



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA



**ESTUDIO DEL DAÑO A BACTERIAS POR
NANOPARTÍCULAS PLASMÓNICAS DE PLATA Y
ORO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

CON OPCIÓN EN: MICROBIOLOGÍA MÉDICA

PRESENTA:

Q.B.C. PABLO ALAN MÉNDEZ PFEIFFER

ASESOR DE TESIS:

D.C. LUIS JAVIER MARTÍNEZ MORALES

PUEBLA, PUE.

ENERO, 2018

Agradecimientos

A mi madre por su amor incondicional y su confianza.

A mi hermano, sé que siempre estará ahí cuando lo necesite.

A mis abuelos, que me criaron como un hijo y ayudaron a forjar la persona que soy ahora.

A mis tíos; Sara y Luis que me han ayudado toda mi vida y sé que puedo contar con ellos.

A Manuel, por todo el tiempo que hemos compartido y estar juntos en cada paso que hemos dado, ya sea en las buenas o en las malas.

A mi director de tesis, Luis Javier por toda su confianza, apoyo y amistad.

A mis compañeros de laboratorio; Belén, Ángeles, Elena, Itzel, Doris, Brenda, Sofí, y Jair, por su amistad y hacer más divertidas todas esas horas de trabajo.

A mis amigos; Abraham, Roxanna, Aracely, Monse, Joaquín, Yesenia, Toñito, Saira, Patty, Angie, Ivan (1 y 2), Alma por todas los momentos y las risas que compartimos fuera y dentro del aula.

A Marisol por ser como una hermana para mí estos dos años

Reconocimientos

Al Centro Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para realizar mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas.

A todos los profesores que compartieron sus conocimientos en estos dos años.

A mi comité tutorial; La DC. Lucia Soto Urzúa, DC. Ana Lilia González Ronquillo, DC. Enrique Sánchez Mora y al DC. Candelario Vásquez Cruz, por todo su apoyo en la realización de este trabajo.

Al DC. José Manuel Romo Herrera, del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM.

Al DC. Enrique Pérez Gutiérrez y DC. Judith Percino Zacarías, del Centro de Química del Instituto de Ciencias.

A la DC. Margarita Arenas Hernández, DC. Claudia Fabiola Martínez de la Peña y al Maestro Joaquín, del Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos.

A la DC. Rosa del Carmen Rocha Gracia, del Laboratorio de Enfermedades Nosocomiales y de la Comunidad.

Al MC. Iván Peña Flores del Instituto de Física de la BUAP, por todo su apoyo incondicional.

INDICE GENERAL

RESUMEN	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. NANOTECNOLOGÍA Y NANOMATERIALES	1
1.2. NANOPARTÍCULAS	2
1.2.1. Nanopartículas de plata y oro	3
1.2.2. Plasmón de superficie	4
1.3. DIÓXIDO DE SILICIO (SiO ₂)	5
1.4. NANOPARTÍCULAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	6
1.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	7
1.4.2 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (MRSA)	7
1.4.3 <i>Escherichia coli</i>	8
2. ANTECEDENTES	10
3. JUSTIFICACIÓN	11
4. HIPÓTESIS	11
5. OBJETIVOS	11
5.1. OBJETIVO GENERAL	11
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
6. MATERIALES Y MÉTODOS	13
6.1. MATERIAL BIOLÓGICO	13
6.2. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN SOLUCIÓN	13
6.3. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO EN SOLUCIÓN	13
6.4. SÍNTESIS DE ESFERAS DE SiO ₂ EN SOLUCIÓN	14
6.5. CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS Y MICROESFERAS DE SiO ₂	14
6.5.1. Espectroscopia ultravioleta-visible	14
6.5.2. Microscopía Electrónica de Transmisión	15
6.5.3. Dispersión de Luz Dinámica (DLS)	15
6.5.4. Determinación de potencial zeta	15
6.5.5. Determinación de la concentración de nanopartículas de plata	16
6.5.6. Espectroscopia RAMAN	16
6.5.7. Espectroscopia Infrarroja	17
6.5.8. Microscopía de Fuerza Atómica	17
6.6. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI), CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) Y CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO	17
6.7. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA EXTRACELULAR E INTRACELULAR	19
6.8. MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA	19
7. RESULTADOS	20
7.1. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y ORO	20
7.2. CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS	20
7.2.1. Posición del plasmón por espectroscopia ultravioleta-visible	20
7.2.2. Determinación de la forma y tamaño de las NPs por TEM	22
7.2.3. Determinación del tamaño por DLS	23

7.2.4. Determinación de la estabilidad de las NPs por potencial zeta-----	25
7.2.5. Determinación de la concentración de nanopartículas de plata -----	27
7.2.6. Determinación de concentración de oro en muestras de AuNPs -----	27
7.3. SÍNTESIS DE ESFERAS DE SiO ₂ -----	28
7.3.1. Espectroscopia de infrarrojo -----	29
7.3.2. Espectroscopia RAMAN-----	30
7.3.4. Microscopía de fuerza atómica (AFM) de esferas de SiO ₂ -----	31
7.4. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO-----	31
7.4.1. Determinación de la CMI y CMB-----	31
7.4.2. Cinética de crecimiento y curva de viabilidad bacteriana en presencia de nanopartículas -----	32
7.4.3. CMI, CMB y cinética de crecimiento con nanopartículas en presencia de luz blanca-----	39
7.4.4. Determinación del daño a membrana por microscopía de fuerza atómica-----	42
7.4.5. Cuantificación de proteína extracelular e intracelular-----	45
8. DISCUSIÓN -----	48
9. CONCLUSIONES -----	53
10. PERSPECTIVAS -----	54
11. BIBLIOGRAFÍA-----	55
12. ANEXOS -----	61

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA DEL PLASMÓN DE SUPERFICIE.-----	5
FIGURA 2. ARREGLO ORDENADO DE MICRO ESFERAS DE SiO ₂ .-----	6
FIGURA 3. A) MUESTRA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA. B) MUESTRA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO. -----	20
FIGURA 4. ESPECTRO UV-VIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA. -----	21
FIGURA 5. ESPECTRO UV-VIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO.-----	21
FIGURA 6. IMAGEN DE TEM DE AGNPs Y AUNPs; HISTOGRAMA DE AGNPs Y AUNPs.-----	23
FIGURA 7. GRAFICA DE LA DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA OBTENIDA POR LA TÉCNICA DE DLS. -----	24
FIGURA 8. GRAFICA DE LA DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO (MUESTRA A) OBTENIDA POR LA TÉCNICA DE DLS. -----	24
FIGURA 9. GRAFICA DE LA DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO (MUESTRA B) OBTENIDA POR LA TÉCNICA DE DLS. -----	25
FIGURA 10. GRÁFICO DE POTENCIAL ZETA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA.-----	26
FIGURA 11. GRÁFICO DE POTENCIAL ZETA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO (MUESTRA A).-----	26
FIGURA 12. GRÁFICO DE POTENCIAL ZETA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO (MUESTRA B).-----	27
FIGURA 13. MUESTRA DE ESFERAS DE DIÓXIDO DE SILICIO (SiO ₂)-----	28
FIGURA 14. ESPECTRO INFRARROJO DE ESFERAS DE SiO ₂ .-----	29
FIGURA 15. ESPECTRO RAMAN DE ESFERAS DE SiO ₂ .-----	30
FIGURA 16. IMÁGENES DE AFM DE ESFERAS DE SiO ₂ .-----	31
FIGURA 17. CURVA DE CRECIMIENTO Y DE VIABILIDAD DE <i>E. COLI</i> Y DE <i>S. AUREUS</i> CON AGNPs. -----	33
FIGURA 18. CURVA DE CRECIMIENTO Y DE VIABILIDAD DE <i>E. COLI</i> Y DE <i>S. AUREUS</i> CON AUNPs A..-----	34
FIGURA 19. CURVA DE CRECIMIENTO Y DE VIABILIDAD DE <i>E. COLI</i> Y DE <i>S. AUREUS</i> CON AUNPs B..-----	36
FIGURA 20. CURVA DE VIABILIDAD DE <i>S. AUREUS</i> Y DE <i>E. COLI</i> CON AGNPs -SiO ₂ Y CON AUNPs-SiO ₂ .--	38
FIGURA 21. CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>E. COLI</i> Y <i>S. AUREUS</i> CON AGNPs Y AUNPs EN PRESENCIA DE LUZ BLANCA.. -----	41
FIGURA 22. IMAGEN DE MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA DE <i>S. AUREUS</i> CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y NANOPARTÍCULAS DE ORO.-----	43
FIGURA 23. IMAGEN DE MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA DE <i>E. COLI</i> CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y NANOPARTÍCULAS DE ORO.. -----	44
FIGURA 24. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL DEL SOBRENADANTE DE <i>E. COLI</i> CON AGNPs Y AUNPs. -----	46
Figura 25. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL DEL SOBRENADANTE DE <i>S. AUREUS</i> CON AGNPs Y AUNPs.-----	47

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. CONCENTRACIONES DE NANOPARTÍCULAS UTILIZADAS PARA CMI, CMB Y CINÉTICA DE CRECIMIENTO. -----	18
TABLA 2. CONCENTRACIÓN DE A) NANOPARTÍCULAS DE PLATA. B) SOLUCIÓN DE $AgNO_3$. -----	27
TABLA 3. CONCENTRACIÓN DE A) MUESTRA A DE NANOPARTÍCULAS DE ORO. B) MUESTRA B DE NANOPARTÍCULAS DE ORO. -----	28
TABLA 4. CMI Y CMB DE <i>S. AUREUS</i> L27 Y <i>E. COLI</i> MC4100 CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA, ORO Y ESFERAS DE SiO_2 . -----	32
TABLA 5. CMI Y CMB BACTERICIDA DE <i>S. AUREUS</i> L27 Y <i>E. COLI</i> MC4100 CON DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y ORO EN PRESENCIA DE LUZ BLANCA. -----	39
TABLA 6. CMI Y CMB DE <i>S. AUREUS</i> L27 Y <i>E. COLI</i> MC4100 CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y ORO SIN LUZ. -----	39

LISTA DE ABREVIATURAS

AFM: Microscopía de fuerza atómica

AgNPs: Nanopartículas de plata

AuNPs: Nanopartículas de oro

BSA (por sus siglas en inglés): Albumina de suero bovino

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

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CMB: Concentración mínima bactericida

DLS: Dispersión de luz dinámica

DS: Desviación estándar

LB: Luria-Bertani

MRSA: *S. aureus* resistente a meticilina

nm: Nanómetros

NPs: Nanopartículas

µg/ml: Microgramos por mililitro

UV-Vis: Ultravioleta visible

Resumen

En la actualidad es muy común el aislamiento de bacterias resistentes y multiresistentes a los antibióticos más comúnmente utilizados para el tratamiento de enfermedades infecciosas, teniendo grandes repercusiones en el sector salud y económico, esto ha generado la necesidad de buscar alternativas eficaces que ayuden a combatir a estos microorganismos y disminuir el surgimiento de mayor resistencia antibiótica. En el campo de la nanotecnología, las nanopartículas plasmónicas han tomado una gran relevancia, especialmente las de plata y oro, ya que se ha estudiado su capacidad antimicrobiana y se ha comprobado sus efectos contra distintas cepas bacterianas. En este trabajo se sintetizaron por medio de reducción química, nanopartículas de plata (AgNPs) de 12 nm y dos muestras de nanopartículas de oro (AuNPs de 14 nm y 28 nm), se caracterizaron por espectroscopia UV-Vis, microscopía electrónica de transmisión, DLS y potencial zeta. Se evaluó su actividad bactericida contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* determinando concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida, curvas de crecimiento y viabilidad en ausencia y presencia de luz blanca. Se evaluó el daño a la bacteria por microscopía de fuerza atómica y cuantificación de proteínas totales y proteínas extracelulares. Se sintetizaron esferas de dióxido de silicio por sus posibles aplicaciones en ciencias de materiales y se evaluó si la combinación de esferas de SiO₂ y nanopartículas modificaba la actividad bactericida de estas últimas.

En este trabajo se encontró que las nanopartículas de plata tienen mejor efecto bactericida contra *E. coli* que las nanopartículas de oro, con una CMB de 5.58 µg/ml. Por otra parte, las nanopartículas de oro presentaron mejor efecto bactericida contra *S. aureus* con una CMB de 1.31 µg/ml para AuNPs A y 5.24 µg/ml para AuNPs B. Al irradiar las nanopartículas con luz blanca y evaluar su CMI y CMB, se observó que en general estos valores disminuyeron comparados a las muestras sin exposición.

Las imágenes de AFM demostraron un daño en la superficie de la membrana de ambas especies bacterianas, así como un cambio en la morfología, este daño permite la permeabilidad de la membrana, lo que se observa en la cuantificación de proteínas extracelulares.

La actividad bactericida de nanopartículas metálicas no se ve afectada por la combinación con esferas de dióxido de silicio, siendo las CMI y CMB igual al control sin nanopartículas, por lo que pueden ser utilizadas como soporte para las NPs y mantener su capacidad antimicrobiana.

1. Introducción

El descubrimiento de la penicilina y su uso alrededor del año 1940 marcó un gran cambio en el tratamiento de enfermedades infecciosas, que fue evolucionando hasta los días actuales, sin embargo debido al uso y abuso de antimicrobianos y la evolución de los microorganismos, están apareciendo nuevos mecanismos de resistencia y se propagan a nivel mundial, por lo que es más difícil el tratamiento de infecciones, esto es de vital importancia en enfermedades nosocomiales, que se han convertido en un gran problema a nivel mundial (OMS, 2017). Por eso es necesario encontrar alternativas eficaces que ayuden a combatir a los microorganismos multirresistentes que causan enfermedad en el humano. Una de las posibles alternativas y que ha tenido un gran auge en los últimos años, es el uso de nanomateriales, como las nanopartículas metálicas (NPs) ya que poseen una gran versatilidad y se ha demostrado su capacidad bactericida contra distintas especies de importancia clínica (Seil y cols., 2012).

1.1. Nanotecnología y nanomateriales

La nanotecnología se define como el desarrollo e investigación de tecnología a escala atómica, molecular o macromolecular, que lleva a la creación de materiales o estructuras de escala de 1 a 100 nanómetros (nm) y que poseen nuevas características físicas y químicas, debido a su tamaño. Ejemplos de estos materiales son las nanopartículas, nanotubos, puntos cuánticos, etc. Por su tamaño se sugiere que estos nanomateriales pueden interactuar con macromoléculas de los organismos vivos o usarlos como vehículo de medicamentos, como sensores o actuar sobre determinadas células, ofreciendo una amplia gama de aplicaciones en el desarrollo de medicamentos, equipos de diagnóstico, etc. (McNeil, 2005).

Entre los nanomateriales disponibles, para este trabajo son de interés las nanopartículas, pues son comúnmente utilizadas en el ámbito de las ciencias biológicas.

1.2. Nanopartículas

Las nanopartículas (NPs) son materiales que poseen en sus tres dimensiones un rango de 1 a 100 nm, lo que ocasiona que sus características físicas y químicas difieran de su conformación de bulto porque poseen una mayor superficie específica (relación área/volumen) y el número de átomos en su superficie es mucho mayor que el del interior. Estas características pueden variar dependiendo de su tamaño y su forma (Chaudhuri y cols., 2012).

Las nanopartículas se pueden sintetizar de distintas formas:

- **Métodos químicos.** Son los métodos de síntesis más utilizados debido a su capacidad de ser escalados, entre ellos el más común es el método de reducción química donde se utiliza un agente reductor como el citrato de sodio, borohidruro de sodio, polietilenglicol, hidrógeno, entre otros. Estos métodos pueden dar una distribución mayor de tamaños y forma, por lo que el control de cada etapa en el proceso es crucial.
- **Métodos físicos.** La ablación laser y el método de evaporación-condensación son los métodos físicos más empleados, las ventajas que presentan es que no existe contaminación por solventes utilizados y se puede controlar mejor la distribución del tamaño y forma.
- **Métodos biológicos.** Ya que los métodos químicos son poco amigables con el medio ambiente, se ha investigado el uso de organismos vivos ya sea eucariotas o procariotas para la síntesis. Por ejemplo, se ha sintetizado nanopartículas de oro, plata, zinc y cadmio utilizando levaduras, hongos y bacterias (Iravani y cols., 2014), a través de su metabolismo o productos metabólicos.

De las nanopartículas de mayor interés en el área de la microbiología, son las de plata y de oro, ya que estos materiales se han caracterizado por tener actividad bactericida.

1.2.1. Nanopartículas de plata y oro

Desde hace tiempo se conocen los efectos bactericidas de la plata, se ha utilizado para el tratamiento de quemaduras o para desinfectar catéteres, dentaduras, etc. (Kim y cols., 2007). Estudios han demostrado que la sal de plata tiene un efecto bactericida en cepas de *E. coli* y *S. aureus* (Feng y cols., 2000), incluso contra *Pseudomonas aeruginosa* y hongos como *Candida albicans* (Low y cols., 2011). Se busca que la plata en forma de nanopartículas y dadas sus características, como una mayor superficie relativa y su actividad plasmónica, presente efecto bactericida y pueda ser usada en situaciones donde no se puede usar en bulto.

Los mecanismos por los que las AgNPs causan daño a los microorganismos no están del todo claros, aunque se proponen algunos; entre ellos podríamos mencionar el daño a la membrana celular bacteriana producido por la unión de nanopartículas metálicas o la unión de la plata a nitrógeno, oxígeno y azufre que son compuestos que forman parte de macromoléculas indispensables para la vida celular (Juan y cols., 2010).

Aunque las nanopartículas de plata pueden resultar tóxicas para células de mamíferos (AshaRani y cols., 2009), la concentración tóxica necesaria en comparación a bacterias suele ser muy alta, e incluso están sujetas a las características de las NPs como el tamaño, forma, recubrimiento, etc. Por lo que en pequeñas concentraciones pueden ser letales para los microorganismos y no causar daño significativo en mamíferos.

De la misma forma que sucede con la plata, el oro como ion o en forma de NPs presenta cierta actividad bactericida, aunque se ha reportado que ésta es mucho menor en comparación con la de nanopartículas de plata (Zhang y cols., 2015).

Las nanopartículas de oro (AuNPs) también poseen las características de una mayor área superficial y actividad plasmónica, y quizás pueden resultar útiles para su actividad antimicrobiana.

Tampoco el mecanismo de acción de las NPs de oro está totalmente descrito, se proponen dos principales formas por las que causan daño: una es inhibiendo la

ATP sintasa ocasionando una disminución en los niveles de ATP y la otra es inhibiendo la subunidad 50S del ribosoma evitando la unión del tRNA (Cui y cols., 2012).

1.2.2. Plasmón de superficie

La Ag y el Au presentan buena respuesta plasmónica, ello se debe a que en los metales los electrones se encuentran altamente deslocalizados (menos confinados) esto debido a que la separación entre la banda de conducción y la banda de valencia desaparece, permitiendo que el material absorba la radiación electromagnética en un amplio rango de energía, sin embargo, cuando un metal se encuentra en una escala nanométrica donde la longitud de onda es mayor que la partícula metálica, la separación o “gap” entre las bandas de valencia y de conducción aumenta, por lo tanto el espacio que tienen los electrones para moverse es menor y ocurre un confinamiento cuántico, en este momento cuando la luz incide sobre la partícula se da un movimiento oscilatorio colectivo de los electrones de conducción que se encuentran en o cerca de la superficie de la nanopartícula (**Figura 1**) a esto se le llama plasmón de superficie localizado (PSL). Para nanopartículas de oro y plata este PSL se encuentra en la región visible del espectro electromagnético lo que confiere un color característico a ambos tipos de partícula cuando se encuentran en solución, tonalidades amarillas para la Ag y rojizas para el Au (Daniel y cols., 2004; El-Sayed y cols., 2001; Maier y cols., 2007).

Cada nanopartícula presenta este plasmón de superficie a una longitud de onda determinada, dependiendo de su composición, forma, tamaño, así como de la sustancia en la que se encuentre dispersa. Esta longitud de onda en la que se presenta el plasmón de superficie se puede conocer utilizando un espectrofotómetro ultravioleta-visible (UV-Vis), por ejemplo, para AgNPs el plasmón de superficie se encuentra en aproximadamente 420 nm y para AuNPs en 520 nm.

El plasmón de superficie además de conferir las características de color, puede ocasionar un aumento de temperatura de la nanopartícula cuando se irradia luz a la longitud de onda necesaria, este aumento de temperatura puede ser causante de daño celular (Dykman y cols., 2012).

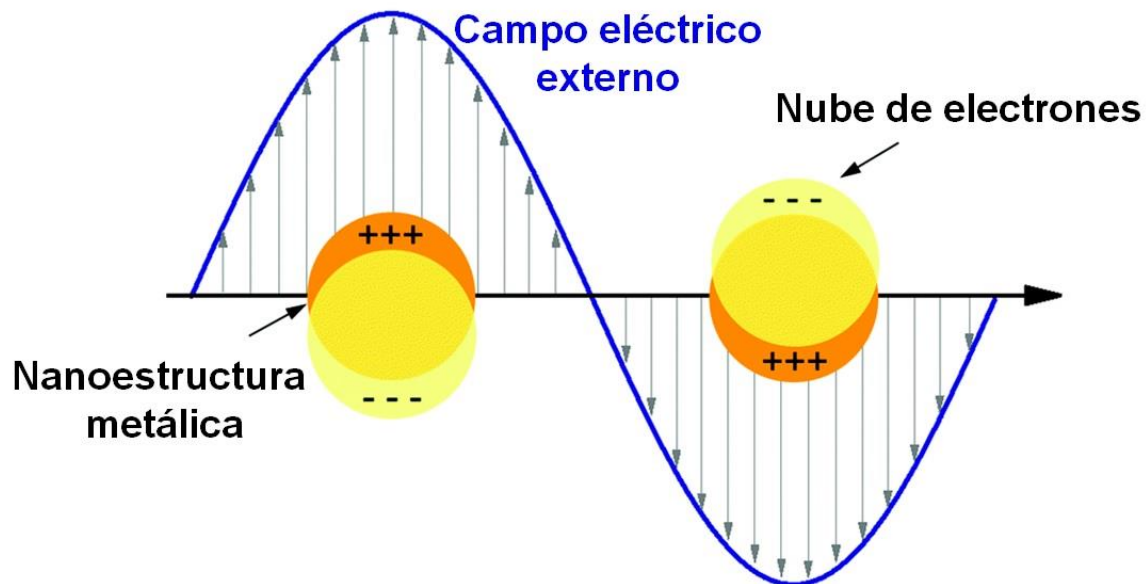


Figura 1. Esquema del plasmón de superficie dipolar de la NP a un tiempo t y t' .
Modificado de Bozzola y cols., 2017.

1.3. Dióxido de silicio (SiO_2)

Sanders en 1964, encontró que la gema llamada ópalo estaba conformada por dióxido de silicio (SiO_2) y mostraba una tendencia a ordenarse en una estructura cúbica. Debido a este ordenamiento, el ópalo es la única gema capaz de refractar la luz y al hacerlo podemos apreciar una amplia gama de colores que asemejan a los del arcoíris. Por otra parte Stöber y cols. en 1968 fueron los primeros en investigar la síntesis de ópalos artificiales, estos se forman a partir de reacciones químicas con compuestos que contengan silicio, como el tetraetilortosilicato (TEOS). El SiO_2 también es un compuesto muy utilizado en la industria y fabricación de materiales como cemento, cerámica y principalmente vidrio (Ojovan, 2004) además de que es inerte y no tóxico (Oopmann y cols., 1975). Astratov y cols en 1995, demostraron que en los arreglos ordenados de SiO_2 como

el que se muestra en la **Figura 2** se pueden incrustar distintos tipos de materiales, aumentando las aplicaciones de ambos.

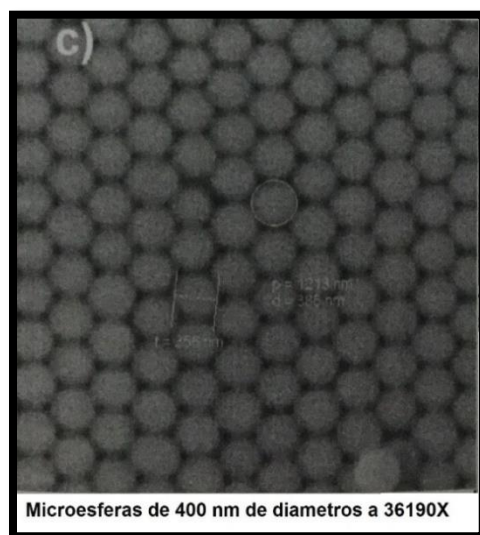


Figura 2. Arreglo ordenado de microesferas de SiO₂. Tomado de Cruz, 2013.

1.4. Nanopartículas con actividad antimicrobiana

Se han desarrollado nanopartículas inorgánicas que presentan un efecto antimicrobiano sobre una gran variedad de microorganismos como bacterias, hongos y virus. Esta actividad se encuentra ligada al tipo de material del que están formadas las NPs y características propias de la escala nanométrica a la que se encuentran, como el tamaño que permite la internalización con mayor facilidad de las NPs al interior de los microorganismos y la relación área-volumen que permite un mayor contacto e interacción con los microorganismos. Las NPs presentan mecanismos diferentes al que presentan la mayoría de los antimicrobianos utilizados hoy en día lo que los convierte en una buena opción para el combate de microorganismos multiresistentes. La acción bactericida dependerá de varios factores como el tamaño, composición química, recubrimiento, forma, carga, medio en el que se encuentren dispersas y concentración utilizada de NPs (Seil y cols., 2012; Hajipour y cols., 2012).

Para este trabajo nuestros microorganismos de estudio son *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, por su gran importancia tanto en el campo de la investigación como en el de salud pública.

1.4.1 *Staphylococcus aureus*

Fue primeramente descrito por el cirujano escocés Sir Alexander Orgston en 1882, quien lo aisló de un absceso supurativo (Wilson, 1987), pero no fue llamado *Staphylococcus aureus* hasta 1884 cuando Friedrich J. Rosenbach identificó una colonia con una coloración amarilla (Rosenbach, 1884).

S. aureus es un coco Gram positivo, regularmente se encuentra agrupado en forma de racimos irregulares, es inmóvil, catalasa y coagulasa positivo, no esporulado. Suele encontrarse como parte de la microbiota normal de la piel y mucosas, aunque en ocasiones puede causar enfermedad (Brooks y cols., 2011).

Es de los principales causantes de enfermedades nosocomiales y con importante emergencia de resistencia a lo antimicrobianos, se ha estimado que 1 de cada 3 personas es portadora de *S. aureus* y 2 de cada 100 son portadoras de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) por lo que representa un gran problema de salud especialmente en ambientes intrahospitalarios (Control Disease Center, 2016). Este microorganismo suele causar enfermedades como neumonía (Frazee y cols., 2005), endocarditis (Charlebois y cols., 2002) e infecciones de la piel y tejidos blandos (Stenstrom y cols., 2009) tales como abscesos, celulitis y furúnculos, por mencionar algunas.

1.4.2 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA)

S. aureus es una especie que ha desarrollado rápidamente resistencia a muchos de los antibióticos utilizados para su tratamiento, por ejemplo; en estudios realizados en 1942, se observó la resistencia a la penicilina, solo un año después de que se introdujera su uso en el ser humano, para los años 50s ya era resistente a la mitad de las penicilinas utilizadas y pronto lo fue para eritromicina, tetraciclinas y estreptomina. Para combatir al microorganismo se introdujo el uso

de la meticilina, pero solo dos años después se comenzaron a aislar cepas resistentes (Stryjewski y cols., 2014; Rammelkamp y cols., 1942).

Los mecanismos por los que *S. aureus* es resistente a la meticilina, son la producción de β -lactamasas y la proteína de unión a penicilinas 2A (PBP2a), codificadas por los genes *blaZ* y *mecA* respectivamente. El uso de PBP2a es de los mecanismos más importante, ya que es una PBP de baja afinidad a β -lactámicos, por lo que cuando estos se unen a la PBP normal de *S. aureus*, la PBP2a puede reanudar la síntesis de la pared celular (Morell y cols., 2010).

Otra enzima que contribuye a la multiresistencia de *S. aureus* es la enzima Cfr (cloranfenicol-florfenicol resistente), codificada en el gen *cfr*, ésta es una metiltransferasa que metila el sitio A2503 de la subunidad mayor ribosomal 23S rRNA y evita que pueda ser blanco de varios antibióticos (cloranfenicol, florfenicol y clindamicina), se encuentra junto al gen *ermB*, que codifica para otra rRNA metiltransferasa que metila los sitios A2058 por lo que también contribuye a la resistencia (Hao y cols., 2012).

1.4.3 *Escherichia coli*

Se describió inicialmente por Theodor Escherich en 1885, es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, es oxidasa negativo, puede ser móvil por flagelos o inmóvil y su temperatura óptima de crecimiento es a 37°C (Jorgensen y cols., 2015).

En general la familia *Enterobacteriaceae* contiene una estructura antigénica muy compleja, con más de 150 tipos de antígeno O (lipopolisacárido), 100 antígenos K (capsular) y 50 antígenos H (flagelar), de los cuales la mayoría son identificables y nos permiten clasificar a las cepas en serotipos (Brooks y cols., 2011).

E. coli es principalmente una bacteria comensal que se encuentra colonizando el intestino de la mayoría de los mamíferos. Sin embargo, debido a eventos de recombinación y transferencia horizontal de genes por elementos genéticos móviles como plásmidos, bacteriófagos e islas de patogenicidad, *E. coli* ha sufrido modificaciones que permitieron el surgimiento de distintos patotipos como *E. coli*

enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatogena (EPEC), enteroagregativa (EAEC), adherencia difusa (DAEC) y uropatógena (UPEC) que poseen la capacidad de colonizar e infectar el sistema gastrointestinal provocando diarrea u otras regiones del cuerpo humano como el tracto urinario y sistema circulatorio, lo que conlleva a la aparición cada vez más frecuente de infecciones extraintestinales (Croxen y *co/s.*, 2012; Friedmann, 2006).

2. Antecedentes

En diversos reportes de investigación se han presentado estudios sobre la actividad antimicrobiana de nanopartículas de plata y oro, diferenciándose principalmente en el método de síntesis utilizado y el rango de tamaño de partículas obtenido, atribuyendo a este último la diferencia en los resultados observados en distintos trabajos. Shrivastava y cols., en el 2007 observaron que concentraciones de 25 µg/ml de nanopartículas de plata, en un rango de tamaño de 10-15 nm podían inhibir por completo el crecimiento de *E. coli*, y *Salmonella typhi*, aunque no obtuvieron resultados positivos contra *S. aureus*. Por otra parte, Yuan y cols en 2017 concluyeron que, para nanopartículas de plata de un tamaño promedio de 20 nm, la concentración mínima inhibitoria (CMI) contra *Pseudomonas aeruginosa* y *S. aureus* fue de 1 y 2 µg/ml respectivamente (Shrivastava y cols., 2007; Yuan y cols., 2017)

Shamaila y cols en 2016, utilizaron nanopartículas de oro de un rango de tamaños de 7 a 34 nm contra *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *S. aureus* y *Klebsiella pneumoniae*, y encontraron que la CMI fue de 2.93 µg/ml, 7.56 µg/ml, 3.92 µg/ml y 3.15 µg/ml respectivamente. Mohammed y cols. en 2017 trabajaron con nanopartículas de oro de un tamaño de 25 nm contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*, encontrando que la CMI fue de 200 µg/ml (Shamaila y cols., 2016; Mohamed y cols., 2017)

Con respecto a la síntesis de nanopartículas, en el Instituto de Física de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Cruz en 2013 sintetizó AgNPs y AuNPs utilizando borohidruro de sodio y citrato de sodio como agentes reductores, respectivamente (Cruz., 2013). Se sintetizaron microesferas de SiO₂ por Flores en el 2014 siguiendo la metodología descrita por Stöber y obtuvo un tamaño promedio de partícula de 364 nm (Flores., 2014).

3. Justificación

El aumento de la resistencia a antimicrobianos por microorganismos de importancia médica que se ha presentado en los últimos años principalmente por el uso indiscriminado de fármacos, representa un gran problema de salud pública a nivel mundial, por lo que el estudio del efecto bactericida de nanopartículas metálicas irradiadas con luz blanca podría ser una alternativa en el combate contra estos microorganismos.

El estudio de las microesferas de SiO₂ en presencia de AgNPs y AuNPs podría generar más aplicaciones para el uso de las NPs y mejor aprovechamiento de sus efectos antimicrobianos.

4. Hipótesis

Las nanopartículas plasmónicas de oro y plata tienen mejor actividad bactericida al ser irradiadas con luz blanca y su efecto no se ve alterado por la presencia de microesferas de SiO₂.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Evaluar la actividad bactericida de nanopartículas plasmónicas de plata y oro.

5.2. Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de plata y oro por método de reducción química y posterior caracterización.
- Realizar pruebas biológicas con nanopartículas de plata y oro en suspensión contra *E. coli* y *S. aureus*.

- Estudiar el efecto antimicrobiano de las nanopartículas de Ag y Au fotoactivadas con luz blanca, sobre *E. coli* y *S. aureus*.
- Estudiar el efecto antimicrobiano de las nanopartículas de Ag y Au en presencia de microesferas de SiO₂.
- Analizar por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), los posibles cambios morfológicos en la membrana de *E. coli* y la pared celular de *S. aureus*, causados por las nanopartículas de Ag y Au.
- Determinar la profundidad del daño (membrana externa o citoplasma) sufrido por el efecto de las nanopartículas de Ag y Au.

6. Materiales y métodos

6.1. Material biológico

La cepa de *E. coli* MC4100 fue donada por la Dra. Margarita María de la Paz Arenas Hernández, del laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos, del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

La cepa de *S. aureus* L27 fue donada por la Dra. Rosa del Carmen Rocha Gracia, del laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

6.2. Síntesis de nanopartículas de plata en solución

Las nanopartículas de plata fueron sintetizadas por método químico, siguiendo la metodología descrita por Turkevich (Turkevich., 1951).

20 ml de una solución 1mM de nitrato de plata (AgNO_3) se llevó a una temperatura de 98°C en agitación vigorosa constante sobre una plancha de calentamiento, posteriormente se agregaron de forma rápida 2 ml de citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) al 1%. La solución se mantuvo en agitación hasta que un color amarillo oscuro o café fue evidente. Se retiró de la plancha y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

6.3. Síntesis de nanopartículas de oro en solución

Para este trabajo se utilizaron dos muestras de AuNPs (muestra A y B) que difieren en su tamaño. Se sintetizaron por método químico en el Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN) de la UNAM, en Ensenada, Baja California Norte, por el Dr. José Manuel Romo Herrera.

Primero se sintetizaron “semillas” de oro (AuNPs de 3-4 nm de diámetro). Estas se obtuvieron agregando rápidamente 450 μl de una solución 10 mM de Borohidruro de sodio (NaBH_4) recién preparada, a 30 ml de una solución 0.125 mM de HAuCl_4

y 0.250 mM de citrato de sodio en agitación. La solución resultante se agito lentamente a 45°C para remover el exceso de NaBH₄. Una vez obtenidas las semillas de oro, se prepararon 40 ml de una solución de crecimiento mezclando 40 mM de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y 0.125 mM de HAuCl₄; seguido por la adición de 100 µl de ácido ascórbico 100 mM, produciendo un cambio de color de amarillo pálido a transparente. Finalmente, cierta cantidad de semillas de oro, previamente sintetizadas, se agregaron a la solución de crecimiento. Para la preparación de AuNPs de distintos tamaños, se usaron 1.8 ml de semillas de oro de 3-4 nm para la muestra A de AuNPs; mientras que 5 ml de AuNPs A se utilizaron como semillas para la preparación de las AuNPs B.

6.4. Síntesis de esferas de SiO₂ en solución

La preparación de las esferas de dióxido de silicio (SiO₂) se hizo siguiendo la metodología descrita por Stöber (Stöber y cols., 1968). Se partió de la solución 1 compuesta por 20 ml de hidróxido de amonio (NH₄OH), 38.4 ml de etanol y 41.6 ml de agua desionizada, se mantuvo en agitación por 5 min. De igual forma se preparó la solución 2 compuesta de 6.6 ml de tetraetilortosilicato (TEOS) y 93.4 ml de etanol y se dejó en agitación por 5 min. Posteriormente se mezclaron las soluciones 1 y 2, la mezcla se dejó en agitación vigorosa por 1 hora a temperatura ambiente hasta obtener un color blanco lechoso.

6.5. Caracterización de nanopartículas y microsferas de SiO₂

6.5.1. Espectroscopia ultravioleta-visible

La espectroscopia UV-Vis nos permite identificar la posición del plasmón superficial, incidiendo luz con diferentes longitudes de onda y determinando para cuál de estas existe la mayor absorción. La posición del plasmón de superficie varía dependiendo del material de la nanopartícula metálica, así como de su tamaño y su forma.

Para este trabajo se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis Cary 100 Scan marca Varian del laboratorio de cromatografía del Instituto de Física de la Benemérita

Universidad Autónoma de Puebla, se realizó un barrido con luz de longitud de onda en el rango de 800 a 200 nm sobre nanopartículas de oro y plata dispersas en agua, utilizando celdas de polimetilmetacrilato (PMMA). Se utilizó agua desionizada (dH₂O) como blanco y para la línea base.

6.5.2. Microscopía Electrónica de Transmisión

Para poder observar algo tan pequeño como las nanopartículas se suele recurrir al microscopio electrónico de transmisión (TEM), este a diferencia de un microscopio óptico, utiliza un haz de electrones que es el que pasa a través de la muestra, permitiendo aumentar un objeto hasta un millón de veces, así podemos determinar la forma y el tamaño aproximado de partícula (Iowa, 2017).

Las nanopartículas se observaron en un TEM JEOL JEM-2010 en el CNyN de la UNAM en Ensenada, Baja California Norte. Se utilizaron rejillas de cobre tipo Holey en las que se depositó una gota de las muestras previamente diluidas y dispersadas.

6.5.3. Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

Para la determinación del tamaño de partícula tanto de oro, plata y SiO₂ se utilizó la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS), donde luz láser incide sobre las partículas en solución haciendo que la primera se disperse en distintas intensidades (Malvern, 2017). El análisis de las fluctuaciones de intensidad debido al movimiento Browniano de las partículas, permite determinar el tamaño de la partícula mediante la relación de Stokes-Einstein.

La determinación del tamaño se llevó a cabo en el equipo automatizado Zetasizer ZS90 marca MALVERN utilizando cubetas DTS0012.

6.5.4. Determinación de potencial zeta

El potencial zeta es una medida de la magnitud de la atracción/repulsión por carga en las partículas, su medición nos puede dar una idea de la estabilidad de las partículas en solución. Se midió el potencial zeta de las muestras de

nanopartículas de oro, plata y SiO_2 en el equipo Zetasizer ZS90, utilizando cubetas DTS1070.

6.5.5. Determinación de la concentración de nanopartículas de plata

Para la determinación de AgNPs, se hizo una digestión ácida de la muestra de NPs, se llevó a cabo en un horno de microondas DIG-1 marca Prendo bajo las siguientes condiciones: Tiempo de 30 min, temperatura de 160°C y potencia del 60%. Para 2 ml de muestra se utilizó una relación de 9 ml de ácido nítrico (HNO_3) y 3 ml de ácido clorhídrico (HCl) concentrados.

Se preparó una curva de calibración de 0.4, 0.6, 0.8, 1 y 1.2 ppm, a partir de una solución estándar de 10 ppm de Ag (marca Perkin Elmer, CAS 7697-373- 2), las cuales fueron aforadas con una solución de HNO_3 al 5%. Se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica con una lámpara multi elementos de cátodo hueco, la flama generada fue a base de acetileno como combustible (10 L/min) y aire (2.5 L/min) como oxidante.

Se llevó a cabo la alineación del quemador de 10 cm del accesorio de atomización por flama del espectrofotómetro de absorción atómica con una solución de cobre (Cu) de 1.5 ppm, a una longitud de onda de 324.75 nm.

Después de calibrar con Cu iónico, se verifico la señal (absorbancia) con una solución estándar de 1 ppm de Ag, a una longitud de onda de 328.08 nm.

6.5.6. Espectroscopia RAMAN

La espectroscopia Raman emplea radiación laser y nos da información sobre los modos de vibración característica de las moléculas proporcionadas por los cambios de energía asociados con la polarizabilidad de las moléculas. El espectro Raman de microesferas de SiO_2 se obtuvo utilizando un equipo Micro Raman Horiba Jobin Yvon modelo lab RAM HR el cual tiene un microscopio óptico acoplado.

6.5.7. Espectroscopia Infrarroja

La interacción de la muestra con la radiación infrarroja provoca un cambio en el estado vibracional de las moléculas, este espectro vibracional es una propiedad física única y característica de las moléculas por lo que funciona como una “huella dactilar” que nos permite identificar las moléculas en una muestra mediante la comparación con espectros de referencia. El equipo utilizado fue un espectrómetro Perkin Elmer FTIR Spectrum One, en la región de 4500 cm^{-1} a 250 cm^{-1} .

6.5.8. Microscopía de Fuerza Atómica

Para determinar el tamaño de las esferas de SiO_2 , se fijó una cantidad pequeña de muestra sobre un sustrato de vidrio y se observó utilizando un microscopio de fuerza atómica Nanosurf Easyscan2.

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

La CMI y CMB de nanopartículas de plata, oro y microesferas de SiO_2 se llevó a cabo siguiendo el protocolo establecido por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, The Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016)

Preparación del inóculo: el inóculo bacteriano para ambas cepas, se preparó partiendo de un cultivo previo en agar de 24 horas, se resuspendieron colonias en un tubo de caldo Luria-Bertani (LB) hasta obtener una turbidez comparable al 0.5 de la escala de McFarland (1×10^8 Unidades Formadoras de Colonia/ml o UFC/ml), esta turbidez se puede medir en un espectrofotómetro dando un valor de $D_{600\text{nm}} = 0.08-0.1$ Abs. Este inóculo se diluyó 1:20 en un volumen final de 1 ml para obtener un aproximado de 5×10^6 UFC/ml, finalmente de este inóculo se tomaron 10 μl que al ser agregados a los 100 μl de la sustancia a probar, obteniendo una concentración final de 5×10^5 UFC/ml.

Preparación de las nanopartículas: se centrifugaron 1 ml de nanopartículas de oro, plata y SiO_2 de la concentración máxima a probar, a una velocidad de 13000

rpm durante 20 minutos en una centrifuga marca eppendorf modelo 5415R. Se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml de medio liquido LB, se resuspendieron las nanopartículas y se realizaron diluciones seriadas 1:2 para obtener las siguientes concentraciones para cada tipo de nanopartícula. **Tabla 1**

Tabla 1. Concentraciones de nanopartículas de plata y oro y de las microesferas de SiO₂ utilizadas para CMI, CMB y cinética de crecimiento.

Tipo de NP	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5
AgNPs	22.39 µg/ml	11.19 µg/ml	5.59 µg/ml	2.79 µg/ml	1.39 µg/ml
AuNPs	10.51 µg/ml	5.25 µg/ml	2.62 µg/ml	1.31 µg/ml	0.65 µg/ml
SiO₂	6 mg/ml	3 mg/ml	1.5 mg/ml	0.75 mg/ml	0.37 mg/ml

Finalmente se tomaron 100 µl de cada muestra de nanopartículas y se agregaron en una placa de ELISA de 96 pozos, a estos se añadieron 10 µl de inóculo bacteriano. Se hicieron mediciones cada hora por un tiempo de 12 horas en un lector automatizado de placas ELx800 Bio-Tek a 620nm. Las placas se incubaron a 37°C.

Se observaron las placas después de 24 horas de incubación y se determinó la CMI con base a la turbidez aparente del medio. Para la determinación de la CMB se sembró en agar LB cada una de las muestras para ver si había crecimiento. Se utilizó H₂AuCl₄ y AgNO₃ como control.

La CMI, CMB y cinética de crecimiento se realizaron también en presencia nanopartículas y luz blanca.

Para la curva de viabilidad se siguió el procedimiento de preparación de muestra e inóculo anteriormente descrito y se tomaron muestras cada 3 horas por un lapso de 12 horas y se sembró por goteo en agar LB y se incubaron por 12 horas a 37°C. Después se contaron las colonias para calcular las UFC/ml. Este ensayo también se realizó en presencia de AgNPs-SiO₂ y AuNPs-SiO₂.

6.7. Cuantificación de proteína intracelular y del sobrenadante

La cuantificación de proteínas del sobrenadante se llevó a cabo como se menciona en trabajos previos (Yuan y cols., 2017). El procedimiento fue el siguiente: en 500 µl de medio LB con las concentraciones de nanopartículas a probar, se inoculó por separado 1×10^6 UFC/ml de las cepas de *E. coli* y *S. aureus*, se incubaron en agitación a 175 rpm, 37°C por 6 horas. Los cultivos se centrifugaron a 4°C por 15 minutos a 10000 rpm y se obtuvo el sobrenadante para cuantificación de proteínas utilizando la técnica de Bradford. Las células que quedaron en el tubo se resuspendieron en solución de buffer de fosfatos (PBS por sus siglas en inglés) y se lavaron 2 veces, se resuspendió la pastilla y se llevó a sonicar en hielo por 15 minutos con pulsaciones de 10 segundos utilizando un sonicador Ultrasonic Processor. Se centrifugaron a 4°C por 15 minutos a 10000 rpm para remover restos celulares y se tomó el sobrenadante para la cuantificación de proteínas totales. Se utilizó una curva estándar con Albumina de suero bovino (Ver Anexo).

6.8. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Para la determinar el daño a la membrana por acción de nanopartículas de plata y oro, se tomaron muestras de ambas cepas y se pusieron en contacto con distintas concentraciones de NPs, después de 6 horas de incubación se observaron en un microscopio de fuerza atómica Nanosurf Easyscan2 y se utilizó una muestra sin NPs como control.

7. Resultados

7.1. Síntesis de nanopartículas de plata y oro

Para este trabajo se utilizaron nanopartículas de plata y de oro, sintetizadas por métodos químicos de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente. Como se puede apreciar en la **Figura 3**, las nanopartículas de plata tienen el color característico amarillo o café, esto se debe a la forma en que la luz interactúa con ellas, también puede apreciar el color rojo o rosado de nanopartículas de oro.

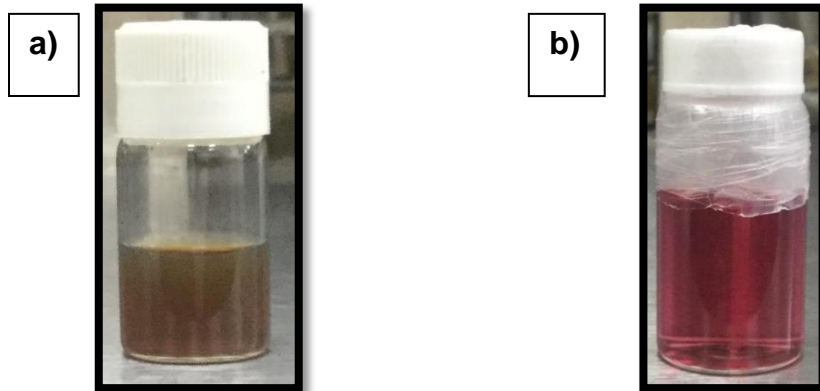


Figura 3. a) muestra de nanopartículas de plata. b) muestra de nanopartículas de oro.

7.2. Caracterización de nanopartículas

7.2.1. Posición del plasmón por espectroscopia ultravioleta-visible

Se obtuvo el espectro UV-Vis de las muestras de nanopartículas para identificar el punto máximo de absorción, cuya longitud de onda se asocia a la excitación del el plasmón de superficie y cuyo rango es característico del material de la nanopartícula.

En la **Figura 4**, se observa el espectro de absorción de las AgNPs, donde la banda de absorción se localiza a 429 nm que es característico de las mismas y en la **Figura 5** se ve el espectro de AuNPs, se aprecia que en muestra A tiene su

banda de absorción en 525 nm y la muestra B en 529 nm, lo que es característico de las nanopartículas de oro.

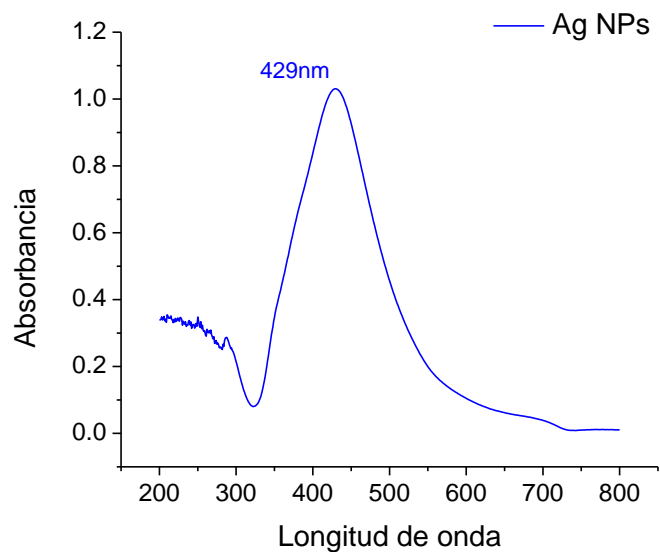


Figura 4. Espectro UV-Vis de nanopartículas de plata. La banda de absorción está centrada en 429 nm.

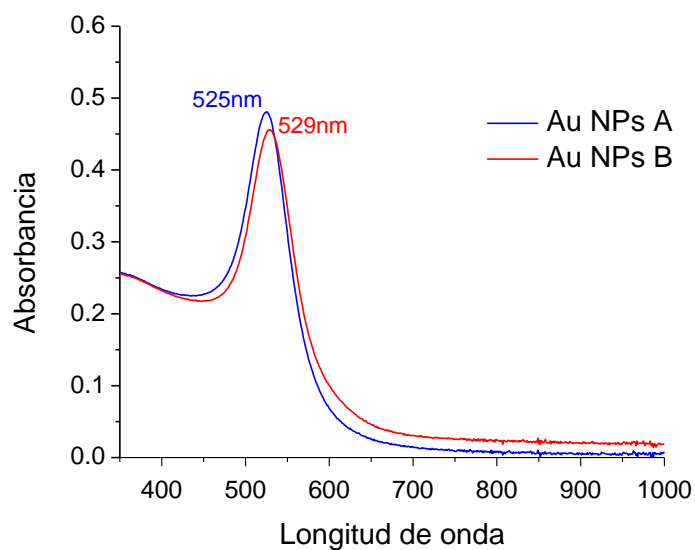


Figura 5. Espectro UV-Vis de nanopartículas de oro. Se observa la muestra A, con una banda de absorción centrada en 525 nm (en azul) y la muestra B con una banda de absorción centrada en 529 nm (en rojo).

7.2.2. Determinación de la forma y tamaño de las NPs por TEM

Para determinar la forma y tamaño de las nanopartículas se obtuvieron imágenes por TEM y por medio del análisis de imagen utilizando el software Image-J se obtuvo una distribución de tamaño aproximado. En la **Figura 6A**, se observa la forma cuasi esférica de nanopartículas de plata, con una distribución de tamaño promedio de 12 nm (**Figura 6B**) y en la **Figura 6C y 6E** correspondiente a las nanopartículas de oro, tanto en la muestra A como en la B, se observa una forma principalmente esférica con una distribución de tamaño de aproximadamente 14 nm para la primera (**Figura 6D**) y 28 nm para la segunda (**Figura 6F**).

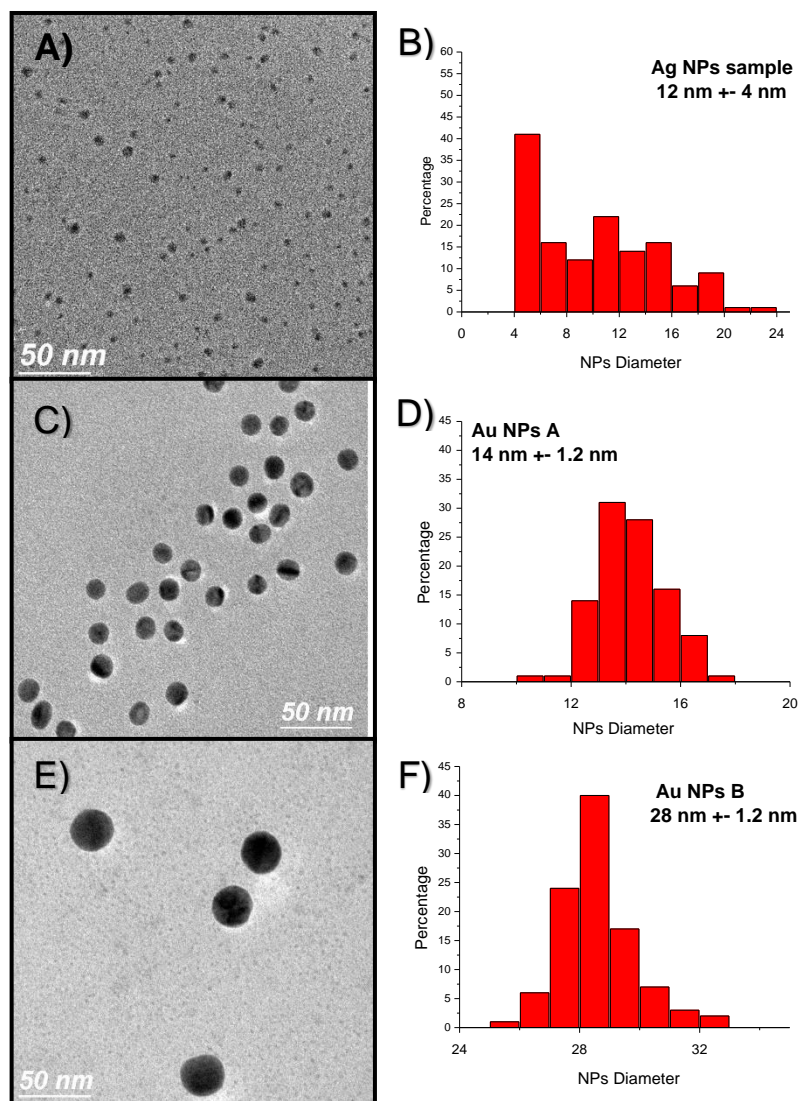


Figura 6. **A)** Imagen de TEM de AgNPs; **B)** Histograma de AgNPs; **C)** Imagen de TEM de AuNPs A; **D)** Histograma de AuNPs A; **E)** Imagen de TEM de AuNPs B; **F)** Histograma de AuNPs B. Los conteos se realizaron a partir de varias imágenes de TEM.

7.2.3. Determinación del tamaño por DLS

Además de la determinación de tamaño utilizando las imágenes de TEM se recurrió a la técnica de dispersión de luz dinámica que nos permite analizar una población más grande de partículas en suspensión. En la **Figura 7** se presenta la curva de distribución de tamaño de la muestra de nanopartículas de plata, donde se observan dos picos correspondientes a dos poblaciones de tamaño, una de 58

nm \pm 25 nm y otra de 4 nm \pm 2 nm. En la **Figura 8** vemos la muestra A de nanopartículas de oro donde se observan dos rangos de tamaño, uno de 44 nm \pm 10 nm y otro de 373 nm \pm 155 nm y en la **Figura 9** la muestra B de AuNPs, con tamaños de 55 nm \pm 18 nm y 2 nm \pm 0.37 nm.

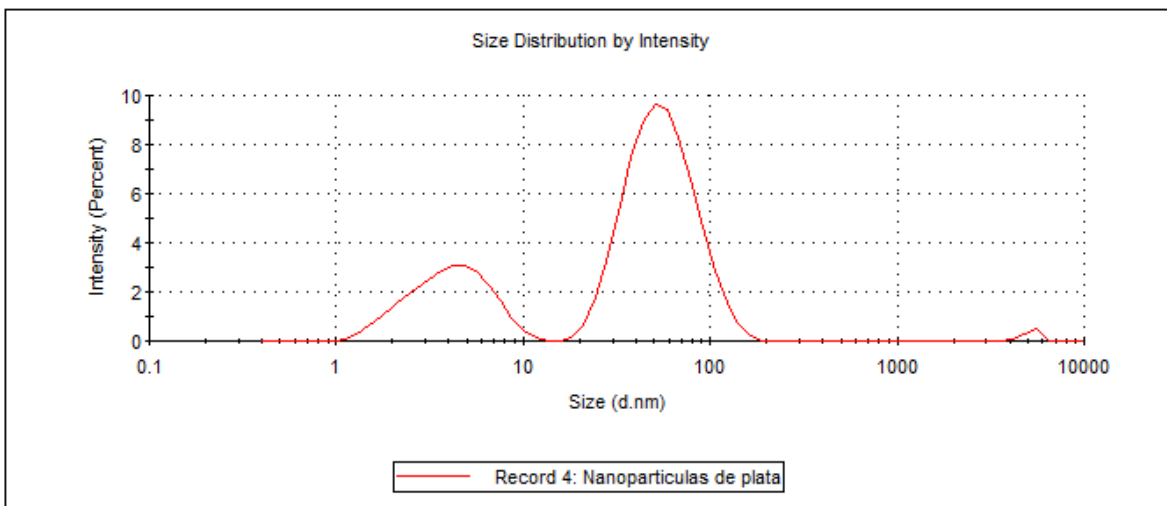


Figura 7. Grafica de la distribución de tamaño de las nanopartículas de plata obtenida por la técnica de DLS.

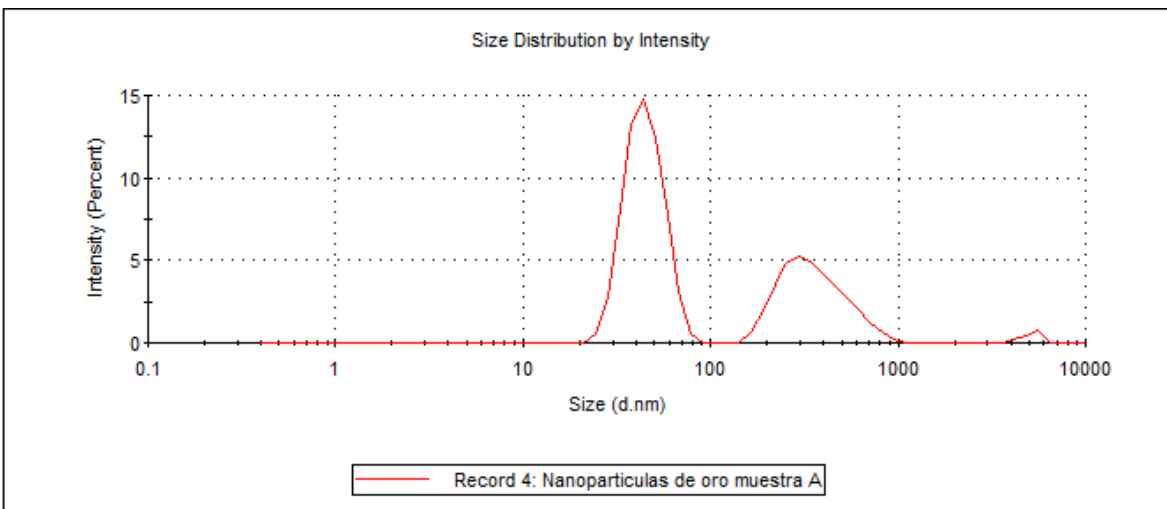


Figura 8. Grafica de la distribución de tamaño de las nanopartículas de oro (muestra A) obtenida por la técnica de DLS.

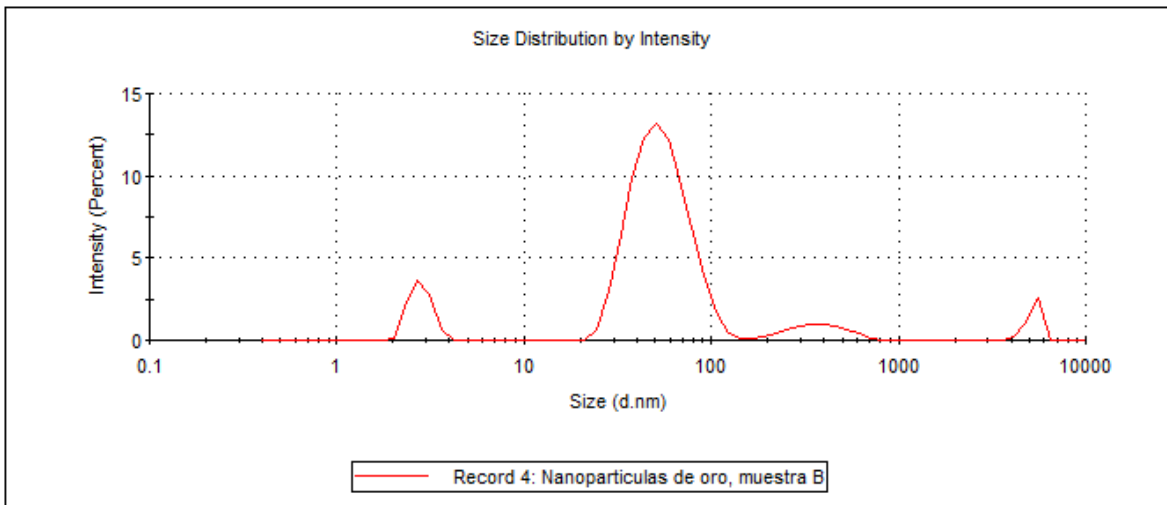


Figura 9. Grafica de la distribución de tamaño de las nanopartículas de oro (muestra B) obtenida por la técnica de DLS.

7.2.4. Determinación de la estabilidad de las NPs por potencial zeta

Para conocer la estabilidad de las partículas en solución se determinó el potencial zeta, este debe tener un valor absoluto mayor a 20 lo que indica una mayor estabilidad. El potencial zeta de nanopartículas de plata fue de -35 mV (**Figura 10**); para las nanopartículas de oro en la muestra A, se obtuvo un valor de 57 mV (**Figura 11**) y dos valores para la muestra B, uno de 45 mV y otro de 18 mV (**Figura 12**). Estos resultados indican una buena estabilidad de las partículas en solución.

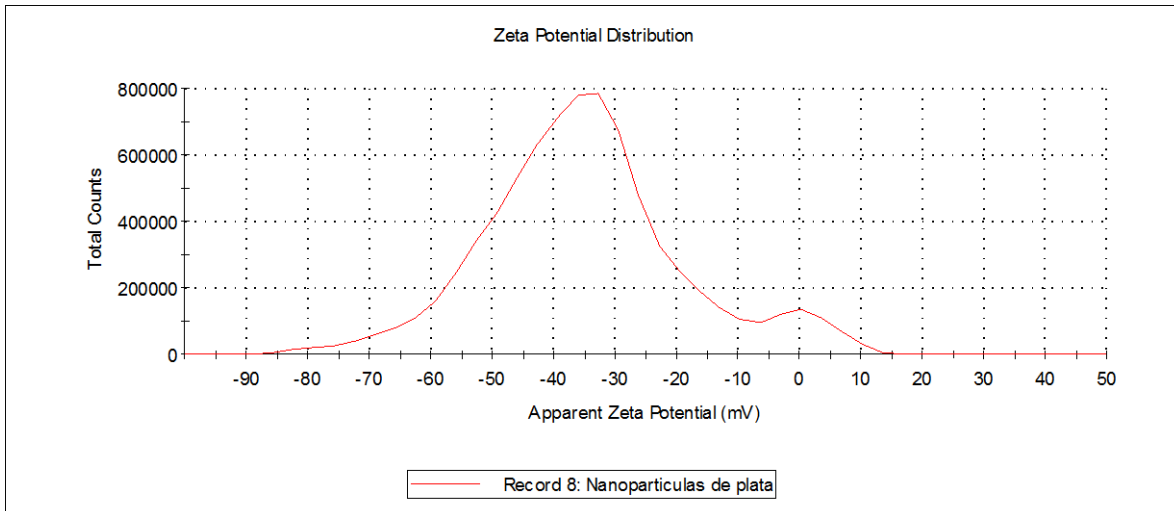


Figura 10. Gráfico de potencial zeta de nanopartículas de plata.

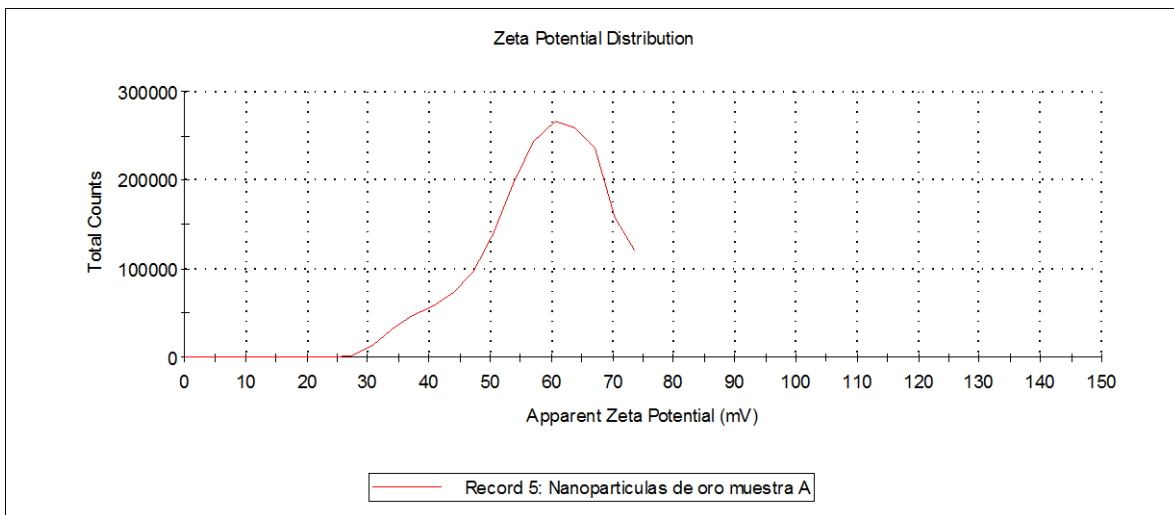


Figura 11. Gráfico de potencial zeta de nanopartículas de oro (muestra A).

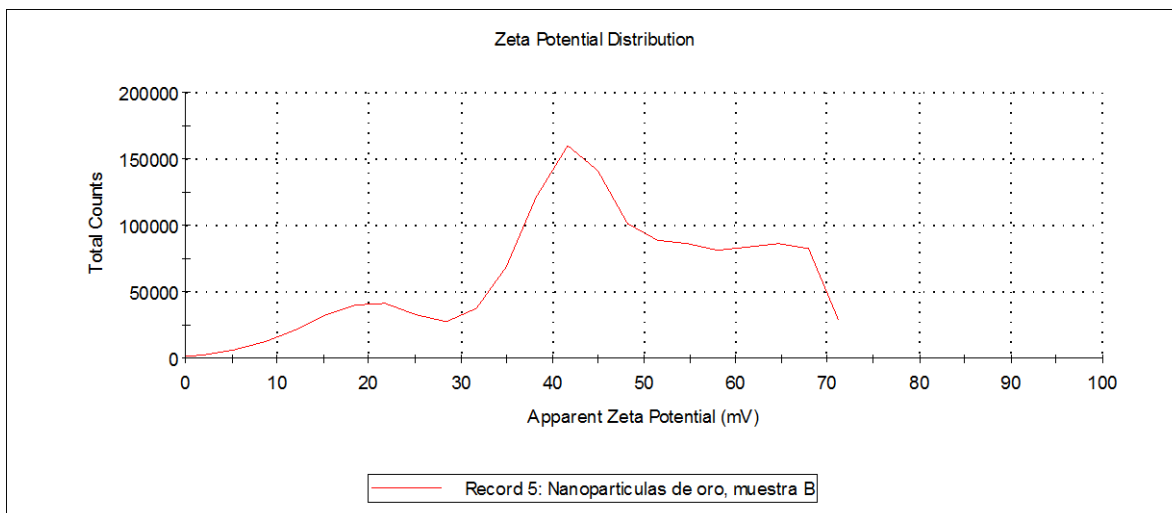


Figura 12. Gráfico de potencial zeta de nanopartículas de oro (muestra B).

7.2.5. Determinación de la concentración de nanopartículas de plata

Se obtuvo la concentración de AgNPs por medio de espectroscopia de absorción atómica, utilizando como control la solución de AgNO₃ empleada para la síntesis de las mismas, los resultados para ambos se pueden observar en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Concentración de **a)** Nanopartículas de plata. **b)** Solución de AgNO₃. Expresados en ppm y molaridad.

Muestra	ppm	Desviación estándar (DS)	Molaridad
a) Nanopartículas de plata	11.2 ppm	0.0661	103.8 ± 0.00613 μM
b) Sol. AgNO ₃ (CONTROL)	12.4 ppm	0.1195	114.9 ± .01107 μM

7.2.6. Determinación de concentración de oro en muestras de AuNPs

La cuantificación de oro de las muestras de AuNPs se realizó en el Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM por el Dc. José Romo Herrera., se obtuvieron los siguientes resultados para las dos muestras (**Tabla 3**).

Tabla 3. Concentración de **a)** muestra A de nanopartículas de oro. **b)** muestra B de nanopartículas de oro, resultados expresados en molaridad.

Muestra	Molaridad
a) Nanopartículas de oro. (Muestra A)	$97.5 \pm 1.4 \mu\text{M}$
b) Nanopartículas de oro. (Muestra B)	$96.8 \pm 2 \mu\text{M}$

7.3. Síntesis de esferas de SiO_2

Se realizó la síntesis de esferas de SiO_2 , teniendo como resultado una solución color blanco lechoso, a la que posteriormente se le realizaron lavados por centrifugación para eliminar el solvente y re dispersar las esferas en dH_2O . En la **Figura 13** se observa el color característico de las esferas de SiO_2



Figura 13. Muestra de esferas de dióxido de silicio (SiO_2)

7.3.1. Espectroscopia de infrarrojo

Para la caracterización de las esferas de SiO₂ se utilizó espectroscopia de infrarrojo, donde se observó el espectro característico del SiO₂ con picos localizados en las posiciones aproximadas de 780 cm⁻¹, 980 cm⁻¹ y 1100 cm⁻¹, como se observa en la **Figura 14**.

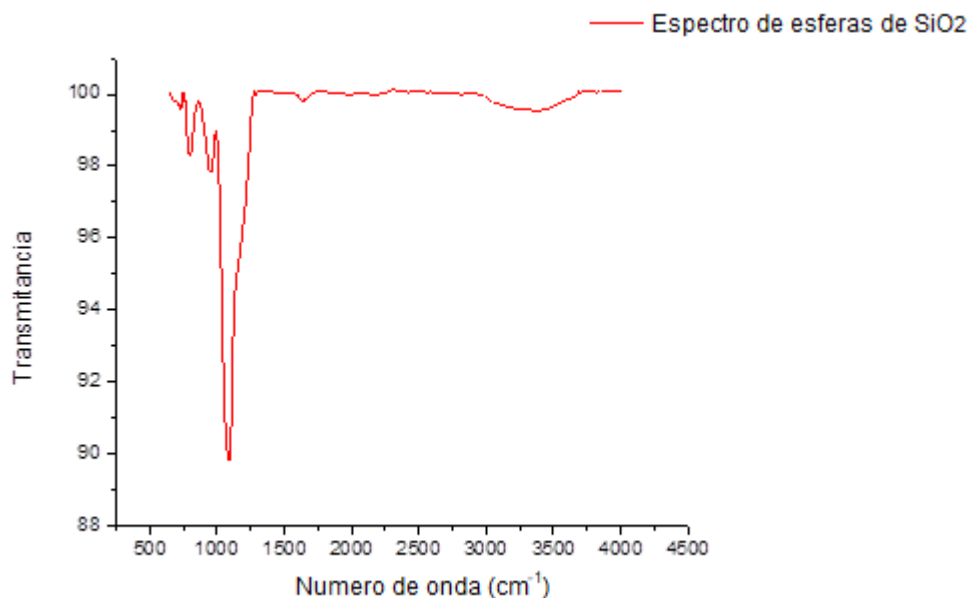


Figura 14. Espectro infrarrojo de esferas de SiO₂.

7.3.2. Espectroscopia RAMAN

Se obtuvo el espectro RAMAN de las esferas de SiO_2 donde se observó el espectro característico del Silicio donde se observan las siguientes bandas centradas en 431, 494, 607 y 713 cm^{-1} , correspondientes a las uniones Si-O. (Figura 15).

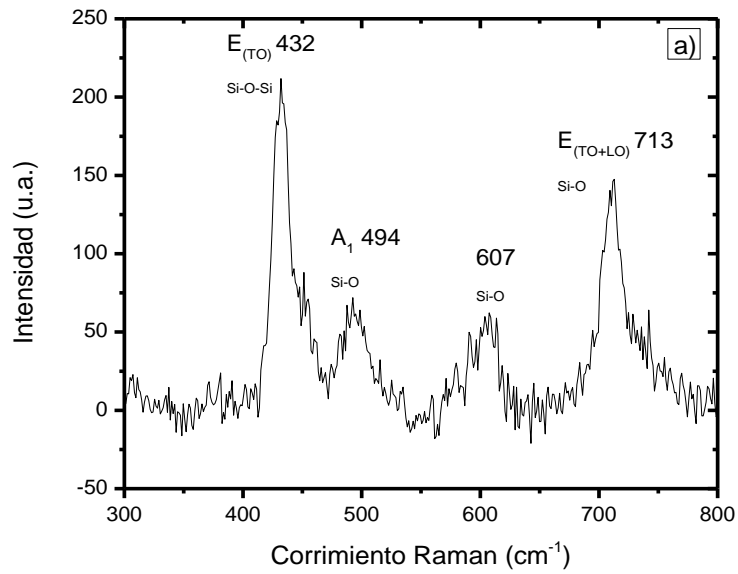


Figura 15. Espectro RAMAN de esferas de SiO_2

7.3.4. Microscopía de fuerza atómica (AFM) de esferas de SiO₂

Las esferas de silicio se observaron por AFM para determinar el tamaño. En las imágenes se observa la forma esférica del SiO₂ con un tamaño aproximado de 270 nm, **Figura 16**.

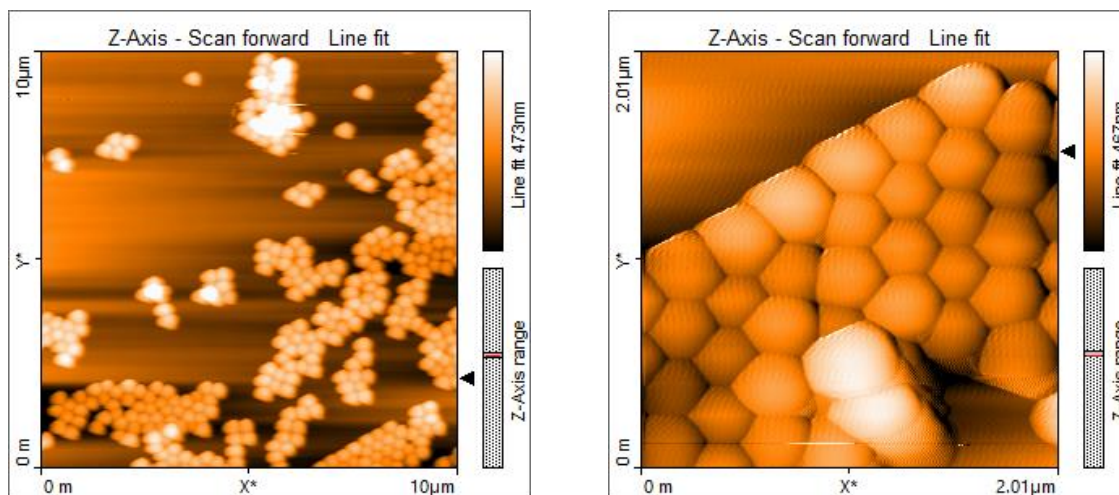


Figura 16. Imágenes de AFM de esferas de SiO₂. Tamaño aproximado de 270 nm.

7.4. Análisis microbiológico

7.4.1. Determinación de la CMI y CMB

Para determinar la concentración más baja de nanopartículas y esferas de SiO₂ que inhibe el crecimiento bacteriano a simple vista (CMI) y la concentración más baja que inhibe el crecimiento en placa (CMB), se trataron ambas cepas con distintas concentraciones de nanopartículas de plata y oro siguiendo los lineamientos del CLSI. Se usaron la AgNO₃ y de HAuCl₄ como controles. Los resultados se presentan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. CMI y CMB de *S. aureus* L27 y *E. coli* MC4100 con nanopartículas de plata, oro y esferas de SiO₂. Se utilizó AgNO₃ y HAuCl₄ como control.

Cepa	CMI					
	AgNPs	AuNPs A	AuNPs B	AgNO ₃	HAuCl ₄	SiO ₂
<i>E. coli</i> MC4100	5.59 µg/ml	10.51 µg/ml	10.51 µg/ml	11.17 µg/ml	13.01 µg/ml	> 6 mg/ml
<i>S. aureus</i> L27	11.19 µg/ml	2.62 µg/ml	5.25 µg/ml	11.17 µg/ml	26.03 µg/ml	> 6 mg/ml
Cepa	CMB					
	AgNPs	AuNPs A	AuNPs B	AgNO ₃	HAuCl ₄	SiO ₂
<i>E. coli</i> MC4100	5.59 µg/ml	10.51 µg/ml	10.51 µg/ml	11.17 µg/ml	13.01 µg/ml	> 6 mg/ml
<i>S. aureus</i> L27	11.19 µg/ml	2.62 µg/ml	5.25 µg/ml	11.17 µg/ml	26.03 µg/ml	> 6 mg/ml

7.4.2. Cinética de crecimiento y curva de viabilidad bacteriana en presencia de nanopartículas

Se realizó una cinética de crecimiento en presencia de las distintas concentraciones de las nanopartículas y una muestra sin nanopartículas como control (C+) mediante las lecturas de absorbancia a 600 nm cada hora por un lapso de 12 horas, también se realizó la cuantificación de UFC para determinar la viabilidad celular. En la **Figura 17A** se muestra la cinética de crecimiento de *E. coli* MC4100 en presencia de nanopartículas de plata, se observa que las concentraciones de 22.39 µg/ml a 5.59 µg/ml inhiben el crecimiento, mientras con las concentraciones de 2.79 µg/ml y 1.39 µg/ml hay un retraso en el crecimiento, donde la cepa comienza a recuperarse a partir de las 10 y 8 horas respectivamente, estos datos son comparables con la curva de viabilidad celular mostrada en la **Figura 17B**.

En la **Figura 17C** se muestra la cinética de crecimiento de *S. aureus* L27 en presencia de nanopartículas de plata, se observa que a partir de una concentración de 11.19 µg/ml hay inhibición en el crecimiento y un retardo de aproximadamente 5 horas a comparación del control a una concentración de 5.59 µg/ml. Ambas concentraciones inhibitorias se correlacionan con lo obtenido en la curva de viabilidad celular observada en la **Figura 17D**, donde se ve una pérdida de viabilidad en la concentración de 22.39 µg/ml y 11.19 µg/ml a partir de las 6 horas de contacto y también se observa el retardo en el crecimiento a 5.59 µg/ml .

En ambas curvas se evidencia un retraso en el crecimiento con la concentración de 2.79 $\mu\text{g/ml}$ a partir de las 3 horas de contacto, aunque tiende a recuperarse más rápido que la concentración anterior.

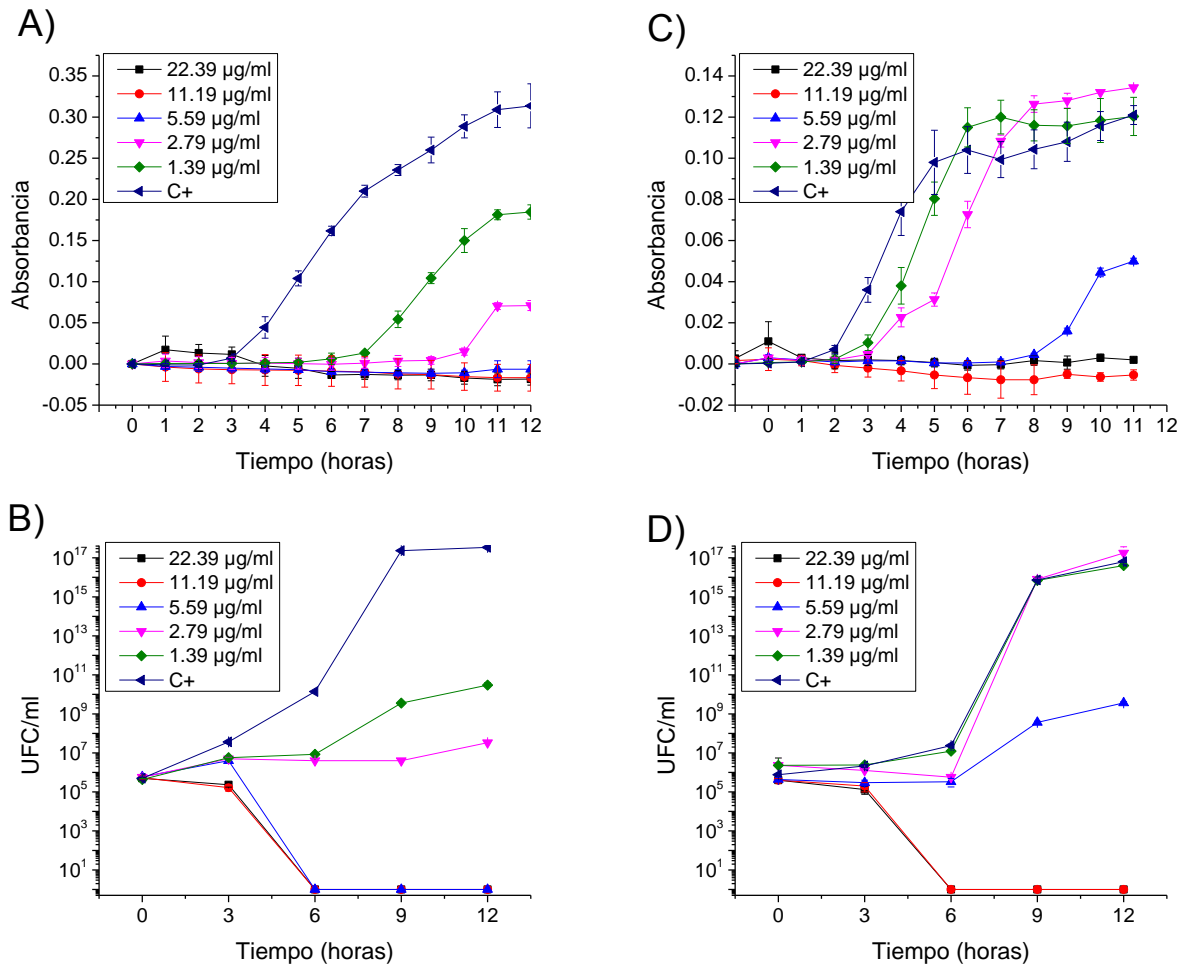


Figura 17. A) Curva de crecimiento de *E. coli* con AgNPs; **B)** Curva de viabilidad de *E. coli* con AgNPs; **C)** Curva de crecimiento de *S. aureus* con AgNPs; **D)** Curva de viabilidad de *S. aureus* con AgNPs. Los ensayos se realizaron por triplicado. Gráficos realizados en Origin 8.6.

De igual forma se obtuvo la cinética y curva de viabilidad para nanopartículas de oro con *E. coli* MC4100, en la **Figura 18A** se muestra la cinética de crecimiento con AuNPs muestra A, se observa que la concentración de 10.51 $\mu\text{g/ml}$ es la única que inhibe el crecimiento mientras que con las demás concentraciones no hubo diferencia significativa con respecto al control. Esto coincide con la curva de

viabilidad celular mostrada en la **Figura 18B**, donde la concentración de 10.51 $\mu\text{g/ml}$ inhibe el crecimiento celular a partir de las 3 horas de contacto.

En la **Figura 18C** se observa la inhibición de crecimiento de *S. aureus* L27 frente a AuNPs muestra A, con concentraciones de 10.51 $\mu\text{g/ml}$, 5.25 $\mu\text{g/ml}$ y 2.62 $\mu\text{g/ml}$ y no se ve diferencias significativas entre las otras dos concentraciones y el control. De igual forma estos resultados se correlacionan con la curva de viabilidad mostrada en la **Figura 18D**, donde en la concentración más elevada de 10.51 $\mu\text{g/ml}$ se observa inhibición de crecimiento a partir de las 3 horas de contacto, y las concentraciones de 5.25 $\mu\text{g/ml}$ y 2.62 $\mu\text{g/ml}$ a partir de las 6 horas de contacto.

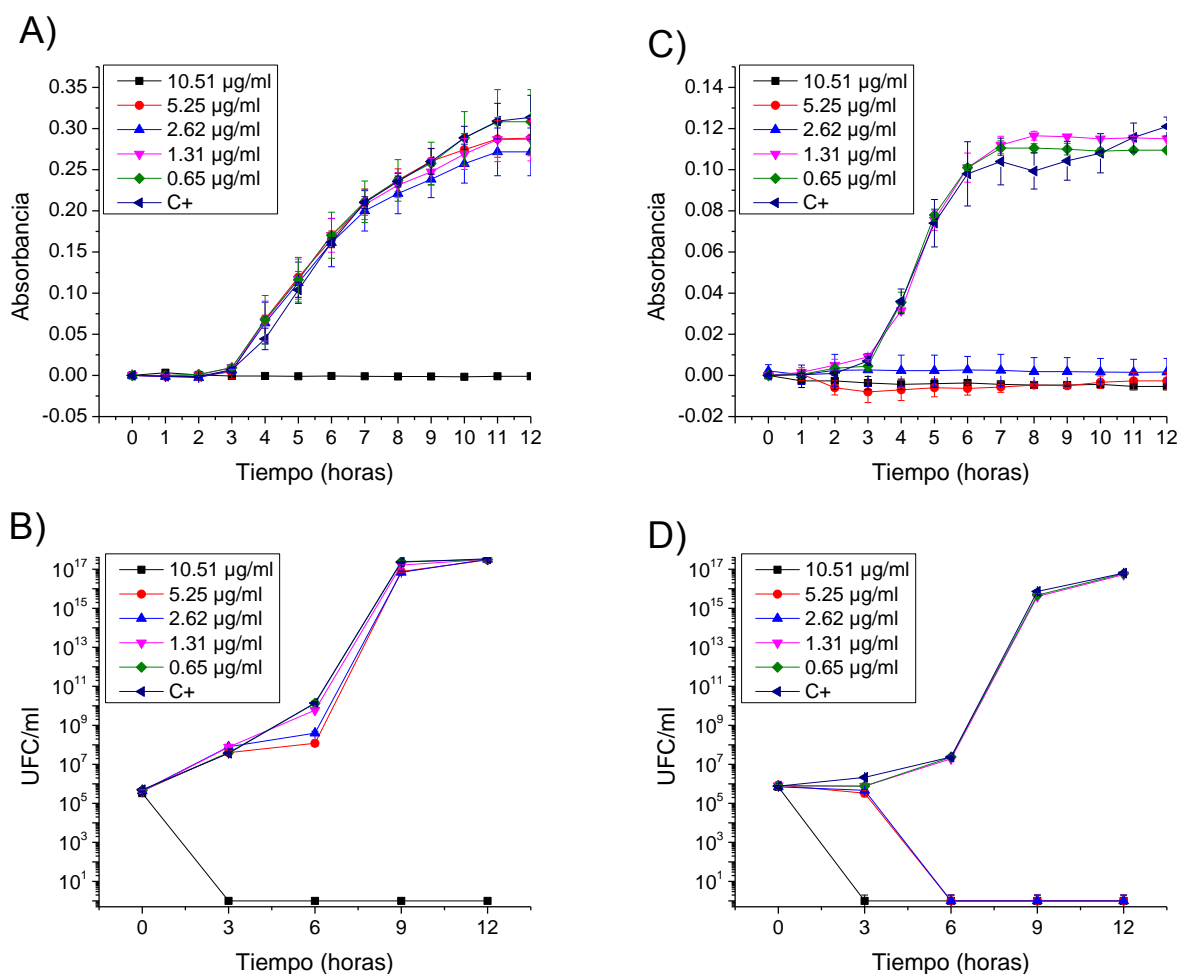


Figura 18. **A)** Curva de crecimiento de *E. coli* con AuNPs A; **B)** Curva de viabilidad de *E. coli* con AuNPs A; **C)** Curva de crecimiento de *S. aureus* con AuNPs A; **D)** Curva de viabilidad de *S. aureus* con AuNPs A. Ensayos realizados por triplicado. Los ensayos se realizaron por triplicado. Gráficos realizados en Origin 8.6.

En la **Figura 19A** se muestran los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento al probar la muestra de AuNPs B contra *E. coli*, la concentración de 10.51 µg/ml es la que inhibe el crecimiento, esto coincide con la curva de viabilidad mostrada en la **Figura 19B**, donde la inhibición completa de crecimiento es a partir de las 6 horas de contacto, también podemos observar que las concentraciones de 5.25 µg/ml y 2.62 µg/ml ocasionan un retraso en el crecimiento a partir de las 3 horas de contacto, sin embargo tiende a recuperarse a partir de las 12 horas.

En el caso de *S. aureus*, se observa en la **Figura 19C** la cinética de crecimiento donde la cepa es susceptible a las concentraciones de 10.51 µg/ml y 5.25 µg/ml y se observa un retraso en el crecimiento a una concentración de 2.62 µg/ml, de igual forma se corrobora con lo encontrado en la curva de viabilidad en la **Figura 19D** donde la concentración de 10.51 µg/ml presenta una inhibición completa de crecimiento a partir de las 3 horas de contacto y la concentración de 5.25 µg/ml a partir de las 9 horas. Las demás concentraciones no muestran cambios significativos comparados con el control.

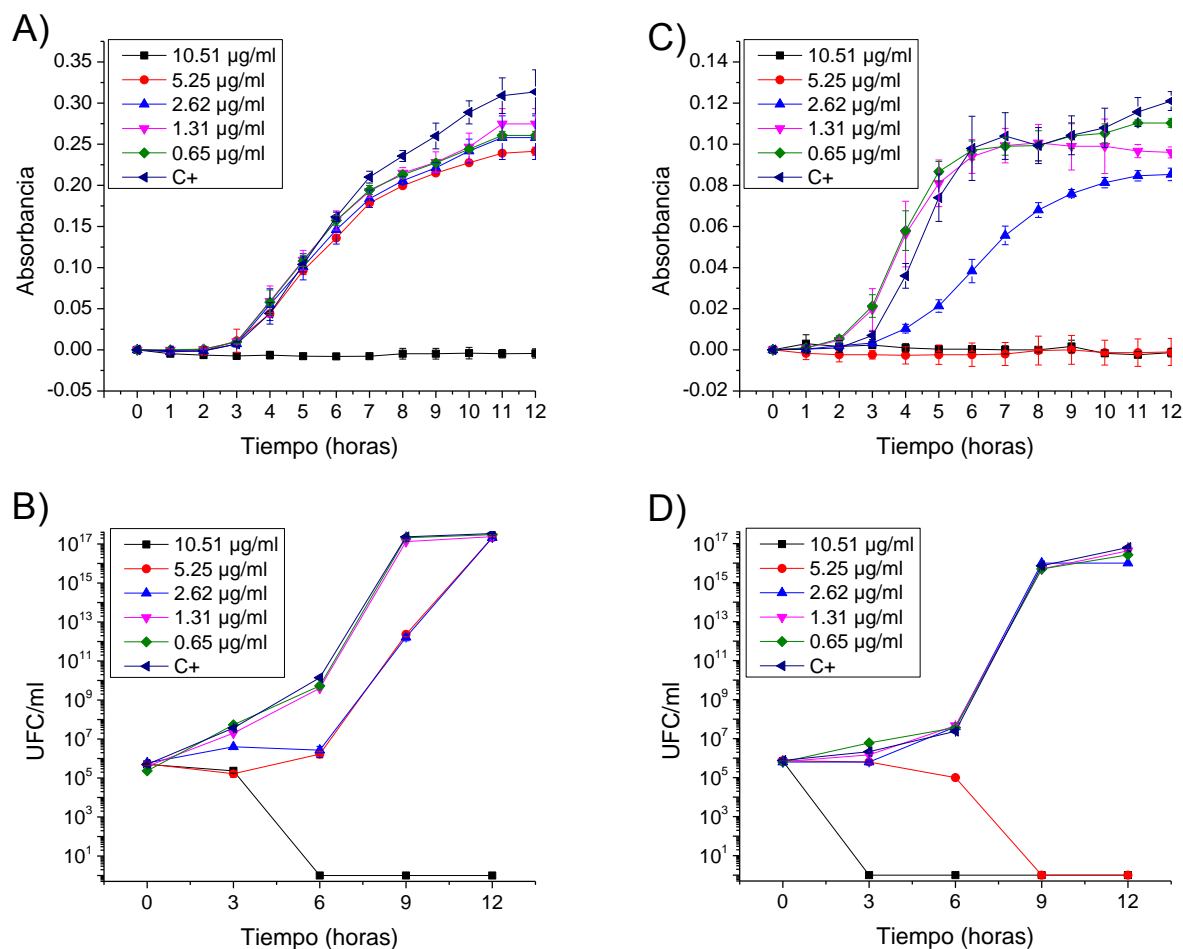


Figura 19. A) Curva de crecimiento de *E. coli* con AuNPs B; **B)** Curva de viabilidad de *E. coli* con AuNPs B; **C)** Curva de crecimiento de *S. aureus* con AuNPs B; **D)** Curva de viabilidad de *S. aureus* con AuNPs B. Ensayos realizados por triplicado. Los ensayos se realizaron por triplicado. Gráficos realizados en Origin 8.6.

Después se mezclaron en solución las mismas concentraciones de nanopartículas metálicas con 6 mg/ml de esferas de SiO₂ y se realizaron las pruebas de viabilidad celular por un periodo de 12 horas, los resultados se observan en las siguientes gráficas. En la **Figura 20A** se observa a *S. aureus* en presencia de AgNPs y SiO₂, se aprecia un comportamiento similar al encontrado solo en presencia de AgNPs donde las concentraciones más altas de 22.39 µg/ml y 11.19 µg/ml tienen un efecto bactericida. En la **Figura 20B y 20C** se observa a *S. aureus* con AuNPs A y AuNPs B respectivamente en presencia de dióxido de silicio, se ve que mantienen el mismo comportamiento que presenta cuando se exponen solo a nanopartículas

de oro. En la **Figura 20D** tenemos a *E. coli* con AgNPs y SiO₂, que de igual forma mantiene el mismo comportamiento que la muestra solo con nanopartículas, donde las concentraciones bactericidas pertenecen a 22.39 µg/ml, 11.19 µg/ml y 5.59 µg/ml. En las **Figuras 20E y 20F** se observa a *E. coli* en presencia de AuNPs A-SiO₂ y AuNPs B-SiO₂ respectivamente, donde la concentración de 10.51 µg/ml se mantiene como la CMB.

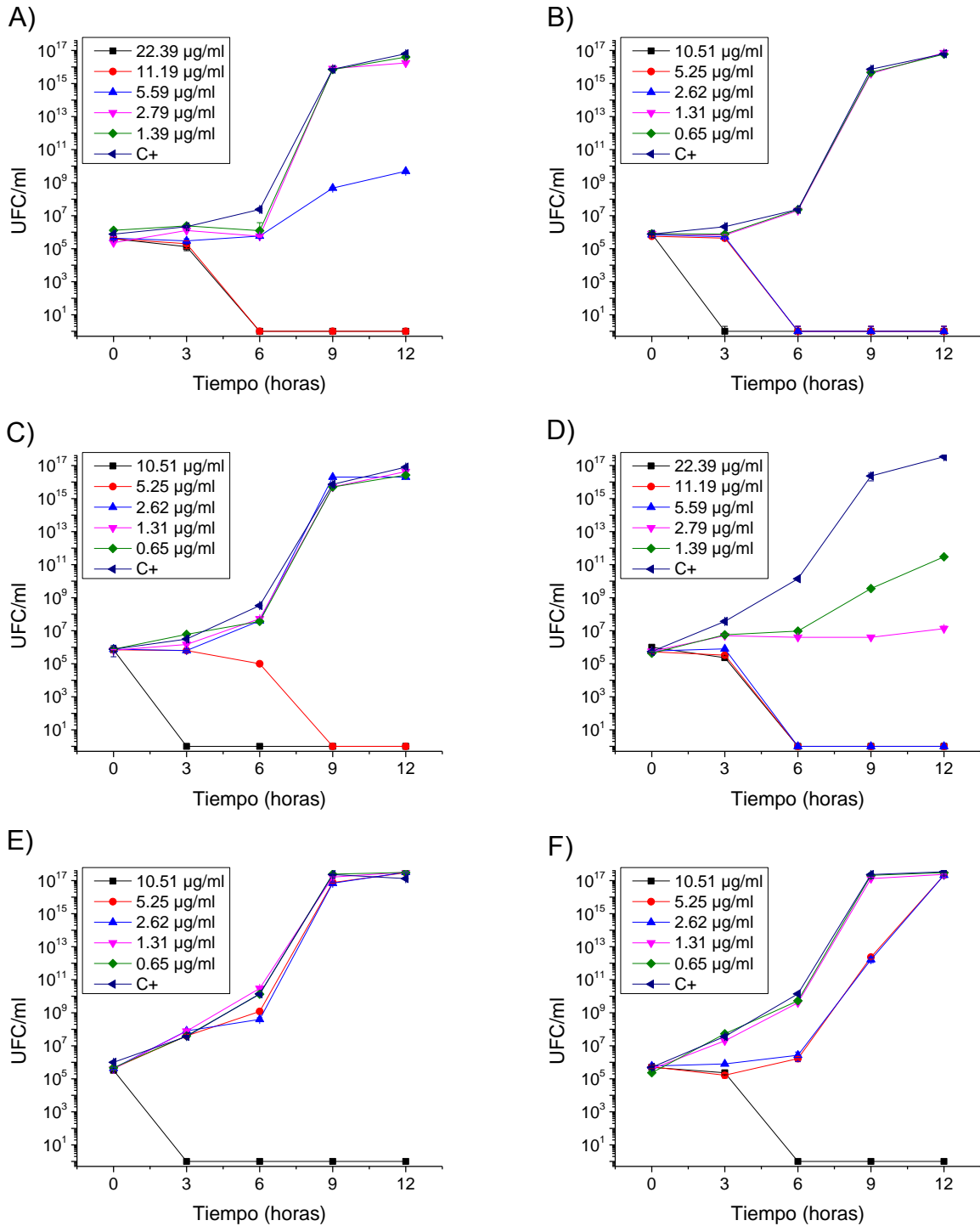


Figura 20. A) Curva de viabilidad de *S. aureus* con AgNPs y SiO₂; **B)** Curva de viabilidad de *S. aureus* con AuNPs A y SiO₂; **C)** Curva de viabilidad de *S. aureus* con AuNPs B y SiO₂; **D)** Curva de viabilidad de *E. coli* con AgNPs y SiO₂; **E)** Curva de viabilidad de *E. coli* con AuNPs A y SiO₂; **F)** Curva de viabilidad de *E. coli* con AuNPs B y SiO₂. Los ensayos se realizaron por triplicado. Gráficos realizados en Origin 8.6.

7.4.3. CMI, CMB y cinética de crecimiento con nanopartículas en presencia de luz blanca

Las nanopartículas metálicas al tener características plasmónicas, pueden fotoactivarse con la luz, aunque el plasmón de superficie se observa mejor a una determinada longitud de onda que depende de las características de cada nanopartícula, esta suele ubicarse en el espectro de la luz visible, por lo que para este trabajo las muestras de bacterias con nanopartículas se pusieron en contacto con luz led blanca en una placa de 96 pozos ELISA, para determinar si había algún cambio en las concentraciones inhibitorias en comparación a las muestras sin luz.

En la **Tabla 5** se muestran las CMI y CMB obtenidas tras 24 horas de exposición de las bacterias y nanopartículas a luz blanca. En la **Tabla 6** se muestran las CMI y CMB sin exposición a la luz.

Tabla 5. CMI y CMB bactericida de *S. aureus* L27 y *E. coli* MC4100 con de nanopartículas de plata y oro en presencia de luz blanca.

CMI			
	AuNPs A	AuNPs B	AgNPs
<i>E. coli</i> MC4100	10.51 µg/ml	10.51 µg/ml	2.79 µg/ml
<i>S. aureus</i> L27	2.62 µg/ml	5.25 µg/ml	5.59 µg/ml
CMB			
<i>E. coli</i> MC4100	10.51 µg/ml	10.51 µg/ml	2.79 µg/ml
<i>S. aureus</i> L27	2.62 µg/ml	5.25 µg/ml	5.59 µg/ml

Tabla 6. CMI y CMB de *S. aureus* L27 y *E. coli* MC4100 con nanopartículas de plata y oro sin luz.

CMI			
	AuNPs A	AuNPs B	AgNPs
<i>E. coli</i> MC4100	10.51 µg/ml	10.51 µg/ml	5.59 µg/ml
<i>S. aureus</i> L27	2.62 µg/ml	5.25 µg/ml	11.19 µg/ml
CMB			
<i>E. coli</i> MC4100	10.51 µg/ml	10.51 µg/ml	2.79 µg/ml
<i>S. aureus</i> L27	2.62 µg/ml	5.25 µg/ml	11.19 µg/ml

Donde se observó una diferencia en la CMI y CMB fue en la muestra de nanopartículas de plata para ambas cepas, los valores de la CMI y CMB se redujeron a 2.79 µg/ml para *E. coli* MC4100 y 5.59 µg/ml para *S. aureus* L27.

Para dar un seguimiento a la diferencia en el crecimiento de las cepas frente a la exposición con luz blanca, se llevó a cabo una cinética de crecimiento.

En la **Figura 21A** se observa la curva de crecimiento de *E. coli* con AgNPs expuesta a luz visible, donde se ve la inhibición de crecimiento a una concentración de 2.79 µg/ml comparada con la curva de crecimiento previa donde a esta concentración se tenía un efecto bacteriostático. En la **Figura 21B** tenemos a *S. aureus* con AgNPs, donde de la misma forma que *E. coli* hay una inhibición de crecimiento a una concentración de 5.59 µg/ml comparada con los datos de la curva de crecimiento previa. La muestra A de AuNPs se muestra en la **Figura 21C** para *E. coli*, no hubo cambios significativos en el crecimiento comparado con la curva de crecimiento anterior, aunque hubo una ligera inhibición en el crecimiento a una concentración de 5.25 µg/ml comparada con el control. Para *S. aureus* (**Figura 21D**) no hubo diferencias significativas comparadas con datos anteriores. Para AuNPs B con *E. coli* hubo una diferencia en el crecimiento especialmente a concentraciones bajas de 1.39 µg/ml y 2.79 µg/ml (**Figura 21E**) y para *S. aureus* (**Figura 21F**) no hubo cambios significativos a ninguna concentración.

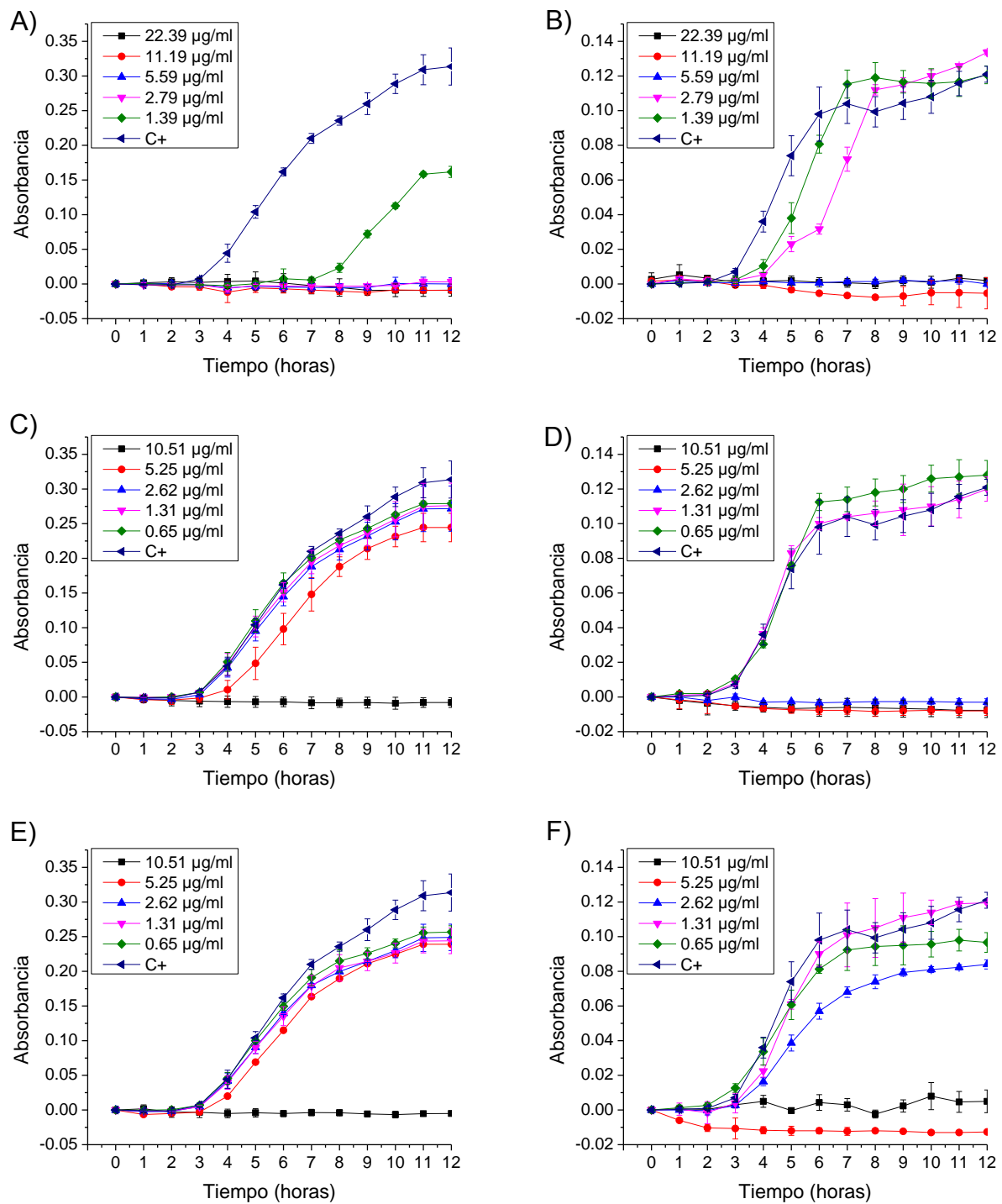


Figura 21. Curva de crecimiento en presencia de luz blanca. **A)** *E. coli* con AgNPs; **B)** *S. aureus* con AgNPs; **C)** *E. coli* con AuNPs A; **D)** *S. aureus* con AuNPs A; **E)** *E. coli* con AuNPs B; **F)** *S. aureus* con AuNPs B. Los ensayos se realizaron por triplicado. Gráficos realizados en Origin 8.6.

7.4.4. Determinación del daño a la envoltura celular por microscopía de fuerza atómica

Para determinar el daño que producían las nanopartículas de plata y oro sobre la envoltura celular de las bacterias, se utilizó microscopía de fuerza atómica. En la **Figura 22A y 22B** se muestra *S. aureus* sin nanopartículas donde se observa la forma semi esférica y una estructura que rodea a la célula que posiblemente sea la capsula. En la **Figura 22C y 22D** se observa a *S. aureus* en presencia de nanopartículas de plata que, aunque conserva un poco la forma semi esférica se observan pliegues en la superficie y deformación de la membrana. En la **Figura 22E y 22F** se observa a *S. aureus* en presencia de nanopartículas de oro y se ven nuevamente la formación de pliegues y deformación de la membrana y ya no se ve la estructura que envuelve a la célula en comparación con la imagen de *S. aureus* sin NPs.

En el caso de *E. coli*, en las **Figuras 23A y 23B** se observa la cepa sin nanopartículas, podemos ver la forma bacilar característica de *E. coli* así como una superficie uniforme, en las **Figuras 23C y 23D** que pertenece a *E. coli* con nanopartículas de plata, se observan células redondeadas donde se ha perdido por completo la forma bacilar característica e incluso se observan algunas células unidas. En las **Figuras 23E y 23F** se observa a *E. coli* en presencia de AuNPs, se puede observar la superficie más rugosa y deformada en comparación al control.

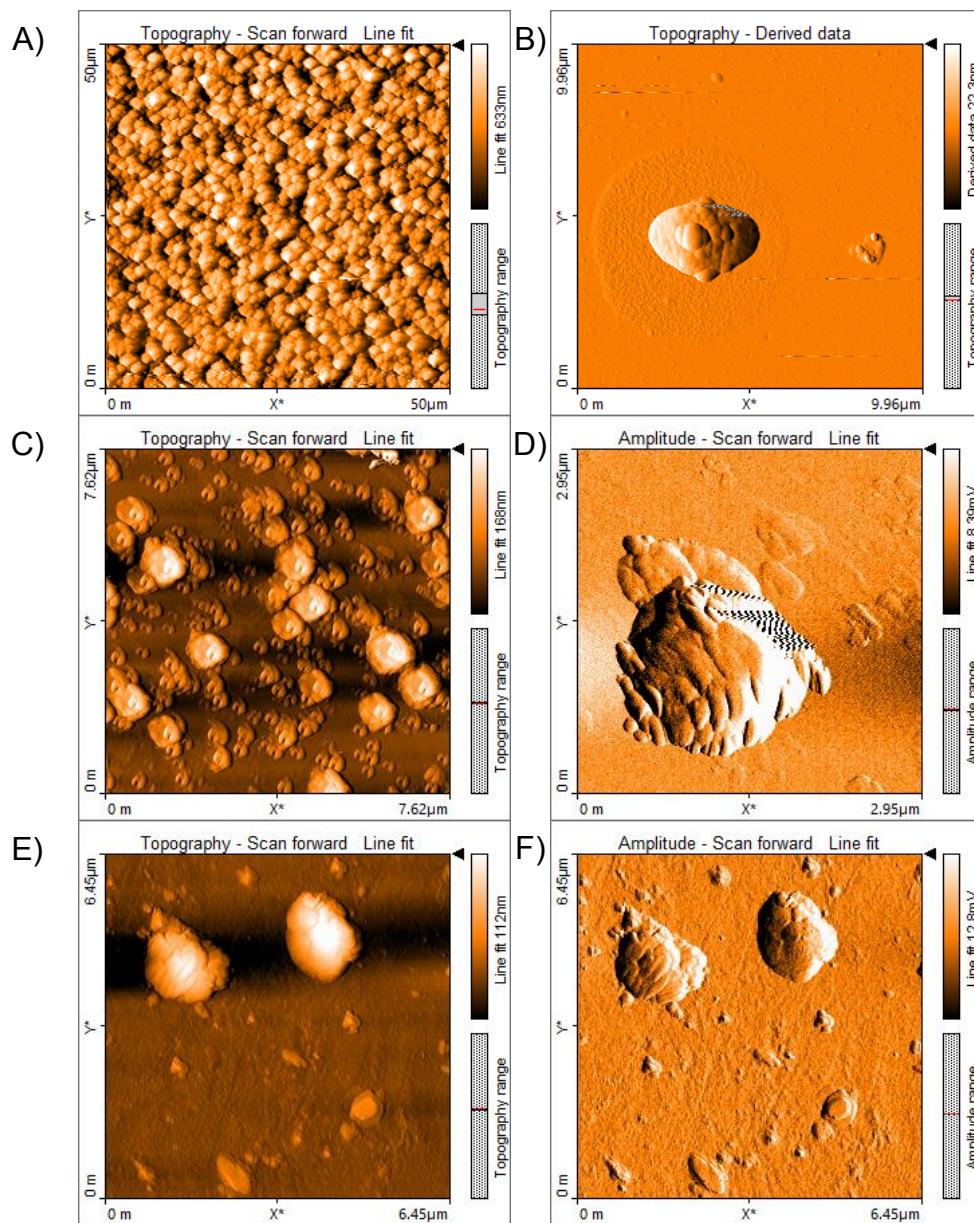


Figura 22. Imagen de microscopía de fuerza atómica de **A y B)** *S. aureus* L27 sin nanopartículas; **C y D)** *S. aureus* L27 con nanopartículas de plata; **E y F)** *S. aureus* L27 con nanopartículas de oro.

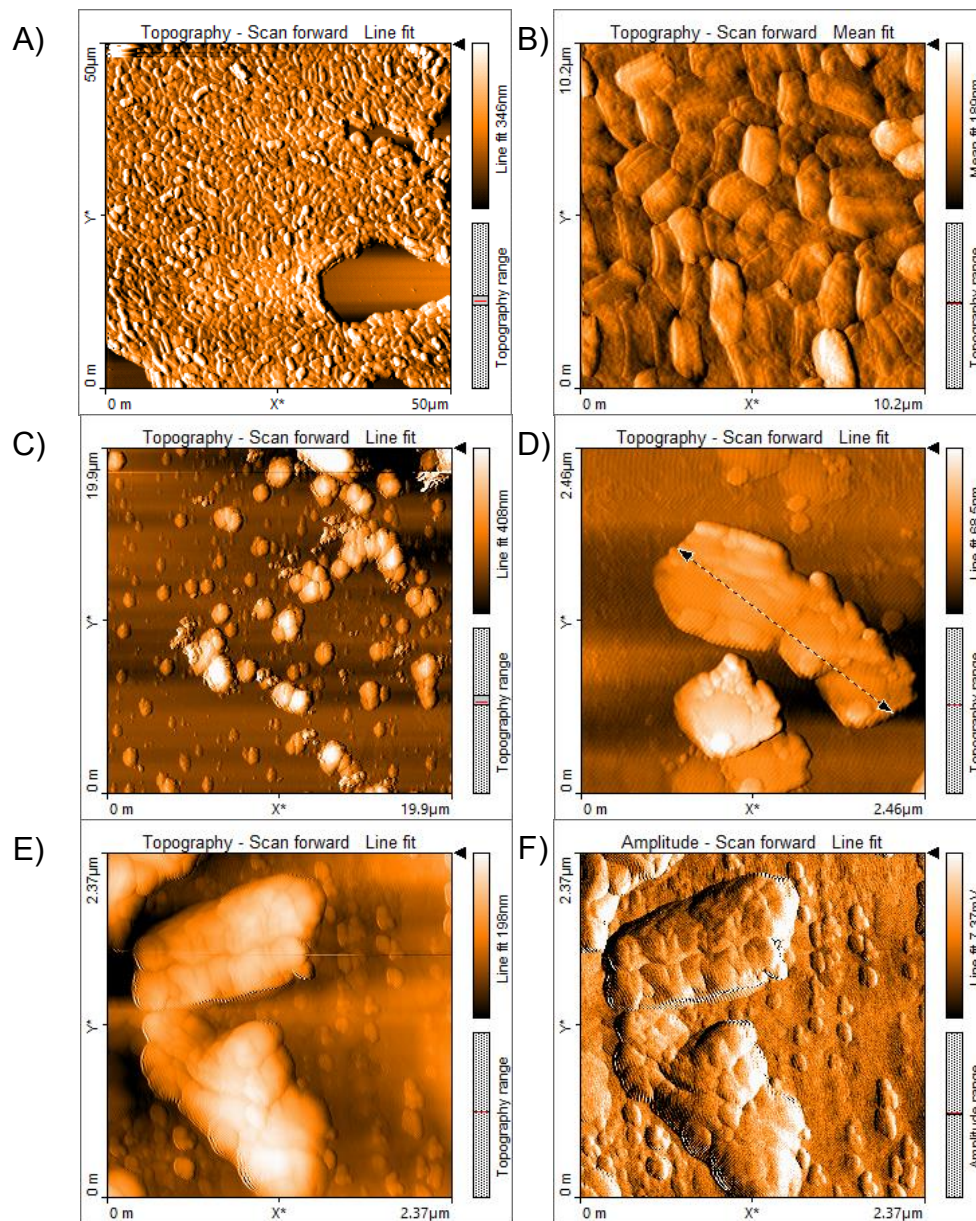


Figura 23. Imagen de microscopía de fuerza atómica de **A y B)** *E. coli* MC4100 sin nanopartículas; **C y D)** *E. coli* MC4100 con nanopartículas de plata; **E y F)** *E. coli* MC4100 con nanopartículas de oro.

7.4.5. Cuantificación de proteína intracelular y de sobrenadante

Se cuantificó la cantidad de proteína extracelular encontrada en el medio de cultivo y la proteína total producida por ambas cepas bacterianas por el método de Bradford mencionado anteriormente. Se obtuvieron los siguientes resultados; para *E. coli* MC4100 con AgNPs la cantidad de proteína total obtenida con las cinco diferentes concentraciones de nanopartículas fue mucho menor comparada con el control (**Figura 24A**), en el caso de la proteína extracelular liberada al medio solo la concentración de 22.39 µg/ml tuvo un ligero incremento comparado con el control, en las demás concentraciones no hubo diferencias significativas (**Figura 24B**).

En el caso de *E. coli* MC4100 con AuNPs A también se observa una disminución considerable de la proteína total (**Figura 24C**) a todas las concentraciones empleadas y la cantidad de proteína excretada (**Figura 24D**) es considerablemente mayor a las concentraciones de 10.51 µg/ml y 5.25 µg/ml en comparación al control. Los resultados con Au NPs B son muy parecidos, pues se observa una disminución de la proteína total (**Figura 24E**) a todas las concentraciones probadas con respecto al control, además se observa en las proteínas excretadas (**Figura 24F**) al medio un considerable incremento a las concentraciones de 10.51 µg/ml y 5.25 µg/ml.

En el caso de la cuantificación de proteína total de *S. aureus* con AgNPs observamos que concentraciones de 22.39 µg/ml, 11.19 µg/ml y 5.59 µg/ml ocasionan una caída en la producción de proteína (**Figura 25A**) y la cantidad de proteína excretada también se ve disminuida (**Figura 24B**). Para AuNPs A la cantidad de proteína total y extracelular también disminuye, especialmente con las 4 concentraciones más altas (**Figuras 25C y 25D**) y se observa un comportamiento similar para AuNPs B (**Figuras 25E y 25D**).

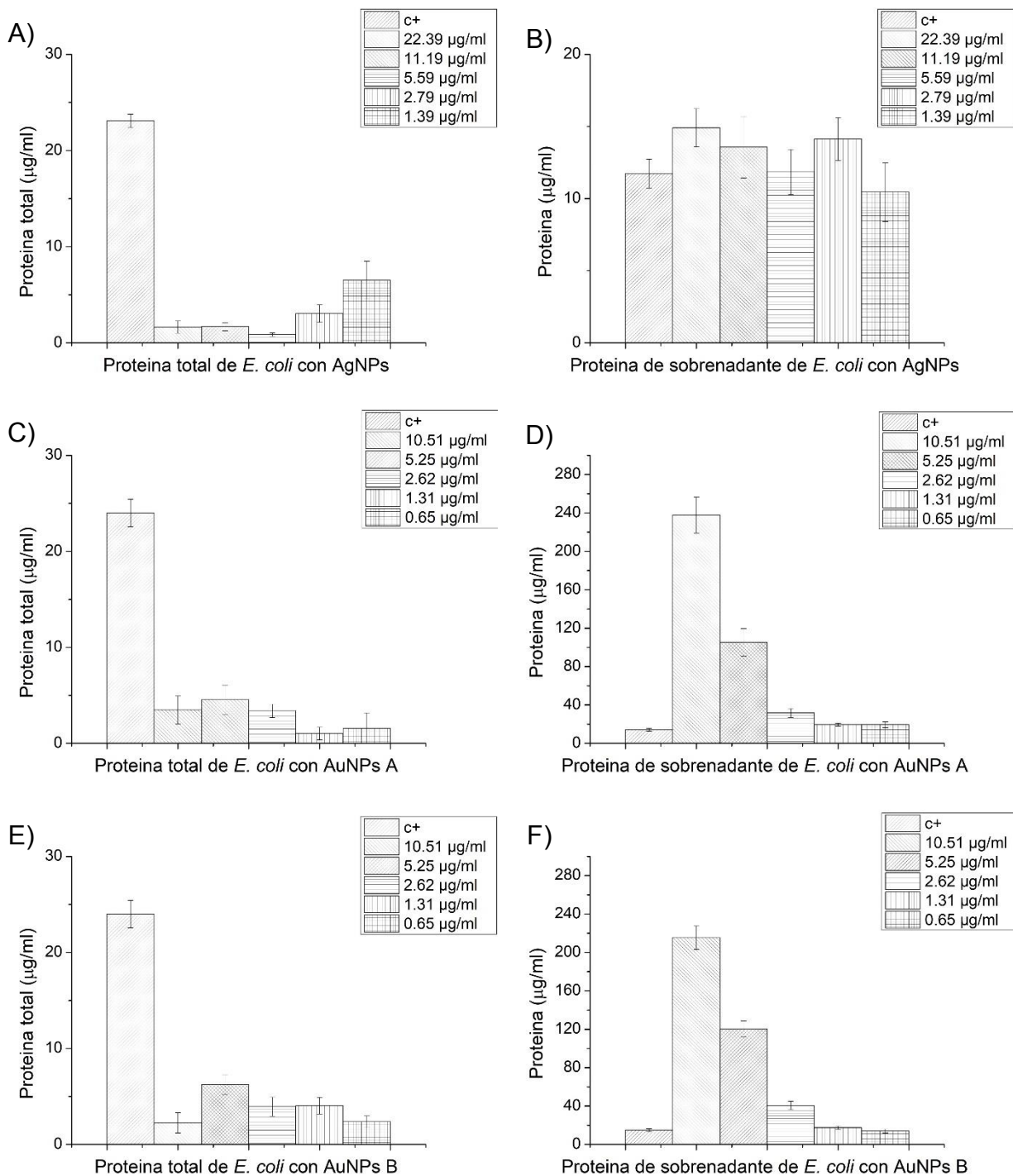


Figura 24. A) Cuantificación de proteína total de *E. coli* MC4100 en presencia de AgNPs; **B)** Cuantificación de proteína de sobrenadante de *E. coli* MC4100 en presencia de AgNPs; **C)** Cuantificación de proteína total de *E. coli* en presencia de AuNPs A; **D)** Cuantificación de proteína de sobrenadante de *E. coli* MC4100 en presencia de AuNPs A; **E)** Cuantificación de proteína total de *E. coli* MC4100 en presencia de AuNPs B; **F)** Cuantificación de proteína de sobrenadante de *E. coli* MC4100 en presencia de AuNPs B. Los ensayos se realizaron por triplicado. Gráficos realizados en Origin 8.6.

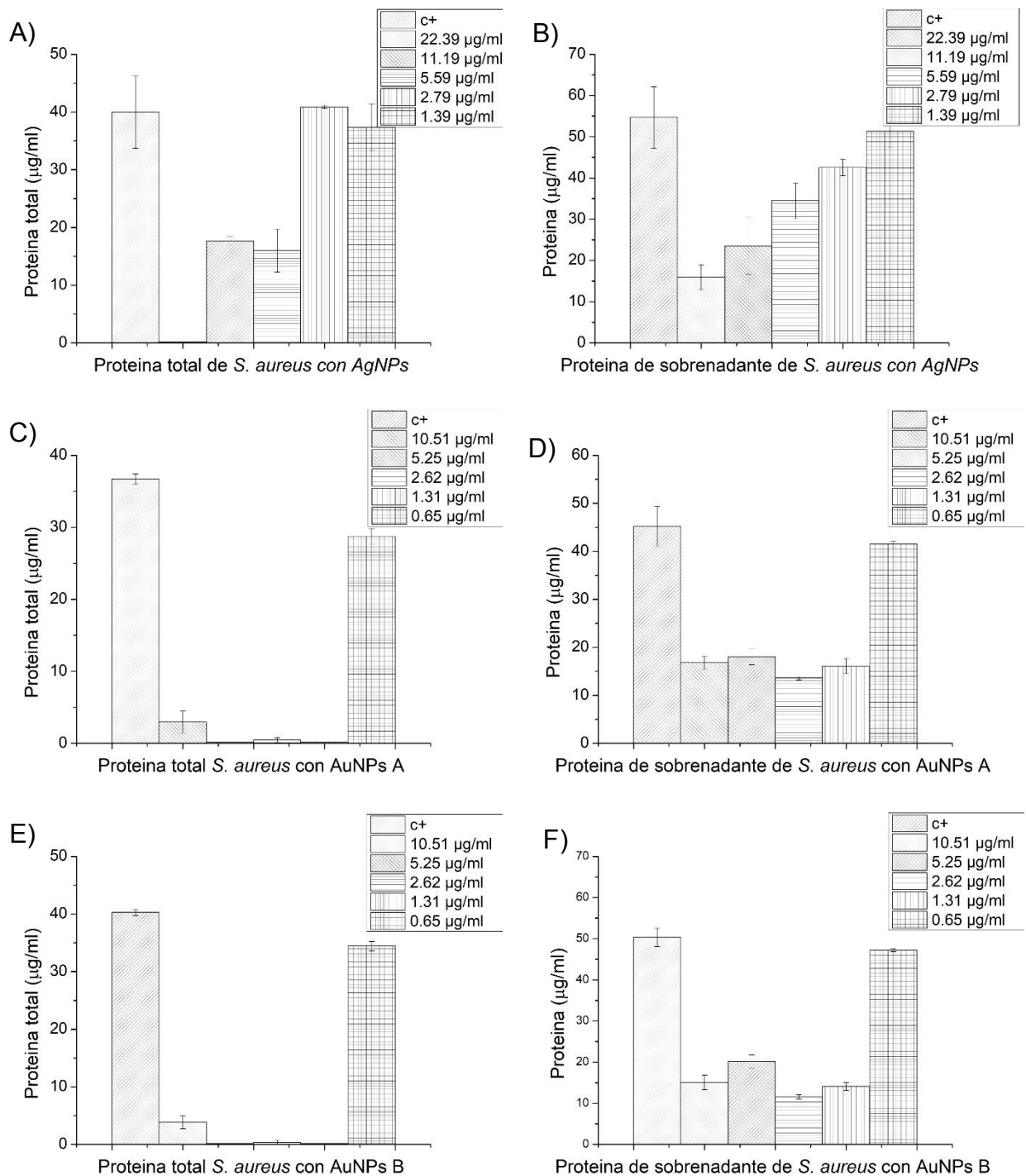


Figura 25. A) Cuantificación de proteína total de *S. aureus* L27 en presencia de AgNPs; **B)** Cuantificación de proteína de sobrenadante de *S. aureus* L27 en presencia de AgNPs; **C)** Cuantificación de proteína total de *S. aureus* L27 en presencia de AuNPs A; **D)** Cuantificación de proteína de sobrenadante de *S. aureus* L27 en presencia de AuNPs A; **E)** Cuantificación de proteína total de *S. aureus* L27 en presencia de AuNPs B; **F)** Cuantificación de proteína de sobrenadante de *S. aureus* L27 en presencia de AuNPs B. Los ensayos se realizaron por triplicado. Gráficos realizados en Origin 8.6.

8. Discusión

Para este trabajo se sintetizaron nanopartículas de plata y oro por métodos de reducción química, en cuanto a las nanopartícula de plata, las imágenes de TEM muestran una forma esférica con un diámetro promedio de 12 nm, un tamaño menor comparado con el de 44 nm obtenido por DLS. Algo similar ocurrió con las nanopartículas de oro, donde las imágenes de TEM mostraron un tamaño promedio de 14 nm y 28 nm para AuNPs A y AuNPs B respectivamente, mientras que con la técnica de DLS el tamaño determinado fue más pequeño, esta discrepancia puede deberse al movimiento browniano de las partículas en solución y al tipo de dispersante en el que las nanopartículas se encuentran suspendidas (Souza y cols., 2016). Aunque el resultado observado por TEM puede acercarse más a la realidad puesto que se observan directamente las partículas, el resultado dependerá en medida de la cantidad de campos y de nanopartículas que se cuenten para tratar de hacer un conteo significativo. Por otra parte, la técnica de DLS es útil cuando se trabaja con partículas en solución ya que se realiza el conteo a partir de una cantidad mayor de la muestra, lo que permite contar una cantidad mucho mayor de partículas a diferencia del TEM. Cabe mencionar que en trabajos previos se sintetizaron nanopartículas utilizando los mismos métodos de reducción química, obteniendo tamaños aproximados de 10-20 nm (RATYAKSHI y cols, 2009) y de 30 nm (Zhou y cols., 2012) para AgNPs y tamaños de 66 nm y 100 nm fueron reportados para la síntesis de AuNPs (Rodríguez-Fernández y cols., 2006). La distribución de tamaños se controla ajustando la temperatura, pH y la concentración de los precursores a utilizar (Gurunathan y cols., 2009).

Las concentraciones mínimas inhibitorias y mínimas bactericidas que determinamos en este trabajo contra *E. coli* fueron de 5.58 µg/ml para AgNPs, 10.48 µg/ml para AuNPs A y 10.48 µg/ml para AuNPs B y para *S. aureus* de 11.17 µg/ml para AgNPs, 1.31 µg/ml para AuNPs A y 5.24 µg/ml para AuNPs B. Siendo *S. aureus* menos susceptible a nanopartículas de plata que *E. coli*, estos resultados se correlacionan con aquellos reportados por Kim y cols (Kim y cols., 2011), donde observaron una mayor inhibición de *E. coli* que *S. aureus*, aunque su

CMI fueron más altas que las obtenidas en este trabajo. Resultados similares fueron obtenidos por Ruparella y cols. (Ruparella y cols., 2008), donde observaron una CMI menor contra *E. coli* que *S. aureus*, aunque fue dependiente de la cepa.

En el caso de nanopartículas de oro ambas muestras tuvieron la misma CMI, aunque esta fue mayor que la reportada por Cui y cols. (Cui y cols., 2012) Estos no reportaron el tamaño de las nanopartículas utilizadas. Zhou y cols. (Zhou y cols., 2012) reportaron una CMI de 0.1 µg/ml contra *E. coli*, siendo esta mucho menor que la reportada aquí, esto puede deberse al nivel de agregación de las partículas que depende de la concentración, agente estabilizante y el tamaño. Resultados muy diferentes pueden observarse contra *S. aureus*, donde partículas más pequeñas de AuNPs mostraron un mejor efecto bactericida, esto puede ser debido a que las partículas más pequeñas penetran la membrana celular más fácilmente, esto se relaciona con lo encontrado por Agnihotri y cols en 2014 donde compararon diferentes tamaños de nanopartículas contra *E. coli* y *S. aureus* y demostraron que partículas más pequeñas tienen mejor efecto antimicrobiano (Agnihotri y cols., 2014), otros trabajos de comparación de tamaño mostraron resultados similares (Ahmad y cols., 2013).

En la mayoría de los trabajos se ha reportado que tanto AgNPs como AuNPs tienen mejor efecto contra Gram negativos que contra Gram positivos, esto se atribuye al hecho de que las nanopartículas atraviesan con mayor facilidad la membrana de Gram negativos. Nosotros encontramos que las AuNPs no siguen este comportamiento, ya que se observó un mejor efecto inhibitorio contra *S. aureus* que *E. coli*, esto nos hace pensar que hay otros mecanismos importantes involucrados en el efecto antimicrobiano en AuNPs aparte de la penetración de la partícula.

La gran variabilidad de resultados observados en los trabajos antes mencionados, puede atribuirse al proceso de síntesis y tamaño de las nanopartículas, así como a las cepas utilizadas, por lo que es necesario seguir ampliando la base de datos de este tipo de estudios para poder dilucidar el tipo de nanopartícula y sus características que más convengan en el combate de microorganismos.

Como se mencionó anteriormente, el plasmón de superficie es una característica importante de nanopartículas metálicas, y ha sido utilizado para terapia foto térmica y otras aplicaciones en el área de física, en este trabajo se activaron las nanopartículas utilizando luz blanca, ya que ésta incluye todo el espectro visible, en el cual se encuentra el plasmón de superficie de las partículas. Encontramos que en general el efecto antimicrobiano se ve ligeramente aumentado comparado con nanopartículas no expuestas a la luz, esto se observó especialmente en nanopartículas de plata, donde la CMI disminuyó tanto para *E. coli* como para *S. aureus*. Actualmente hay pocas investigaciones donde se registre este efecto, Mocan y cols (Mocan y cols., 2014), demostraron un incremento en el efecto de AuNPs contra *S. aureus* después de ser foto activadas con luz láser en el rango de luz visible, por otra parte, Ismail y cols. (Ismail y cols., 2011) probaron una cubierta de azul de metileno con AuNPs, y la foto activaron con luz blanca demostrando un incremento en el efecto antimicrobiano. Es importante seguir investigando el efecto de la luz sobre la capacidad antimicrobiana de nanopartículas metálicas, ya que representan una alternativa sencilla y segura para potenciar el efecto de las NPs.

Se observó la envoltura celular de ambas cepas por medio de microscopía de fuerza atómica con AgNPs y AuNPs, Son pocos los trabajos en los que se ha utilizado AFM para determinar el daño a membrana por acción de NPs, aunque podemos citar el realizado por Ketchart y cols en 2012 (Ketchart y cols., 2012), ellos observaron la envoltura de *S. aureus* en presencia de AgNPs y reportaron la formación de rugosidades o pozos en la superficie celular. La mayoría de los trabajos observan esta interacción utilizando microscopía electrónica de transmisión, pues tiene una mejor resolución que el AFM. Salvioni y cols en 2017 (Salvioni y cols., 2017), observaron la acumulación de AgNPs y lisis celular por medio de TEM en *E. coli* y *S. aureus*. Alavi y col (Alavi y cols., 2017), observaron en *E. coli* un aumento en el tamaño de las células, así como lisis de la membrana con AgNPs. Aunque los estudios de AuNPs son más escasos, Ahmad y cols. en 2017 (A. Ahmad y cols., 2017), probaron estas nanopartículas contra *E. coli* y *B. subtilis* y por medio de imágenes de TEM demostraron la alteración y daño de la

envoltura de ambos géneros. En nuestro trabajo encontramos que las nanopartículas de plata sobre *E. coli* ocasionan que la célula se redondee, así como rugosidad sobre la superficie y agrandamiento de las células. En el caso de *S. aureus* tanto para AgNPs como AuNPs, se observó la formación de rugosidades y pliegues en la envoltura y ya no se observa la capsula a diferencia del control positivo. Aunque no se observa una evidente lisis o salida de material citoplasmático, sabemos por los ensayos previos que no hay viabilidad celular.

Observamos que las proteínas totales de *S. aureus*, disminuyen con las concentraciones más altas de nanopartículas, especialmente en presencia de AuNPs lo que concuerda con el hecho de que tienen mejor actividad contra esta cepa. En el caso de las proteínas obtenidas del sobrenadante también disminuyen en comparación al control, esto puede deberse al hecho de que las proteínas o su síntesis se ven afectadas por las NPs, y al no haber una lisis completa de la membrana celular tampoco hay salida de estas al medio. Estos resultados de proteína en el sobrenadante no coinciden con los reportados por Yuan y cols. (Yuan y cols., 2017), donde *S. aureus* en contacto con AgNPs producían una liberación mayor de proteínas al medio en comparación al control, esto atribuido a la lisis celular, aunque no presentan micrografías relacionadas a este daño.

Para el caso de *E. coli* observamos nuevamente que la cantidad de proteínas totales se ve disminuida a concentraciones altas tanto de AgNPs como AuNPs, aunque a diferencia de *S. aureus* se ve un aumento en la cantidad de proteínas en el sobrenadante en comparación con el control, esto se relaciona mejor con lo reportado por Yuan y cols (Yuan y cols., 2017), así como por Kim y cols. (Feng y cols., 2000), donde la cantidad de proteína en comparación al control era mayor, esto puede deberse a que en las micrografías de AFM de *E. coli* se observa una mayor lisis celular que en *S. aureus*.

En este trabajo también se sintetizaron esferas de SiO₂ y se comprobó su efecto contra *E. coli* y *S. aureus* así como la síntesis de una película utilizando estas esferas, como posible candidato para la formación de una matriz SiO₂-Ag y SiO₂-Au que mantenga un efecto bactericida. Se probaron concentraciones muy

elevadas de SiO₂ comparadas con las usadas de AgNPs y AuNPs y no hubo daño contra los microorganismos, ni tampoco alteraron el efecto de las nanopartículas al ser utilizadas juntas en solución, por lo que pueden ser utilizadas como matrices para insertar AgNPs y AuNPs y ampliar las posibles aplicaciones de estas nanopartículas.

9. Conclusiones

- Las nanopartículas de plata de un tamaño promedio de 12 nm presentaron mejor actividad bactericida contra *E. coli* que contra *S. aureus*. Esta actividad bactericida se ve potenciada por el efecto de la luz visible.
- Las nanopartículas de oro tuvieron mejor actividad bactericida contra *S. aureus* que contra *E. coli*. Esta actividad bactericida se ve potenciada por el efecto de la luz visible.
- Las nanopartículas de oro de menor tamaño presentaron mejor actividad bactericida contra *S. aureus* que las de mayor tamaño.
- Las nanopartículas metálicas de plata y oro afectan la envoltura celular, alterando su forma, su permeabilidad y su grado de lisis.
- Las nanopartículas metálicas de Ag y Au afectan la producción de proteínas de ambas especies.
- La actividad bactericida de las nanopartículas metálicas de Ag y Au no se ve afectada por la combinación con microesferas de SiO₂ en solución.

10. Perspectivas

Como perspectivas para este trabajo es necesario profundizar más en el efecto de la luz sobre las nanopartículas y el consecuente aumento en su eficiencia como agente bactericida, comparando los resultados obtenidos con una foto activación por luz láser a la longitud de onda exacta del plasmón de superficie de las nanopartículas.

También es necesario realizar la síntesis de las capas de $\text{SiO}_2\text{-Ag}$ y $\text{SiO}_2\text{-Au}$ y probar su efecto antimicrobiano para determinar si este se ve afectado por la movilización de las nanopartículas sobre la matriz de SiO_2 y si es factible el uso de este sistema para aplicaciones médicas, industriales, etc.

11. Bibliografía

- Agnihotri, S., Mukherji, S., & Mukherji, S. (2014). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Adv.*, 4(8), 3974–3983. <https://doi.org/10.1039/C3RA44507K>
- Ahmad, A., Wei, Y., Ullah, S., Shah, S. I., Nasir, F., Shah, A., ... Yuan, Q. (2017). Synthesis of phytochemicals-stabilized gold nanoparticles and their biological activities against bacteria and Leishmania. *Microbial Pathogenesis*, 110, 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.07.009>
- Ahmad, T., Wani, I. A., Lone, I. H., Ganguly, A., Manzoor, N., Ahmad, A., ... Al-Shihri, A. S. (2013). Antifungal activity of gold nanoparticles prepared by solvothermal method. *Materials Research Bulletin*, 48(1), 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2012.09.069>
- Alavi, M., & Karimi, N. (2017). Characterization, antibacterial, total antioxidant, scavenging, reducing power and ion chelating activities of green synthesized silver, copper and titanium dioxide nanoparticles using Artemisia haussknechtii leaf extract. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 0(0), 1–16. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1408121>
- AshaRani, P. V., Mun, G. L. K., Hande, M. P., & Valiyaveetil, S. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*, 3(2), 279–290. <https://doi.org/10.1021/nn800596w>
- Astratov, V. N., Bogomolov, V. N., Kaplyanskii, A. A., Prokofiev, A. V., Samoilovich, L. A., Samoilovich, S. M., & Vlasov, Y. A. (1995). Optical spectroscopy of opal matrices with CdS embedded in its pores: Quantum confinement and photonic band gap effects. *Il Nuovo Cimento D*, 17(11–12), 1349–1354. <https://doi.org/10.1007/BF02457208>
- Bozzola, A., Perotto, S., & De Angelis, F. (2017). Hybrid plasmonic–photonic whispering gallery mode resonators for sensing: a critical review. *The Analyst*, 142(6), 883–898. <https://doi.org/10.1039/C6AN02693A>
- Brooks, Geo. F., Brooks, G. F., Butel, J. S., Carroll, K. C., Mietzner, T. A., & Morse, S. A. (2011). 'Jawetz, Melnick y Adelberg'" *Microbiología médica. Capítulo 13: Staphylococcus*". <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Charlebois, E. D., Bangsberg, D. R., Moss, N. J., Moore, M. R., Moss, A. R., Chambers, H. F., & Perdreau-Remington, F. (2002). Population-based community prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in the urban poor of San Francisco. *Clinical Infectious Diseases*, 34(4), 425–433. <https://doi.org/doi:10.1086/338069>
- Chaudhuri, R. G., & Paria, S. (2012). Core / Shell Nanoparticles: Classes , Properties , Synthesis Mechanisms , Characterization , and Applications,

2373–2433.

- Control Disease Center. (2016). General Information About MRSA in Healthcare Settings. Retrieved from <https://www.cdc.gov/mrsa/healthcare/index.html>
- Croxen, M. A., & Finlay, B. B. (2012). Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), 141–141. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2953>
- Cruz, R. A. L. (2013). *Modelacion teorica de opalos inversos con inclusiones metalicas y su comparacion experimental*. Benemerita Universidad Autonoma de Puebla.
- Cui, Y., Zhao, Y., Tian, Y., Zhang, W., Lü, X., & Jiang, X. (2012). The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on Escherichia coli. *Biomaterials*, 33(7), 2327–2333. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.057>
- Daniel, M. C. M., & Astruc, D. (2004). Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size Related Properties and Applications toward Biology, Catalysis and Nanotechnology. *Chemical Reviews*, 104, 293–346. <https://doi.org/10.1021/cr030698>
- Dykman, L., & Khlebtsov, N. (2012). Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. *Chem. Soc. Rev.*, 41(6), 2256–2282. <https://doi.org/10.1039/C1CS15166E>
- El-Sayed, M. A. (2001). Some Interesting Properties of Metals Confined in Time and Nanometer Space of Different Shapes. *Accounts of Chemical Research*, 34(4), 257–264. <https://doi.org/10.1021/ar960016n>
- Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., & Kim, J. O. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52(4), 662–668. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20001215\)52:4<662::AID-JBM10>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20001215)52:4<662::AID-JBM10>3.0.CO;2-3)
- Flores, J. I. P. (2014). *Estudio de la humectabilidad de películas de TiO₂-Fe₂O₃ soportadas en opalos de SiO₂: Efecto de la concentración de Fe₂O₃ y radiación UV*. Benemerita Universidad Autonoma de Puebla.
- Frazer, B. W., Salz, T. O., Lambert, L., & Perdreau-Remington, F. (2005). Fatal community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus pneumonia in an immunocompetent young adult. *Annals of Emergency Medicine*, 46(5), 401–404. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2005.05.023>
- Friedmann, H. C. (2006). Escherich and Escherichia. *Advances in Applied Microbiology*, 60, 133–196. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(06\)60005-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(06)60005-1)
- Gurunathan, S., Kalishwaralal, K., Vaidyanathan, R., Venkataraman, D., Pandian, S. R. K., Muniyandi, J., ... Eom, S. H. (2009). Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using Escherichia coli. *Colloids and*

- Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Akbar Ashkarran, A., Jimenez de Aberasturi, D., Larramendi, I. R. de, Rojo, T., ... Mahmoudi, M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 30(10), 499–511. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.06.004>
- Hao, H., Dai, M., Wang, Y., Huang, L., & Yuan, Z. (2012). Key genetic elements and regulation systems in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiology*, 7(11), 1315–1329. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.107>
- Instruments, M. (2017). Dynamic Light Scattering (DLS). Retrieved July 29, 2017, from <https://www.malvern.com/en/products/technology/dynamic-light-scattering>
- Iowa, U. of. (2017). Transmission electron microscopy. Retrieved September 29, 2017, from <https://cmrf.research.uiowa.edu/transmission-electron-microscopy>
- Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V., & Zolfaghari, B. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: Chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences*.
- Ismail, S., Perni, S., Pratten, J., Parkin, I., & Wilson, M. (2011). Efficacy of a Novel Light-Activated Antimicrobial Coating for Disinfecting Hospital Surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 32(11), 1130–1132. <https://doi.org/10.1086/662377>
- John Turkevich, P. C. S. and J. H. (1951). a Study of the Nucleation and Growth Processes I N the Synthesis of Colloidal Gold, 55(c), 55–75.
- Jorgensen, J. H., Pfaller, M. A., Carroll, K. C., Landry, M. L., Funke, G., Richter, S. S., & Warnock, D. W. (2015). *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555816728>
- Juan, L., Zhimin, Z., Anchun, M., Lei, L., & Jingchao, Z. (2010). Deposition of silver nanoparticles on titanium surface for antibacterial effect. *International Journal of Nanomedicine*, 5(1), 261–267. <https://doi.org/10.2147/IJN.S8810>
- Ketchart, O., Treetong, A., Na-Ubon, P., & Supaka, N. (2012). Determination the Effect of Silver Nanoparticles on Gram-Positive Bacterial Cells by Atomic Force Microscopy. *Advanced Materials Research*, 506(614), 202–205. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.506.202>
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J., ... Cho, M. H. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3(1), 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>
- Kim, S. H., Lee, H. S., Ryu, D. S., Choi, S. J., & Lee, D. S. (2011). Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(1), 77–85. <https://doi.org/10.5897/AJMR2016.7908>

- Low, W. L., Martin, C., Hill, D. J., & Kenward, M. A. (2011). Antimicrobial efficacy of silver ions in combination with tea tree oil against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37(2), 162–165. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.10.015>
- McNeil, S. E. (2005). Nanotechnology for the biologist. *Journal of Leukocyte Biology*, 78(3), 585–594. <https://doi.org/10.1189/jlb.0205074>
- Mocan, L., Ilie, I., Matea, C., Tabaran, F., Kalman, E., Iancu, C., & Mocan, T. (2014). Surface plasmon resonance-induced photoactivation of gold nanoparticles as bactericidal agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Nanomedicine*, 9(1), 1453–1461. <https://doi.org/10.2147/IJN.S54950>
- Mohamed, M. M., Fouad, S. A., Elshoky, H. A., Mohammed, G. M., & Salaheldin, T. A. (2017). Antibacterial effect of gold nanoparticles against *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 5(1), 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.02.003>
- Morell, E. A., & Balkin, D. M. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A pervasive pathogen highlights the need for new antimicrobial development. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 83(4), 223–233.
- Ojovan, M. I. (2004). Glass formation in amorphous SiO₂ as a percolation phase transition in a system of network defects. *Journal of Experimental and Theoretical Physics Letters*, 79(12), 632–634. <https://doi.org/10.1134/1.1790021>
- OMS. (2015). Resistencia a los antimicrobianos. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- Oopmann, D. K., Ag, B., & Republic, F. (1975). Selenium and selenium compounds. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man*, 9(112945), 245–260. <https://doi.org/10.1002/14356007.a23>
- Rammelkamp, C. H., & Maxon, T. (1942). Resistance of *Staphylococcus aureus* to the Action of Penicillin. *Experimental Biology and Medicine*, 51(3), 386–389. <https://doi.org/10.3181/00379727-51-13986>
- Ratyakshi and R.P. CHAUHAN. (2009). Colloidal Synthesis of Silver Nano Particles. *Asian Journal of Chemistry*, 21(10), 113–116.
- Rodríguez-Fernández, J., Pérez-Juste, J., García De Abajo, F. J., & Liz-Marzán, L. M. (2006). Seeded growth of submicron Au colloids with quadrupole plasmon resonance modes. *Langmuir*, 22(16), 7007–7010. <https://doi.org/10.1021/la060990n>
- Rosenbach, F. J. (1884). Mikroorganismen bei den Wundinfektionskrankheiten des Menschen, 1–122.

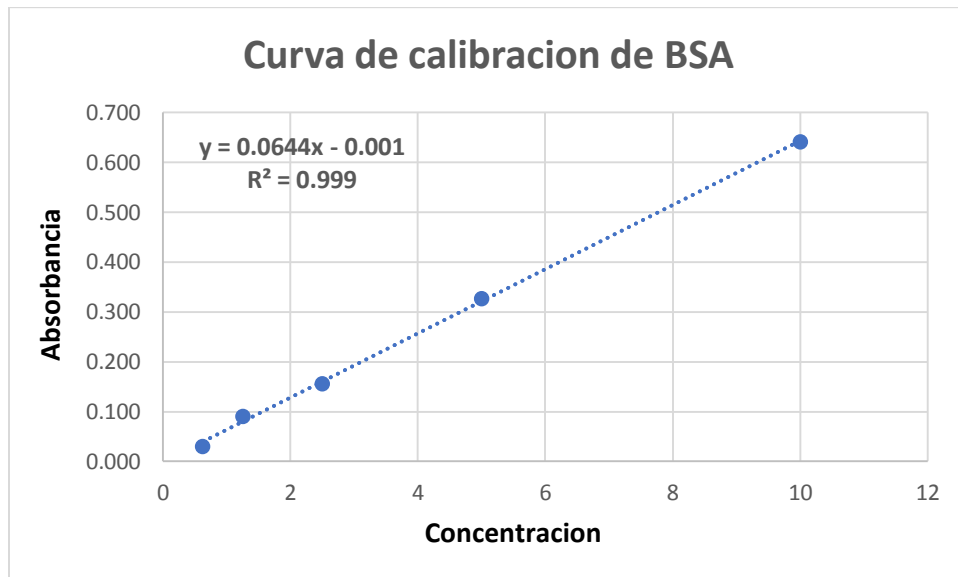
- Ruparelia, J. P., Kumar, A., & Duttagupta, S. P. (2008). Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles, *4*, 707–716. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.11.006>
- Salvioni, L., Galbiati, E., Collico, V., Alessio, G., Avvakumova, S., Corsi, F., ... Colombo, M. (2017). Negatively charged silver nanoparticles with potent antibacterial activity and reduced toxicity for pharmaceutical preparations. *International Journal of Nanomedicine*, *12*, 2517–2530. <https://doi.org/10.2147/IJN.S127799>
- Sanders, J. V. (1964). Colour of Precious Opal. *Nature*, *204*(4964), 1151–1153. <https://doi.org/10.1038/2041151a0>
- Seil, J. T., & Webster, T. J. (2012). Antimicrobial applications of nanotechnology: Methods and literature. *International Journal of Nanomedicine*, *7*, 2767–2781. <https://doi.org/10.2147/IJN.S24805>
- Shamaila, S., Zafar, N., Riaz, S., Sharif, R., Nazir, J., & Naseem, S. (2016). Gold Nanoparticles: An Efficient Antimicrobial Agent against Enteric Bacterial Human Pathogen. *Nanomaterials*, *6*(4), 71. <https://doi.org/10.3390/nano6040071>
- Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P., & Dash, D. (2007). Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, *18*(22), 225103. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/22/225103>
- Souza, T. G. F., Ciminelli, V. S. T., & Mohallem, N. D. S. (2016). A comparison of TEM and DLS methods to characterize size distribution of ceramic nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series*, *733*(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/733/1/012039>
- Stefan A. Maier. (2007). *Plasmonics: Fundamentals and Applications*. Boston, MA: Springer US. <https://doi.org/10.1007/0-387-37825-1>
- Stenstrom, R., Grafstein, E., Romney, M., Fahimi, J., Harris, D., Hunte, G., ... Christenson, J. (2009). Prevalence of and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infection in a Canadian emergency department. *CJEM: Canadian Journal of Emergency Medical Care = JCMU: Journal Canadien de Soins Médicaux D'urgence*, *11*(5), 430–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19788787>
- Stöber, W., Fink, A., & Bohn, E. (1968). Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science*, *26*(1), 62–69. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(68\)90272-5](https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5)
- Stryjewski, M. E., & Corey, G. R. (2014). Methicillin-resistant *staphylococcus aureus*: An evolving pathogen. *Clinical Infectious Diseases*, *58*(SUPPL. 1), 10–19. <https://doi.org/10.1093/cid/cit613>
- The Clinical and Laboratory Standards Institute. (2016). *Performance Standards*

for *Antimicrobial Susceptibility Testing CLSI supplement M100S*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

- Wilson, L. G. (1987). The early recognition of streptococci as causes of disease. *Medical History*, 31(4), 403–414. <https://doi.org/10.1017/S0025727300047268>
- Yuan, Y. G., Peng, Q. L., & Gurunathan, S. (2017). Effects of silver nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from mastitis-infected goats: An alternative approach for antimicrobial therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3). <https://doi.org/10.3390/ijms18030569>
- Zhang, Y., Shareena Dasari, T. P., Deng, H., & Yu, H. (2015). Antimicrobial Activity of Gold Nanoparticles and Ionic Gold. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 33(3), 286–327. <https://doi.org/10.1080/10590501.2015.1055161>
- Zhou, G., & Wang, W. (2012). Synthesis of silver nanoparticles and their antiproliferation against human lung cancer cells in vitro. *Oriental Journal of Chemistry*, 28(2), 651–655. <https://doi.org/10.13005/ojc/280204>
- Zhou, Y., Kong, Y., Kundu, S., Cirillo, J. D., & Liang, H. (2012). Antibacterial activities of gold and silver nanoparticles against *Escherichia coli* and *Bacillus Calmette-Guérin*. *Journal of Nanobiotechnology*, 10(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-10-19>

12. Anexos

Curva de calibración de BSA



Concentración	Absorbancia
----------------------	--------------------

0.625 µg/ml	0.030
1.25 µg/ml	0.090
2.5 µg/ml	0.156
5 µg/ml	0.326
10 µg/ml	0.641