



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA**

INSTITUTO DE CIENCIAS

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS
MICROBIOLÓGICAS**

**Estudio de la actividad bactericida de las
AgNP y AuNP en solución y soportadas
en microesferas de PHB**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCION EN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

PRESENTA

I.B.Q. Jair Grajales Velázquez

DIRECTOR DE TESIS

D.C. LUIS JAVIER MARTÍNEZ MORALES

Puebla, Pue.

Octubre, 2019.



Puebla, Pue. a 8 de octubre 2019.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría del alumno **Jair Grajales Velázquez**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Estudio de la actividad bactericida de los AgNP y AuNP en solución y soportadas en microesferas de PHB”

A nuestro juicio, el alumno **Jair Grajales Velázquez** puede proceder a la impresión de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”

D.C. Lucía Soto Urzúa



D.C. Ana Lilia González Ronquillo

D.C. Enrique Sánchez Mora

D.C. Sandra Raquel Reyes Carmona

Agradecimientos

A mis padres y a mis hermanos por su apoyo y amor incondicional, en esta etapa de mi vida, ya que sin ustedes jamás hubiera logrado culminar la maestría.

A mis compañeros de laboratorio: Belén, Pablo, Ángeles, Elena, Itzel, Brenda, Sofí, Carlos y Alma, por su grata amistad y por hacer que cada momento en el laboratorio haya sido inolvidable.

A mis mejores amigos al DC. Daniel Palacios Lagunas, a la MC. Alejandra J. de los Santos Alegría, MC. Doris del Carmen Fuentes, MC. María de Lourdes Tovilla Coutiño, DC. Azariel Ruiz Valencia y a la IBQ. Bellanirys Moreno Juan, por haber creído en mí y por su apoyo incondicional.

A la DC. Eunice de Anda, DC. Anabel Romero, DC. Alfredo Romero, D.C Guillermo Santamaria, D.C Iván Peña de Jesús y a mis compañeros del ECOCAMPUS con los que compartí momentos inolvidables y que además me apoyaron en poder concluir el presente proyecto.

A mis compañeras de generación: Berenice, Lenis, Carmen y Mari por hacer que la maestría fuera de lo mejor y que cada momento vivido con ustedes fuera inolvidable. Por ultimo a la IBQ. Navarro y a la Lic. Brenda por su apoyo incondicional y por estar pendiente de mi durante el transcurso del presente posgrado.

Reconocimientos

Al Centro Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico que me permitió realizar mis estudios de posgrado (No de becario 628702).

Al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por el apoyo prestado durante el desarrollo de la tesis.

A los miembros de mi comité tutorial: DC. Lucia Soto Urzúa, DC. Ana Lilia González Ronquillo y al DC. Enrique Sánchez Mora, por todo su apoyo en la realización del presente proyecto.

Al DC. Jose Juan Gervacio Arciniega, por el apoyo brindado durante el proyecto.

Al DC. Luis Javier Martínez por el apoyo brindado para lograr que el proyecto lograra concluir con éxito.

Índice

Índice de figuras.....	6
Índice de tablas.....	8
Lista de abreviaturas.....	9
Resumen.....	10
1. Introducción.....	11
1.1. Nanotecnología.....	11
1.2. Nanopartículas.....	12
1.3. Nanopartículas de plata.....	13
1.4. Nanopartículas de oro.....	13
1.5. Polímeros en el sector salud.....	14
1.5.1. Polihidroxibutirato.....	15
1.6. <i>Staphylococcus aureus</i>	16
1.7. <i>Escherichia coli</i>	17
2. Antecedentes.....	18
2.1. Antecedentes directos.....	19
3. Justificación.....	20
4. Hipótesis.....	20
4.1. Objetivo general.....	20
4.2. Objetivos específicos.....	20
5. Materiales y métodos.....	21
5.1. Material biológico.....	21
5.2. Preparación de las nanopartículas de plata.....	21
5.3. Preparación de las nanopartículas de oro.....	21
5.4. Preparación de las microesferas de PHB.....	22
5.5. Preparación de la película de microesferas de PHB.....	22
6. Descripción de las técnicas utilizadas.....	23
6.1. Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis).....	23
6.2. Dispersión de Luz Dinámica.....	23
6.3. Determinación del potencial zeta.....	24
6.4. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).....	24
6.5. Determinación de la concentración de plata de las Ag-NPs por absorción atómica.....	24

6.6.	Determinación de la concentración de oro de las Au-NPs por peso constante.....	25
6.7.	Espectrofotometría de infrarrojo (FTIR).....	25
6.8.	Cuantificación de PHB de la película delgada.....	25
6.9.	Estudios microbiológicos.....	27
6.9.1.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración mínima bactericida (CMB) y cinética de crecimiento bacteriano	27
7.	Resultados.....	29
7.1.	Síntesis de nanopartículas de plata y oro.....	29
	Caracterización de las Ag-NPs y Au-NPs.....	30
7.2.	Espectroscopía UV-Vis.....	30
7.3.	Estimación de tamaños por DLS.....	32
7.4.	Determinación de la estabilidad de las Ag-NPs, Au-NPs y microesferas de PHB por potencial zeta.....	34
7.5.	Determinación de la forma y tamaño de las nanopartículas y de la película delgada de microesferas de PHB por AFM.....	35
7.6.	Determinación de la concentración de plata de las Ag-NPs por absorción atómica.....	37
7.7.	Determinación de la concentración de Au-NPs mediante la técnica de peso constante.....	37
7.8.	Espectrofotometría de infrarrojo de la película delgada de microesferas de PHB.....	37
7.9.	Cuantificación del biopolímero de la película delgada.....	38
7.10.	Perfilometría de la película.....	38
7.11.	Análisis microbiológico.....	39
7.11.1.	Determinación de la CMB de las cepas <i>E. coli</i> MC4100 y <i>S. aureus</i> L27.....	39
7.11.2.	Cinética de crecimiento bacteriana.....	40
8.	Discusión de resultados.....	44
9.	Conclusiones.....	49
10.	Perspectivas.....	50
11.	Bibliografía.....	51
13.	Anexos.....	57

Índice de figuras

Figura 1. Unidad estructural del PHB.....	15
Figura 2. Reacción de degradación del PHB.....	16
Figura 3. Nanopartículas metálicas obtenidas por el método de reducción química.....	29
Figura 4. Espectro de UV-Vis de las Ag-NPs.....	30
Figura 5. Espectro de UV-Vis de las Au-NPs.....	31
Figura 6. Espectro UV-Vis de las microesferas de PHB.....	31
Figura 7. Gráfica de distribución del diámetro hidrodinámico de las Ag-NPs obtenida por DLS.....	33
Figura 8. Gráfica de distribución del diámetro hidrodinámico de las Au-NPs obtenida por DLS.....	33
Figura 9. Gráfica de distribución del diámetro hidrodinámico de las microesferas de PHB obtenida por DLS.....	33
Figura 10. Gráfico de potencial zeta de las Ag-NPs.....	34
Figura 11. Gráfico de potencial zeta de las Au-NPs.....	34
Figura 12. Gráfico de potencial zeta de las microesferas de PHB.....	35
Figura 13. Imagen de AFM e Histograma de las NPs:.....	36
Figura 14. Espectro en el infrarrojo de la película delgada de microesferas de PHB.....	37
Figura 15. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> MC4100 y <i>S. aureus</i> L27 en presencia de las Ag-NPs en solución y soportadas en la película delgada de microesferas de PHB....	42
Figura 16. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> MC4100 y <i>S. aureus</i> L27 en presencia de las Au-NPs en solución y soportadas en la película delgada de microesferas de PHB....	43

Índice de tablas

Tabla 1. Concentraciones de CTAB y partículas de plata, oro, PHB y PHB funcionalizado con CTAB utilizadas para la CMI y CMB.....	28
Tabla 2. CMI de las cepas <i>E. coli</i> MC4100 y <i>S. aureus</i> L27 con CTAB, PHB y PHB-CTAB.	39
Tabla 3. CMB de las cepas <i>E. coli</i> MC4100 y <i>S. aureus</i> L27 con Ag-NPs y Au-NPs	39

Lista de abreviaturas

MDR: Multidrogo resistentes

PHB: Poli-D- β -Hidroxibutirato

NPs: Nanopartículas

Ag-NPs: Nanopartículas de plata

Au-NPs: Nanopartículas de oro

IH: Infección hospitalaria

PHA: Polihidroxialcanoato

MRSA (por sus siglas en inglés): *S. aureus* resistente a meticilina

UV-Vis: Ultravioleta visible

DLS (por sus siglas en inglés): Dispersión de luz dinámica

PZ: Potencial zeta

AFM (por sus siglas en inglés): Microscopia de fuerza atómica

FTIR: Espectroscopia de infrarrojo

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CMB: Concentración mínima bactericida

$\mu\text{g/ml}$: Microgramos por mililitro

nm: Nanómetros

CLSI (por sus siglas en inglés): Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio

CTAB (por sus siglas en inglés): Hexadeciltrimetilamonio

rpm: Revoluciones por minuto

$^{\circ}\text{C}$: Grados Celsius

μg : Microgramo

μL : Microlitro

mg: Miligramo

Resumen

Las bacterias multidrogo resistentes (MDR), siguen siendo un desafío en la salud pública, el número de infecciones causadas por estas ha ido aumentando a nivel mundial, esta resistencia representa un desafío para muchos medicamentos. Los recientes avances en la nanotecnología nos permiten desarrollar nuevas formulaciones basadas en distintos tipos de nanopartículas. Éstas pueden ofrecer una solución prometedora en especial las de plata y oro, se ha estudiado la capacidad antimicrobiana y comprobado su efecto contra distintas cepas bacterianas. Una forma para extender aún más las aplicaciones antimicrobianas de estos metales es mediante la incorporación como nanopartículas en el biopolímero poli-β-hidroxibutirato (PHB). En el presente trabajo se sintetizaron nanopartículas mediante reducción química, plata de 74.3 nm y 114.1 nm, oro de 76.5 nm y microesferas de PHB por el método físico dando un tamaño de 172.3 nm. Las partículas metálicas fueron caracterizadas por UV-Vis, AFM, DLS y potencial zeta, mientras que la elaboración de la película de PHB se hizo mediante la cuantificación del polímero depositado en el sustrato, perfilometría y AFM.

En el presente proyecto se encontró que la película de microesferas de PHB por sí sola no presenta actividad antimicrobiana alguna, pero al tener soportadas a las nanopartículas de plata se observó que presentan mejor efecto bactericida ante la cepa de *E. coli* MC4100 que las de oro, con una CMB de 4.95 µg/mL mientras las nanopartículas de oro presentaron un mejor efecto bactericida contra la cepa *S. aureus* L27 con una CMB de 1.38 µg/mL. La actividad antimicrobiana de las Ag-NPs y Au-NPs se ve afectada al estar soportadas en la película delgada de microesferas de PHB, esto debido a que presentaron un tiempo de desfase de 3 horas en la inhibición del crecimiento total de las cepas. Esto puede ser debido a que las Ag-NPs y Au-NPs al estar soportadas no pueden interactuar de manera directa con los microorganismos provocando una disminución en el área de contacto.

1. Introducción

Los antimicrobianos son medicamentos que se usan para tratar infecciones y estos se pueden agrupar de acuerdo a los microorganismos contra los que actúan principalmente (antibióticos, antifúngicos y antiprotozoarios) (Gudepalya *et al.*, 2016). Estos pueden ser sintéticos, de origen vegetal o compuestos naturales modificados químicamente que puede tener un impacto en el resultado de un paciente/animal infectado (Nussbaum *et al.* 2006). Sin embargo, el uso indiscriminado de estos ha provocado el aumento de bacterias resistentes, causando infecciones que son más difíciles de tratar, generando mayores gastos médicos, estadías prolongadas en el hospital y una mayor mortalidad (Organization World Health). La lucha contra la resistencia a los antibióticos es una prioridad, ya que diversas estrategias se han empleado para superarla como el manejo adecuado y reducción del agente antimicrobiano, el desarrollo de nuevos fármacos y nanotecnología (Gudepalya *et al.*, 2016). Durante la última década, se ha generado gran interés por las nanopartículas (NPs) metálicas como herramientas para combatir la resistencia antimicrobiana, debido a que estas han demostrado tener un amplio espectro contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Hemeg, 2017). Uno de los métodos para ampliar las aplicaciones antimicrobianas de las NPs metálicas es soportarlas a un polímero, por ejemplo las nanopartículas pueden incorporarse o incrustarse a la superficie de un polímero como: fibras de algodón, látex entre otros materiales poliméricos como el polihidroxibutirato (PHB) (Palza, 2015). El PHB o P3HB es un polímero natural que se compone de monómeros de cuatro átomos de carbono el cual está conformado por un grupo metileno (-CH₂-) en su cadena alifática principal, un grupo alquilo (-CH₃) en el carbono β y un grupo carboxilo (-COOH) en su cadena lateral, este polímero es de interés industrial debido a sus propiedades termoplásticas, no es tóxico y es biodegradable, por lo tanto se puede usar tanto en productos que entran en contacto con tejidos humanos o animales (Alves *et al.*, 2017).

1.1. Nanotecnología

La nanotecnología es la ciencia de manipular la materia en tamaños que van desde 1 hasta 100 nm, moleculares o macromolecular; poseen propiedades físicas y químicas particulares diferentes de los materiales a escala macroscópica (forma de bulto) (Rai, Yadav & Gade, 2009). Entre la gama amplia de los nanomateriales, el interés particular se ha dirigido hacia las NPs, las cuales tienen una serie de características que las hacen favorables como vectores de medicamentos para el tratamiento de patógenos causantes

de enfermedades (su facilidad de síntesis, su biocompatibilidad, liberación prolongada del fármaco, entre otros) (Baptista *et al.*, 2018).

1.2. Nanopartículas

Las NPs son materiales en la que sus dimensiones se encuentran en el rango de 1 a 100 nm. Esta reducción de tamaño en las NPs metálicas provoca que presenten diferentes motivos estructurales, según su tamaño y composición. Cuando una partícula es excitada por un campo electromagnético (EM), los electrones comienzan a oscilar con la misma frecuencia que la del EM incidente (González *et al.* 2005). Este fenómeno conocido como mejora de campo a escala nanométrica se ha empleado para almacenar energía, mejorar celdas fotovoltaicas al aumentar la absorción de luz y transformar energía electromagnética a energía térmica para destruir células bacterianas (Noguez *et al.* 2015)

Las técnicas de síntesis de las nanopartículas son las siguientes:

- Métodos físicos: El método de evaporación-condensación y la ablación con láser es el más utilizado, ya que la ausencia de contaminación por solventes y la uniformidad del tamaño de la distribución de las NPs son ventajas que se obtienen por estos métodos.
- Métodos químicos: EL método más empleado para la síntesis de NPs es la reducción química mediante el uso de agentes reductores, como es el borohidruro de sodio, citrato de sodio, ácido ascórbico, entre otros. Es importante usar agentes estabilizantes (hexadeciltrimetilamonio, dodecilsulfato sódico, citrato de sodio, polivinilpirrolidona, entre otros) durante la preparación de las nanopartículas para evitar su aglomeración.
- Métodos biológicos: Este método surge como una manera para desarrollar procesos amigables con el ambiente, que no utilicen productos químicos tóxicos en los protocolos de síntesis. Lo que dio origen a desarrollar técnicas de síntesis de NPs en células eucariotas y/o procariotas. Por ejemplo, se han realizado investigaciones donde han sintetizado NPs de oro, plata y cadmio utilizando levaduras, hongos y bacterias (Iravani & Zolfaghari, 2013), a través de diversos mecanismos como son: bioprecipitación, quelación, secuestro intracelular, bombas de eflujo, cambio de concentración de iones metálicos y precipitación extracelular.

1.3. Nanopartículas de plata

La actividad antimicrobiana de la plata se ha conocido desde la antigüedad y actualmente está siendo aplicado a productos médicos para prevenir infecciones de heridas, quemaduras y úlceras crónicas causadas por microorganismos (Akter *et al.*, 2017). En recientes años las NPs de plata (Ag-NPs) han llamado la atención en el área de la salud, porque diversos estudios han reportado que las Ag-NPs han presentado un amplio espectro antimicrobiano tanto en bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhimurium*) como en bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* y *Bacillus subtilis*) (Yan *et al.*, 2018).

Los mecanismos antimicrobianos (actividad bactericida) de las Ag-NPs no están del todo claros, aunque algunos de ellos han sido propuestos, entre ellos podemos mencionar: 1) las Ag-NPs liberan iones plata y estos incrementan la permeabilidad de la membrana, provocan pérdida de la fuerza protón motriz (la interrupción de la producción de ATP), inducen la de-energización de las células y el eflujo de fosfato, fuga del contenido celular, interrupción de la replicación del ADN, 2) las Ag-NPs inducen la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que afectan al ADN, la membrana celular y las proteínas de la membrana y 3) las nanopartículas causan daño directo a la membrana celular debido a su adhesión (Marambio-Jones & Hoek, 2010).

1.4. Nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro (Au-NPs) han llamado la atención debido a sus propiedades características, 1) diversas formas de Au-NPs son fáciles de sintetizar y sus propiedades ópticas y eléctricas dependen en gran medida de su tamaño y forma, 2) debido a la carga superficial negativa de las Au-NPs, éstas pueden ser funcionalizadas fácilmente por diferentes biomoléculas, fármacos y otros ligandos, 3) las Au-NPs son biocompatibles lo cual le brinda una gran ventaja. Todas estas propiedades anteriormente mencionadas permiten que las Au-NPs se conviertan en un material para varias aplicaciones biomédicas, incluyendo biosensores, imágenes moleculares entre otros (Kong *et al.*, 2017).

El mecanismo antibacteriano de las Au-NPs no ha quedado del todo claro, pero se han propuesto dos mecanismos de acción antimicrobiana de las partículas: 1) inhibición de la actividad de la ATP sintasa lo que provoca un decremento de los niveles de ATP provocando una disminución general en el metabolismo y 2) inhibición de la unión del

tRNA a la subunidad del ribosoma, lo cual provoca un colapso en el proceso biológico (Cui *et al.*, 2012).

1.5. Polímeros en el sector salud

Los compuestos polímeros/metal han emergido como una ruta para extender las aplicaciones de las NPs metálicas, ya que un gran porcentaje de las infecciones son adquiridas en los hospitales (IH) las cuales se propagan a través de dispositivos médicos invasivos como ventiladores y catéteres. Entre el 80%-95% de las infecciones del tracto urinario son adquiridas en catéteres urinarios.

El crecimiento del mercado de polímeros en el área de la salud va en aumento y esto se debe a las propiedades que estos poseen: resistencia al calor, rigidez, flexibilidad de diseño y resistencia química. Por ello, los productos de polipropileno (PP) se utilizan ampliamente como dispositivos médicos, productos de embalaje, sistema de suministro de fármacos. Aproximadamente un cuarto de los dispositivos médicos se basan en PP, aunado a ello, la tasa de crecimiento global del PP en la industria médica es de aproximadamente el 8.7% anual (Palza, 2015).

En 2008 Matsuzaki propuso una lista de cuatro características principales que debe poseer un polímero para presentar una actividad antimicrobiana eficiente (Matsuzaki, 2008):

- a) Debe establecer un contacto con los microorganismos.
- b) Debe poseer suficientes grupos catiónicos para lograr la adhesión al microorganismo.
- c) Debe tener residuos hidrófobos que sean responsables de la unión e integración dentro de la membrana celular.
- d) Debe ser capaz de matar selectivamente a los microorganismos en presencia de otras células, como las células de mamífero.

1.5.1. Polihidroxi butirato

El PHB en forma de película podría soportar las NPs metálicas y evaluar su efectividad antimicrobiana ante *E. coli* y *S. aureus* ya que estos microorganismos tienen una gran importancia tanto en el área de la investigación como en el de salud pública.

El PHB pertenece a la familia de los polihidroxi alcanoatos (PHA), presenta un centro quiral en la posición 3 (**Figura 1**), esta posición es importante para las enzimas implicadas en su síntesis y degradación (Sudesh, Abe & Doi, 2000). El PHB es sintetizado por diversas bacterias (*Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodospirillum rubrum*, *Azospirillum brasilense*, entre otras) en condiciones de limitación de O₂, N₂, P o elementos traza (Mg⁺², Ca⁺² y Fe⁺²) y una alta concentración de carbono. Una vez sintetizado el polímero este es almacenado en forma granular, el cual servirá como una fuente de almacenamiento de carbono intracelular (Kok *et al.* 2004).

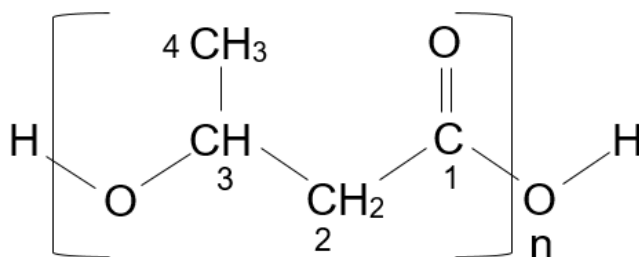


Figura 1. Unidad estructural del PHB. En la posición 3 se encuentra ubicado el carbono quiral y unidos a él se encuentran los grupos metilo e hidroxilo.

El PHB se ha encontrado en una amplia variedad de organismos que va desde bacterias hasta células eucariotas, además se ha demostrado que participa en la formación de canales iónicos en algunos organismos. La degradación del polímero de PHB da como resultado la formación del 3-hidroxi butirato (**Figura 2**), un metabolito natural en huéspedes animales que se sabe que está asociado con la formación de cuerpos cetónicos. Debido a estos hallazgos es que el PHB así como otros PHAs, sean biocompatibles, sugiriendo que implantes quirúrgicos, suturas, parches para aplicación en ingeniería de tejido, etc., producidos a partir de PHB no produzcan una respuesta inmune en el organismo huésped (Brigham & Sinskey, 2012).

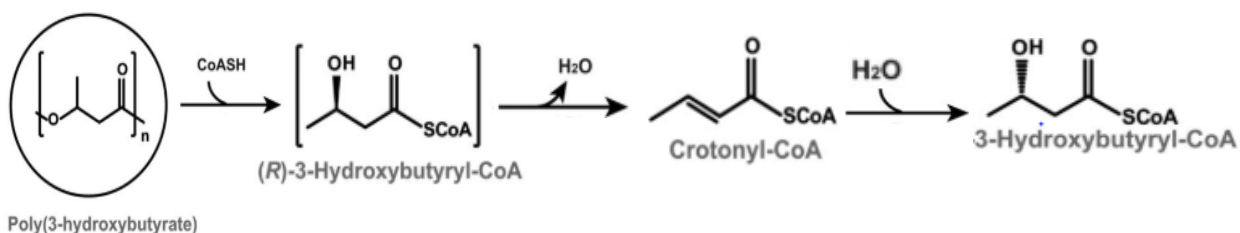


Figura 2. Reacción de degradación del PHB. El PHB se degrada a crotonil-CoA a través del 3-hidroxi-butiril-CoA mediante la depolimerasa de PHB, en seguida una reacción de hidratación del enlace entre el C-2 y C-3 es llevado a cabo para la formación del 3-hidroxi-butiril-CoA (Eggers y Steinbüchel, 2013).

1.6. *Staphylococcus aureus*

El estafilococo ha causado enfermedades en los seres humanos durante siglos, estas bacterias fueron definidas por primera vez en 1882 por el cirujano escocés Sir Alex Ogston, no fue hasta que un médico alemán, Friedrich J. Rosenbach identificó una colonia con pigmentación amarilla a la cual nombro como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Madigan *et al.* 2009) .

S. aureus es un coco Gram positivo, coloniza aproximadamente el 30% de la población humana. Cuando se rompen las barreras cutáneas y mucosas, debido a infecciones crónicas en la piel, heridas o intervención quirúrgica, el *S. aureus* puede acceder a los tejidos subyacentes o al torrente sanguíneo logrando así causar una serie de enfermedades como: foliculitis, mastitis, síndrome de la piel escaldada, endocarditis, osteomielitis, meningitis, abscesos y síndrome del shock tóxico (Li, 2018). Las personas con dispositivos médicos invasivos (catéteres venosos periféricos y centrales) o sistemas inmunes comprometidos son particularmente vulnerables a la infección (Lee *et al.* 2018).

La resistencia de *S. aureus* a los antibióticos surgió a los 2 años de la introducción de la penicilina, el antibiótico semisintético meticilina se desarrolló a finales de la década de 1950 y *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA, por sus siglas en inglés) se identificó clínicamente en 1960. Las infecciones debidas a cepas MRSA están asociadas con tasas de mortalidad más altas que las infecciones causadas por cepas susceptibles a la meticilina, dando como resultado un aumento en la duración de las estadías en el hospital, así como los costos de atención médica (Chukwunonso *et al.*, 2018). Las cepas MRSA producen una proteína alterada de unión a la penicilina (PBP, por sus siglas en

inglés), esta proteína es codificada por el gen *mecA*, este gen se transporta en un elemento genético móvil (*mge*, por sus siglas en inglés), la adquisición de resistencia microbiana ha presentado un desafío para el tratamiento médico en términos de control y tratamiento de infecciones por *Staphylococcus*. Las cepas MRSA representan del 25 al 50% de las infecciones por *S. aureus* en entornos hospitalarios, y esto es de gran preocupación debido a la alta mortalidad que esta provoca, así como su resistencia a las penicilinas disponibles y a los fármacos que contienen β -lactámicos (Lakhundi & Zhang, 2018).

1.7. *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) es una bacteria Gram negativa, es aerobia y anaerobia facultativa, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es una de las bacterias ampliamente estudiadas y crece a temperatura óptima de 37°C, replicándose cada 20 minutos (Jang *et al.*, 2017).

E. coli es una de las principales bacterias que se encuentra colonizando el tracto gastrointestinal en mamíferos, por lo general esta bacteria y su huésped humano pueden coexistir en un buen estado de salud, rara vez estas cepas comensales causan alguna enfermedad, a excepción de huéspedes inmunocomprometidos o que se rompa la barrera gastrointestinal, como en la peritonitis, por ejemplo (Kaper *et al.* 2004).

Sin embargo, hay clones de *E. coli* que han adquirido factores de virulencia, lo que le confiere una mayor capacidad para adaptarse a nuevos nichos y a su vez causar un amplio espectro de enfermedades. Estos factores de virulencia son codificados frecuentemente en elementos genéticos móviles como islas de patogenicidad, plásmidos o fagos y a menudo son transmisibles entre cepas de *E. coli*. Según el tipo de factor de virulencia y los síntomas clínicos del huésped, las cepas de *E. coli* se clasifican en los siguientes patotipos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enterotoxigena (ETC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC), adherencia difusa (DAEC) y la uropatógena (UPEC) (Miri *et al.* 2016).

2. Antecedentes

Las nanopartículas metálicas han sido objeto de investigación debido a su capacidad antibacteriana, diferenciándose en cada uno de estos el método de síntesis, el rango de tamaños y los agentes estabilizantes empleados. Debido a esto es que se observan diferencias en los resultados de los distintos trabajos publicados, Shrivastava y colaboradores en el 2007 sintetizaron Ag-NPs utilizando a la D-glucosa y a la hidracina como agentes reductores, obteniendo partículas con un tamaño de rango de 10-15 nm, la actividad antibacteriana de las Ag-NPs fueron probadas en bacterias Gram negativas (*E. coli* y *Salmonella typhi*) y Gram positiva (*S. aureus*), reportando que concentraciones de 25 µg/mL de Ag-NPs podían inhibir completamente el crecimiento de *E. coli* y *Salmonella typhi*, en el caso de *S. aureus* se requirió una concentración de 100 µg/mL para inhibir su crecimiento (Shrivastava *et al.*, 2007).

Li y colaboradores en el 2014 sintetizaron Au-NPs de 2 nm funcionalizadas con diferentes ligandos (cadenas alifáticas y aromáticas). Para las pruebas antimicrobianas de aislados clínicos (*E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aureginosas* y *S. aureus*) optaron por trabajar con la muestra Au-NP 3 (n-decano) debido al efecto bactericida que había presentado ante *E.coli* DH5α, el cual logro suprimir por completo el crecimiento de las cepas de aislados clínicos (Li *et al.* 2014).

Por otro lado, Paredes y colaboradores en el 2014 sintetizaron Ag-NPs. Para su síntesis emplearon a la cisteína como agente reductor y como agentes estabilizantes al Acetato de Polivinilo (PVA) y Hexadeciltrimetilamonio (CTAB), obteniendo NPs con un tamaño promedio de 25 nm a 36 nm, observando que a concentraciones de 0.50 µg/mL y 1 µg/mL inhibían el crecimiento de *S. aureus* MRSA y *E. coli* O15:H7 respectivamente (Paredes & Torres, 2014).

Mohamed y colaboradores en el 2017 sintetizaron Au-NPs mediante el método de reducción del citrato obteniendo nanopartículas con un tamaño aproximado de 25 nm, reportando una CMI para *Corynebacterium pseudotuberculosis* de 200 µg/mL (Mohamed *et al.*, 2017).

2.1. Antecedentes directos

Abid y colaboradores en 2016, sintetizaron microesferas de PHB mediante el método de evaporación del solvente en emulsión, utilizando acetato de polivinilo, como agente emulsificante y estabilizante, obteniendo esferas con dos tamaños de población, una de 128 nm y otra de 320 nm. Para la elaboración de la película delgada, una cantidad de la solución de esferas fue aplicada en una superficie del cristal y mediante su caracterización obtuvieron una película con un ángulo de contacto de 90° (Abid & Rehman, 2016).

Por otro lado, Méndez en el 2019, sintetizó Ag-NPs y Au-NPs por el método de reducción química. Para la elaboración de las Ag-NPs, utilizó el citrato de sodio como agente reductor y para las Au-NPs utilizó una mezcla de agentes reductores (ácido ascórbico, citrato de sodio y borohidruro de sodio), obteniendo un tamaño promedio de 12 nm para las Ag-NPs y para las Au-NPs obtuvo dos tamaños promedios 14 y 28 nm. En ese trabajo las Ag-NPs presentaron un mayor efecto antimicrobiano ante *E. coli* de 5.58 µg/mL y las Au-NPs 5.24 µg/mL para *S. aureus*, sin embargo, al ser fotoactivadas las Ag-NPs presentaron una mejor actividad antimicrobiana tanto para *E. coli* 2.79 µg/mL como para *S. aureus* 5.59 µg/mL en comparación con las Au-NPs.

3. Justificación

El uso indiscriminado de los antibióticos ha inducido un aumento de la resistencia en las cepas bacterianas, lo cual genera un problema grave a nivel mundial. El uso de nanopartículas de plata y oro se ha presentado como una alternativa al uso de antibióticos. La unión de las nanopartículas metálicas a una película de microesferas de PHB abre nuevas aplicaciones, debido que al ser un material biocompatible y no tóxico, éste puede influir en la modificación de las características de disponibilidad de las NPs contra las bacterias, pudiendo así potenciar su efecto y ampliar sus usos.

4. Hipótesis

Las nanopartículas de plata y oro presentan una modificación en su efecto bactericida al encontrarse soportadas en la película delgada de microesferas de PHB.

Objetivos

4.1. Objetivo general

Estudiar el comportamiento de las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en presencia de Ag-NPs y Au-NPs en solución y soportadas en la película delgada de microesferas de PHB.

4.2. Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar las Ag-NPs y Au-NPs.
- Sintetizar y caracterizar las microesferas de PHB
- Elaborar y caracterizar la película delgada de microesferas de PHB con y sin Ag-NPs y Au-NPs
- Evaluar el efecto bactericida de las nanopartículas metálicas soportadas en la película frente a las cepas *E. coli* y *S. aureus*.

5. Materiales y métodos

5.1. Material biológico

La cepa *E. coli* MC4100 resistente a ampicilina (amp^R) fue donada por la Dra. Margarita María de la Paz Arenas Hernández, del laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos.

La cepa *Staphylococcus aureus* L27 resistente a meticilina (MRSA) y amp^R fue donada por la Dra. Rosa del Carmen Rocha Gracia, del laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, ambos laboratorios del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

5.2. Preparación de las nanopartículas de plata

Las Ag-NPs fueron sintetizadas siguiendo la metodología descrita por Turkevich, modificando el grado de agitación (Turkevich, 1951) y el método es el siguiente:

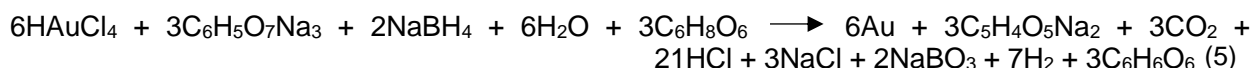
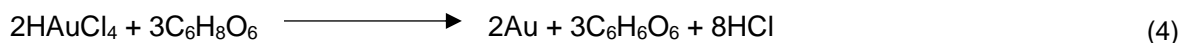
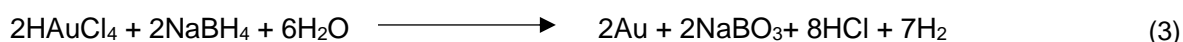
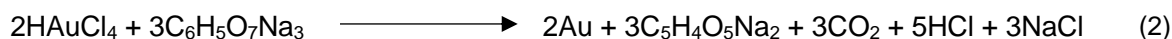
Una solución de 20 mL de nitrato de plata (AgNO₃) a una concentración de 1 mM (Riedel-de-Haen, 99%) fue transferido a un vaso de precipitados de 100 mL y este se llevó a una temperatura de 94°C en agitación vigorosa constante (1,200 rpm) sobre una parrilla (Thermo Fisher Scientific) por un lapso de 20 minutos, en seguida se agregó de forma rápida 2 mL de citrato de sodio (Na₃C₆H₅O₇) al 1% (J.T. Baker, 100 %). Esta solución se mantuvo en agitación hasta que cambió de un color transparente a un café oscuro. Posteriormente se retiró de la parrilla y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La reacción llevada a cabo durante la síntesis de las nanopartículas de plata el cual es propuesta por Khan y colaboradores (Khan *et al.* 2011), es la siguiente:



5.3. Preparación de las nanopartículas de oro

Las Au-NPs fueron sintetizadas por el método de semillas (Pérez *et al.* 2004). Para esto una solución de 30 mL fue preparada en un vaso de precipitados de 100 mL mezclando 15 mL de 0.125 mM de ácido cloroáurico (HAuCl₄) (Sigma-aldrich, ≥ 99 %) y 15 mL de 0.250 mM de citrato de sodio (J.T Baker, 100%). Después se adiciono 450 μL de una

solución 10 mM de Borohidruro de sodio (NaBH_4) (Sigma-aldrich, $\geq 98\%$) fue agregado rápidamente a la solución que se encontraba en agitación vigorosa (1,200 rpm). Cuando se logró apreciar un color rosa claro la solución se mantuvo en una agitación lenta (400 rpm) y a una temperatura de 45°C por un lapso de 20 minutos con el objetivo de eliminar el exceso de NaBH_4 . Obtenidas las semillas de oro, se preparó 40 mL de una solución de crecimiento mezclando 20 mL de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) (Sigma-aldrich, $\geq 99\%$) y 20 mL de 0.125 mM de HAuCl_4 ; en seguida se le adicionó 100 μL de 100 mM de ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), produciendo un cambio de color pasando de amarillo pálido a transparente. Finalmente, a 1.8 mL de las semillas de oro previamente sintetizadas fueron agregadas a la solución de crecimiento. Las reacciones químicas de formación de las Au-NPs mediante la incorporación de cada uno de los agentes reductores: (2) citrato de sodio propuesto por Tran y Luty (Tran y Luty, 2016), (3) borohidruro de sodio propuesto Luty-Blocho (Luty-Błocho *et al.* 2011) y (4) ácido ascórbico propuesto por Sun (Sun & Miao, 2009) y (5) la reacción total. Son las siguientes:



5.4. Preparación de las microesferas de PHB

Para la elaboración de las microesferas de PHB, 6 mL de una solución de PHB (Sigma-aldrich, $\geq 99.8\%$, 350,000 g/mol) a una concentración de 0.33 mg/mL disuelta en cloroformo (J.T. Baker, $\geq 99.8\%$), fue agregado por goteo en 10 mL de agua desionizada en agitación vigorosa constante (1,200 rpm). Dicha solución fue dejada en el mismo nivel de agitación por aproximadamente 24 horas para permitir la evaporación del cloroformo.

5.5. Preparación de la película de microesferas de PHB

Para la preparación de la película se utilizaron 2 mL de la solución de microesferas de PHB, a continuación, se agregó 0.5 mg de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) a la solución, seguido de esto la solución fue sometida a agitación por un tiempo de 30 minutos, seguido de sonicación por 30 minutos, esto se hizo de forma alterna hasta cumplir un

lapso de tiempo de 4 horas, con la finalidad de lograr la adsorción del CTAB. Lograda la dispersión la muestra fue centrifugada a 13000 rpm a 20 °C durante 20 minutos, con la finalidad de remover el excedente de CTAB. En seguida 100 µL de la solución fue depositada en una mica y secada a temperatura ambiente (Metodología propuesta en el laboratorio de Fisiología Microbiana de la Interacción Microorganismo-Hospedero).

6. Descripción de las técnicas utilizadas.

6.1. Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis)

La espectroscopia UV-Vis nos permite la identificación de las NPs mediante la posición del plasmón de superficie. Esto se logra haciendo incidir un haz de luz con diferentes longitudes de onda y determinando en donde se localiza la banda de absorción. La posición energética de dicho plasmón de superficie depende de la nanopartícula metálica, así como también de su tamaño y forma.

Para el análisis UV–Vis se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible Cary 100 Scan marca Varian del laboratorio de cromatografía del Instituto de Física (IF) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), Campus Valsequillo. Se llevó a cabo un barrido de 800 hasta los 200 nm. Para la medición de las nanopartículas de plata, oro y microesferas de PHB dispersas en agua, se utilizaron celdas de polimetilmetacrilato (PMMA). Se usó agua desionizada como blanco y para la obtención de la línea base.

6.2. Dispersión de Luz Dinámica

La dispersión de luz dinámica (DLS) es una técnica que se utiliza para la caracterización del tamaño hidrodinámico de partículas en muestras monodispersas y diluidas, en donde se hace pasar un haz de luz láser (longitud de onda de 632.8 nm) a numerosas partículas que hay en una suspensión. Debido al movimiento Browniano que estas presentan y que provoca que la luz se disperse en todas las direcciones posibles (Malvern, 2018). Para la determinación del tamaño se utilizó el equipo automatizado Zetasizer ZS90 marca MALVERN del laboratorio química general del IF, BUAP, Campus Valsequillo. Se utilizaron celdas DTS0012 y el protocolo del laboratorio de química general para la realización de cada una de las mediciones.

6.3. Determinación del potencial zeta

El potencial zeta es una medida de repulsión o atracción electrostática entre las partículas, y es uno de los parámetros fundamentales que afectan su estabilidad (Malvern, 2018). Se midió el potencial zeta de las partículas de plata, oro y PHB en el equipo Zetasizer ZS90 del laboratorio química general del IF, BUAP, Campus Valsequillo, utilizando celdas DTS1070 y el protocolo del laboratorio de química general para la realización de cada una de las mediciones.

6.4. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Para la determinación de la morfología y tamaño de las nanopartículas de Ag, Au y PHB, se fijó una pequeña cantidad de muestra sobre un sustrato de vidrio y se observó utilizando un microscopio de fuerza atómica modelo XE-7 marca Park Systems del laboratorio de caracterización de la Facultad de Físico-Matemáticas ubicado en Ciudad Universitaria. Para la medición de cada una de las muestras se utilizó el protocolo del laboratorio de caracterización.

6.5. Determinación de la concentración de plata de las Ag-NPs por absorción atómica

Para la determinación de la concentración de plata se siguió el protocolo del laboratorio de análisis instrumental, el cual consistió en realizar una digestión ácida a las Ag-NPs, para 2 mL de muestra de NPs se utilizó una relación de 9 mL de ácido nítrico (HNO_3) (J.T Baker, 66%) y 3 mL de ácido clorhídrico (HCl) (J.T Baker, 38%) concentrados, dicha mezcla fue calentada a temperatura de ebullición por un lapso de 30 minutos.

Se elaboró una curva de calibración de 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 y 1.2 partes por millón (ppm), a partir de una solución estándar de 10 ppm de AgNO_3 (Riedel-de-Haen, grado de pureza $\geq 99\%$), las cuales fueron aforadas a un volumen de 100 mL con una solución de HNO_3 al 5%. Se usó un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer HGA 900) con una lámpara multi elementos de cátodo hueco del laboratorio de análisis instrumental de la Facultad de Ingeniería Química ubicado en Ciudad Universitaria, la flama generada fue a base de acetileno como combustible (2.5 L/min) y aire (10 L/min) como oxidante.

6.6. Determinación de la concentración de oro de las Au-NPs por peso constante

Para la determinación de la concentración de Au en las Au-NPs se recurrió a la técnica de peso constante debido a que no se contaba con una lámpara de oro para realizar la cuantificación por absorción atómica. Un volumen de 30 mL de muestra fue centrifugado a 13000 rpm (20 °C por 20 minutos) esto se hizo dos veces con la finalidad de retirar el exceso de CTAB. La muestra fue agregada a una capsula previamente preparada (peso constante) y esta fue llevada a la mufla a una temperatura de 120 °C. Las mediciones de peso constante se realizaron en una balanza analítica (AND Company modelo BM-20) del laboratorio de caracterización magnética del IF, BUAP, Campus Valsequillo. Mediante la diferencia de pesos se calculó la concentración de las nanopartículas de oro. Para la medición de cada una de las muestras se utilizó el protocolo del laboratorio de caracterización magnética.

6.7. Espectrofotometría de infrarrojo (FTIR)

La interacción de la radiación infrarroja con los estados vibracionales de una molécula solo es posible si el campo eléctrico de la radiación incidente oscila con la misma frecuencia que el momento dipolar molecular (Mcmurry, 2008). El equipo que se utilizó para la caracterización de la película de microesferas de PHB fue un espectrómetro Perkin Elmer FTIR Spectrum One, en la región de 4500 cm^{-1} a 500 cm^{-1} (laboratorio de análisis instrumental de la Facultad de Ingeniería Química ubicado en Ciudad Universitaria). Para la medición de cada una de las muestras se utilizó el protocolo del laboratorio de análisis instrumental.

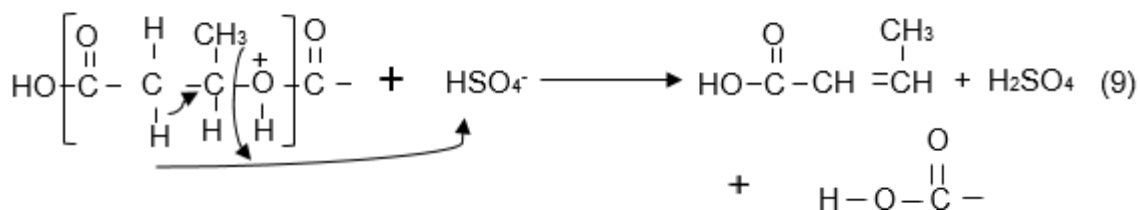
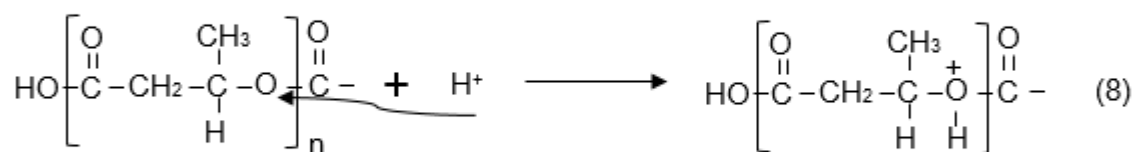
6.8. Cuantificación de PHB de la película delgada

La cuantificación de PHB se hizo mediante la técnica del ácido crotónico, el cual consta de los siguientes pasos: El primer paso consiste en la ionización del ácido sulfúrico (6 y 7), en el segundo paso se produce la protonación del oxígeno vecino al grupo carbonilo (8) y en el tercer paso se rompe el enlace carbono-oxígeno y al mismo tiempo el ion hidrosulfato reacciona con un átomo de hidrogeno del CH_2 , permitiendo la formación del ácido crotónico, regeneración del ácido sulfúrico y el resto de la cadena polimérica (9). (Slepecky, 1960).

La metodología consistió en tomar 50 μL de una solución de microesferas de PHB que estuvo en contacto con el sustrato de vidrio, este volumen fue transferido a un tubo de

vidrio y calentado a una temperatura de 65 °C hasta lograr la evaporación del líquido, una vez seca la muestra se agregó 5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) (J.T Baker, 95%), se calentó a 97 °C por 30 minutos, se dejó enfriar y posterior a ello la muestra fue transferida a una celda de cuarzo para medir su absorbancia en un espectrofotómetro (Zeigen, modelo UV 2101) a una longitud de onda de 235 nm. Como blanco se usó ácido sulfúrico tratado bajo las mismas condiciones.

Se elaboró una curva de calibración basándose en el protocolo del Laboratorio de Fisiología Microbiana de la Interacción Microorganismo-Hospedero utilizando PHB comercial (Sigma-Aldrich) disuelto en H₂SO₄ (concentrado) para cada uno de los puntos de la curva (9.49 µg/mL, 7.12 µg/mL, 5.34 µg/mL, 4 µg/mL, 3 µg/mL, 1.26 µg/mL, 0.94 µg/mL y 0.7 µg/mL).



6.9. Estudios microbiológicos

6.9.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración mínima bactericida (CMB) y cinética de crecimiento bacteriano

La CMI de las microesferas de PHB, CTAB, PHB-CTAB y la CMB de las Ag-NPs y Au-NPs, se llevó a cabo mediante el protocolo establecido por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, 2016).

Preparación del inóculo: La preparación del inóculo bacteriano para la cepa de *E.coli* MC4100 y *S. aureus* L27, se llevó a cabo partiendo de un cultivo previo en agar de 24 horas, se resuspendieron 3 colonias en un tubo de caldo Luria-Bertani (LB) y estas fueron incubadas a 37 °C hasta obtener una turbidez comparable al 0.5 McFarland (1×10^8 UFC/mL), esta turbidez fue medida en un espectrofotómetro dando un valor de $D.O_{625nm} = 0.08-0.1$ de absorbancia. El inóculo se diluyó 1:20 en un volumen final de 1 mL hasta obtener una concentración de 5×10^6 UFC/mL, de este inóculo se tomaron 10 μ L que fueron agregados a los 100 μ L de la sustancia a probar, para obtener una concentración final de 5×10^5 UFC/mL (para garantizar la concentración final del inóculo se realizó un conteo en placa).

Preparación de las NPs: 6 mL de las partículas de plata (74 y 114 nm) y 1 mL de NPs de oro (76 nm), PHB (172 nm) y PHB-CTAB (relación 4:1), fueron centrifugadas a una velocidad de 13000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante de cada una de las NPs fue descartado y cada paquete obtenido fue resuspendido en 1 mL de caldo LB, posteriormente se realizaron diluciones seriadas 1:2. Las concentraciones para cada tipo de NPs se observan en la **Tabla 1**.

En una placa de ELISA de 96 pozos fueron agregados 100 μ L de cada una de las muestras a estudiar (Ag-NPs, Au-NPs, CTAB, PHB y PHB-CTAB), a estos se añadieron 10 μ L del inóculo bacteriano, la microplaca fue incubada a temperatura de 37°C por 20 horas y se determinó la CMI con base a la turbidez aparente. Para la determinación de la CMB las muestras fueron sembradas en agar LB para cada una de ellas, para determinar la viabilidad, cada uno de los ensayos se realizaron por triplicado y eventos independientes.

Tabla 1. Concentraciones de CTAB y Ag-NPs, Au-NPs, PHB y PHB funcionalizado con CTAB utilizadas para la CMI y CMB.

Muestra	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Conc. 7	Conc. 8	Conc. 9	Conc. 10	Conc. 11
Ag-NPs	11.5 µg/mL	5.75 µg/mL	2.87 µg/mL	1.43 µg/mL	0.71 µg/mL						
Au-NPs	22 µg/mL	11 µg/mL	5.5 µg/mL	2.75 µg/mL	1.38 µg/mL	0.69 µg/mL					
PHB	330 µg/mL	165 µg/mL	82.5 µg/mL	41.25 µg/mL	20.62 µg/mL						
CTAB	125 µg/mL	62.5 µg/mL	31.2 µg/mL	15.6 µg/mL	7.8 µg/mL	3.9 µg/mL	1.95 µg/mL	0.97 µg/mL	0.48 µg/mL	0.24 µg/mL	0.12 µg/mL
PHB-CTAB	330 µg/mL	165 µg/mL	82.5 µg/mL	41.25 µg/mL	20.62 µg/mL	10.31 µg/mL	5.15 µg/mL				

Preparación de la película de esferas de PHB unida a NPs metálicas: En una microplaca de ELISA de 96 pozos, 50 µL de una solución de 5.15 µg/mL PHB-CTAB fueron depositadas en cada uno de los pozos a utilizar. La microplaca fue colocada en una incubadora a una temperatura de 37°C por un lapso de 24 horas para lograr la evaporación del solvente. Para la incorporación de las Ag-NPs y Au-NPs a la película, estas fueron lavadas con agua tridestilada y concentradas en un volumen aproximado de 100 µL, agregadas a cada uno de los pozos como se describió anteriormente en la **Tabla 1** y se dejaron incubar a 37 °C por un lapso de 24 horas, con la finalidad de lograr la evaporación del solvente. En seguida, 100 µL de caldo LB fueron agregados en cada uno de los pozos que contenían a las Ag.NPs y Au-NPs soportadas en la película de microesferas de PHB y por último 10 µL del inóculo bacteriano (5×10^5 UFC/mL). Para la curva de viabilidad se optó por trabajar con la CMB y con el doble de dicha concentración, esto se realizó con la finalidad de inhibir el crecimiento total de las cepas ya que al estar soportadas las NPs no podrían interactuar de manera directa con los microorganismos. Se tomaron muestras de 10 µL cada 3 horas por un lapso de 12 horas. Se sembró por la técnica de droplate en agar LB (Chen, 2003), se incubó por 24 horas a 37°C y se realizó un conteo en placa, cada uno de los ensayos se realizaron por triplicado y eventos independientes.

7. Resultados

Las nanopartículas metálicas y las microesferas de PHB se caracterizaron mediante espectroscopia Ultravioleta Visible (UV-Vis) para determinar la longitud de onda de resonancia del plasmón de superficie de las nanopartículas metálicas y el pico de absorción característico del PHB. También se utilizó la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) para conocer el tamaño hidrodinámico de las NPs y el potencial zeta (PZ) para determinar la carga superficial de éstas. La microscopia de fuerza atómica (AFM) se utilizó para determinar la morfología y tamaño de las NPs. Una vez obtenida la película delgada de microesferas se utilizó AFM para conocer la morfología de la película obtenida, posteriormente se realizó espectroscopia de infrarrojo (FTIR) para confirmar si la película elaborada contenía PHB, esto basándose en la identificación de grupos funcionales del polímero. Además, se realizó la cuantificación del PHB mediante el método del ácido crotonico para conocer la cantidad depositada en la película. Debido a que el sustrato de vidrio se observaba totalmente transparente, lo cual indicaba que posiblemente no había depósito de material. Se optó por utilizar la técnica de perfilometría como una prueba confirmatoria, para conocer si había depósito alguno de las microesferas PHB en el sustrato de vidrio. Los resultados obtenidos por las técnicas antes mencionadas, así como también de los estudios microbiológicos realizados se muestran a continuación:

7.1. Síntesis de nanopartículas de plata y oro

Las nanopartículas fueron sintetizadas por los métodos de reducción química como se describió anteriormente. En la **Figura 3** se puede observar que las Ag-NPs tienen un color café oscuro, mientras que las Au-NPs poseen un color rosado.

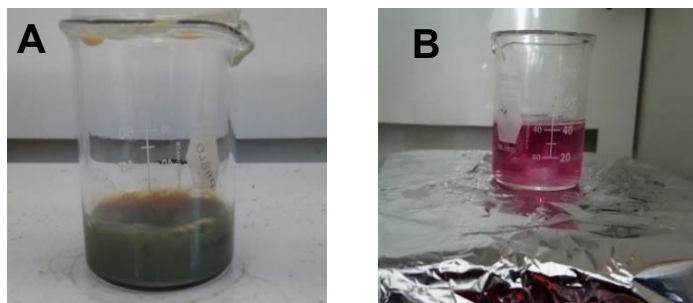


Figura 3. Nanopartículas metálicas obtenidas por el método de reducción química. A) muestra de Ag-NPs y B) muestra de Au-NPs.

Caracterización de las Ag-NPs y Au-NPs

7.2. Espectroscopía UV-Vis

Se obtuvieron los espectros UV-Vis de las muestras de Ag-NPs, Au-NPs y de las microesferas de PHB, los cuales se muestran en las Figuras 7-9. En la **Figura 4**, se observa el espectro de UV-Vis de las Ag-NPs, en donde se aprecia la banda de absorción localizada en 429 nm. En la **Figura 5** se observa el espectro de las Au-NPs, en donde se ve la banda de absorción ubicada en 529 nm y en la **Figura 6** se muestra el espectro de las microesferas de PHB, la banda de absorción se localiza en 285 nm.

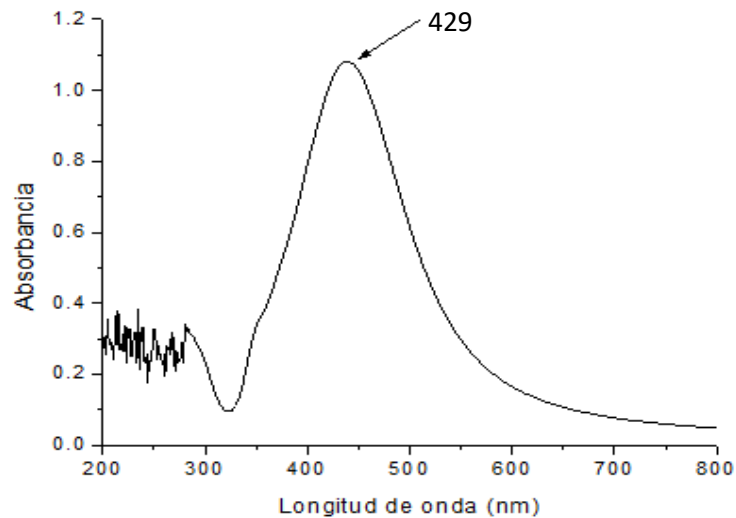


Figura 4. Espectro de UV-Vis de las Ag-NPs. La longitud de onda de la resonancia del plasmón de superficie se encuentra en 429 nm

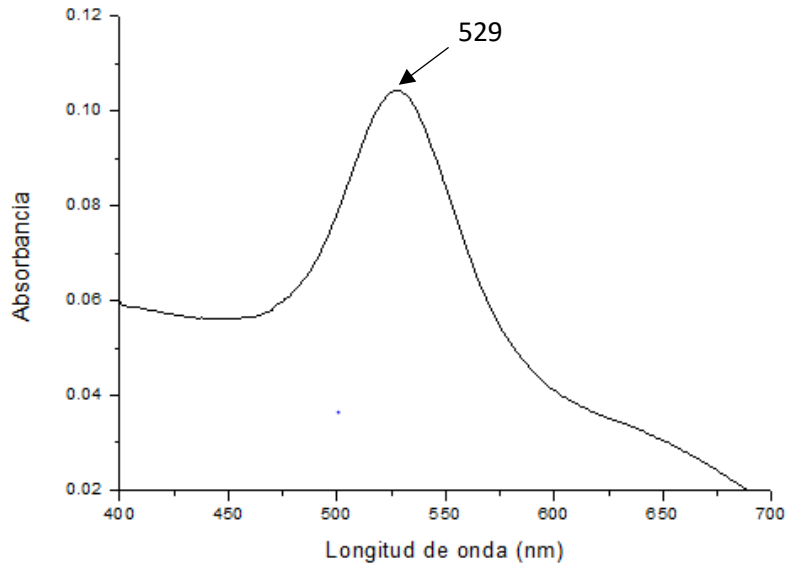


Figura 5. Espectro UV-Vis de las Au-NPs. La longitud de onda de la resonancia del plasmón de superficie se encuentra en 529 nm.

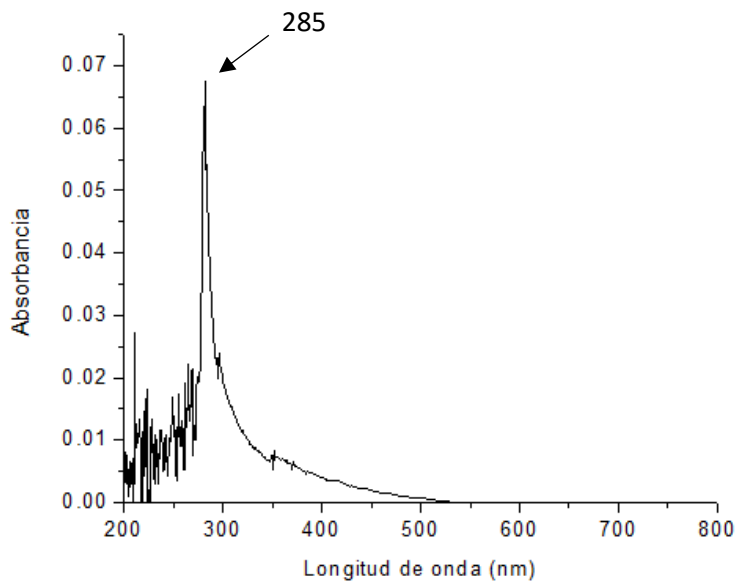


Figura 6. Espectro UV-Vis de las microsferas de PHB. El pico de absorción se encuentra ubicado en 285 nm.

7.3. Estimación de tamaños por DLS

La técnica de dispersión de luz dinámica nos permite analizar poblaciones grandes de partículas en dispersión, los datos obtenidos por esta técnica se presentan a continuación. En la **Figura 7** se presenta la curva de distribución del diámetro hidrodinámico de las Ag-NPs obtenidas por la técnica DLS donde se observa 3 picos correspondientes a 3 poblaciones distintas de tamaños, una de 66 ± 26 nm correspondiente a una intensidad del 79.6%, seguida de una población de 6 ± 2 nm con una intensidad del 19.2% y una última población de 5335 ± 366 nm correspondiente a una intensidad del 1%. En la **Figura 8** se presenta la curva de distribución del diámetro hidrodinámico de las Au-NPs, donde se observan 2 picos que corresponde a 2 tamaños de población, una de 78 ± 36 nm correspondiente a una intensidad del 80.7% y una población de un tamaño de 5 ± 1 nm con una intensidad del 19%. Finalmente en la **Figura 9** se presenta la gráfica de distribución del diámetro hidrodinámico de las esferas de PHB donde se observa tres rangos de tamaño, una de 246 ± 182 nm con una intensidad del 95.3%, seguida de una población de 4916 ± 671 nm correspondiente a una intensidad del 2.9% y una última población de 0.88 ± 0.06 nm correspondiente a una intensidad del 1.8%.

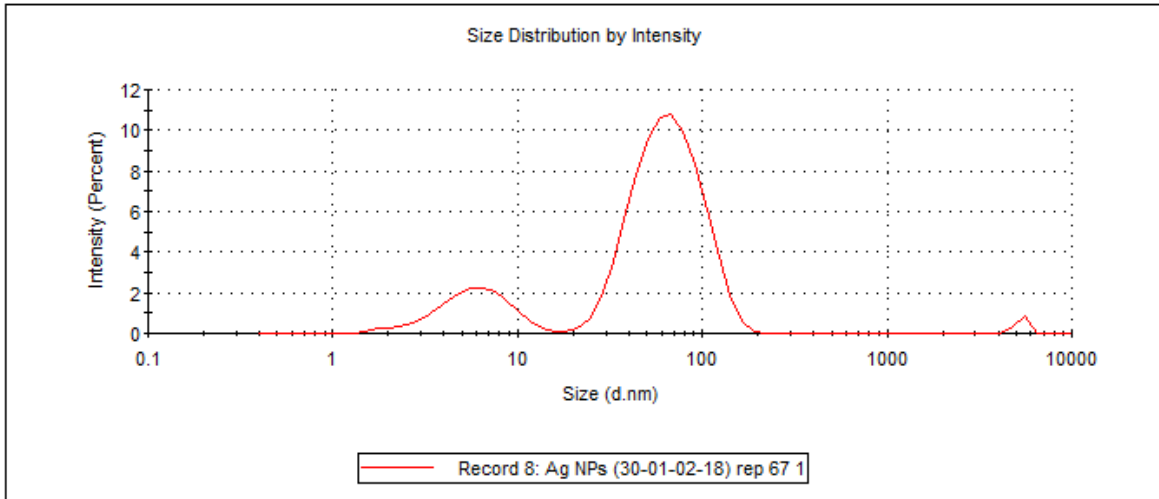


Figura 7. Gráfica de distribución del diámetro hidrodinámico de las Ag-NPs obtenida por DLS. Observando 3 tamaños de población: 66 ± 26 nm, 6 ± 2 nm y 5335 ± 366 nm.

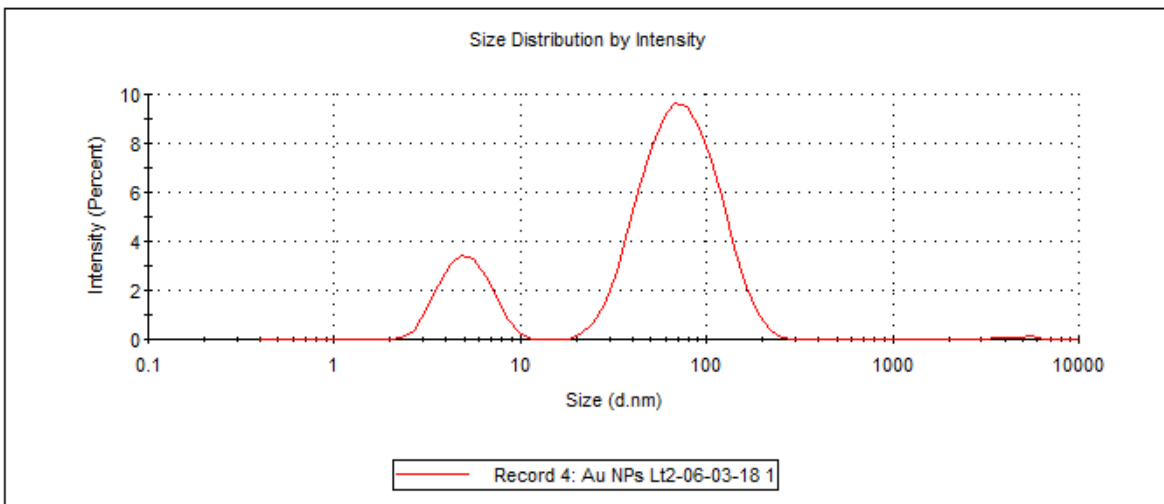


Figura 8. Gráfica de distribución del diámetro hidrodinámico de las Au-NPs obtenida por DLS. Observando 2 tamaños de población: 78 ± 36 nm y 5 ± 1 nm.

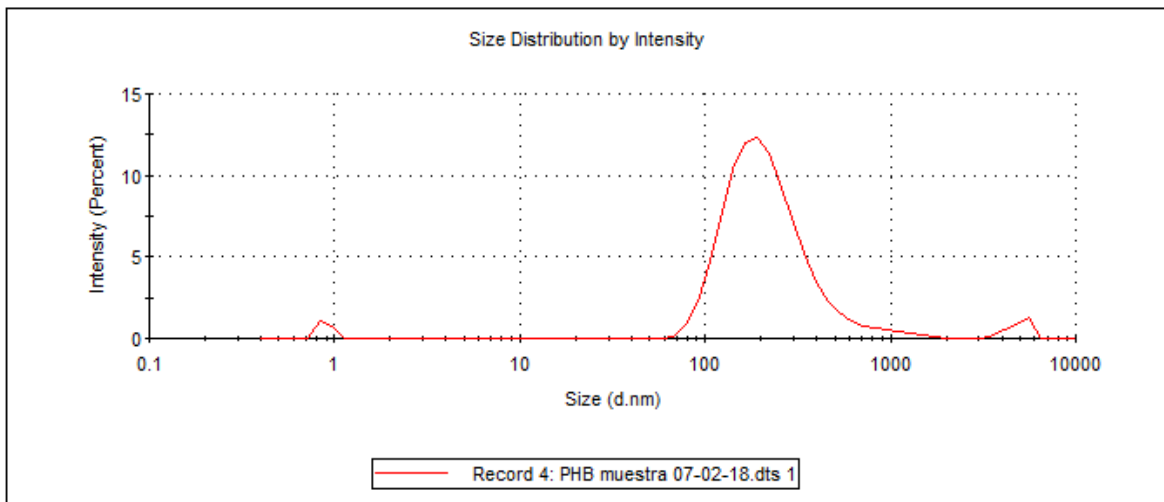


Figura 9. Gráfica de distribución diámetro hidrodinámico de las microsferas de PHB obtenida por DLS: Observando 3 tamaños de población: 246 ± 182 nm, 4916 ± 671 nm y 0.88 ± 0.06 nm.

7.4. Determinación de la estabilidad de las Ag-NPs, Au-NPs y microsferas de PHB por potencial zeta

Para conocer la estabilidad de las partículas se determinó el potencial zeta. Los datos obtenidos se presentan en la **Figura 10**, en la cual se observa el gráfico de distribución de potencial z de las Ag-NPs obteniendo un valor de -39 mV; En la **Figura 11** se observa el gráfico de distribución de potencial z de las Au-NPs obteniendo un valor de 45 mV. En la **Figura 12** se observa el gráfico de distribución de potencial z de las microsferas de PHB obteniendo un valor de -21 mV. Estos datos nos indican que las Au-NPs son las más estables, seguido de las Ag-NPs y microsferas de PHB. Y esto es debido a que el potencial zeta indica el grado de repulsión electrostática entre partículas, mientras más alto sea el valor mayor estabilidad presentaran las NPs.

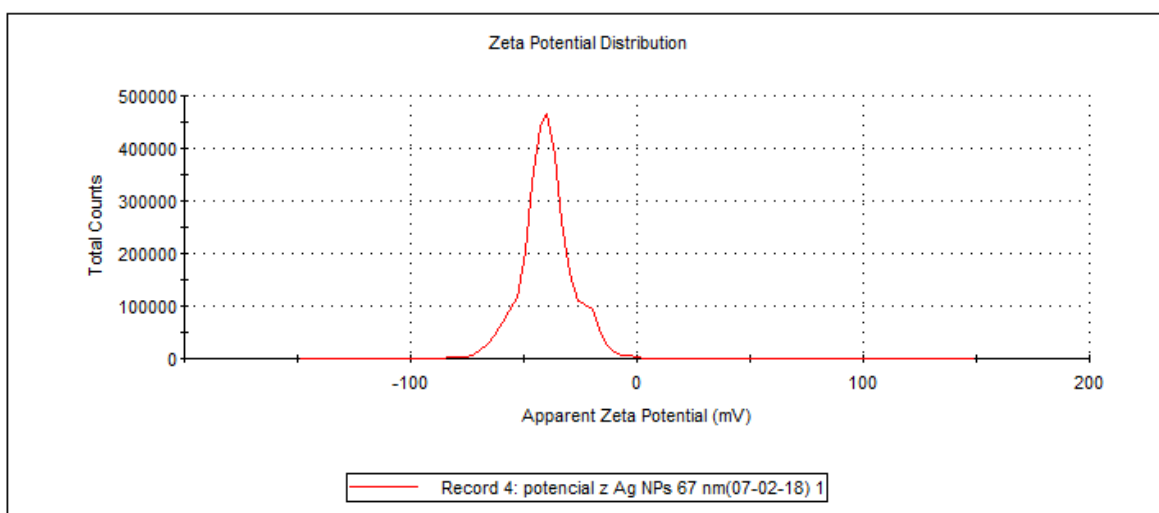


Figura 10. Gráfico de potencial zeta de las Ag-NPs.

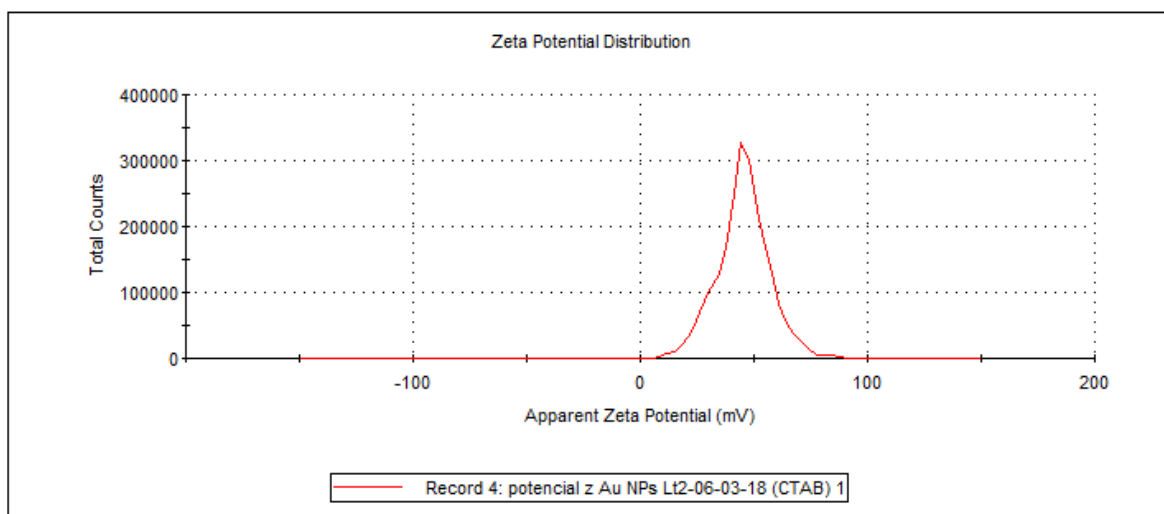


Figura 11. Gráfico de potencial zeta de las Au-NPs

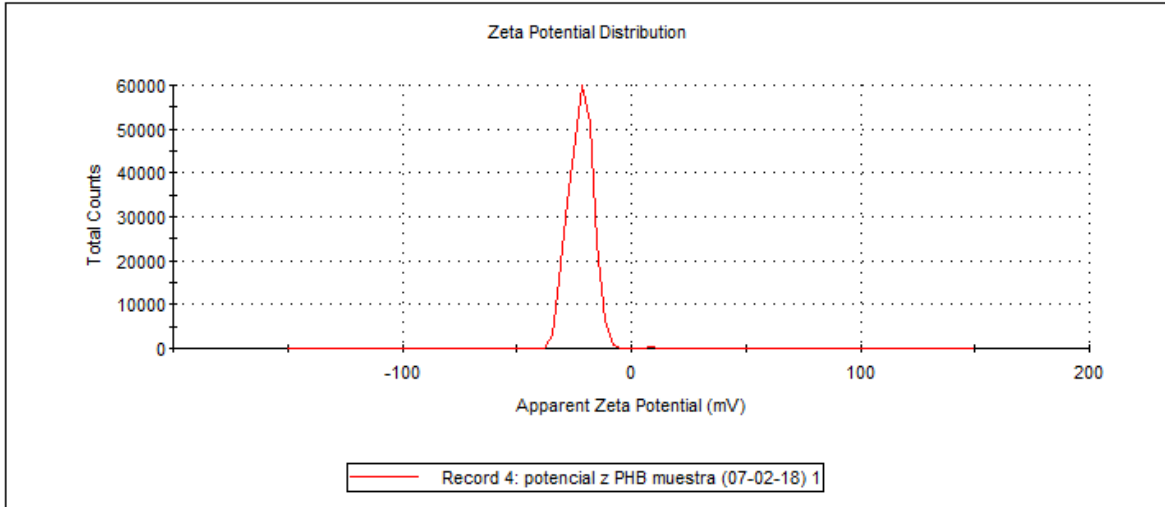


Figura 12. Gráfico de potencial zeta de las microsferas de PHB

7.5. Determinación de la forma y tamaño de las nanopartículas y de la película delgada de microsferas de PHB por AFM

Para determinar la forma y el tamaño de las NPs y de las microsferas de PHB se obtuvieron imágenes por AFM y mediante un análisis de imagen utilizando el software Gwyddion se obtuvo una distribución de tamaño de las nanopartículas. En la **Figura 13 A**, se observan las Ag-NPs sintetizadas por el método de Turkevich, estas presentan una forma esférica y dos tamaños de distribución una de 74.3 ± 10 nm y 114.1 ± 17.4 nm (**Figura 13 B**). En la **Figura 13 C**, se puede observar que las Au-NPs sintetizadas por el método de semillas tienen una forma casi esférica y presentan un tamaño de distribución de $76.5 \text{ nm} \pm 15.7$ nm (**Figura 13 D**). En la **Figura 13 E** se puede observar las microsferas de PHB tienen una forma esférica y se pueden observar diversos tamaños en las imágenes, éstas poseen un tamaño de distribución $172.3 \text{ nm} \pm 40.9$ nm (**Figura 13 F**). En la **Figura 13 G** se puede observar la morfología de la película de microsferas de PHB y esta posee una distribución de tamaño de $187.6 \text{ nm} \pm 22.8$ nm (**Figura 13 H**).

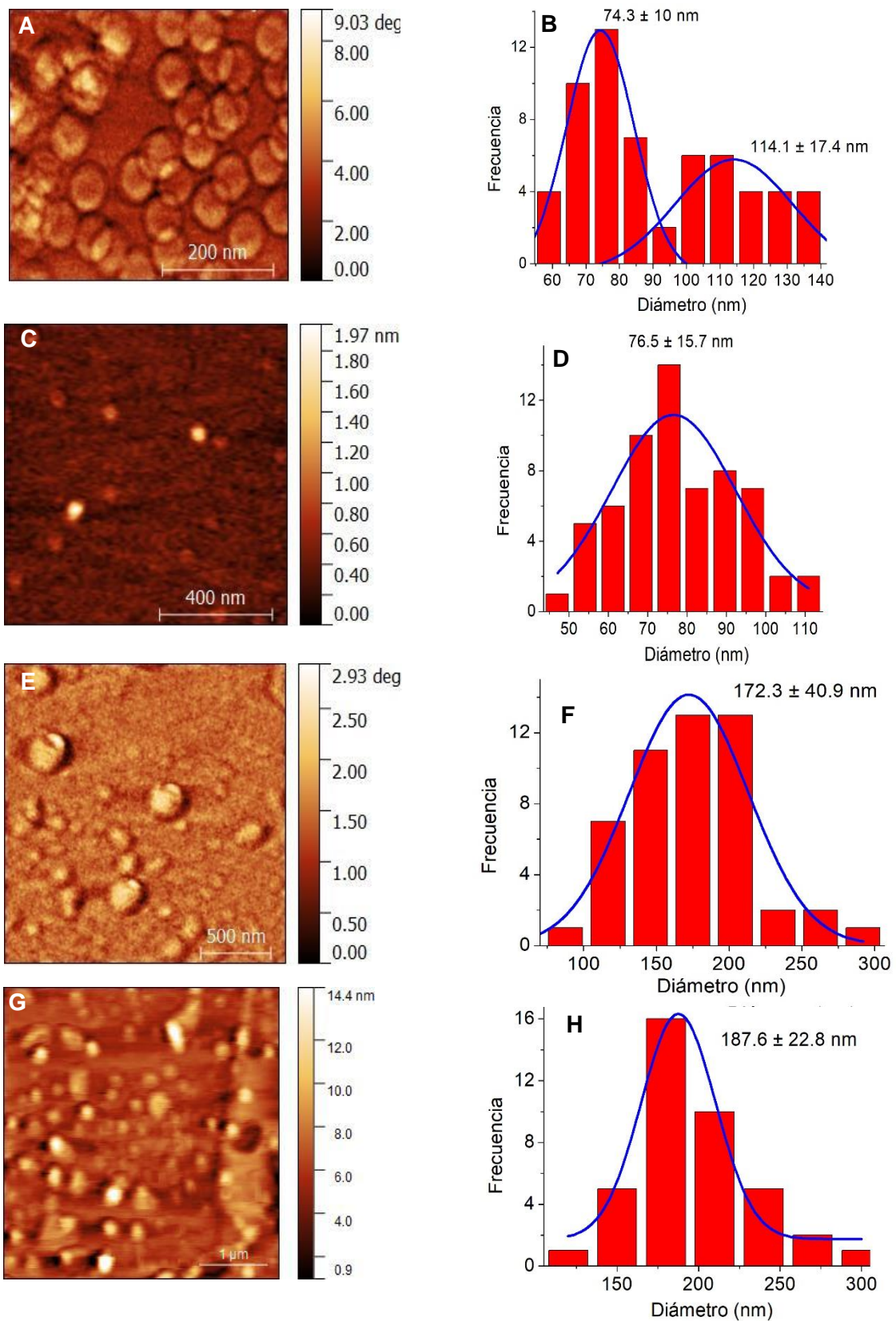


Figura 13 . Imagen de AFM e Histograma de las NPs: (A) Imagen de AFM de Ag-NPs; (B) Histograma de las Ag-NPs; (C) Imagen de AFM de las Au-NPs; (D) Histogramas de las Au-NPs; (E) Imagen de AFM de las microsferas de PHB; (F) Histograma de las microsferas de PHB; (G) Imagen de AFM de la película delgada de PHB; (H) Histograma de la película delgada de PHB

7.6. Determinación de la concentración de plata de las Ag-NPs por absorción atómica

Los resultados obtenidos de las muestras de las Ag-NPs mediante la técnica de absorción atómica, nos da como resultado que las muestras tienen una concentración de Ag^+ [$0.96 \pm 0.003 \mu\text{g/mL}$]. Los cálculos para llegar a las concentraciones empleadas en dicho trabajo se pueden observar en el Anexo 1.

7.7. Determinación de la concentración de Au-NPs mediante la técnica de peso constante

Los resultados obtenidos mediante la técnica de peso constante, nos indicó que la concentración de Au-NPs a partir de un volumen de 30 mL es de $44 \mu\text{g/mL}$. Los cálculos para llegar a las concentraciones empleadas en el trabajo se pueden observar en el Anexo 2.

7.8. Espectrofotometría de infrarrojo de la película delgada de microesferas de PHB

Para la caracterización de la película delgada de microesferas de PHB se utilizó espectrofotometría de infrarrojo (**Figura 14**), donde se observan picos localizados en 3328 , 2997 , 2880 , 1724 , 1279 y 1039 cm^{-1} que corresponden a los modos vibracionales de flexión de los grupos $-\text{OH}$, CH_3 , CH_2 , $\text{C}=\text{O}$, CH y $\text{C}-\text{O}$ respectivamente. Lo cual nos da indicio que el material depositado en el portaobjetos se puede tratar del PHB.

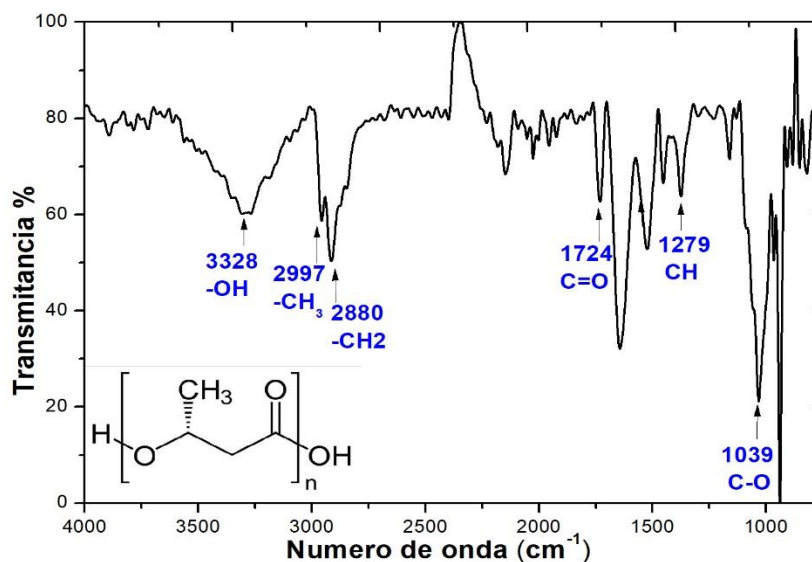


Figura 14. Espectro en el infrarrojo de la película delgada de microesferas de PHB, como control se utilizó un sustrato de vidrio que fue sometido bajo las mismas condiciones que la muestra.

7.9. Cuantificación del biopolímero de la película delgada

En la reacción para la formación del ácido crotonico (**Figura 4**) se puede deducir que un mol de ácido crotonico corresponde a 1 mol de PHB, por lo que la concentración obtenida de ácido crotonico es igual a la de PHB. A partir de la curva estándar (**Anexo 3**) se hizo la cuantificación de PHB obteniendo una concentración de 0.945 µg/mL (correspondientes a 50 µL de la solución), para conocer la concentración del polímero en los 2 mL de la solución (estuvo en contacto con el sustrato) se hicieron los cálculos correspondientes obteniendo una concentración de 37.8 µg/mL correspondientes al polímero. La concentración inicial de PHB en la solución fue de 0.033 mg/mL, por lo tanto, la concentración de PHB en los 2 mL de la solución es de 0.066 mg ó 66 µg, por lo que la concentración de PHB depositado en el material, se realizó mediante una diferencia de la concentración inicial del polímero y la concentración del polímero no depositado, dando como resultado que la concentración del polímero depositado en el material es de 28.2 µg.

$$[\text{PHB}]_{\text{depositado}} = [\text{PHB}]_o - [\text{PHB}]_{\text{no depositado}}$$

Donde:

$[\text{PHB}]_{\text{depositado}}$ = concentración en (µg) del polímero depositado

$[\text{PHB}]_o$ = concentración inicial en (µg) del polímero

$[\text{PHB}]_{\text{no depositado}}$ = concentración en (µg) del polímero no depositado (calculado a partir de la reacción del ácido crotonico de la solución de microesferas de PHB que estuvo en contacto con el sustrato de vidrio).

7.10. Perfilometría de la película

El valor del espesor obtenido por el perfilometro es 130.14 nm, este resultado puede ser considerado como un dato de referencia del perfil de la película, ya que la técnica determina un valor directo del espesor. Dicho dato da indicio de que las esferas más pequeñas se hayan ordenado en monocapa, recordando que se tiene una amplia distribución de tamaños de las microesferas de PHB.

7.11. Análisis microbiológico

7.11.1. Determinación de la CMI de las cepas *E. coli* MC4100 y *S. aureus* L27

Para determinar la CMI y CMB, ambas cepas *E. coli* MC4100 y *S. aureus* L27 fueron retadas con distintas concentraciones de CTAB, Ag-NPs, Au-NPs, PHB y PHB-CTAB siguiendo los lineamientos que marca el CLSI. Los resultados se presentan en las **Tablas 2 y 3**. Los resultados obtenidos de la CMI, se observa que *E. coli* MC4100 presenta una mayor resistencia al CTAB y PHB-CTAB caso contrario a *S. aureus* L27. En el caso de la CMB se observa que *S. aureus* L27 presenta una mayor resistencia a las Ag-NPs mientras que *E. coli* MC4100 presenta una mayor tolerancia a las Au-NPs.

Tabla 2. CMI de *E. coli* MC4100 y *S. aureus* L27 con CTAB, PHB y PHB-CTAB. Los valores obtenidos de la CMI para *E. coli* MC4100 fueron: 3.9 µg/mL CTAB, >330 µg/mL PHB y 82.5 µg/mL PHB-CTAB, en el caso de *S. aureus* L27 los resultados obtenidos fueron: 0.24 µg/mL CTAB, >330 PHB µg/mL y 10 µg/m PHB-CTAB respectivamente.

CMI			
Cepa	CTAB	PHB	PHB-CTAB
<i>E. coli</i> MC4100	3.9 µg/mL	>330 µg/mL	82.5 µg/mL
<i>S. aureus</i> L27	0.24 µg/mL	>330 µg/mL	10 µg/mL

Tabla 3. CMB de *E. coli* MC4100 y *S. aureus* L27 con Ag-NPs y Au-NPs. Los valores obtenidos de la CMB para *E. coli* MC4100 fueron: 4.95 Ag-NPs y 11 µg/mL Au-NPs, en el caso de *S. aureus* L27 los resultados obtenidos fueron: 11.5 Ag-NPs y 1.38 µg/mL Au-NPs.

CMB		
Cepa	Ag-NPs	Au-NPs
<i>E. coli</i> MC4100	4.95 µg/mL	11 µg/mL
<i>S. aureus</i> L27	11.5 µg/mL	1.38 µg/mL

7.11.2. Cinética de crecimiento bacteriana

En la realización de la cinética microbiana se trabajó con la CMB y con el doble de dicha concentración, esto se realizó debido a que al estar soportadas las NPs no podrían interactuar de manera directa con los microorganismos, por lo que para inhibir el crecimiento total de las cepas se optó por trabajar con dicha concentración (doble de la CMB). Para las Ag-NPs se emplearon concentraciones de 4.95, 9.90, 11.5 y 23 $\mu\text{g/mL}$ **Tabla 3**, en el caso de las Au-NPs se utilizaron concentraciones de 1.38, 2.76, 11 y 22 $\mu\text{g/mL}$ **Tabla 3**.

Para la realización de la cinética de crecimiento microbiano en presencia de las partículas en solución, se utilizó como control positivo (C+) una muestra sin NPs. En el caso de la cinética de crecimiento en presencia de la NPs soportadas en la película delgada de microesferas de PHB se utilizaron como controles: una muestra sin NPs y sin película (C+) y una con la película delgada de microesferas de PHB. En la **Figura 15** se presenta la cinética de crecimiento de *E. coli* MC4100 en diferentes condiciones: **A)** presencia de las Ag-NPs en solución y **B)** soportadas en películas de PHB. Se utilizaron 2 concentraciones de NPs, se observó que a partir de las 3 horas la concentración de 4.95 $\mu\text{g/mL}$ tiene un efecto menor en la inhibición del crecimiento en comparación a la observada a una concentración de 9.90 $\mu\text{g/mL}$. Un comportamiento similar fue observado cuando las partículas se encuentran soportadas en la película de PHB, **Figura 15 B**, donde ambas concentraciones logran la inhibición total del crecimiento de la cepa a partir de las 6 horas.

En la **Figura 15 C** se observa la cinética de crecimiento de *S. aureus* L27 en presencia de las Ag-NPs en solución, donde se observa que las concentraciones empleadas (11.5 y 23 $\mu\text{g/mL}$) inhiben el crecimiento total de la cepa a partir de las 6 horas, caso contrario fue observado cuando las NPs se encontraban soportadas en la película, **Figura 15 D**, observando un desfase de 3 horas en la inhibición del crecimiento de ésta cepa, para ambas concentraciones de NPs empleadas.

En la **Figura 16 A** se muestra la cinética de crecimiento de *E. coli* MC4100, en presencia de las Au-NPs en solución, se observó que la concentración de 22 $\mu\text{g/mL}$ logró inhibir completamente el crecimiento de la cepa a las 3 horas mientras que una concentración de 11 $\mu\text{g/mL}$ la inhibición del crecimiento de la cepa se presentó a partir de las 6 horas. Cuando ambas concentraciones se encontraban soportadas en la película se observó que la concentración de 22 $\mu\text{g/mL}$ no presentó una modificación en el tiempo de inhibición de

la cepa en comparación a la concentración de 11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ que presentó un desfase de 3 horas en el tiempo de inhibición **Figura 16 B**.

En la **Figura 16 C** se muestra la cinética de crecimiento de *S. aureus* L27 en presencia de las Au-NPs en solución, observando que una concentración doble de la CMB (2.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y la CMB (1.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$) logran inhibir el crecimiento de dicha cepa a partir de las 3 horas. El mismo tiempo de inhibición del crecimiento total de la cepa es visto para ambas concentraciones de Au-NPs cuando se encuentran soportadas en la película logrando la inhibición del crecimiento a partir de las 3 horas **Figura 16 D**.

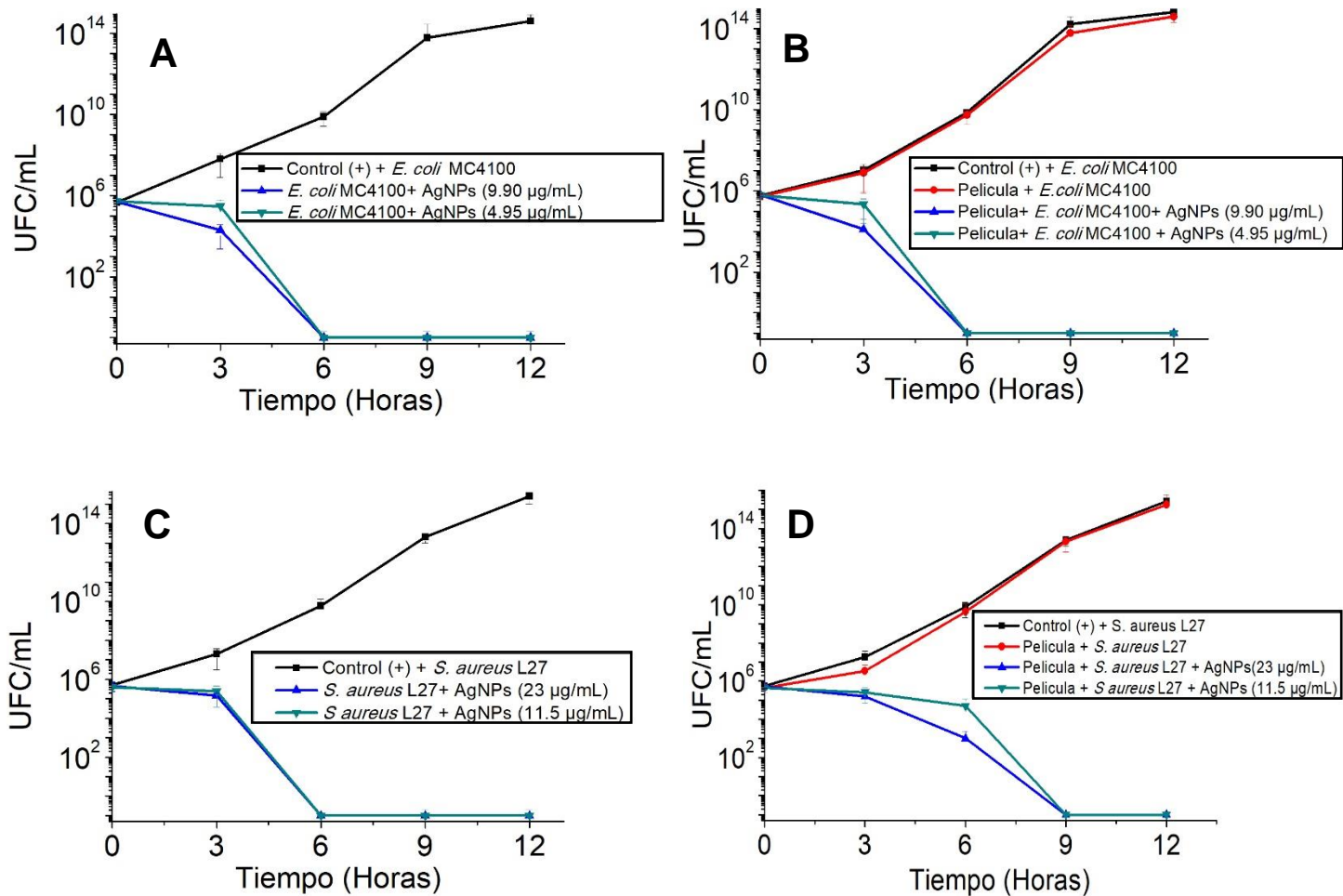


Figura 15. Cinética de crecimiento de *E. coli* MC4100 y *S. aureus* L27 en presencia de las NPs en solución y soportadas en la película delgada de microesferas de PHB. **A)** Cinética de crecimiento de *E. coli* MC4100 en presencia de Ag-NPs (4.95 y 9.90 µg/mL) en solución, **B)** Cinética de crecimiento de *E. coli* MC4100 en presencia de las Ag-NPs soportadas en la película delgada de PHB, **C)** Cinética de crecimiento de *S. aureus* L27 en presencia de Ag-NPs (11.5 y 23 µg/mL) en solución, **D)** Cinética de crecimiento de *S. aureus* L27 en presencia de las Ag-NPs soportadas en la película delgada.

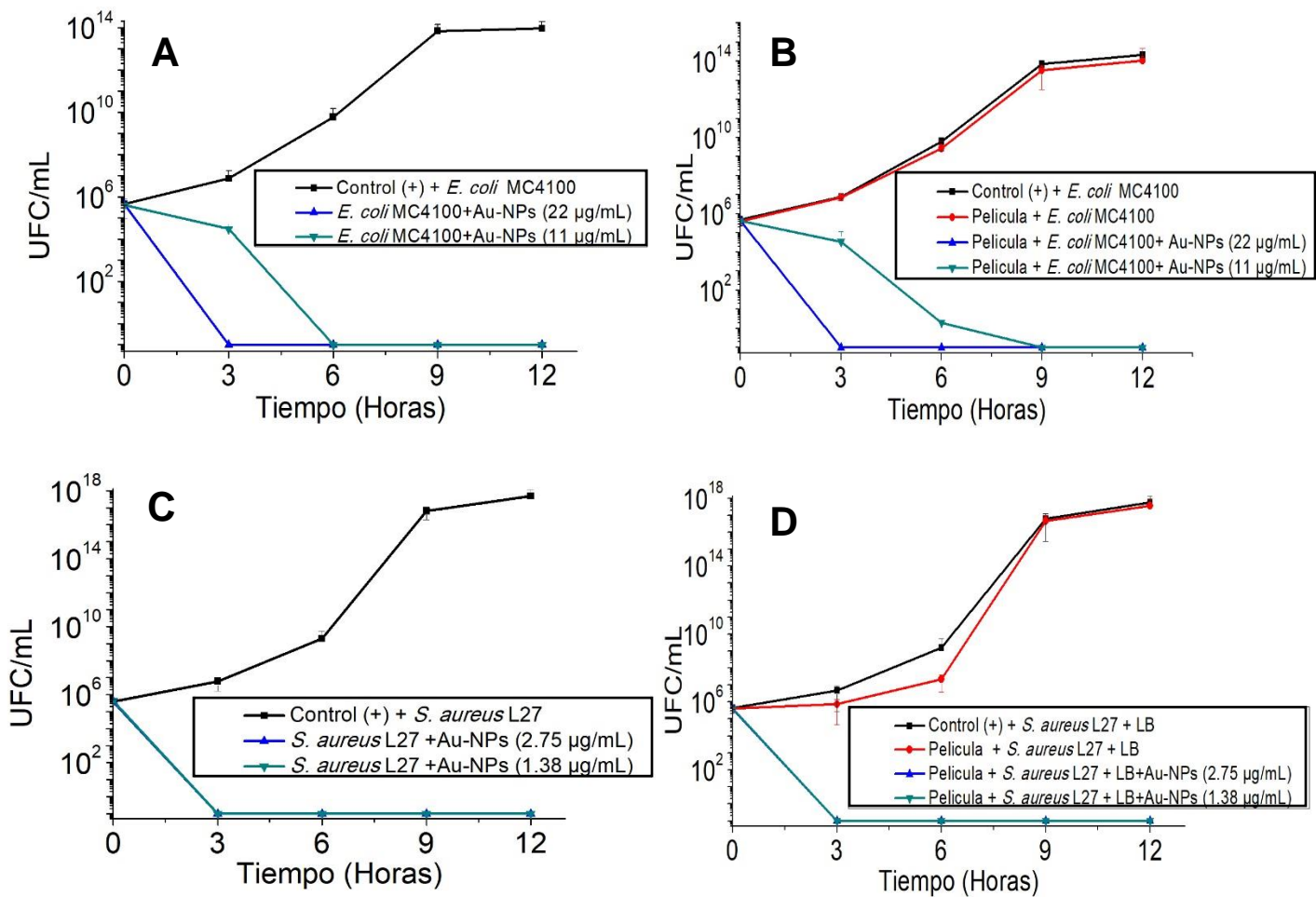


Figura 16. Cinética de crecimiento de *E. coli* MC4100 y *S. aureus* L27 en presencia de las NPs en solución y soportadas en la película delgada de microesferas de PHB. **A)** Cinética de crecimiento de *E. coli* MC4100 en presencia de Au-NPs en solución, **B)** Cinética de crecimiento de *E. coli* MC4100 en presencia de las Au-NPs soportadas en la película delgada de PHB, **C)** Cinética de crecimiento de *S. aureus* L27 en presencia de Au-NPs en solución, **D)** Cinética de crecimiento de *S. aureus* L27 en presencia de las Au-NPs soportadas en la película delgada.

8. Discusión de resultados

En el presente trabajo se sintetizaron Ag-NPs y Au-NPs por el método de reducción química, con respecto a las primeras se aprecian tamaños promedios de 74.3 ± 10 nm y 114.1 ± 17.4 nm, las cuales están asociadas a una banda ancha en el plasmón de superficie posicionado en 429 nm. Además, las Ag-NPs poseen una forma casi esférica, basándonos en los resultados obtenidos por AFM. Algo similar fue determinado por Bastús y colaboradores, sintetizaron Ag-NPs mediante reducción química utilizando la técnica de semillas, obteniéndolas con un tamaño promedio de 103 nm, las cuales están asociadas a una banda ancha en el plasmón de superficie posicionado en 435 nm. Argumentando que este ensanchamiento de banda, es debido a los diversos tamaños de nanopartículas obtenidos como producto final de la síntesis (10-110 nm) (Bastús *et al.* 2014). Por lo antes mencionado debido a la distribución de tamaños se induce un ensanchamiento en la banda del plasmón de superficie.

Las Au-NPs sintetizadas por el método de semillas, permitieron obtener NPs con un tamaño de promedio de $76.5 \text{ nm} \pm 15.7$ nm y una forma casi esférica. Las cuales están asociadas a una banda ancha en el plasmón de superficie, posicionado en 529 nm, el cual fue determinado por el análisis en UV-Vis. Rodríguez y colaboradores sintetizaron Au-NPs por el método de semillas, obtuvieron NPs con tamaños entre 12-70 nm y están asociadas a un ensanchamiento del pico de absorción entre 525 a 548 nm (Rodríguez *et al.* 2006). Por otro lado Ghaforyan y colaboradores, afirman que para partículas de menor tamaño presentan picos más definidos en comparación a las partículas más grandes, ya que a medida que aumente el tamaño se presenta un desplazamiento hacia longitudes de onda mayor y se produce un ensanchamiento del pico de absorción (Ghaforyan *et al.* 2015). Debido a lo anteriormente mencionado nuestros resultados son similares a los reportados por Ghaforyan, ya un mayor tamaño produce un desplazamiento hacia longitud de onda e induce un ensanchamiento en a banda del plasmón de superficie.

Para el caso de las microesferas de PHB, Abid y colaboradores sintetizaron esferas de PHB empleando diferentes concentraciones de polivinil alcohol (PVA) (10, 15 y 20 mg/mL). Obteniendo esferas con un tamaño aproximado de 128 a 306 nm, deduciendo que al ir aumentando la concentración de PVA se obtienen esferas con menor tamaño. Para la elaboración de la película delgada, una cantidad de la solución de esferas fue depositada en una superficie de cristal, formando una película delgada de dicho polímero (Abid *et al.*, 2016). La técnica para la elaboración de las microesferas de PHB empleada

en el presente proyecto, nos permite obtener NPs de PHB con un tamaño aproximado de $172.3 \text{ nm} \pm 40.9$ y una morfología esférica. Para el caso de la película de microesferas de PHB obtenida en el presente proyecto, se logró observar mediante la técnica de AFM una película casi homogénea. Esta metodología comparada a la utilizada por Abid, requirió de la funcionalización de las esferas mediante la adición de CTAB (implementación en el laboratorio). En los análisis por UV-Vis para la caracterización de las microesferas de PHB se observa un pico posicionado en 285 nm, similar al observado por Thin y colaboradores reportando que esto es debido a que las bandas de transición atribuidas a la presencia de los grupos C-O y C=O que se encuentran repetidos en cada unidad del polímero (Thin *et al.*, 2013). Por otro lado Getachew y Woldesenbet afirman que la aparición de dicho pico es debido al grupo carboxilo (Getachew & Woldesenbet, 2016).

En los resultados por DLS de las Ag-NPs, Au-NPs y de las microesferas de PHB, se observa que los valores de la curva del diámetro hidrodinámico de las partículas, en algunos casos son menores o mayores en comparación a los datos obtenidos por AFM. Esto puede ser debido a que en dicha técnica es necesario diluir muestras altamente concentradas, lo cual puede conducir a la distorsión de resultados, debido a cambios en el grado de interacciones colectivas entre las nanopartículas y su estado de aglomeración, presentando así más de un pico en la curva del diámetro hidrodinámico (Moreno *et al.* 2014).

El análisis de estabilidad de las NPs mediante la técnica de PZ, nos permitió determinar los siguientes valores: -39 mV para Ag-NPs, 45 mV para Au-NPs y -21 mV para PHB. Estos datos nos indican que las NPs presentan una buena estabilidad, ya que si son comparados a los resultados de Gabor, donde considera que un potencial zeta entre -10 y +10 mV son considerados neutros mientras que aquellos con potencial mayor a +30 mV o menor a -30 mV son considerados como cationes y aniones fuertes, y que además indican una buena estabilidad por parte de las NPs (Gabor, 2011).

En la caracterización de la película por FTIR, se observaron picos localizados en las posiciones 3328 cm^{-1} (OH), 2880 cm^{-1} (CH_2), 2997 cm^{-1} (CH_3), 1724 cm^{-1} (C=O), 1279 cm^{-1} (CH) y 1039 cm^{-1} (C-O). Resultados similares son vistos por Rivas y colaboradores en el 2017 donde reportan una banda estrecha entre 3000 cm^{-1} y 3600 cm^{-1} correspondientes al grupo (OH), 2933 cm^{-1} (CH) y 1727 cm^{-1} al grupo (C=O) reportando que estos picos son característicos del PHB (Rivas *et al.* 2017).

En los ensayos microbiológicos, las concentraciones mínimas bactericidas de las Ag-NPs ante *E. coli* MC4100 y *S. aureus* L27 fueron de 4.95 µg/mL y 11.5 µg/mL respectivamente, siendo *E. coli* MC4100 más susceptible a dichas partículas con tamaños aproximados de 74.3 ± 10 nm y 114.1 ± 17.4 nm. Este resultado se relaciona al reportado por Kubo y colaboradores, quienes sintetizaron Ag-NPs por el método de reducción química obteniendo un tamaño aproximado de 50 nm, reportando que la concentración mínima bactericida para *E. coli* fue de 0.8 µg/mL y para *S. aureus* de 7.5 µg/mL, siendo *E. coli* más susceptible. Argumentando que puede ser debido a que la pared de las bacterias Gram positivas tiene un mayor espesor (30 nm) en comparación a las Gram negativas (2-3 nm) y esta puede actuar como una barrera que protege a la célula de las Ag-NPs así como también de los iones plata provocando una disminución de su actividad antimicrobiana (Kubo y Capjak, 2018). Datos similares fueron vistos por Suppi y colaboradores donde sintetizaron nanopartículas de plata con tamaños aproximados de 41 nm y 121 nm, reportando una CMB menor para *E. coli* (0.1 µg/mL) en comparación a *S. aureus* (1 µg/mL) (Suppi *et al.* 2015). En nuestro laboratorio hemos encontrado comportamiento similar con una variación en los datos, encontrado CMB de 5.59 µg/mL para *E. coli* MC4100 y 11.19 µg/mL para *S. aureus* L27.

En el caso de las Au-NPs, las concentraciones mínimas bactericidas reportadas en este trabajo para *E. coli* MC4100 y *S. aureus* L27 fueron de 11 µg/mL y 1.38 µg/mL respectivamente, siendo en este caso *S. aureus* L27 más susceptible ante dichas partículas. La CMB obtenida para *E. coli* MC4100 en el presente trabajo es un valor mayor en comparación al obtenido por Shamaila y colaboradores, reportando un valor de 2.93 µg/mL. Esta discrepancia de valores puede ser debido a que las NPs reportadas en este trabajo ($76.5 \text{ nm} \pm 15.7 \text{ nm}$) son de mayor tamaño en comparación a las utilizadas por dicho autor (6-40 nm). Concluyendo que el mecanismo antibacteriano se ve afectado por el tamaño y la dosis de las partículas, ya que el mecanismo antimicrobiano aumenta al ir disminuyendo el tamaño y aumentando la concentración de las NPs (Shamaila *et al.* 2016). Por otro lado, Li y colaboradores reportaron que la concentración mínima bactericida para *S. aureus* fue de 32 µg/mL, este valor es mayor en comparación al que se reporta en el presente proyecto (1.38 µg/mL) y esto puede ser debido a que las Au-NPs están recubiertas por CTAB (Li *et al.* 2014). Halder y colaboradores expusieron a *E. coli* y a *S. aureus* a distintas concentraciones de CTAB (0.3, 0.6, 30, 60, 120 y 170 µg/mL), observando que *S. aureus* era más susceptible a dicho surfactante, reportando que esto es debido a la diferencia que existe del potencial zeta (PZ) entre ambas cepas *E.*

E. coli -44.2 mV y *S. aureus* -35.6 mV, respectivamente, deduciendo que el PZ que posee *E. coli* es debido a que en la membrana externa hay una capa de lipopolisacáridos, el antígeno "O" entre otros, lo cual contribuyen a la carga de la cepa, y por lo tanto contrarrestan las cargas positivas del CTAB logrando así neutralizar el efecto de dicho surfactante (Halder *et al.* 2015).

En las cinéticas realizadas de las Ag-NPs soportadas en la película delgada en presencia de *E. coli* MC4100 y *S. aureus*, L27 se observa que a partir de las 6 horas hay una inhibición de crecimiento para *E. coli* MC4100 correspondiente a ambas concentraciones empleadas de Ag-NPs 4.45 µg/mL y 9.90 µg/mL. En el caso de *S. aureus* L27 la inhibición del crecimiento se observa a partir de las 9 horas para ambas concentraciones de Ag-NPs empleadas 11.5 y 23 µg/mL, lo cual sugiere que *E. coli* MC4100 es más susceptible a la actividad antimicrobiana de las Ag-NPs soportadas en la película. Para el caso de *E. coli* MC4100 este comportamiento es similar al de las NPs en solución donde concentraciones de 4.45 y 9.90 µg/mL lograron inhibir el crecimiento total de dicha cepa a partir de las 6 horas. Esto puede ser debido a que gran parte de la actividad antimicrobiana de las NPs tanto en solución como en soporte sea mediante la liberación de iones Ag⁺. Mientras que para *S. aureus* L27 ambas concentraciones empleadas en solución (11.5 y 23 µg/mL) la inhibición se dio en un lapso de 6 horas, por lo que las Ag-NPs estando soportadas tienen un retraso de 3 horas en el efecto de inhibición de la cepa y esto puede ser debido a la liberación prolongada de los iones Ag⁺, sugiriendo que en las primeras 6 horas de la cinética de crecimiento todavía no se llega a las concentraciones de iones plata necesarias para inhibir el crecimiento de la cepa en comparación a las 9 horas. Dicho tiempo de retraso en el tiempo de inhibición para *S. aureus* L27 es reportado por Barrera y colaboradores donde la actividad antimicrobiana de las Ag-NPs soportadas en los nanocompuestos de polímero se ve más pronunciado en *E. coli* que en *S. aureus* argumentando que la liberación de los iones plata de las nanopartículas dañan la integridad y permeabilidad de la membrana, además dichos iones inducen la formación de ROS los cuales pueden reaccionar con proteínas y con el material genético logrando inhibir el metabolismo y la replicación, causando la muerte celular (Barrera *et al.* 2018). Por otro lado Palza propone que el mecanismo antimicrobiano de los nanocompuestos de polímero/metal se basa principalmente en la liberación de iones metálicos en lugar de que la partícula sea adsorbida por las bacterias (Palza, 2015).

En las cinéticas de crecimiento realizadas con las Au-NPs soportadas en la película delgada de microesferas de PHB ante la presencia de las cepas *E. coli* MC4100 y *S. aureus* L27, en la **Figura 16** se observa que a partir de las primeras 3 horas hay una inhibición de crecimiento para una concentración de 22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y para la concentración de 11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se aprecia que a las 9 horas logra suprimir el crecimiento de *E. coli* MC4100. Estos resultados en comparación a la cinética de las Au-NPs en solución, donde una concentración de 22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Au-NPs logra inhibir por completo el crecimiento de *E. coli* MC4100 en las primeras 3 horas, mientras que una concentración de 11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inhibe el crecimiento a partir de las 6 horas, este desfase de tiempo puede deberse a que las Au-NPs en solución pueden interactuar de manera directa con la membrana y deteriorarla debido a la adhesión de la nanopartícula en la superficie provocando un engullimiento total de la partícula (Contini *et al.* 2018). Para el caso de la cepa *S. aureus* L27 las concentraciones 2.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Au-NPs logran inhibir el crecimiento de ésta cepa a partir de las 3 horas de contacto, este resultado es similar a la cinética obtenida con las Au-NPs en solución, donde ambas concentraciones 2.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$, logran inhibir el crecimiento de *S. aureus* L27 a partir de las 3 horas. Regiel y colaboradores reportan que los nanocompuestos de quitosano/oro lograron suprimir el crecimiento de *S. aureus* en comparación a *Pseudomonas aeruginosa*, deduciendo que las Gram positivas son más sensibles a este tipo de compuestos en comparación con las Gram negativas (Regiel-Futyra *et al.* 2014).

9. Conclusiones

- Se obtuvo la película delgada de microesferas de PHB mediante la funcionalización con agentes surfactantes como el CTAB.
- Las microesferas de PHB acopladas a CTAB permitieron mejorar su actividad bactericida.
- Las Au-NPs presentaron una mejor actividad antimicrobiana en *S. aureus* L27, contrario a las Ag-NPs.
- Las Ag-NPs presentaron una mejor actividad antimicrobiana en *E. coli* MC4100, a diferencia de las Au-NPs.
- Las Ag-NPs soportadas en la película delgada de microesferas de PHB presentaron una mejor actividad bactericida ante *E. coli* MC4100 que ante *S. aureus* L27.
- Las Au-NPs soportadas en la película delgada de microesferas de PHB presentaron una mejor actividad bactericida ante *S. aureus* L27 que frente a *E. coli* MC4100.

10. Perspectivas

Como perspectiva para este trabajo, es necesario realizar algunos ensayos en la parte de caracterización de las NPs metálicas soportadas en la película, así como también en la parte de la cinética microbiana. Los ensayos que se proponen se presentan a continuación:

- Modificar el agente surfactante que recubre a las esferas de PHB y probar su actividad antimicrobiana.
- Cuantificar la cantidad de las NP metálicas mediante energía dispersiva de rayos x a la película delgada soportando a las NPs metálicas.
- Cuantificar la concentración de Au^+ de las Au-NPs por la técnica de absorción atómica.
- Obtener imágenes de la película delgada soportando a las nanopartículas metálicas por AFM.
- Cuantificar la concentración de las NPs metálicas mediante absorción atómica en cada una de las etapas de la cinética de crecimiento microbiano en presencia de las NPs soportadas en la película delgada de microesferas de PHB y en solución.

11. Bibliografía

1. Abid S., Raza Z.A. and Rehman A. 2016. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) nanospheres and deposition thereof into porous thin film. *Material Research Express*; 3:1-8.
2. Akter M., Sikder M.T., Rahman M.M., Ullah., Hossain K.F.B., Banik S., Hosokawa T., Saito T and Kurasaki M. 2017. Review: A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *Journal of Advanced Research*; 9:1–16.
3. Alves M.I., Macagnan K.L., Rodrigues A.A., Assis D.A., Torres M.M., Oliveira P.D., Furlan L., Vendruscolo C.T., Moreira A. 2017. Poly(3-hydroxybutyrate)-P(3HB): Review of Production Process Technology. *Industrial of Biotechnology*; 13:192–208.
4. Baptista P.V., McCusker M.P., Carvalho A., Ferreira D.A., Mohan N.M., Martins M. and Fernandes A.R. 2018. Review: Nano-strategies to fight multidrug resistant bacteria "A Battle of the Titans". *Frontier in Microbiology*; 9:1–26.
5. Barrera N., Guerrero L., Debut A. and Cruz P.S. 2018. Printable nanocomposites of polymers and silver nanoparticles for antibacterial devices produced by DoD technology. *PLOS ONE*; 13:1–18.
6. Bastús N.G., Merkoçi F., Piella J. and Puntès V. 2014. Synthesis of highly monodisperse citrate-stabilized silver nanoparticles of up to 200 nm: Kinetic control and catalytic properties. *Chemistry of Materials*; 26:2836–2846.
7. Brigham C.J., Sinsky A.J. 2012. Applications of Polyhydroxyalkanoates in the Medical Industry. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industry*;1:53–60.
8. Chen C., Nace., G and Irwin., P. 2003. A 6X6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*; 55: 475-479.
9. Chukwunonso E., Veronica B., Chiagozie E., Amadi C., Abe T., Otohinoyi D.A., Olunu E. and Omotuyi A. 2018. Review: Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*: A Mini Review. *International Journal of Medical Research and Health Sciences*; 7:122–127.
10. Contini C., Schneemilch M., Gaisford S. and Quirke N. 2018. Nanoparticle–

- membrane interactions. *Journal of Experimental Nanoscience*; 13:62–81.
11. Cuadros-Moreno A., Pimentel R.C., Martín-Martínez E.S. and Fernandez J. 2014. Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Latin-American Journal of Physics Education*; 8:1-5.
 12. Cui Y., Zhao Y., Tian Y., Zhang W., Lü X. and Jiang X. 2012. The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli*. *Biomaterials*; 33:2327–2333.
 13. Eggers A. and Steinbüchel A. 2013. Degradación de poli (3-hidroxibutirato) en *Ralstonia eutropha* H16 IS mediado estereoselectivamente a (S)-3-Hidroxibutiril coenzima A (CoA) a través de Crotonil-CoA. *Journal of Bacteriology*; 195: 3213-3223
 14. Gabor F. 2011. Review: “Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery.” *Scientia Pharmaceutica*; 79:701–702.
 15. Getachew A. and Woldesenbet F. 2016. Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material. *BMC Research Notes*; 9:1–9.
 16. Ghaforyan H., Ebrahimzadeh M., Bilankohi S.M. 2015. Study of the Optical Properties of Nanoparticles using Mie Theory. *World Applied Programming*; 5:79–82.
 17. González A., Noguez C., Ortiz G. and Rodríguez G. 2005. Optical absorbance of colloidal suspensions of silver polyhedral nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry*; 109: 17512-17517.
 18. Gudepalya R.R., Rudramurthy, Mallappa K.S., Uma R.S. and Ghasemzadeh A. 2016. Review: Nanoparticles: Alternatives Against Drug-Resistant. *Molecules*; 21:836–866.
 19. Halder S., Yadav K.K., Sarkar R., Mukherjee S., Saha P., Haldar S., Karmakar S. and Sen T. 2015. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. *Springerplus*; 4:1-15.
 20. Hemeg H.A. 2017. Review: Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. *International Journal of Nanomedicine*; 12:8211–8225.
 21. Iravani S., Korbekandi H., Mirmohammadi S.V. and Zolfaghari B. 2013. Review: Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences*; 9:385–406.

22. Jang J., Hur H.G., Sadowsky M.J., Byappanahalli M.N., Yan T. and Ishii S. 2017. Review: Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications a review. *Journal of Applied Microbiology*; 123:570–581.
23. Kaper J.B; Nataro J.P and Mobley L.T. 2004. Review: Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Microbiology*; 2:123–140.
24. Khan Z., Al-Thabaiti S.A., Obaid A.Y., Al-Youbi A.O. 2011. Preparation and characterization of silver nanoparticles by chemical reduction method. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*; 82:513–517.
25. Kok F., Hasirci V. 2004. *Tissue Engineering and Novel Delivery Systems*. Marcel Dekker Inc.
26. Kong F.Y., Zhang J.W., Li R.F., Wang Z.X., Wang W.J. and Wang W. 2017. Review: Unique roles of gold nanoparticles in drug delivery, targeting and imaging applications. *Molecules*; 22: 1445-1458.
27. Kubo A., Capjak I., Vrcek I.V., Bondarenko O.M., Kurvet I., Vija H., Ivask A., Kasemets K and Kahru A. 2018. Antimicrobial potency of differently coated 10 and 50 nm silver nanoparticles against clinically relevant bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Colloids Surfaces B. Biointerfaces*; 170:401-410.
28. Lakhundi S., Zhang K. 2018. Review: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *American Society for Microbiology*; 31:1–103.
29. Lee A.S, Lencastre H., Garau J., Kluytmans J., Malhotra-Kumar S., Peschel A. and Harbarth S. 2018. Review: Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Nature*; 4:1-23.
30. Li X., Robinson S.M., Gupta A., Saha K., Jiang Z., Moyano D.F., Sahar A., Riley M.A and Rotello V.M. 2014. Functional Gold Nanoparticles as Potent Antimicrobial Agents against Multi-Drug-Resistant Bacteria. *ACS Nano* 30:1–5.
31. Li Z. 2018. Review: A Review of *Staphylococcus aureus* and the Emergence of Drug-Resistant Problem. *Advances in Microbiology*; 08:65–76.
32. Luty-Błocho M., Fitzner K., Hessel V., Löb P., Maskos M., Metzke D., Paclawski K. and Wojnicki M. 2011. Synthesis of gold nanoparticles in an interdigital micromixer using ascorbic acid and sodium borohydride as reducers. *Chemical Engineering Journal*; 171:279–290.
33. Madigan M.T, Martinko J.M., Parker J. 2009. *Brock biología de los microorganismos*, 12th ed. Pearson, Madrid.

34. Malvern panalytical. 2018. Dispersión de luz dinámica. Retrieved July 27, 2019, from <https://www.malvern.com/en/products/technology/dynamic-light-scattering>.
35. Marambio-Jones C., Hoek EMV. 2010. Review: A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*; 12:1531–1551.
36. Matsuzaki K. 2008. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. Review: *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*; 1788:1687–1692.
37. McMurry J. 2008. *Química Orgánica*, 7th ed. Panamericana, México.
38. Méndez P., Soto L., Sánchez E., González A. L., Romo J., Gervacio J. and Martínez L.J. 2019. Damage on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* using white light photoactivation of Au and Ag nanoparticles. *Journal of Applied Physics*; 125: 23102-23102-9.
39. Miri S.T., Dashti A., Mostaan S., Kazemi F. and Bouzari S. 2016. Identification of different *Escherichia coli* pathotypes in north and north-west provinces of Iran. *Iranian Journal of Microbiology*; 9:33–37.
40. Mohamed M.M., Fouad S.A., Elshoky H.A., Mohammed G.M. and Salaheldin T.A. 2017. Antibacterial effect of gold nanoparticles against *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*; 5:23–29.
41. Noguez C., Villagómez J. and González A. 2015. Plasmonics of multifaceted metallic nanoparticles, field enhancement, and TERS. *Physica status solidi*; 1: 56-71.
42. Nussbaum F.V, Brands M., Hinzen B., Weigand S. and Häbich D. 2006. Review: Antibiotics Antibacterial Natural Products in Medicinal Chemistry-Exodus or Revival. *Angewandte Chemie*; 45: 5072–5129.
43. Organization World Health. (2018). Antimicrobial resistance. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
44. Palza H. 2015. Review: Antimicrobial polymers with metal nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*; 16:2099–2116.
45. Paredes D., Ortiz C., Torres R. 2014. Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial effect of Ag nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *International Journal of Nanomedicine*; 9:1717–1729.
46. Pérez-Juste J., Liz-Marzán L., Carnie S. and Mulvaney P. 2004. Electric-Field-

- Directed Growth of Gold Nanorods in Aqueous Surfactant Solutions. *Advanced Functional Materials*; 14:571–579.
47. Rai M., Yadav A. and Gade A. 2009. Review: Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv*; 27:76–83.
 48. Regiel A., Kus M., Sebastian V., Irusta ., Arruebo M., Stochel G. and Kyzio A. 2014. Developmente of noncytotoxic chitosan-gold nanocomposites as efficiente antibacterial materials. *Applied materials and interfaces*.
 49. Rivas L., Casarin S.A., Nepomuceno N.C., Alencar M.I., Agnelli J.A.M., Medeiros E.S., Neto A., Oliveira M.P., Medeiros A.M. and Santos A.S. 2017. Reprocessability of PHB in extrusion: ATR-FTIR, tensile tests and thermal studies. *Polímeros* 27:122–128.
 50. Rodriguez J., Perez J., García F.J., and Liz-marza L.M. 2006. Seeded Growth of Submicron Au Colloids with Quadrupole Plasmon Resonance Modes. *Langmuir* 22:7007–7010.
 51. Shamaila S., Zafar N., Riaz S., Sharif R., Nazir J. and Naseem S. 2016. Gold Nanoparticles: An Efficient Antimicrobial Agent against Enteric Bacterial Human Pathogen. *Nanomaterials*; 6:1-10.
 52. Shrivastava S., Bera T., Roy A., Singh G., Ramachandrarao P. and Dash D. 2007. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*; 1:1-9.
 53. Slepecky R and Law J.H. 1960. A rapid spectrophotometric assay of alpha, beta.unsaturated acids and beta-hydroxy acids. *Analytical Chemistry*; 32:1697-1699.
 54. Soloviev M. 2004. Review: Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology*; 2:1–6.
 55. Sudesh K., Abe H. and Doi Y. 2000. Review: Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Progress in Polymer Science*; 25:1503–1555.
 56. Sun K., Qiu J., Liu J. and Miao Y. 2009. Preparation and characterization of gold nanoparticles using ascorbic acid as reducing agent in reverse micelles. *Journal of Material Science*; 44:754–758.
 57. Suppi S., Kasemets K., Ivask A., Künnis-Beres K., Sihtmäe M., Kurvet I., Aruoja V. and Kahru A. 2015. A novel method for comparison of biocidal properties of nanomaterials to bacteria, yeasts and algae. *Journal of Hazardous Materials* 286:75–84.

58. The Clinical and Laboratory Estándar Institute. (2016). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing CLSI supplement M100S. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
59. Thinh P.X., Basavaraja C., Kim K. and Huh D.S. 2013. Fabrication and characterization of honeycomb-patterned film from poly(ϵ -caprolactone)/poly((R)-3-hydroxybutyric acid)/reduced graphene oxide composite. *Polymer Journal* 45:1064–1071.
60. Tran M., DePenning R., Turner M. and Padalkar S. 2016. Effect of citrate ratio and temperature on gold nanoparticle size and morphology. *Materials Research Express*; 3:1–10.
61. Turkevich J. Stevenson P.C and Hillier J. 1951. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold; 1:56-65.
62. Yan X., He B., Liu L., Qu G., Shi J., Hu L. and Jiang G. 2018. Antibacterial mechanism of silver nanoparticles in: *Pseudomonas aeruginosa*: Proteomics approach. *Metallomics*; 10:557–564.

12. Anexos

Anexo 1 cálculos para la obtención de las concentraciones empleadas de Ag-NPs. Para obtener una concentración de 9.90 µg/mL, se partió de un volumen inicial de 1,031 µL el cual contiene una concentración de plata [0.96 µg/mL] (dicha concentración fue determinada por absorción atómica), las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante fue descartado hasta obtener un volumen final de 100 µL, lo cual permitió reconcentrar la muestra y llegar a la concentración deseada.

Datos:

C1: 0.96 µg/mL

V1: 1,031 µL

C2:

V2: 100 µL

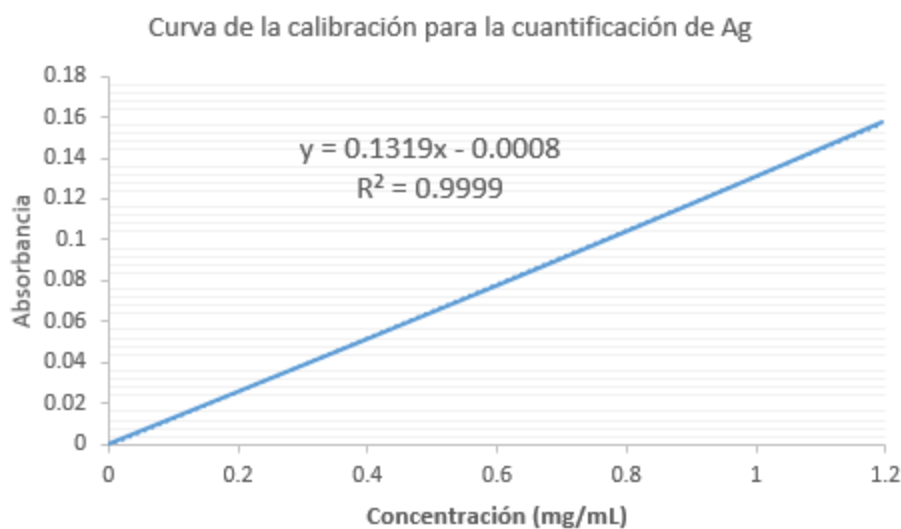
Formula

$$C1V1=C2V2$$

$$(0.96 \mu\text{g/mL}) (1,031 \mu\text{L}) = C2 (100 \mu\text{L})$$

$$C2= ((0.96 \mu\text{g/mL}) (1,031 \mu\text{L})) / (100 \mu\text{L})$$

$$C2= 9.90 \mu\text{g/mL}$$



Anexo 2 cálculos para la obtención de las concentraciones empleadas de Au-NPs.

La determinación de la concentración de las Au-NPs, un volumen de 30 mL de muestra fue depositada en una capsula previamente tratada (peso constante) y esta fue llevado a peso constante a una temperatura de 120 °C y mediante diferencias de peso se calculó la concentración de las nanopartículas de oro.

$$[\text{Au-NPs}] = ((P_{cm} - P_c) / v) (1,000 \mu\text{g})$$

Donde:

P_{cm} = Peso de la cápsula con la muestra en (g)

P_c = Peso de la cápsula en (g)

V = volumen de la muestra en (mL)

Datos:

Peso de la cápsula: 10.7929 g

Peso de la cápsula+muestra: 12.1129 g

Volumen: 30 mL

$$[\text{Au-NPs}] = ((12.1129 \text{ g} - 10.7926 \text{ g}) / 30 \text{ mL}) (1,000 \mu\text{g})$$

$$[\text{Au-NPs}] = (0.04401 \text{ g/mL}) (1,000 \mu\text{g})$$

$$[\text{Au-NPs}] = 44 \mu\text{g/mL}$$

Anexo 3. Curva estándar para la cuantificación de PHB

