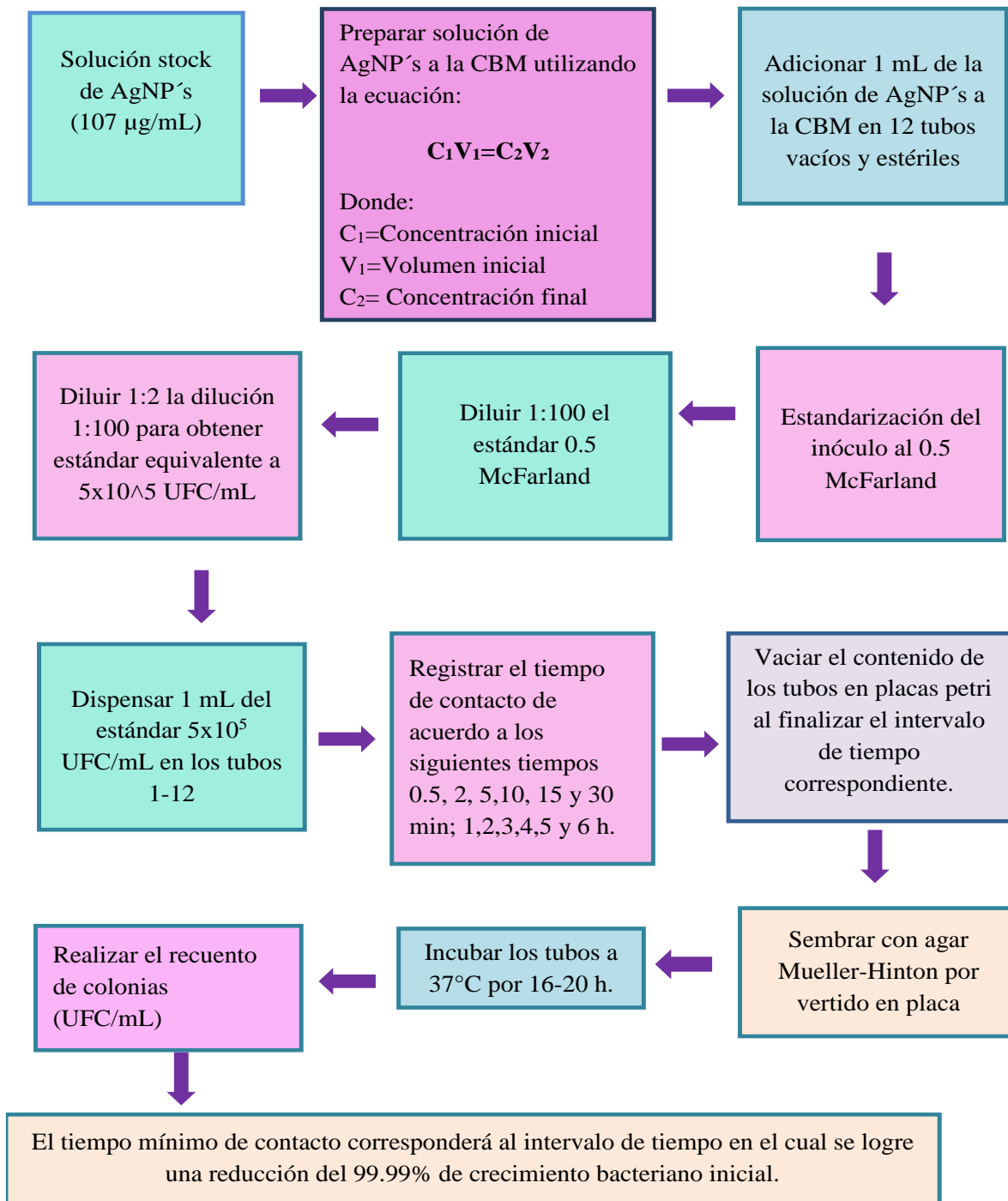
**Fuente: Diseño de estudio (CLSI M07-A9, 2012)**

### Esquema 3. Árbol de decisión para el recuento de colonias en placa



Fuente: Diseño de estudio (Tomado de Yousef y Carlstrom, 2006).

#### Esquema 4. Determinación del tiempo mínimo de contacto



Fuente: CLSI M07-A9, 2012; Norma Oficial NMX-BB-040-SCFI-1999

## 10. RESULTADOS

Se probaron las AgNP's contra *L. monocytogenes* y EHEC O157:H7 para ver su efecto antimicrobiano. Para ello, ambas cepas fueron identificadas de acuerdo a diferentes criterios microbiológicos mencionados en la metodología. Se realizó la estadística descriptiva mediante tablas y gráficas para el análisis de la CMI y CBM. En el análisis del TMC se hizo un diagrama de caja y se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar tres muestras independientes (Control de inóculo sin AgNP's, inóculo con AgNP'sAc e inóculo con AgNP'sEt), para lo cual se utilizó el programa estadístico SPSS Statistics 23<sup>®</sup>. Cabe mencionar que por el origen de las AgNP's, éstas presentan una turbidez natural, por lo tanto, es importante diluirlas para disminuir su turbidez propia y poder observar la turbidez del inóculo de las bacterias de estudio (*L. monocytogenes* y EHEC O157:H7).

### 10.1. Identificación de las cepas

En la identificación de *Listeria monocytogenes* se observaron bacilos cortos Gram positivos, oxidasa negativa y catalasa positiva, movilidad en forma de sombrilla a 25 °C en el medio SIM, presencia de colonias negras con halo negro en medio Oxford, colonias verdes en agar cromogénico, colonias negras en medio PALCAM, colonias negras en agar con bilis esculina, en el tubo de TSI se observó alcalino/ácido, en agar sangre presentó beta hemólisis y fue positivo a la prueba de CAMP al observarse la hemólisis con forma de cabeza de fósforo.

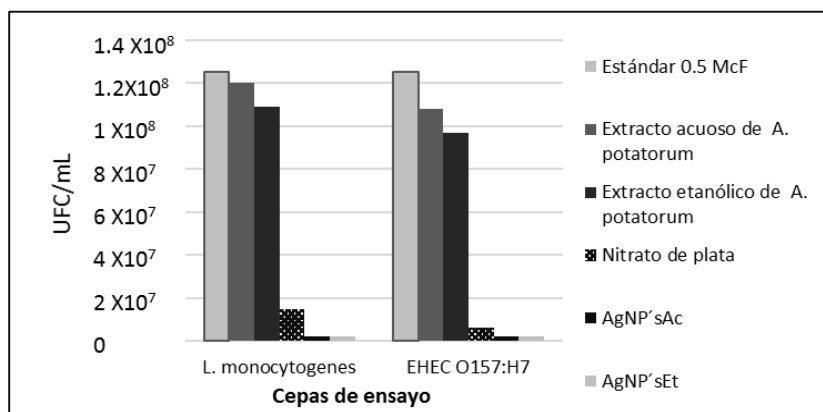
En las pruebas de identificación para EHEC O157:H7 se observaron bacilos cortos Gram negativos, oxidasa negativa y catalasa positiva, presencia de colonias rosas en agar MacConkey con lactosa, crecimiento de colonias cafés en agar MacConkey con sorbitol, en agar cromogénico se observaron colonias púrpuras y en las pruebas bioquímicas se obtuvo fermentación de glucosa y lactosa, movilidad positiva, descarboxilación de ornitina y lisina positiva, indol positivo, citrato y urea negativos.

### 10.2. Ensayos del efecto antibacteriano de las AgNP's y sus precursores

En la figura 4, se observa la comparativa de los ensayos en función del crecimiento bacteriano (UFC/mL). En el ensayo con *L. monocytogenes*, la sal de plata presentó una disminución de la carga bacteriana del 88%, el extracto vegetal acuoso del 4 %, extracto etanólico del 13 %, las AgNP'sAc y AgNP'sEt se obtuvo una disminución del 99.99% en comparación con el estándar 0.5 McFarland. Por otro lado, en el ensayo con EHEC O157:H7 la sal de plata presentó una disminución de la carga bacteriana del 93%, el extracto vegetal acuoso del 11%,

extracto etanólico del 23 %, mientras que las AgNP'sAc y AgNP'sEt se observó una disminución del 99.99% en comparación con el estándar 0.5 McFarland. Los resultados mostrados en la figura 4, corresponden al recuento de colonias dentro del rango de placas representativas (diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ ).

**Figura 4.** Comparativa del crecimiento bacteriano (UFC/mL) contra los precursores de las AgNP's

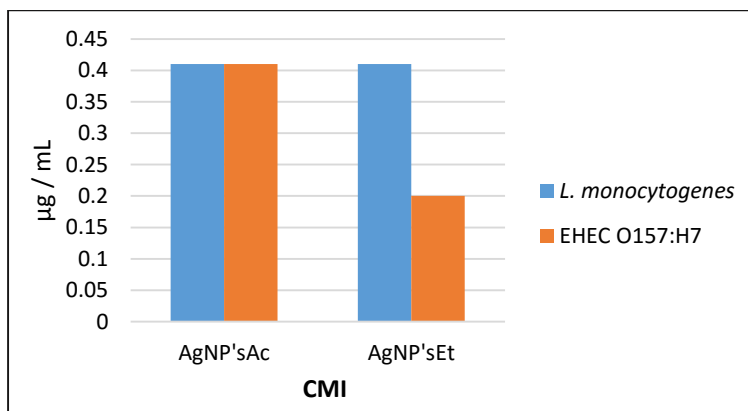


Fuente: Resultados de laboratorio

### 10.3. CMI

En la figura 5, se muestra la comparativa de CMI entre AgNP'sAc y AgNP'sEt en las cepas evaluadas, reportándose que la CMI de las AgNP'sAc en *L. monocytogenes* y EHEC O157:H7 fue 0.41  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y la CMI de las AgNP'Et en *L. monocytogenes* y EHEC O157:H7 fue 0.41  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 0.20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. Dichos resultados corresponden al promedio de los ensayos por triplicado y están expresados en unidades de  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**Figura 5.** Determinación de la CMI de AgNP'sAc y AgNP's Et en *L. monocytogenes* y EHEC O157:H7



Fuente: Resultados de laboratorio

## 10.4. CBM

En las tablas 3 y 4, se muestran los resultados del conteo bacteriano (UFC/mL) de las tres diluciones sucesivas seleccionadas para determinación de la CBM de AgNP's acuosas y etanólicas en *L. monocytogenes* y EHEC O157:H7

**Tabla 3.** CBM de AgNP's acuosas en *L. monocytogenes* y EHEC O157:H7

Nanopartículas Bacteria	Concentración de AgNP's (µg/mL)	Control bacteriano (UFC/mL)	Crecimiento bacteriano (UFC/mL)
<b>AgNP'sAc</b>			
<i>L. monocytogenes</i>	6.68	5X10 <sup>5</sup>	0
	3.34	5X10 <sup>5</sup>	78
	1.67	5X10 <sup>5</sup>	365
<b>EHEC O157:H7</b>	1.67	5X10 <sup>5</sup>	0
	0.83	5X10 <sup>5</sup>	0
	0.41	5X10 <sup>5</sup>	24

Fuente: Resultados de laboratorio

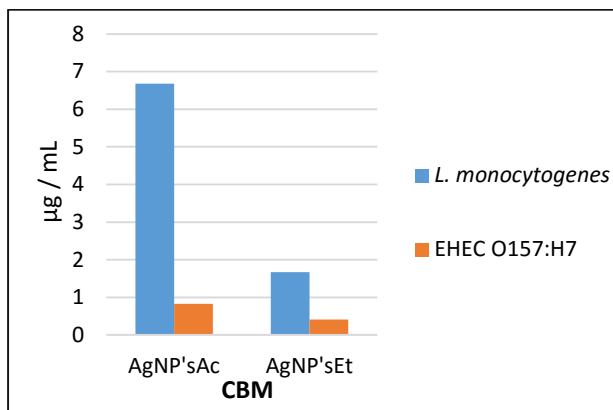
**Tabla 4.** CBM de AgNP's etanólicas en *L. monocytogenes* y EHEC O157:H7

Nanopartículas Bacteria	Concentración de AgNP's (µg/mL)	Control bacteriano (UFC/mL)	Crecimiento bacteriano (UFC/mL)
<b>AgNP'sEt</b>			
<i>L. monocytogenes</i>	1.67	5X10 <sup>5</sup>	0
	0.83	5X10 <sup>5</sup>	650
	0.41	5X10 <sup>5</sup>	1100
<b>EHEC O157:H7</b>	1.67	5X10 <sup>5</sup>	0
	0.83	5X10 <sup>5</sup>	0
	0.41	5X10 <sup>5</sup>	0

Fuente: Resultados de laboratorio

En la figura 6, se muestra la comparativa de CBM entre AgNP'sAc y AgNP'sEt en las cepas evaluadas. De acuerdo con los resultados, la CBM de AgNP'sAc en *L. monocytogenes* fue de 6.68 µg/mL y en EHEC fue de 0.83 µg/mL, mientras que la CBM de AgNP'sEt en *L. monocytogenes* fue de 1.67 µg/mL y en EHEC O157:H7 fue de 0.41 µg/mL.

**Figura 6.** Determinación de la CBM de AgNP'sAc y AgNP's Et en *L. monocytogenes* y EHEC O157:H7



Fuente: Resultados de laboratorio

Para determinar si un compuesto es un agente bacteriostático o bactericida se puede utilizar el parámetro CBM/CMI (Núñez, 2010, Lara *et al.*, 2010). Cuando la CBM es menor o igual a cuatro veces la CMI ( $CBM/CMI \leq 4$ ), el compuesto se considera un agente bactericida; si la CBM es mayor que el cuádruple de la CMI ( $CBM/CMI > 4$ ), el compuesto es considerado un agente bacteriostático (Gallagher y MacDougall, 2016).

En la tabla 5, se indican los valores del radio CBM/CMI de AgNP'sAc y AgNP'sEt en *L. monocytogenes* y EHEC O157:H7. De acuerdo al criterio mencionado anteriormente, se tuvo que las AgNP'sAc tuvieron un efecto bacteriostático frente a *L. monocytogenes* y un efecto bactericida en EHEC O157:H7. Mientras que las AgNP'sEt presentaron un efecto bactericida tanto en *L. monocytogenes* como en EHEC O157:H7.

**Tabla 5.** Radio CBM/CMI de AgNP'sAc y AgNP'sAgNP'sEt en *L. monocytogenes* y EHEC O157:H7

Compuesto Bacteria	CMI (µg/mL)	CBM (µg/mL)	Radio CBM/CMI
<b>AgNP'sAc</b>			
EHEC O157:H7	0.41	0.83	2
<i>L. monocytogenes</i>	0.41	6.68	16
<b>AgNP'sEt</b>			
EHEC O157:H7	0.20	0.41	2
<i>L. monocytogenes</i>	0.41	1.67	4

Fuente: Resultados de laboratorio

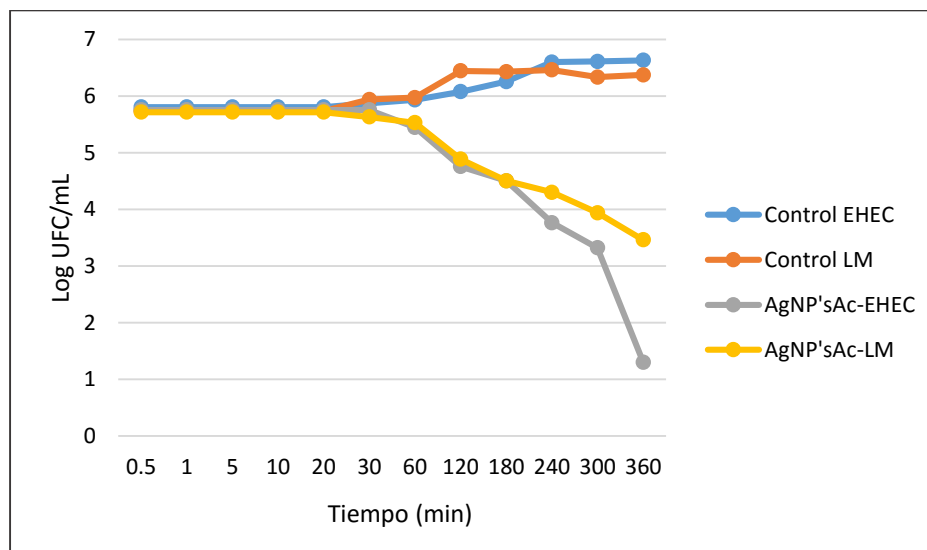


## 10.5. TMC

Para los ensayos de TMC se realizó el control de crecimiento bacteriano tanto de EHEC O157:H7 como de *L. monocytogenes* a lo largo del tiempo (T1-T12) para determinar la viabilidad de las bacterias y obtener el crecimiento bacteriano inicial, es decir, cuantificar el 100% de la población. El tiempo T1-T12 corresponde de 0.5 a 360 min (0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360), mientras que el número de UFC/mL se grafican en escala logarítmica.

En la figura 7, se muestra la comparativa del crecimiento de *L. monocytogenes* y EHEC O157:H7 en ausencia y presencia de AgNP'sAc durante el intervalo de tiempo T1-T12. De acuerdo a la gráfica, la población de *L. monocytogenes* en contacto con AgNP'sAc disminuyó a los 120 min en un 97.25% ( $7.7 \times 10^4$  UFC/mL) y a los 360 min su reducción fue del 98.29% ( $2.9 \times 10^3$  UFC/mL), pero no fue posible determinar el TMC. Para el caso de EHEC O157:H7, la población disminuyó a los 120 min en un 95.25% ( $5.7 \times 10^4$  UFC/mL) y a los 360 min la reducción fue de 99.99% (0 UFC/mL), por lo cual se registró este tiempo como el TMC.

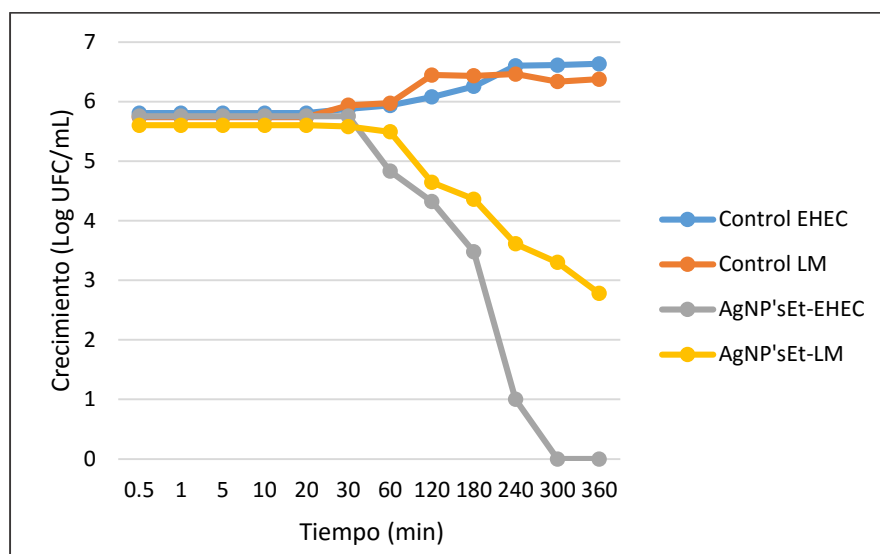
**Figura 7.** Viabilidad de *L. monocytogenes* y EHEC O157:H7 en contacto con AgNP'sAc a lo largo del tiempo. AgNP'sAc-EHEC, nanopartículas de plata en solución acuosa con EHEC O157:H7; AgNP'sAc-LM, nanopartículas de plata en solución acuosa con *L. monocytogenes*.



Fuente: Resultados de laboratorio

En la figura 8, se muestra la comparativa del crecimiento de *L. monocytogenes* y EHEC O157:H7 en ausencia y presencia de AgNP'sEt durante el intervalo de tiempo T1-T12. Tal como se observa en la gráfica, la población de *L. monocytogenes* expuesta a AgNP'sEt disminuyó a los 120 min en un 98.43% ( $4.4 \times 10^4$  UFC/mL) y a los 360 min logró reducir el 99.65% ( $6 \times 10^2$  UFC/mL); sin embargo, no fue posible determinar el TMC. Por otra parte, en el crecimiento de EHEC O157:H7 se tuvo que las AgNP'sEt disminuyeron el crecimiento bacteriano a los 120 min en un 98.25% ( $2.1 \times 10^4$  UFC/mL) y a los 240 min logró reducir el 99.9% ya que se observaron 0 UFC/mL, siendo éste el TMC.

Figura 8. Viabilidad de *L. monocytogenes* y EHEC O157:H7 en contacto con AgNP'sEt a lo largo del tiempo. AgNP'sEt-EHEC, nanopartículas de plata en solución etanólica con EHEC O157:H7; AgNP'sEt-LM, nanopartículas de plata en solución etanólica con *L. monocytogenes*.



Fuente: Resultados de laboratorio

En la tabla 6, se pueden observar los valores obtenidos para la determinación del TMC en función de la CBM. Al comparar los resultados, se observa que no fue posible obtener el TMC de AgNP'sAc y AgNP'sEt en *L. monocytogenes*, aun cuando las concentraciones utilizadas fueron más altas que las utilizada para EHEC.

**Tabla 6.** TMC de AgNP'sAc y AgNP'sEt en *L. monocytogenes* y EHEC O157:H7, <sup>a</sup> valor no determinado

Compuesto Bacteria	Concentración de AgNP's (CBM)	TMC (min)
<b>AgNP'sAc</b>		
EHEC O157:H7	0.83	360
<i>L. monocytogenes</i>	6.68	N.D. <sup>a</sup>
<b>AgNP'sEt</b>		
EHEC O157:H7	0.41	240
<i>L. monocytogenes</i>	1.67	N.D. <sup>a</sup>

Fuente: Resultados de laboratorio

### 10.6. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en la prueba de Kruskal-Wallis evidenciaron que al comparar el crecimiento normal con respecto al crecimiento en presencia de las AgNP'sAc y AgNP'sEt, existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

En la figura 9, se muestra el diagrama de caja de EHEC O157:H7 y *L. monocytogenes* en donde se observa que la distribución de las tres muestras (Control sin AgNP's, con AgNP'sAc y con AgNP'sEt) es significativamente diferente.

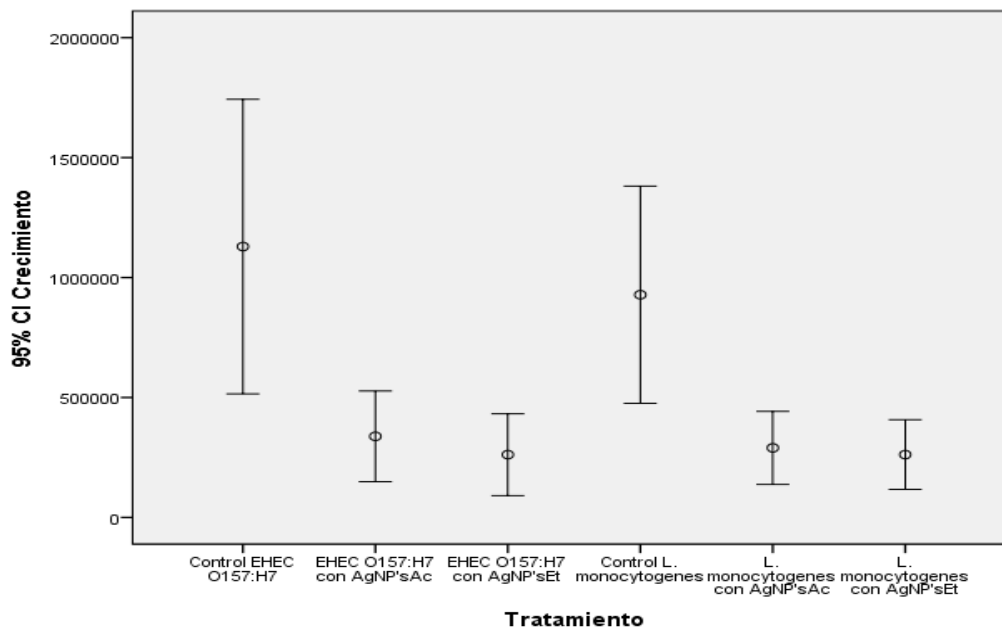


Figura 9. Diagrama de cajas simple con relación al crecimiento de EHEC O157:H7 y *L. monocytogenes* en contacto con AgNP'sAc y AgNP'sEt a la CBM determinada.

## 10.7. Discusión

Con base en los ensayos del efecto antibacteriano de las AgNP's de *A. potatorum* y sus precursores, se demostró que las AgNP'sAc y AgNP'sEt presentaron actividad antibacteriana contra *L. monocytogenes* y EHEC serotipo O157:H7 a la concentración utilizada (107 µg/mL). Además, se comprobó que los extractos vegetales de *A. potatorum* en solución acuosa y etanólica no son los responsables del efecto bactericida de las AgNP'sAc y AgNP'sEt, ya que el porcentaje de inhibición fue mínimo. Por otra parte, el AgNO<sub>3</sub> mostró actividad bactericida a la misma concentración que las AgNP's (107 µg/mL), pero al ser comparada con éstas, es posible observar que tanto las AgNP'sAc como las AgNP'sEt lograron incrementar significativamente el efecto bactericida del AgNO<sub>3</sub>. En relación con el efecto tóxico de la plata en células de mamíferos, se sabe que la exposición prolongada a concentraciones altas de AgNO<sub>3</sub> (dosis letal, 308 mg/kg) puede producir argiria, neurotoxicidad e inmunotoxicidad (Hadrup y Lam, 2014), por esta razón algunos autores han realizado ensayos de citotoxicidad de AgNP's y AgNO<sub>3</sub>, observando diferencias entre éstos, Conolly *et al.*, 2015 evaluó la citotoxicidad *in vitro* de AgNP's y AgNO<sub>3</sub> en células de hepatocitos primarios RTL-W1 y determinó que la dosis IC<sub>50</sub> de las AgNP's (75.9 µg/mL) era 7 veces menor que la del AgNO<sub>3</sub> (11 µg/mL). Por otra parte, Kermanizadeh *et al.*, 2012 reportó que la dosis IC<sub>50</sub> de AgNP's en células renales humanas era de 31.25 µg/mL. Tomando en cuenta dichos estudios, es posible considerar el uso de las AgNP's como agente antimicrobiano a concentraciones inferiores a niveles tóxicos para los seres vivos.

A partir de los ensayos de CMI, se deduce que las AgNP'sAc y AgNP'sEt de *A. potatorum* presentan un efecto bacteriostático independientemente de su naturaleza (solución acuosa y solución etanólica) y de la especie bacteriana utilizada; sin embargo, no fue posible determinar el porcentaje de inhibición y cuantificar el efecto bacteriostático, debido a la técnica utilizada (macrodilución), la cual pese a que es la técnica recomendada por el CLSI para la determinación de CMI, tiene la limitación de que no es una medida directa del número de células (Flores, 2014; CLSI M07-A9, 2012). Por otro lado, algunos autores han determinado la CMI de AgNP's de extractos diferentes a *A. potatorum* frente a *L. monocytogenes* y EHEC O157:H7 utilizando técnicas similares. Zarei *et al.*, 2014 determinó por microdilución que la CMI de AgNP's fue diferente para *L. monocytogenes* y EHEC O157:H7, reportando 6.25 y 3.12 µg/mL, respectivamente. De manera similar, Petrus *et al.*, 2011 realizaron por macrodilución la CMI de AgNP's reportando 24.58 y 12.43 µg/mL para

*L. monocytogenes* y EHEC O157:H7. Estas diferencias observadas podrían atribuirse en primera instancia a la naturaleza de las AgNP's y su tamaño. Al comparar las distribuciones de tamaño entre sí, se puede inferir que las nanopartículas de Zarei y Petrus tienen una heterogeneidad significativamente mayor que las AgNP's de *A. potatorum*, cuyo tamaño fue de 1-40 nm.

En relación con los ensayos de CBM, se pudo comprobar el efecto bactericida de las AgNP'sAc y AgNP'sEt en *L. monocytogenes* y EHEC serotipo O157:H7. Aunado a lo anterior, se observaron diferencias de la capacidad bactericida entre AgNP'sAc y AgNP'sEt, ya que las AgNP'sEt mostraron su efecto bactericida a concentraciones inferiores que las requeridas para AgNP'sAc. Asimismo, fue posible observar diferencias en el efecto bactericida entre las especies bacterianas evaluadas, ya que EHEC O157:H7 fue notablemente más sensible a las AgNP'sAc y AgNP'sEt que *L. monocytogenes*. A partir de los resultados de CBM, se infiere que el efecto bactericida de las AgNP's es dependiente de la concentración de AgNP's utilizada, de la naturaleza de las AgNP's (solución acuosa y etanólica) y de la especie bacteriana evaluada. De acuerdo con la concentración de AgNP's utilizada, en diversos estudios en los cuales se evaluó el efecto de AgNP's en diferentes cepas bacterianas se observó que la concentración de nanopartículas era directamente proporcional a la actividad antibacteriana, es decir, conforme aumentaba la dosis de AgNP's se observaba mayor inhibición del crecimiento bacteriano (Núñez, 2010; Pazos-Ortiz *et al.*, 2017). Por otro lado, se ha observado que la naturaleza de las especies bacterianas evaluadas, es un factor importante en el efecto bactericida de las AgNP's, de acuerdo con diversos autores, se ha demostrado que las AgNP's biogénicas presentan un mayor efecto bactericida en bacterias Gram negativas que en las bacterias Gram positivas, debido a las diferencias en la estructura de la pared celular (Kim *et al.*, 2007; Dhand *et al.*, 2016). En un estudio comparativo, Ibrahim, 2015 determinó que las bacterias Gram negativas (*P. aeruginosa*, *E. coli*) requerían de una CBM de AgNP's menor que las Gram positivas (*B. subtilis*, *S. aureus*), reportando 5.1 y 10.2 µg/mL, respectivamente, llegando a la conclusión de que las AgNP's tenían una mayor dificultad de permeabilidad en la pared celular de las bacterias Gram positivas y en consecuencia un menor efecto bactericida.

Al comparar los resultados de TMC, se observa que no fue posible obtener el TMC de AgNP'sAc y AgNP'sEt en *L. monocytogenes*, aun cuando las concentraciones utilizadas fueron más altas que las utilizadas para EHEC. En el caso de EHEC, si fue posible determinar

el TMC, obteniéndose que las AgNP'sEt mostraron un TMC menor que las AgPN'sAc, a pesar de que la concentración de AgNP'sEt fue inferior que la de AgPN'sAc.

De forma paralela, en el presente trabajo se demuestra una variación del TMC de las AgNP's entre bacterias Gram negativas y Gram positivas. Pese a que no fue posible determinar el TMC de las AgNP's en *L. monocytogenes*, se determinó que se requiere de un mayor tiempo de contacto de las AgNP's en bacterias Gram positivas que en Gram negativas, por lo cual, los resultados reportados en este trabajo concuerdan con lo reportado por Zarei *et al.*, 2014 quien determinó un mayor TMC para *L. monocytogenes* (TMC, 7 h) que para *E. coli* (TMC, 6 h). Actualmente se tienen pocos reportes sobre el tiempo mínimo de exposición de AgNP's. Zarei *et al.*, 2014 quien evaluó AgNP's cuya marca comercial es NanoCid L200®, determinó un mayor TMC para *L. monocytogenes* (TMC, 7 h) que para *E. coli* (TMC, 6 h) por lo cual determinó que se requiere de un mayor tiempo de exposición de las AgNP's en bacterias Gram positivas que en Gram negativas. A este respecto, se ha propuesto que el efecto retardado de las AgNP's puede ser debido a la liberación gradual de los iones Ag<sup>+</sup> (Belluco *et al.*, 2016).

## 11. CONCLUSIONES

- 1) Las AgNP's presentan efecto antibacteriano intrínseco no atribuible al extracto de *A. potatorum* acuoso o etanólico.
- 2) Las AgNP'Ac evaluadas actúan como un agente bacteriostático frente a *L. monocytogenes* y un agente bactericida en EHEC O157:H7 de acuerdo a los parámetros de CMI y CBM determinados.
- 3) Las AgNP'sEt actúan como un agente bactericida en *L. monocytogenes* y en EHEC O157:H7 de acuerdo a los parámetros de CMI y CBM obtenidos.
- 4) Las AgNP'sAc y AgNP'sEt tienen un efecto bactericida retardado que puede atribuirse a la liberación gradual de los iones plata; sin embargo, las AgNP'sEt actúan en un tiempo de exposición significativamente menor que las AgNP'sAc frente a las dos bacterias evaluadas.
- 5) Las AgNP's Et poseen un efecto bactericida significativamente mayor que las AgNP'sAc, al comparar los parámetros de CMI, CBM y TMC frente a las dos bacterias evaluadas.

### **11.1. Perspectivas:**

- Dilucidar el mecanismo de acción de las AgNP's en *L. monocytogenes* y EHEC O157:H7.
- Evaluar la actividad antibacteriana de las AgNP's biogénicas en función de los factores anteriormente descritos (forma y tamaño de las AgNP's, pH, temperatura).
- Realizar estudio de evaluación antibacteriana sobre diferentes superficies en contacto con los alimentos: plástico, acero inoxidable, vidrio.
- Hacer pruebas de citotoxicidad de las AgNP'Ac y AgNP'sEt a las concentraciones en las cuales se presenta el efecto antibacteriano.



## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Agnihotri, S., Mukherji, S., & Mukherji, S. (2014). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Advances*, **4**(8):3974-3983.
2. Androletti, O., Budka, H., Buncic, S., Colin, P., Collins, J. D., De, A., ... & Kruse, H. (2008). Assessment of the possible effect of the four antimicrobial treatment substances on the emergence of antimicrobial resistance. *EFSA J*, **659**: 1-26.
3. Apurba S.S., & Sandhya B.K. (2015). Review of Microbiology and Immunology. Fourth edition, Pondcherry, India: The Health Sciences Publisher.
4. Beier, R. C., Anderson, P. N., Hume, M. E., Poole, T. L., Duke, S. E., Crippen, T. L., ... & Nisbet, D. J. (2011). Characterization of Salmonella enterica isolates from turkeys in commercial processing plants for resistance to antibiotics, disinfectants, and a growth promoter. *Foodborne pathogens and disease*, **8**(5): 593-600
5. Belluco, S., Losasso, C., Patuzzi, I., Rigo, L., Conficoni, D., Gallocchio, F., ... & Ricci, A. (2016). Silver as antibacterial toward Listeria monocytogenes. *Frontiers in microbiology*, **7**.
6. Bragg, R., Jansen, A., Coetzee, M., van der Westhuizen, W., & Boucher, C. (2014). Bacterial resistance to quaternary ammonium compounds (QAC) disinfectants. *Infectious Diseases and Nanomedicine II*, **808**: 1-13.
7. Braoudaki, M., & Hilton, A. C. (2005). Mechanisms of resistance in Salmonella enterica adapted to erythromycin, benzalkonium chloride and triclosan. *International journal of antimicrobial agents*, **25**(1): 31-37.
8. Buchanan, R. L., Gorris, L. G., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. (2017). A review of Listeria monocytogenes: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, **75**: 1-13.
9. Cabrita, P., Trigo, M. J., Ferreira, R. B., & Brito, L. (2014). Is the exoproteome important for bacterial pathogenesis? Lessons learned from interstrain exoprotein diversity in listeria monocytogenes grown at different temperatures. *Omics: a journal of integrative biology*, **18**(9): 553-569.

10. Castañeda-Ruelas, G., Eslava-Campos, C., Castro-del Campo, N., León-Félix, J., & Chaidez-Quiroz, C. (2014). Listeriosis en México: importancia clínica y epidemiológica. *salud pública de méxico*, *56*, 654-659.
11. Chaudhry, Q., Scotter, M., Blackburn, J., Ross, B., Boxall, A., Castle, L., & Watkins, R. (2008). Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food additives and contaminants*, *25*(3): 241-258.
12. CLSI M02-A11 (2012), Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standard Eleventh Edition M02-A11. CLSI, Wayne, PA, USA.
13. CLSI M07-A9 (2012), Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard Ninth Edition M07-A9. CLSI, Wayne, PA, USA.
14. CLSI M100-S22 (2012), Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards Susceptibility Testing; Twenty second Informational Supplement M100-S22. CLSI, Wayne, PA, USA.
15. Colombia, M. (2013). *Calidad e inocuidad de alimentos*. Ministerio de Salud y Protección Social. [Consultado el 03 de marzo 2017]. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/salud/publica/HS/Paginas/calidad-inocuidad-alimentos.aspx>
16. Connolly, M., Fernandez-Cruz, M. L., Quesada-Garcia, A., Alte, L., Segner, H., & Navas, J. M. (2015). Comparative cytotoxicity study of silver nanoparticles (AgNPs) in a variety of rainbow trout cell lines (RTL-W1, RTH-149, RTG-2) and primary hepatocytes. *International journal of environmental research and public health*, *12*(5), 5386-5405
17. Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli. *Clinical microbiology reviews*, *26*(4): 822-880.
18. Das, J., & Velusamy, P. (2013). Antibacterial effects of biosynthesized silver nanoparticles using aqueous leaf extract of Rosmarinus officinalis L. *Materials Research Bulletin*, *48*(11): 4531-4537.

19. Dhand, V., Soumya, L., Bharadwaj, S., Chakra, S., Bhatt, D., & Sreedhar, B. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using *Coffea arabica* seed extract and its antibacterial activity. *Materials Science and Engineering: C*, *58*, 36-43.
20. Dizaj, S. M., Lotfipour, F., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M. H., & Adibkia, K. (2014). Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, *44*: 278-284.
21. Durán, N., Durán, M., de Jesus, M. B., Seabra, A. B., Fávoro, W. J., & Nakazato, G. (2016). Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *12*(3): 789-799.
22. Ebel, E. D., Williams, M. S., Cole, D., Travis, C. C., Klontz, K. C., Golden, N. J., & Hoekstra, R. M. (2016). Comparing Characteristics of Sporadic and Outbreak-Associated Foodborne Illnesses, United States, 2004–2011. *Emerging infectious diseases*, *22*(7): 1193.
23. ENSANUT (2012). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición*. [Consultado el 05 de marzo 2017]. Disponible en <http://ensanut.insp.mx/>
24. Esparza Rivera, E. L., Gallegos Morales, G. D. A., Lira Saldivar, R. H., & Hernandez Suarez, M. (2015). Tesis: Actividad Antimicrobial de Nanopartículas de Cobre y Óxido de Zinc contra Hongos y Bacterias Fitopatógenas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Coahuila, México.
25. Fernández, E. E. (2000). *Microbiología e inocuidad de los alimentos*. Querétaro, México: Universidad Autónoma de Querétaro.
26. Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., & Stasiewicz, M. J. (2014). *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of food protection*, *77*(1): 150-170.
27. Flores, C. Y. (2014). AgNP's con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas).
28. Flores, T. G., & Herrera, R. A. R. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud pública de México*, *47*(5): 388-390.

29. Fontecha Umaña, F., & Rodríguez Jerez, J. J. (2015). Tesis: Estudio de la eficacia bactericida y bacteriostática de productos químicos embebidos en materiales. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España.
30. Forbes, B., Sahn, D., & Weissfeld, A. B. (2004). Scott: diagnóstico microbiológico. Ed Panamericana. Buenos Aires, Argentina: 281, 2009.
31. Gallagher, J. C., & MacDougall, C. (2016). *Antibiotics simplified*. Jones & Bartlett Publishers.
32. Greulich, C., Braun, D., Peetsch, A., Diendorf, J., Siebers, B., Epple, M., & Köller, M. (2012). The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cells occurs in the same concentration range. *RSC Advances*, *2*(17): 6981-6987.
33. Hadrup, N., & Lam, H. R. (2014). Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver—a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *68*(1), 1-7.
34. Henry, J. B. (2005). *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. Elsevier. New York.
35. Hui, Y., Nip, W., & Gorham, J.R. (2003). Food Plant Sanitation. Chapter 3: The FDA's, GMP's, HACCP, and the Food Code. Marcel Dekker, Inc. New York.
36. Ibrahim, H. M. (2015). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, *8*(3): 265-275.
37. Jay, J. M. L., Loessner, M. J. & Golden, D. A. (2005). Modern food microbiology. Maryland, USA: Springer.
38. Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic escherichia coli. *Nature Reviews Microbiology*, *2*(2): 123-140.
39. Kermanizadeh, A., Gaiser, B. K., Hutchison, G. R., & Stone, V. (2012). An in vitro liver model-assessing oxidative stress and genotoxicity following exposure of hepatocytes to a panel of engineered nanomaterials. *Particle and fibre toxicology*, *9*(1), 28.
40. Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J., ... & Kim, Y. K. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *3*(1), 95-101.

41. Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W., Gutiérrez, G., Rosell, C., & Mejía, D. (2009). Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. *Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua*. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
42. Krishnaraj, C., Jagan, E. G., Rajasekar, S., Selvakumar, P., Kalaichelvan, P. T., & Mohan, N. (2010). Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **76**(1): 50-56.
43. Lara, H. H., Ayala-Núñez, N. V., Turrent, L. D. C. I., & Padilla, C. R. (2010). Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **26**(4): 615-621.
44. Lekshmi, N. P., Sumi, S. B., Viveka, S., Jeeva, S., & Brindha, J. R. (2017). Antibacterial activity of nanoparticles from *Allium* sp. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, **2**(1): 115-119.
45. Lelieveld, H. L., Holah, J., & Gabric, D. (Eds.). (2016). *Handbook of hygiene control in the food industry*. Woodhead Publishing.
46. Li, Q., Mahendra, S., Lyon, D. Y., Brunet, L., Liga, M. V., Li, D., & Alvarez, P. J. (2008). Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. *Water research*, **42**(18): 4591-4602.
47. Liu, J., Sonshine, D. A., Shervani, S., & Hurt, R. H. (2010). Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces. *ACS nano*, **4**(11): 6903-6913.
48. MacFaddin, J. F. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana.
49. Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2012). *Brock biology of microorganisms* (13th edn). Upper Saddle River, NJ: prentice hall.
50. Marriott, N., & Gravani, R. B. (2006). *Principles of food sanitation* 5<sup>th</sup> Edition. Springer Science & Business Media.
51. Meyer, B., & Cookson, B. (2010). Does microbial resistance or adaptation to biocides create a hazard in infection prevention and control?. *Journal of Hospital Infection*, **76**(3), 200-205.

52. Mikhalovsky, S., & Khajibae, A. (Eds.). (2011). *Biodefence: Advanced Materials and Methods for Health Protection*. Springer. Pág.170
53. Millemann, Y., Gaubert, S., Remy, D., & Colmin, C. (2000). Evaluation of IS200-PCR and comparison with other molecular markers to trace *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium bovine isolates from farm to meat. *Journal of clinical microbiology*, **38**(6): 2204-2209.
54. Mittal, A. K., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology advances*, **31**(2): 346-356.
55. Moreno-Luna, F.B., Tovar-Corona A., Herrera-Pérez J.L., Vázquez-Cuchillo O., Santoyo-Salazar J. (2016). *Síntesis biogénica de metales nobles (Au y Ag) mediante uso de extractos vegetales*. Primer Congreso de Biotecnología y Bioquímica Aplicada. Memorias. Pág. 57
56. Nabikhan, A., Kandasamy, K., Raj, A., & Alikunhi, N. M. (2010). Synthesis of antimicrobial silver nanoparticles by callus and leaf extracts from saltmarsh plant, *Sesuvium portulacastrum* L. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **79**(2), 488-493.
57. Nath, D., & Banerjee, P. (2013). Green nanotechnology—A new hope for medical biology. *Environmental toxicology and pharmacology*, **36**(3): 997-1014.
58. Norma Oficial NMX-BB-040-SCFI-1999 Métodos generales de análisis. Determinación de la actividad antimicrobiana en productos germicidas. Diario Oficial de la Federación. México, 3 de noviembre de 1999.
59. Núñez, N. V. A. (2010). AgNP's como microbicidas: Actividad y mecanismos de acción contra la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y diferentes bacterias resistentes a antibióticos (Doctoral dissertation, Ph. D. Thesis. Universidad Autónoma de Nuevo León, México).
60. OMS. (2015). *Inocuidad de los alimentos*. Nota descriptiva (399). [Consultado el 17 de enero 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>
61. OPS/OMS. (2001). Perfil del sistema de servicios de salud. Programa de organización y gestión de servicios de salud.
62. Pal, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, **73**(6), 1712-1720.

63. Panáček, A., Kvítek, L., Pucek, R., Kolář, M., Večeřová, R., Pizúrová, Sharma V., Nevečná, T., & Zbořil, R. (2006). Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J. Phys. Chem. B*, **110**(33): 16248-16253.
64. Panáček, A., Kolář, M., Večeřová, R., Pucek, R., Soukupová, J., Kryštof, V., Hamal, P., Zbořil, R., & Kvítek, L. (2009). Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials*, **30**(31): 6333-6340.
65. Pazos-Ortiz, E., Roque-Ruiz, J. H., Hinojos-Márquez, E. A., López-Esparza, J., Donohué-Cornejo, A., Cuevas-González, J. C., Espinosa-Cristóbal L. F., & Reyes-López, S. Y. (2017). Dose-Dependent Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles on Polycaprolactone Fibers against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Journal of Nanomaterials*, 2017.
66. Petrus, E. M., Tinakumari, S., Chai, L. C., Ubong, A., Tunung, R., Elexson, N., ... & Son, R. (2011). A study on the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of Nano Colloidal Silver on food-borne pathogens. *International Food Research Journal*, *18*(1).
67. Radosavljevic, V., Finke, E. J., & Belojevic, G. (2014). Escherichia coli O104: H4 outbreak in Germany—clarification of the origin of the epidemic. *The European Journal of Public Health*, **25**(1): 125-129.
68. Ravichandran, V., Vasanthi, S., Shalini, S., Shah, S. A. A., & Harish, R. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using *Atrocarpus altilis* leaf extract and the study of their antimicrobial and antioxidant activity. *Materials Letters*, **180**: 264-267.
69. Romero Blázquez M.F, Tovar-Corona, A., Moreno-Luna F. B.; Vázquez-Cuchillo O.; Herrera-Pérez J.L. (2016). *Aplicación de extractos selectivos de Agave potatorum en la síntesis de bionanomateriales de plata*. Primer congreso de Biotecnología y Bioquímica Aplicada. Memorias. Pág.43-47
70. Royal Society and Royal Academy of Engineering. (2004). Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties.
71. Ruparelia, J. P., Chatterjee, A. K., Duttagupta, S. P., & Mukherji, S. (2008). Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta biomaterialia*, **4**(3): 707-716.
72. Sánchez-Saldaña, L., & Saenz-Anduaga, E. (2015). Antisépticos y desinfectantes.

73. Sarsar, V., Selwal, K. K., & Selwal, M. K. (2017). Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Mangifera indica* and evaluation of their antimicrobial activity. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, **3**(5): 27-32.
74. Schmid, G. (Ed.). (2011). *Nanoparticles: from theory to application*. John Wiley & Sons.
75. Secretaría de Salud (2015). Dirección General de Epidemiología. Boletín Epidemiológico. *El Impacto de la Inocuidad Alimentaria en la Salud*. [Consultado el 12 de febrero 2017]. Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2015/sem14.pdf>
76. Seguridad Alimentaria Global (2017). Seguridad Alimentaria, herramientas y capacitación. HACCP y programas de prerrequisitos. [Consultado el 03 de marzo de 2017]. Disponible en: <http://seguridad-alimentaria-global.com/haccp.html>
77. Shivakumar, M., Nagashree, K. L., Yallappa, S., Manjappa, S., Manjunath, K. S., & Dharmaprakash, M. S. (2017). Biosynthesis of silver nanoparticles using pre-hydrolysis liquor of Eucalyptus wood and its effective antimicrobial activity. *Enzyme and Microbial Technology*, **97**: 55-62.
78. Tang, Y. W., Sussman, M., Liu, D., Poxton, I., & Schwartzman, J. (Eds.). (2015). *Molecular Medical Microbiology, Three-Volume Set*. Academic press.
79. Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2006). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Chapter*, **36**: 663-671.
80. Tovar-Corona A., Hernández-Márquez L., Moreno-Luna F. B., Herrera Pérez J. L. (2017). *Comparación de la síntesis de bionanomateriales de oro mediante fracciones selectivas de un extracto de origen natural*. Segundo Congreso de Biotecnología y Bioquímica Aplicada. Memorias. Pág. 61-64
81. UNAM (2011). Dirección General de Comunicación Social. Boletín UNAM-DGCS-486, agosto. En México, la bacteria *Escherichia coli* sólo se vincula con diarrea aguda persistente. [Consultado el 27 de abril 2018]. Disponible en: [http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2011\\_486.html](http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2011_486.html)
82. US Food and Drug Administration (FDA)(2012. Comment, P. Guidance for Industry and FDA Reviewers: Content and Format of Premarket Notification [510 (k)] Submissions for Liquid Chemical Sterilants/High Level Disinfectants. [Consultado el 12



de febrero 2017]. Disponible en:  
<https://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm073773.htm>

83. Yousef A.E. & Carlstrom C. (2006). Microbiología de Alimentos. Manual de laboratorio. 1ra Edición. Editorial Limusa. México. D.F. 283 pp.
84. Zanella, R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología*, 5(1).
85. Zarei, M., Jamnejad, A., & Khajehali, E. (2014). Antibacterial effect of silver nanoparticles against four foodborne pathogens. *Jundishapur journal of microbiology*, 7(1).
86. Zhang, Y., Cheng, X., Zhang, Y., Xue, X., & Fu, Y. (2013). Biosynthesis of silver nanoparticles at room temperature using aqueous aloe leaf extract and antibacterial properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **423**: 63-68.