

**ESTUDIO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE NANOPARTÍCULAS DE
PLATA SOBRE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus***

DAISSY JULIETH PAREDES GUERRERO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2011

**ESTUDIO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE NANOPARTÍCULAS DE
PLATA SOBRE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus***

DAISSY JULIETH PAREDES GUERRERO

**Trabajo de grado presentado como requisito para obtener el título de
QUÍMICO**

DIRECTOR

RODRIGO TORRES SÁEZ, Ph.D.

Escuela de Química

CODIRECTOR

CLAUDIA ORTIZ LÓPEZ, Ph.D.

Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2011

DEDICATORIA

A Dios Padre todopoderoso por iluminar mi camino cada día y permitirme haber alcanzado este logro.

A mis padres Alfonso y Rubiela, a quienes debo todo lo que soy, por quienes gracias a su lucha y esfuerzo constantes estoy donde estoy y quienes son mi motor para seguir creciendo como persona y como profesional.

A mi hermana Jazmin, quien representa mi mayor orgullo, mi fortaleza y ser esa persona incondicional con la que siempre puedo contar.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su apoyo absoluto y voz de aliento cuando creí no ser capaz de continuar, por respaldarme al tomar mis decisiones, por sus constantes enseñanzas de vida y por motivarme para ser cada día mejor.

A la Universidad Industrial de Santander, por su educación de alta calidad, a todos aquellos profesores de la Escuela de Química que hicieron parte de mi formación profesional como Química. Especialmente al Dr. Rodrigo Torres Sáez y la Dra. Claudia Ortiz López por su dirección, orientación, contribuciones y gran paciencia durante el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros del Grupo de Investigación de Bioquímica y Microbiología por su apoyo y porque de una u otra manera aportaron sugerencias que ayudaron a la solución de inconvenientes en la realización de esta investigación.

A mis amigos, por tantos momentos compartidos, buenos y malos que me permitieron disfrutar de esta etapa de mi vida. En especial a mi gran amiga Marilyn, quien siempre me brindó su apoyo y su más sincera amistad desde el inicio de mi carrera.

A Diego Armando, por su colaboración, por no dejarme cansar ni vencer, por su permanente comprensión y tolerancia, y su gran amor que siempre me ha dado felicidad y tranquilidad cuando más lo he necesitado.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	15
1. MARCO DE REFERENCIA	17
1.1 NANOTECNOLOGÍA	17
1.2 NANOPARTÍCULAS DE PLATA	18
1.3 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA	20
1.4 PROPIEDADES DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA	23
1.4.1 Ópticas y físicas	23
1.4.2 Propiedades antibacterianas	24
1.5 MICROORGANISMOS ESTUDIADOS	26
1.5.1 <i>Escherichia coli</i> O157:H7.	26
1.5.2 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (SARM).	27
3. OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVO GENERAL	29
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	29
4. MATERIALES Y MÉTODOS	30
4.1 REACTIVOS	30
4.2 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA	30
4.2.1 Síntesis empleando cisteína	31
4.2.2 Síntesis empleando citrato de Sodio	32
4.2.3 Síntesis empleando hidracina	32
4.3 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN	32
4.3.1 Espectrometría UV-VIS	32
4.3.2 Microscopía electrónica de transmisión	33
4.3.3 Dispersión de luz en modo dinámico	33
4.3.4 Potencial Zeta	33
4.4 DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE LAS NANOPARTÍCULAS	34

4.4.1 Determinación de Concentración mínima inhibitoria (CMI)	34
4.4.1.1 Método en caldo	34
4.4.1.2 Método de difusión de disco	34
4.4.2 Determinación de Concentración mínima bactericida (CMB)	35
4.5 DETERMINACIÓN DEL EFECTO SINÉRGICO CON ANTIBIÓTICOS	35
4.5.1 Diseño experimental de Plackett-Burman	36
4.5.2 Optimización del diseño	36
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	38
5.1 SÍNTESIS de AgNPs	38
5.1.1 AgNPs	38
5.1.2 AgNPs empleando citrato de Sodio	40
5.1.3 AgNPs empleando hidracina	43
5.2 CARACTERIZACIÓN DE AgNPs	45
5.2.1 Espectrofotometría UV-VIS	45
5.2.2 Microscopía de transmisión electrónica	48
5.2.3 Dispersión de luz en modo dinámico	50
5.2.4 Potencial Z	51
5.3 PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS	53
5.3.1 Determinación de CMI y CMB contra <i>Escherichia coli</i> O157:H7	53
5.3.2 Determinación de CMI y CMB contra <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a Meticilina (SARM).	58
5.4 ANÁLISIS DEL EFECTO SINÉRGICO DE AGNPS CON ANTIBIÓTICOS	64
5.4.1 Diseño experimental de Plackett-Burman	64
5.4.2 Optimización del diseño	68
6. CONCLUSIONES	72
7. RECOMENDACIONES	74
BIBLIOGRAFIA	75
ANEXOS	88

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Diferentes formas de AgNPs dependiente de la concentración de CTAB en la síntesis (García-Barrasa <i>et al.</i> , 2011).	18
Figura 2 Mecanismo de formación de AgNPs por medio de reducción química (García-Barrasa <i>et al.</i> , 2011).	21
Figura 3 Procedimiento general para la obtención de las AgNPs.	31
Figura 4 Mecanismo propuesto para la formación de AgNPs empleando cisteína como agente reductor.	39
Figura 5 AgNPs sintetizadas empleando cisteína a diferentes velocidades de agitación a) 200 rpm b) 400 rpm c) 800 rpm, y con d) Ultrasonido a 37KHz.	40
Figura 6 Mecanismo propuesto para la formación de AgNPs empleando aniones citrato como agente reductor.	41
Figura 7 AgNPs sintetizadas empleando citrato a diferentes velocidades de agitación: a) 200 rpm b) 400 rpm c) 800 rpm, y con d) Ultrasonido a 37KHz.	42
Figura 8 Mecanismo propuesto para la formación de AgNPs empleando hidracina como agente reductor.	43
Figura 9 AgNPs sintetizadas empleando hidracina a diferentes velocidades de agitación a) 200 rpm b) 400 rpm c) 800 rpm, y con d) Ultrasonido a 37KHz.	44
Figura 10 Espectro de absorción de las AgNPs empleando Cisteína a diferentes velocidades de agitación a) 200 rpm b) 400 rpm c) 800 rpm d) Ultrasonido a 37KHz.	46
Figura 11 Espectro de absorción de las AgNPs empleando aniones citrato a diferentes velocidades de agitación a) 200 rpm b) 400 rpm c) 800 rpm y con d) Ultrasonido a 37KHz.	47
Figura 12 Espectro de absorción de las AgNPs empleando hidracina a diferentes velocidades de agitación a) 200 rpm b) 400 rpm c) 800 rpm y con d) Ultrasonido a 37KHz.	48

Figura 13 TEM de AgNPs sintetizadas empleando cisteína como agente reductor. a) Bajo agitación de 200 rpm a 2h. b) Bajo agitación de 800 rpm a 4h. c) Bajo ultrasonido a 37KHz durante 1h.	49
Figura 14 TEM de AgNPs sintetizadas empleando diferentes agentes reductores. a) Agente reductor hidracina b) Agente reductor iones citrato.	49
Figura 15 DLS de AgNPs sintetizadas empleando diferentes agentes reductores. a) Agente reductor cisteína. b) Agente reductor iones citrato. c) Agente reductor hidracina.	50
Figura 16 Potencial Zeta de AgNPs sintetizadas empleando diferentes agentes reductores. a) Cisteína b) Iones citrato c) Hidracina.	52
Figura 17 Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7 en presencia de AgNPs a) Sintetizadas con cisteína b) Sintetizadas con citrato c) Sintetizadas con hidracina.	54
Figura 18 Efecto de inhibición de <i>E. coli</i> O157:H7 cultivada en medio Muller-Hilton (MH), utilizando AgNPs sintetizadas con diferentes agentes reductores a) Cisteína b) Iones citrato c) Hidracina.	57
Figura 19 Cinética de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a Meticilina (SARM) en presencia de AgNPs a) Sintetizadas con cisteína b) Sintetizadas con citrato c) Sintetizadas con hidracina.	59
Figura 20 Efecto de inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (SARM) cultivada en medio Muller-Hilton (MH), utilizando AgNPs sintetizadas con diferentes agentes reductores a) Cisteína b) Iones citrato c) Hidracina.	62

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Compilación de trabajos recientes sobre la actividad antibacteriana de AgNPs.	26
Tabla 2 Convenciones empleadas para cada tipo de AgNPs sintetizadas.	38
Tabla 3 Tamaños promedio de AgNPs sintetizadas empleando diferentes agentes reductores.	51
Tabla 4 Carga superficial de AgNPs sintetizadas empleando diferentes agentes reductores.	53
Tabla 5 Resultados obtenidos de CMI y CMB de las AgNPs sintetizadas contra <i>E. coli</i> O157:H7 (ver convenciones tabla 2).	55
Tabla 6 Efecto de inhibición de <i>E. coli</i> O157:H7 en presencia de las AgNPs sintetizadas por el método de difusión de disco.	58
Tabla 7 Resultados obtenidos de CMI y CMB de las AgNPs sintetizadas cisteína contra <i>S. aureus</i> resistente a meticilina.	61
Tabla 8 Diámetros de inhibición de <i>S. aureus</i> resistente a meticilina en presencia de las AgNPs sintetizadas por el método de difusión de disco.	62
Tabla 9 Nomenclatura implementada para las AgNPs seleccionadas en el diseño experimental de Plackett-Burman.	64
Tabla 10 Porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano en los doce experimentos frente <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> .	65
Tabla 11 Resultados del análisis estadístico del efecto de AgNPs y diferentes antibióticos sobre el porcentaje de inhibición contra <i>E. coli</i> O157:H7.	66
Tabla 12 Resultados del análisis estadístico del efecto de AgNPs y diferentes antibióticos sobre el porcentaje de inhibición contra <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina.	67
Tabla 13 Resultados de la variable respuesta aplicada a las dos cepas de interés en los experimentos de optimización.	68

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A CÁLCULO DE PORCENTAJE DE INHIBICIÓN BACTERIANA	89
ANEXO B ECUACIONES UTILIZADAS PARA LA EVALUACIÓN DEL EFECTO SINÉRGICO ENTRE AgNPs Y ANTIBIÓTICOS DE ACUERDO CON EL MÉTODO PLACKETT-BURMAN	90
ANEXO C NIVELES Y MATRICES EMPLEADOS EN EL DISEÑO EXPERIMENTAL DE PLACKETT-BURMAN	93
ANEXO D NIVELES Y MATRICES SELECCIONADOS EN LA OPTIMIZACIÓN DEL DISEÑO CENTRADO EN LAS CARAS COMPUESTO (CCD)	95
ANEXO E SUPERFICIES DE RESPUESTA DE CADA DOS VARIABLES CON RESPECTO AL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN PARA CADA CEPA PATÓGENA	98

RESUMEN

TITULO: ESTUDIO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus**

AUTOR: PAREDES GUERRERO Daissy Julieth**

PALABRAS CLAVE: Concentración Mínima Inhibitoria, Nanopartículas de plata (AgNPs), Actividad Antibacteriana.

DESCRIPCION

En esta tesis se realizó la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) por reducción química empleando tres tipos de agentes reductores: cisteína, aniones citrato e hidracina. Las AgNPs se caracterizaron mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM), dispersión de luz en modo dinámico (DLS), espectrofotometría UV-VIS y por medición de potencial zeta. Las AgNPs sintetizadas fueron en general esféricas, con tamaños en torno a 50 nm y con carga neta cero. Posteriormente, se determinó la actividad antimicrobiana *in vitro* de las AgNPs sobre *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a Metilicina (SARM) por medio del método de microdilución y difusión de disco, determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) de las AgNPs sintetizadas.

Adicionalmente, se evaluó el efecto sinérgico entre las AgNPs sintetizadas y cuatro antibióticos con diferentes mecanismos de acción antimicrobiana: Ampicilina, Kanamicina, Eritromicina y Ofloxacina, utilizando para ello un diseño experimental de Plackett-Burman. Las AgNPs sintetizadas exhibieron tanto actividad bacteriostática como bactericida frente a las cepas patógenas estudiadas, alcanzando valores de CMI y CMB de 0,25 y 1 µg/mL, respectivamente. Por otro lado, el uso combinado de AgNPs con los antibióticos kanamicina y eritromicina mostró un efecto antimicrobiano sinérgico sobre *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* resistente a medicina.

Estos resultados demuestran el potencial de las AgNPs sintetizadas por reducción química como agentes antibacterianos contra bacterias patógenas *in vitro* y el sinergismo que puede ser logrado cuando son usadas como compuestos antimicrobianos con antibióticos de amplio espectro contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

* Proyecto de grado

** Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Rodrigo Torres Sáez. Facultad de Salud. Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Codirectora: Claudia Ortiz López.

ABSTRACT

TITLE: STUDY OF THE ANTIBACTERIAL EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES ON *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus**

AUTHOR: PAREDES GUERRERO Daissy**

Keywords: Minimum Inhibitory concentration, Silver Nanoparticles (AgNPs), Antibacterial Activity.

DESCRIPTION

In this thesis, silver nanoparticles synthesis (AgNPs) was carried out by chemical reduction using three different types of reducing agents: cysteine, citrate anions and hydrazine. AgNPs were characterized by transmission electron microscopy (TEM) dynamic light scattering (DLS), UV-Vis spectrophotometry and by Zeta potential measurements.

Synthesized AgNPs were in general spherical, with sizes around 50 nm and with zero net charge. Subsequently, *in vitro* antimicrobial activity of AgNPs was determined on *Escherichia coli* O157:H7 and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by using of micro dilution and disc diffusion methods, determining minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericide concentration (MBC) of synthesized AgNPs.

Additionally, synergic effect among AgNPs and four antibiotics with different mechanisms of antimicrobial action: ampicillin, kanamycin, erythromycin and ofloxacin, using for this aim a Plackett-Burman experimental design. Synthesized AgNPs exhibited both bacteriostatic and bactericide activity against pathogenic strains studied, showing its great potential as antibacterial agents, and achieving CMI and CMB values of 0.25 and 1 µg/mL, respectively. Finally, combined use of AgNPs and antibiotics kanamycin and erythromycin showed a synergic antimicrobial effect against *E.coli* O157:H7 and methicillin resistant *S.aureus*.

These results demonstrate the potential of AgNPs synthesized by chemical reduction as *in vitro* antibacterial agents against pathogenic bacteria, and synergism that can be obtained when they are used as antimicrobial compounds with broad-spectrum antibiotics against both Gram-positive and Gram-negative bacteria.

* Project Grade

** Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Rodrigo Torres Sáez. Facultad de Salud. Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Codirectora: Claudia Ortiz López

INTRODUCCION

La nanotecnología ha tenido un amplio desarrollo en las últimas décadas en la físico-química y sus áreas afines. Es por ello que han surgido numerosas formas de obtención de nanomateriales con fines y aplicaciones en diversos campos, lo cual ha sido posible gracias al descubrimiento de que las propiedades fisicoquímicas de los materiales cambian drásticamente a medida que su tamaño se reduce hasta la escala nano. Entre los nanomateriales obtenidos, se destacan las nanopartículas de plata, debido a que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano. Su principal aplicación se ha centrado en el área de la salud, siendo utilizado en el recubrimiento de materiales dentales, prótesis, catéteres, injertos vasculares y tratamiento tópico de quemaduras (Dibrov *et al.*, 2002). Además, se han utilizado en otros campos de aplicación, como monitoreo del medio ambiente, catálisis, tratamiento ambiental, electrónica, óptica, fotónica y en la detección de espectroscopia Raman mejorada por superficie (Kreibig *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 2009).

Para cada aplicación, las nanopartículas requieren unas características específicas que definirán las propiedades físicas y químicas, tales como el tamaño y distribución, forma, y carga superficial, entre otras. Uno de los desafíos en síntesis de estos materiales es la obtención de nanopartículas con forma y tamaño homogéneo. Para ello se modifican condiciones de reacción tales como concentración de reactivos, adición de agentes estabilizantes, tiempo de reacción, temperatura y agitación (Maturana, 2009).

La estandarización del proceso de síntesis de las nanopartículas es un aspecto muy importante, ya que se ha establecido que las propiedades antibacterianas están estrechamente relacionadas con el tamaño y carga superficial. Si se manejan adecuadamente estas propiedades, las nanopartículas de plata podrían

tener un enorme potencial como agentes antibacterianos (Salopek-Sondi, 2004; Morones *et al.*, 2005; Panacek *et al.*, 2006).

Desde el punto de vista biomédico, las nanopartículas de plata se presentan como una alternativa para el uso indiscriminado de antibióticos, a los que una gran variedad de microorganismos han desarrollado una amplia resistencia. Por tal razón, se ha incentivado la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos más eficaces que los antibióticos actuales, de tal forma que presenten baja citotoxicidad y que se puedan sintetizar de manera sencilla (Rai *et al.*, 2009).

El presente trabajo describe el desarrollo de nanopartículas de plata mediante distintas metodologías de síntesis, incluyendo diferentes agentes reductores y métodos de agitación. Posterior a la síntesis de nanopartículas de plata, se evaluó la actividad antibacteriana sobre las cepas patógenas *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina(SARM). Finalmente se estudió el efecto sinérgico entre diferentes antibióticos (ampicilina, kanamicina, ofloxacina y eritromicina) y las nanopartículas de plata, utilizando un diseño experimental de Plackett-Burman.

1. MARCO DE REFERENCIA

1.1 NANOTECNOLOGÍA

La nanotecnología ha sido definida como la comprensión y el control de la materia en dimensiones en torno a 1 y 100 nanómetros, donde el comportamiento único de la misma permite nuevas aplicaciones en diversos campos de la ciencia (Liu, 2006; Gong *et al.*, 2007; Atiyeh *et al.*, 2007).

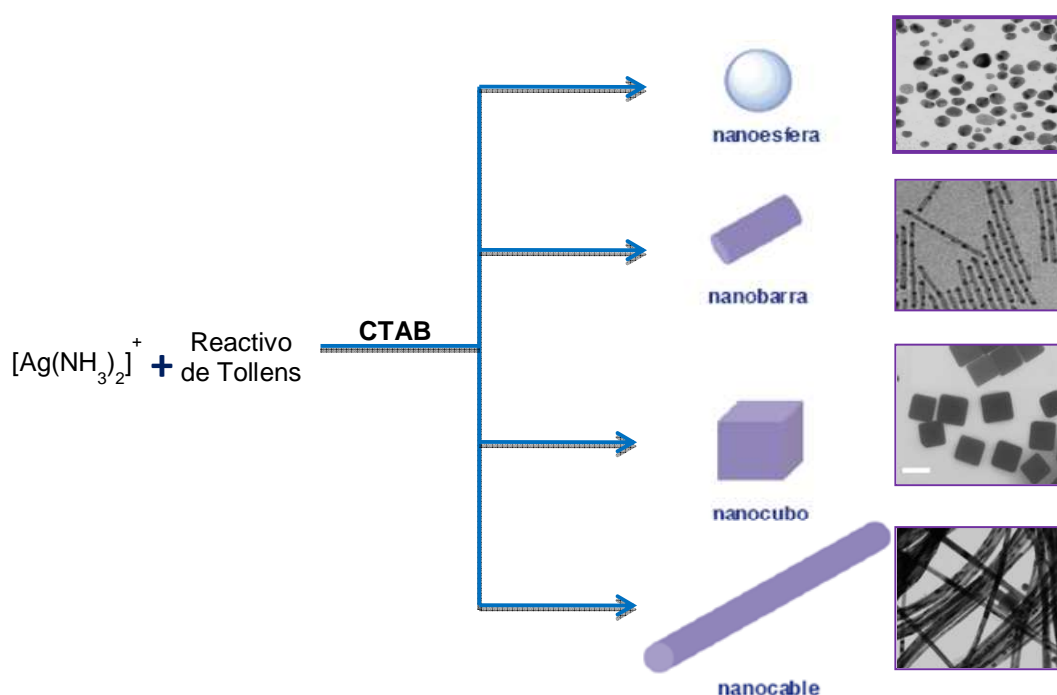
El término nanotecnología fue acuñado por el profesor Norio Taniguchi en 1974 para describir la precisión en la fabricación de los materiales a escala nanométrica. Sin embargo, el concepto de nanotecnología fue expuesto previamente por el profesor Richard P. Feynman en su célebre discurso durante la reunión de la Sociedad Americana de Física (Feynman, 1959; Rai *et al.*, 2009).

El surgimiento y progreso de la nanotecnología está ligado al desarrollo de nuevos nanomateriales que no sólo se enfocan en la ciencia sino también en la tecnología. Los estudios en nanotecnología involucran un amplio espectro de áreas de investigación, desde actividades industriales hasta ciencias aplicadas. Uno de los mayores adelantos en esta nueva ciencia es la producción y aplicación de nanopartículas a las ciencias biológicas. En general, las nanopartículas están definidas como partículas que se encuentran en un rango de 1-100 nm, formando ramificaciones entre 20 y 15000 átomos que presentan un comportamiento que se debate entre la física clásica y la cuántica (Rai *et al.*, 2009; Liu, 2006).

Las nanopartículas se pueden obtener a partir de diferentes materiales y en diversas formas como esferas, barras, alambres y tubos (Ver **figura 1**). De igual manera, es posible controlar las condiciones de reacción y el método de síntesis que permita la obtención de diversas estructuras nanométricas, entre ellas nanopartículas poliméricas, dendrímeros, nanopartículas metálicas, liposomas

Y otros tipos de nanomateriales dependiendo en gran medida de la aplicación específica para la cual se desee implementar (Yang *et al.*, 2010).

Figura 1 Diferentes formas de AgNPs dependiente de la concentración de CTAB en la síntesis (García-Barrasa *et al.*, 2011).



1.2 NANOPARTÍCULAS DE PLATA

La plata ha sido empleada durante miles de años como metal precioso por el ser humano en aplicaciones tan diversas como joyería, utensilios, moneda, fotografía o explosivos. De todos estos usos, uno de los más importantes es su empleo como agente desinfectante con fines higiénicos y médicos (García-Barrasa *et al.*, 2011). Así, ya desde la antigüedad, se empleaban vasijas de plata para almacenar agua o vino ya que se consideraba que preservaba sus condiciones. También

Hipócrates, padre de la medicina moderna, describió el empleo de polvo de plata para su aplicación en la curación de heridas y en el tratamiento de úlceras. En los siglos XVII y XVIII se empleó nitrato de plata para el tratamiento de úlceras y su actividad antimicrobiana se estableció en el siglo XIX. Sin embargo, después de la introducción de los antibióticos en 1940 el uso de las sales de plata disminuyó. Posteriormente, se han empleado sales y compuestos de plata en diferentes campos biomédicos, especialmente en el tratamiento de quemaduras (García-Barrasa *et al.*, 2011).

El renacimiento del interés en la plata y en las nanopartículas de plata ha sido motivado por la aparición desenfrenada de bacterias resistentes a antibióticos y la creciente prevalencia de las infecciones nosocomiales bacterianas. El uso de la plata se ha visto seriamente limitado por la toxicidad de los iones de plata para los seres humanos; sin embargo, la nanotecnología ha permitido la producción de pequeñas partículas de plata con una superficie cada vez mayor de área por volumen, mayor eficacia contra las bacterias y, lo más importante, menor toxicidad para los seres humanos (Rai *et al.*, 2009).

El gran potencial de las nanopartículas de plata (AgNPs) se ve reflejado en las múltiples aplicaciones en diversas áreas tanto de las ciencias puras y aplicadas como en la industria. Las ventajas de la utilización de nanopartículas se fundamentan en que pueden exhibir tanto propiedades macro como microscópicas, lo que le confiere características únicas. Se han propuesto como materiales útiles en la industria textil, electrónica, y para monitoreo de aguas en preservación del medio ambiente. Así mismo, las AgNPs han tenido auge en la ingeniería médica, pues se han empleado como recubrimiento en sondas uretrales, endoprótesis vasculares, tubos endotraqueales, dispositivos de diálisis peritoneal, instrumentos quirúrgicos, entre otros (Yang *et al.*, 2010; Chen y Schluesener, 2008).

1.3 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

La nanotecnología y la química sintética moderna se han utilizado para desarrollar diferentes métodos para la síntesis de AgNPs. Cada método tiene sus propias ventajas y limitaciones. Los parámetros que están influenciados por el método de síntesis incluyen el diámetro promedio de AgNPs y el tamaño, la distribución de tamaño, la forma, adición de agentes estabilizantes, rendimiento de la reacción, química de la reacción, y la presencia de impurezas.

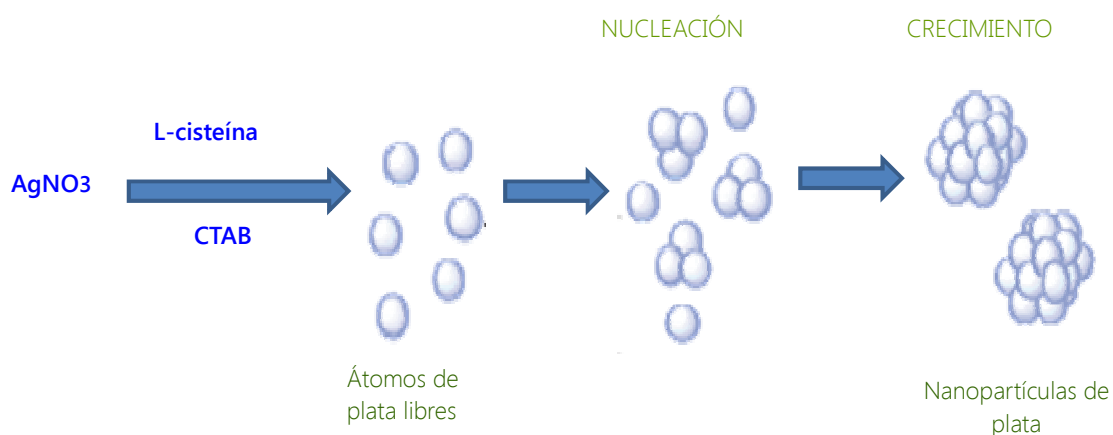
Mediante el control de las condiciones experimentales (por ejemplo la temperatura, la concentración, la presencia de agentes estabilizantes), se puede controlar la cinética de la reacción de tal manera que los átomos de plata formen agrupaciones de dimensiones nanométricas. Se ha publicado en la literatura una impresionante variedad de métodos muy novedosos e ingeniosos para la síntesis de AgNPs, aunque sólo unos pocos se han adaptado para la industria. La mayoría de estos métodos químicos y físicos para la síntesis de AgNPs requieren la adición de agentes estabilizantes para las nanopartículas en dispersión, o agentes protectores, de recubrimiento o ligandos. La estrategia más común es la protección de las nanopartículas con agentes protectores que pueden ser absorbidos o unirse a la superficie de las nanopartículas, para así evitar su aglomeración (Oliveira *et al.*, 2005; Bai *et al.*, 2007).

Reducción química

La reducción química es el método más frecuentemente aplicado para la preparación de AgNPs como dispersiones estables, coloidales en agua o disolventes orgánicos. Inicialmente, la reducción de varios complejos con iones Ag^+ conduce a la formación de átomos de plata (Ag^0), la cual es seguida por la asociación en grupos oligoméricos. Estos grupos pueden dar lugar a la formación de nanopartículas coloidales de plata (Tao *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 1982; Sondi *et*

al., 2003). El mecanismo de formación de las disoluciones coloidales a partir de la reducción de iones plata consta de dos etapas diferentes: nucleación y crecimiento (ver **figura 2**). El proceso de nucleación requiere una energía de activación alta, mientras que el proceso de crecimiento requiere una baja energía de activación. El tamaño y la forma de las nanopartículas dependerá de las velocidades relativas de estos procesos, que pueden ser controladas a través de la modificación de los parámetros de reacción, entre ellos: concentración, temperatura, pH, poder reductor, etc (Burda *et al.*, 2005; Cushing *et al.*, 2004; Liz-Marzán, 2004).

Figura 2 Mecanismo de formación de AgNPs por medio de reducción química (García-Barrasa *et al.*, 2011).



Fotorreducción

La fotorreducción iniciada por radiación ultravioleta (UV) es un método simple y efectivo para producir nanopartículas de plata y de oro en la presencia de citrato, y polivinilpirrolidona (PVP), poli ácido acrílico (PAA) y colágeno. La irradiación desintegra las AgNPs en tamaños más pequeños con un único modo de distribución homogénea estable y de tamaño uniforme. Al realizar este tipo de síntesis en presencia de iones citrato, la formación de nanopartículas de plata depende fuertemente de la longitud de onda de excitación que se aplique sobre la

superficie de electrones oscilantes de las partículas metálicas (Maillard *et al.*, 2003; Abou *et al.*, 2010).

Microemulsión

La síntesis de AgNPs en sistemas bifásicos acuosos-orgánicos se basa en la separación espacial inicial de los reactivos (precursor de metal y el agente reductor) en dos fases inmiscibles. La velocidad de interacción entre el precursor y el agente reductor es controlada por la interfase entre los dos líquidos. Las AgNPs formadas se estabilizan debido a que la superficie se recubre con moléculas estabilizantes en el medio acuoso no polar, y es transferido al medio orgánico por el transportador de la interfase, que generalmente consta de una sal cuaternaria de alquilamonio (Krutzyakov *et al.*, 2008).

El método de microemulsión permite la preparación de nanopartículas de tamaño uniforme y controlable. Sin embargo, a menudo se emplean disolventes orgánicos altamente tóxicos. Así, grandes cantidades de surfactante y disolventes orgánicos que se añaden al sistema, se deben separar y eliminar del producto final. La ineficacia del método radica en los altos costos del proceso en las etapas de separación y purificación de las AgNPs (Abou *et al.*, 2010).

Biosíntesis

Recientemente, se han usado métodos de biosíntesis empleando métodos de química verde que usan agentes reductores biológicos naturales, tales como: polisacáridos, bacterias y extracto de hongos o plantas. Estas metodologías se han convertido en una alternativa simple y viable a los procedimientos de síntesis química más compleja para obtener AgNPs (Abou *et al.*, 2010).

En estos métodos se añade a un sobrenadante microbiano una solución de nitrato de plata. En este caso, los agentes reductores presentes en el sobrenadante microbiano, tales como hidroquinonas, reducen la Ag^+ a AgNPs en condiciones constantes (por ejemplo, temperatura). La desventaja de este método es la necesidad de purificar la muestra y extraer las AgNPs del medio para que puedan ser implementadas en aplicaciones médicas (Chaloupka *et al.*, 2010).

1.4 PROPIEDADES DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA

A escala nanométrica, las partículas presentan diferentes propiedades físicas, ópticas, químicas y antimicrobianas, que difieren en gran medida a las propiedades que presentan los mismos materiales pero en escala de milímetros o metros. Entre estas propiedades se encuentran: incremento de la polarizabilidad óptica, aumento de la conductividad eléctrica, propiedades electromagnéticas y catalíticas, y actividad antimicrobiana de amplio espectro. Generalmente, estas propiedades dependen del material, tamaño y forma de las nanopartículas (Leff *et al.*, 1995; He *et al.*, 2004; Seney *et al.*, 2009).

1.4.1 Ópticas y físicas. Debido a la escala nanométrica en la que se encuentran, las nanopartículas tienen propiedades que surgen de los efectos de confinamiento cuántico y el intercambio entre la superficie y el volumen que conduce a cambios significativos sobre la forma y el tamaño de las nanopartículas en solución (Kamat, 2002; Callegari *et al.*, 2003).

Las nanopartículas metálicas presentan fuertes bandas de absorción en las regiones ultravioleta y visible (UV-VIS) del espectro electromagnético. Esta propiedad se debe a las oscilaciones colectivas de electrones de conducción del metal, cuando están excitados por un campo electromagnético incidente (CEI) de radiación. A esta propiedad se le denomina superficie de plasmones resonantes (SPR). Entre los factores que en conjunto conducen a estas oscilaciones se

encuentran: 1) la aceleración de los electrones de conducción por el CEI, 2) fuerzas de restauración que resultan de la polarización inducida, y 3) el confinamiento de los electrones a dimensiones más pequeñas que la longitud de onda de la luz. La longitud de onda exacta y la intensidad de la banda de absorción proporcionan importante información acerca del tamaño, forma, concentración y propiedades dieléctricas de las nanopartículas de plata (Evanoff *et al.*, 2005; Seney *et al.*, 2009).

Las propiedades ópticas de las nanopartículas, como la absorción o emisión a diferentes longitudes de onda dependen del tamaño de las partículas y puede ser controlada al funcionalizar la superficie. Al preparar nanocompuestos en matrices sólidas, es posible obtener diferentes propiedades mecánicas de los nuevos nanocompuestos, como por ejemplo, mayor elasticidad. Una prueba de estas propiedades son las nanopartículas de silicato, que gracias a su morfología y gran área superficial presentan las mejores propiedades elásticas y mecánicas que favorecen su utilización como vehículos moleculares de sustancias impregnadas en su superficie (Shenhar *et al.*, 2005; Nagarajan *et al.*, 2008).

1.4.2 Propiedades antibacterianas. La actividad antibacteriana de la plata es bien conocida, como lo demuestra su uso clínico actual en el tratamiento de quemaduras (Klasen, 2000; Atiyeh *et al.*, 2007). Se acepta que la plata y las AgNPs en una solución acuosa producen la liberación de iones de plata, los cuales son biológicamente activos y con efecto bactericida. Sin embargo, un estudio comparativo entre AgNPs, nitrato de plata y cloruro de plata, reveló que las AgNPs tienen mayor actividad antibacteriana que los iones de plata libre. Se ha propuesto como mecanismo alternativo que las AgNPs interactúan con la pared celular de la bacteria, provocando la lisis de la misma. Este hecho conlleva a una mayor permeabilidad en la pared celular dejando a la célula bacteriana incapaz de la regulación del transporte a través de la membrana plasmática, lo que culmina

con la muerte celular (Sondi y Salopek-Sondi, 2004; Morones *et al.*, 2005; Yamanaka *et al.*, 2005;Choi *et al.*, 2008).

Adicionalmente se ha sugerido que el mecanismo antimicrobiano de las AgNPs se encuentra relacionado con la formación de radicales libres que inducen daño en la membrana celular y posteriormente muerte celular. Por otra parte, como resultado de estudios comparativos entre el efecto de AgNPs sobre bacterias resistentes y susceptibles, se ha establecido que las AgNPs no se unen selectivamente a algunas proteínas, sino a un amplio espectro de dianas que incluyen la membrana, proteínas citoplasmática y plásmidos de ADN bacteriano (Kim *et al.*, 2007; Ayala-Núñez, *et al.*, 2009;Rastogi *et al.*, 2011).

Al realizar un análisis del mecanismo de acción antibacteriano de las AgNPs por medio de electroforesis 2D se encontró que tres tipos de precursores de proteínas presentes en la membrana externa de la bacteria, después del tratamiento con AgNPs se ven afectados,comprobando que tras el uso de las AgNPs se produce una alteración de la pared celular bacteriana y como consecuencia se presenta un colapso de la fuerza motriz de protones, cuya función es impulsar la respiración celular en la membrana celular(Morones *et al.*, 2005; Lok *et al.*, 2006).

Las AgNPs presentan efectos antibacterianos frente a un gran número de especies bacterianas (ver **Tabla 1**). Actualmente, el mecanismo más aceptado de acción de las AgNPs es que éste se da por un efecto combinado, en el que cada mecanismo propuesto (interacción con la pared celular, ADN citoplasmático y proteínas bacterianas) contribuye a proporcionar una mayor actividad bactericida (Chaloupka *et al.*, 2010).

Tabla 1 Compilación de trabajos recientes sobre la actividad antibacteriana de AgNPs.

MICROORGANISMOS PROBADOS	AÑO	RESULTADOS	REFERENCIAS
<i>E. coli</i> , <i>Vibrio cholera</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhi</i>	2005	El efecto bactericida de las AgNPs es dependiente del tamaño y entre menor sea éste, mayor será su actividad.	Morones <i>et al.</i>
<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	2006	Diferentes sacáridos se emplearon como agentes reductores y se obtuvieron AgNPs de varios tamaños, corroborando lo propuesto por Morones <i>et al.</i>	Panacek <i>et al.</i>
<i>E. coli</i> , <i>S. typhi</i> , <i>S. aureus</i>	2007	El efecto antibacteriano fue dependiente de la dosis de AgNPs aplicado. La actividad fue mayor contra las bacterias Gram-negativas evaluadas que frente a las Gram-positivas.	Shrivastava <i>et al.</i>
<i>E. coli</i> (4 strains), <i>Bacillus subtilis</i> (3 strains), <i>S. aureus</i> (3 strains)	2008	Para este estudio se encontró que el efecto bactericida fue mayor para bacterias Gram-positivas que para Gram-negativas, probablemente debido a que se evaluaron múltiples cepas de la misma bacteria en lugar de una sola.	Ruparelia <i>et al.</i>
<i>S. aureus</i> resistente a Meticilina (SARM), <i>S. aureus</i> no resistente	2009	Para AgNPs de 10 nm se reportó inhibición de 90% contra SARM bajo concentraciones no citotóxicas.	Ayala-Nuñez <i>et al.</i>
<i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157:H7, <i>P. aeruginosa</i> , <i>Salmonella entérica</i> , <i>Bacillus cereus</i>	2011	Encontraron CMI desde 34 µg/mL para <i>E. coli</i> patógena empleando AgNPs, mientras que al evaluar nanopartículas de Ag-SiO ₂ se requirieron 100 µg/mL.	Rastogi <i>et al.</i>

1.5 MICROORGANISMOS ESTUDIADOS

1.5.1 *Escherichia coli* O157:H7. *Escherichia coli* es una bacteria (bacilo Gram-negativo) que posee flagelos móviles y se localiza en el intestino de los animales, incluido el ser humano. Existen diferentes tipos de *E. coli* verocitotoxigénicos (ECVT) que tienen mayor importancia por considerarse agentes causales de infecciones tóxicas alimentarias. Entre los ECVT, el serotipo más frecuentemente implicado es el O157 (Madigan *et al.*, 2003; Usera, 2005). Aunque se conocen más

de 60 serotipos de *E. coli* capaces de producir toxinas, el serotipo O157:H7 es el patógeno más importante dentro del grupo ECVT y es el objeto del presente estudio.

Las cepas ECVT son los agentes productores de diarrea más importantes en menores de edad, causando la enfermedad diarreica aguda (EDA) y la gastroenteritis aguda (GEA). Representa uno de los mayores problemas de salud pública en países en vía de desarrollo, ya que cerca del 30% al 40% de los casos publicados son causados por este patógeno. En Colombia la GEA es la segunda causa de morbilidad y mortalidad infantil. Sin embargo, hasta 1997 se realizó un estudio en pacientes pediátricos con GEA que demostró por primera vez la presencia en Colombia de *E. coli* O157:H7 con una prevalencia del 5.3%, lo que representa un valor alto en comparación con otros países (Ruiz y Mattar, 1999; Cuesta *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2009).

Se han empleado numerosas cepas para evaluar la actividad antibacteriana de las AgNPs y entre ellas una de las más usadas ha sido *E. coli* como modelo de bacteria Gram-negativa. Asimismo, la cepa *E. coli* O157:H7 ha sido investigada por varios autores encontrando que se requieren mayores concentraciones de AgNPs que para una *E. coli* no patógena (Sondi y Salopek-Sondi, 2004; Kim *et al.*, 2007; Rastogi *et al.*, 2011).

1.5.2 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM). *Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram-positiva que presenta una morfología de cocos inmóviles agrupados en pequeños conjuntos y se encuentra generalmente en los tejidos mucosos y piel de individuos sanos. *S. aureus* es un comensal de los seres humanos y otros vertebrados, pero también es un importante patógeno causante de infecciones como abscesos de tejidos blandos, infecciones de heridas, endocarditis, osteomielitis y bacteriemia (Madigan, 2003; Guignard *et al.*, 2005).

S. aureus resistente a Meticilina (SARM) se reportó por primera vez en la década de 1960 y en la actualidad un porcentaje importante de las infecciones nosocomiales son producidas por cepas de *S. aureus* resistentes a múltiples fármacos. Durante los últimos 20 años se ha venido presentando una creciente resistencia a los antibióticos en las bacterias Gram-positivas que ha dado lugar a un tratamiento complicado y al aumento en los índices de la morbilidad y la mortalidad. De hecho, se ha descrito que las tasas de infección por SARM se ven incrementadas en las unidades de cuidados intensivos en Asia, África, Europa y principalmente en América Latina (Mann, 2008; Witte *et al.*, 2007; Alvarez *et al.*, 2010).

S. aureus ha sido empleado como modelo de bacteria Gram-positiva para evaluar las propiedades bactericidas de las AgNPs encontrando que es más susceptible que otras bacterias Gram-negativas. Adicionalmente, al evaluar la actividad de AgNPs frente a *S. aureus* resistente a Meticilina (SARM) y *S. aureus* no resistente se muestra que el mecanismo de inhibición de las AgNPs tiene un modo de acción diferente al presentado por los antibióticos β -lactámicos (Nanda y Saravanan, 2009; Ayala-Nuñez, *et al.*, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata sobre las bacterias patógenas *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Sintetizar nanopartículas de plata empleando tres diferentes agentes reductores para observar su influencia sobre sus propiedades físicas y antibacterianas.

Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericidas (CMB) de las nanopartículas sobre cepas de *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* resistente a meticilina utilizando las nanopartículas de plata previamente sintetizadas.

Determinar la existencia de un efecto sinérgico de las nanopartículas de plata con antibióticos en el porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano frente a ambas cepas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 REACTIVOS

El nitrato de plata (AgNO_3 , 99.998%), la L-cisteína ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$, >99%), el monohidrato de hidracina ($\text{H}_2\text{NNH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 98+%) y el citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$, 99%) fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania). El bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, 99%), el polivinil alcohol (PVA, 99+%) y el ácido tánico ($\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$, 99%) fueron comprados de Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri). Todos los reactivos usados eran de grado analítico y se emplearon sin purificación posterior. Las soluciones fueron preparadas con agua desionizada.

4.2 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Se sintetizaron nanopartículas de plata (AgNPs) por medio de reducción química a partir del nitrato de plata empleando tres diferentes agentes reductores: aniones citrato, cisteína e hidracina, con el fin de evaluar diferencialmente el poder reductor sobre iones plata así como también obtener AgNPs de diferentes tamaños. Durante las síntesis de nanopartículas se estudió el efecto de la agitación sobre la estabilidad en el tiempo de las nanopartículas. Para ello, se estandarizó la síntesis llevando a cabo una serie de 12 ensayos por agente reductor, variando tres parámetros: velocidad de agitación magnética (200, 400 y 800 rpm), tiempo de agitación (1, 2 y 4h) y estabilización por ultrasonido a diferentes tiempos (1, 2 y 4h) resultando en un total de 36 tipos de síntesis diferentes.

De igual manera, cada tipo de agente reductor requería de condiciones de reacción diferentes entre ellas: temperatura, luz, pH, relación molar entre precursor y agente reductor, velocidad y orden de adición de cada componente.

En la **figura 3** se describe el procedimiento general de las síntesis de éstas nanopartículas.

Figura 3 Procedimiento general para la obtención de las AgNPs.



4.2.1 Síntesis empleando cisteína. Se mezclaron inicialmente las soluciones de AgNO_3 y CTAB en un matraz y a continuación se adicionó L-cisteína a la mezcla de reacción. Posteriormente, se agregó PVA como segundo agente surfactante para obtener un volumen final de 20 mL. La síntesis se llevó a cabo a temperatura ambiente en presencia de luz. La aparición de un color rojo-vinotinto indicó la formación de AgNPs. Las concentraciones finales de cada componente en la suspensión que contenía las AgNPs fueron: AgNO_3 (2 mM), CTAB (0,6 mM), L-cisteína (0,4 mM) y PVA (200 ppm). Cada solución coloidal se almacenó en frascos ámbar a temperatura ambiente.

4.2.2 Síntesis empleando citrato de Sodio. Inicialmente se precalentaron las soluciones de AgNO_3 y citrato de sodio, que contenía ácido tánico, a 60°C . Se adicionó lentamente la solución de AgNO_3 sobre la solución de citrato de sodio en un erlenmeyer para un volumen final de 20 mL bajo condiciones de vigorosa agitación magnética. Se mantuvo a esa temperatura hasta la aparición de una coloración amarilla. Posteriormente, se dejó en ebullición a 300°C durante 20 min., mientras se observó una transición de coloración hacia un tono más oscuro. La solución coloidal final contenía AgNO_3 (0,59 mM), citrato de sodio (5,5 mM) y ácido tánico ($47,8 \mu\text{M}$). Se conservó la solución coloidal que contenía las AgNPs formadas en frascos ámbar a 4°C siendo estables por más de 6 meses.

4.2.3 Síntesis empleando hidracina. Se mezclaron AgNO_3 , CTABe hidrato de hidracina en un matraz con agitación magnética suave. La aparición de una coloración amarilla indicó la formación de las nanopartículas. La síntesis se llevó a cabo a temperatura ambiente en ausencia de luz. La solución coloidal final contenía AgNO_3 (0,6 mM), CTAB (0,6 mM) e hidrato de hidracina (0,6 mM) en un volumen de 20 mL. Se almacenaron las soluciones coloidales que contenían las AgNPs formadas en frascos ámbar a temperatura ambiente siendo estables por más de 6 meses.

4.3 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN

4.3.1 Espectrometría UV-VIS. Las nanopartículas se caracterizaron empleando un espectrofotómetro UV-VIS Shimadzu UV-1601-1601 PC con un ancho de rejilla de 0.5 nm realizando un barrido desde 300 nm hasta 600 nm posterior a la reacción de formación. Se determinó la longitud de onda máxima característica para cada solución coloidal de cada tipo de nanopartículas de plata. Se colocó la solución coloidal de AgNPs diluida en una cubeta de cuarzo y la absorbancia resultante se calculó empleando la Ley de Lambert-Beer.

4.3.2 Microscopía electrónica de transmisión. Las nanopartículas se prepararon dejando caer 10 μL de cada solución coloidal sobre un grid (Formvar) de cobre cubierto por carbón y se enviaron para su caracterización por microscopía electrónica de transmisión (TEM) en el Centro de Investigación en Materiales (CCMR) de la Universidad de Cornell, Ithaca, Nueva York (EE UU) y al Laboratorio de Microscopía electrónica de transmisión de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira (Colombia) en un equipo TECNAI 20 Twin de alta resolución con voltaje de 200kV. Las mejores imágenes se obtuvieron con un rango de ampliación desde 195kx hasta 1957kx.

4.3.3 Dispersión de luz en modo dinámico. Las nanopartículas de plata fueron caracterizadas por dispersión de luz en modo dinámico (DLS) con un equipo Malvern Zetasizer Nano-ZS de la Universidad de Cornell, Ithaca, Nueva York (EE UU) y un equipo Mastersizer 2000 de Malvern (UK) del Laboratorio de Instrumentación química de la Universidad Industrial de Santander. Se necesitó un volumen de muestra de 1.5 mL de solución coloidal de AgNPs de un rango de concentración de 100-200ppm.

4.3.4 Potencial Zeta. Las nanopartículas de plata fueron analizadas por el equipo mencionado anteriormente que también mide el potencial Zeta de las partículas en dispersión (Mastersizer 2000 de Malvern). Se introdujeron 800 μL de la muestra coloidal de AgNPs (100-200ppm) en la celda atravesada por un potencial de 150V. Se utilizó el programa Zetasizer software con el fin de medir la magnitud de la repulsión o atracción entre las AgNPs. Su medición aporta información detallada sobre el mecanismo de dispersión y es la clave para controlar la dispersión electrostática.

4.4 DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE LAS NANOPARTÍCULAS

4.4.1 Determinación de Concentración mínima inhibitoria (CMI)

4.4.1.1 Método en caldo. El método de microdilución para la estimación de los valores de CMI fue realizado en placas multipocillo de ELISA de acuerdo con los protocolos publicados por otros autores (Martínez *et al.*, 2010; Wayne, 2003).

Inicialmente se preparó un preinóculo de *E. coli* O157:H7 en caldo Luria-Bertani (LB), durante 14h a 37°C y 200rpm hasta alcanzar una concentración bacteriana de $4,6 \times 10^8$ UFC/mL. De igual manera, se preparó un preinóculo de *S. aureus* resistente a Meticilina (SARM) en caldo Muller-Hilton (MH), en las mismas condiciones hasta alcanzar una concentración bacteriana de 7×10^8 UFC/mL.

Posteriormente, se hizo el seguimiento de la cinética de crecimiento empleando 100 μ L de este inóculo bacteriano durante 9h, en microplacas que previamente contenían AgNPs a diferentes concentraciones (entre 0.25 y 80 μ g/mL) a 37°C con una agitación de 200rpm. Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro lector de microplaca ELISA (Biorad, imarck) a 595 nm. La CMI fue definida como la menor concentración de AgNPs que produce una inhibición en el crecimiento de la bacteria. Los valores de CMI₉₉, CMI₉₀, CMI₅₀ corresponden a las dosis que inhibe el 99%, 90% y 50% del crecimiento bacteriano, respectivamente.

4.4.1.2 Método de difusión de disco. Se realizó el ensayo de actividad antibacteriana en medio sólido como se describe en el método de difusión de disco para antibióticos (Bauer *et al.*, 1966). Inicialmente, se preparó un inóculo que alcanzara una absorbancia entre 0,08-0,1 que en la escala 0.5 McFarland corresponde a 10^8 UFC/ml (McFarland, 1907), el cual fue usado para sembrar en

superficie de placas Petri que contenían agar Muller-Hilton (MH). Posteriormente, se adicionaron sensidiscos de papel filtro Microclar (0,45 mm) de diámetro 5 mm impregnados de AgNPs en diferentes concentraciones (1, 5, 10, 20 y 50 µg/mL). Después de la incubación a 37°C durante 24 horas, la inhibición fue determinada midiendo el diámetro del halo de inhibición que se formó alrededor del disco. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Se emplearon controles positivos de *E. coli* y *S. aureus* que correspondían al crecimiento neto (100%) de cada bacteria en ausencia de AgNPs bajo las mismas condiciones especificadas anteriormente.

4.4.2 Determinación de Concentración mínima bactericida (CMB). Posterior a la determinación de la CMI, se determinó la CMB. Para ello se trabajó con aquellos cultivos de *E.coli* y *S.aureus* que fueron inhibidos por AgNPs durante la determinación de CMI. Se tomaron muestras de estos cultivos y se inocularon en un caldo de cultivo compuesto por una Infusión de cerebro-corazón (BHI). Los cultivos fueron llevados a cabo en tubos Eppendorf a 37°C durante 24 horas.

A continuación, se tomó una alícuota de cada tubo y se realizó siembra en superficie de cajas de Petri que contenían BHI agar con el fin de corroborar el efecto bactericida en aquellas donde no hubo crecimiento de colonias bacterianas. El valor de CMB se determinó como aquella concentración donde el 100% del crecimiento bacteriano fue inhibido completamente en comparación con el control positivo (sin tratamiento con AgNPs).

4.5 DETERMINACIÓN DEL EFECTO SINÉRGICO CON ANTIBIÓTICOS

Estos estudios se llevaron a cabo utilizando ampicilina, eritromicina, kanamicina y ofloxacina. Se seleccionaron estos antibióticos debido a que presentan diferentes mecanismos de acción tanto sobre bacterias Gram-positivas como Gram-

negativas. Así mismo, se eligieron tres tipos de AgNPs provenientes de las síntesis con cada agente reductor (citrato, cisteína e hidracina). La evaluación del efecto sinérgico por medio de la adición de nanopartículas a sensidiscos que contienen previamente el antibiótico y su posterior análisis por el método Kirby-Bauer se ha llevado a cabo de acuerdo con Bauer *et al.* (1966). Sin embargo, en este trabajo se decidió emplear un método en caldo con el fin de garantizar una mejor homogenización entre las nanopartículas y el antibiótico, y una mayor interacción con la bacteria en medio acuoso.

4.5.1 Diseño experimental de Plackett-Burman. La determinación del efecto sinérgico entre las siete variables de interés (distintos antibióticos y AgNPs) seleccionadas se realizó empleando la metodología descrita en el apartado 2.3.1.1 y llevando a cabo un diseño experimental de Plackett y Burman (Plackett y Burman, 1966).

El diseño experimental de Plackett-Burman permite identificar las variables más significativas (N-1) sobre una variable de respuesta realizando N ensayos a dos niveles. Las variables y los niveles se definieron de acuerdo con el método estadístico y se describen en las **Tablas 1, 2 y 3** del Anexo C. Para evaluar los resultados de los ensayos del diseño experimental se determinó el efecto de la variable, la varianza del efecto y el error estándar del efecto para el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano.

4.5.2 Optimización del diseño. La optimización del diseño experimental de Plackett-Burman se realizó teniendo en cuenta las variables significativas halladas en el apartado anterior. Para llevar a cabo esta experiencia se eligieron cinco niveles (correspondientes a diferentes concentraciones de las variables seleccionadas) en matrices de 20 y 31 ensayos para cada bacteria, respectivamente. Las matrices y niveles seleccionados se muestran en las **tablas 4, 5, 6 y 7** del Anexo D.

La optimización del diseño experimental tiene como objetivo encontrar aquellos valores óptimos en donde las variables significativas produzcan el mayor valor en la variable de respuesta, es decir, en donde el porcentaje de inhibición sea del 100%. Así mismo se realizaron las gráficas de superficie de respuesta en donde se muestra cómo es la interacción de cada dos variables con respecto a la variable de respuesta.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 SÍNTESIS de AgNPs

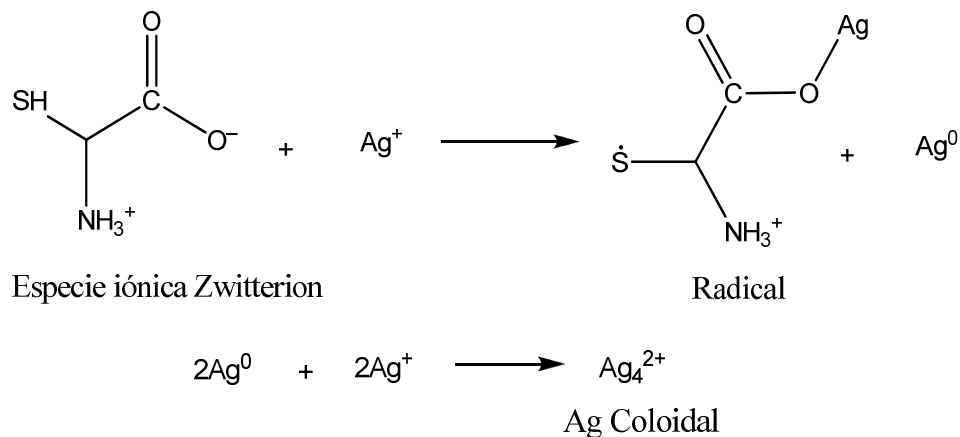
Se obtuvieron AgNPs en soluciones coloidales variando el agente reductor y la velocidad de agitación después de la reacción bajo las condiciones descritas en el apartado 2.1. La caracterización de las AgNPs mostró que se obtuvieron en un rango amplio de tamaño, con diferente carga superficial y cierto grado de polidispersión, lo que indica que en este estudio preliminar no hubo control de tamaño. La **tabla 2** muestra las convenciones empleadas para cada uno de los 36 tipos de AgNPs sintetizadas variando las condiciones de agitación y agente reductor.

Tabla 2 Convenciones empleadas para cada tipo de AgNPs sintetizadas.

	Variables	Nomenclatura asignada
Agente reductor	Cisteína	I
	Citrato de Sodio	II
	Hidracina	III
Velocidad de agitación	200 rpm	a
	400 rpm	b
	800 rpm	c
Tiempo de agitación	1h	1
	2h	2
	4h	3

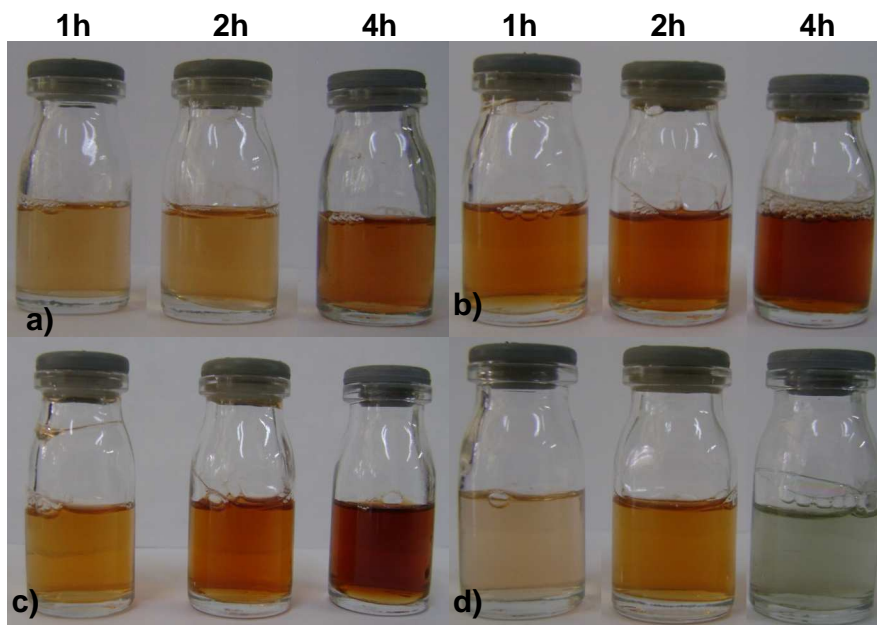
5.1.1 AgNPs empleando cisteína. Se obtuvieron 12 tipos de nanopartículas sintetizadas empleando como agente reductor la cisteína variando la agitación después de la reacción. Las reacciones de reducción de los iones plata se esquematizan en la **figura 4**.

Figura 4 Mecanismo propuesto para la formación de AgNPs empleando cisteína como agente reductor.



Bajo las condiciones experimentales de síntesis de AgNPs se determinó que el pH de la solución coloidal de AgNPs fue 3.30, lo que indica que la formación de las especies catiónica (-COOH) y aniónica (-NH₃) de la cisteína no están presentes en el medio, puesto que los pK₁ y pK₂ de la cisteína son 1.70 y 10.78 respectivamente. Por lo tanto, la especie iónica Zwitterion provocaría el acercamiento de Ag⁺ a su región carboxílica para formar un complejo que, por la transferencia de electrones de la fracción del sulfuro de la cisteína resulta en la formación de Ag⁰ y el radical. La dimerización del radical conduciría a su posterior eliminación durante el curso de la reacción. Por otro lado, el Ag⁰ estaría reaccionando rápidamente con iones de Ag⁺ libres para producir Ag₄⁺², especie que finalmente se encuentra en el estado coloidal (Khan *et al.*, 2009).

Figura 5 AgNPs sintetizadas empleando cisteína a diferentes velocidades de agitación **a)** 200 rpm **b)** 400 rpm **c)** 800rpm, y **cond)** Ultrasonido a 37KHz.

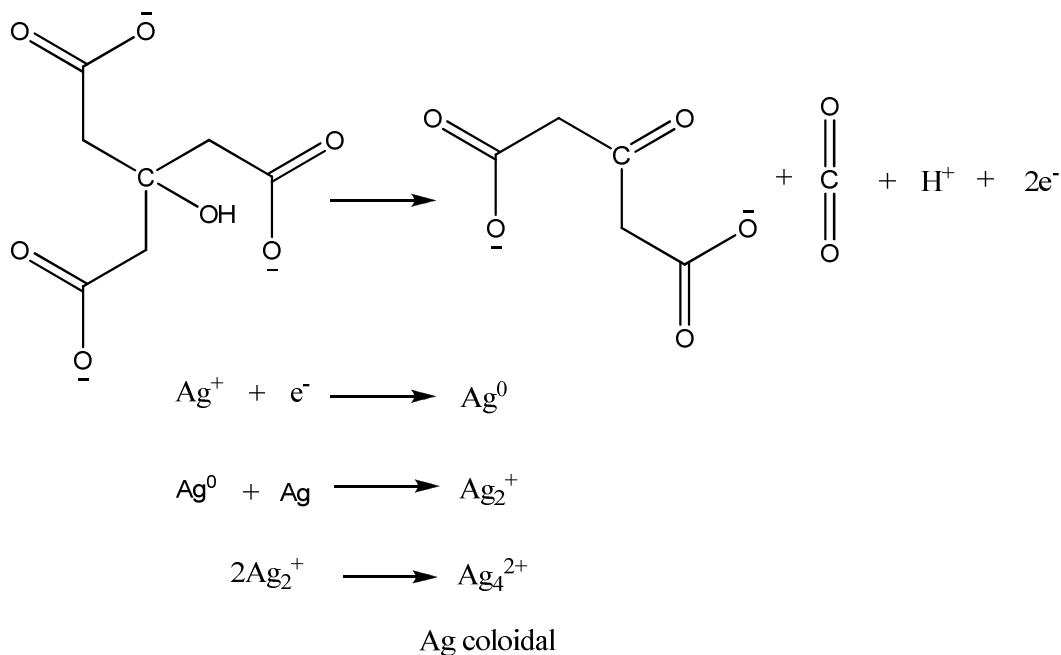


Las AgNPs sintetizadas con cisteína como agente reductor exhibieron una coloración vinotinto-rojiza tras la reacción de formación en presencia de luz (**Figura 5**). Se ha publicado que la adición del CTAB permite una mayor solubilización, estabilización y adsorción de los reactivos. Además, se ha observado que impide la formación de un complejo Cisteína-Ag insoluble en el medio cuando se agrega entre el precursor metálico y el agente reductor. La absorbancia, el crecimiento y la velocidad de formación de AgNPs en su etapa Ag_4^{+2} se detiene con la adición de PVA (Khan *et al.*, 2009).

5.1.2 AgNPs empleando citrato de Sodio. Se llevaron a cabo doce síntesis de AgNPs en presencia de citrato de sodio como agente reductor y estabilizante, y ácido tánico como agente surfactante. Se varió la velocidad de la agitación magnética posterior a la síntesis con el fin de apreciar cambios significativos en la estabilidad de las AgNPs. La **figura 6** describe un posible mecanismo de formación

de las AgNPs por reducción directa del anión citratopropuesto por Kumar *et al.* (2007).

Figura 6 Mecanismo propuesto para la formación de AgNPs empleando aniones citrato como agente reductor.

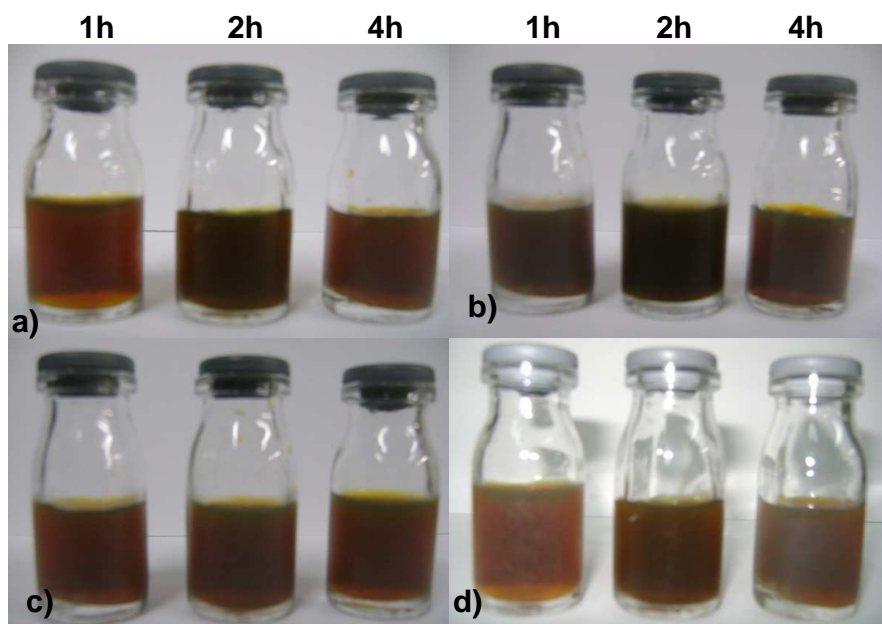


Se han realizado estudios previos empleando esta metodología de obtención de AgNPs (Henglein y Giersig, 1999). Sin embargo, el mecanismo de formación de las nanopartículas por acción del anión citrato no está completamente dilucidado.

Algunos autores plantean que en este proceso de múltiples pasos, con reacciones que se producen en serie y en paralelo, se presentainicialmente la oxidación del citrato,obteniéndose dicarboxiacetona y electrones libres capaces de reducir la plata y generar Ag^0 . A continuación, se formaría rápidamente el dímero de plata (Ag_2^+) que finalmente se convierte en Ag coloidal, Ag_4^{2+} (Kumar *et al.*, 2007).

Por otra parte, también se ha planteado que el anión citrato puede producir la agregación de Ag_2^+ , ya que se pueden formar complejos entre el anión citrato y el dímero de plata de carga positiva. Si se forma este complejo, la Ag_2^+ logra estabilizarse desprendiéndose del complejo y la conversión a Ag_4^{2+} se transforma en un proceso lento (Pillai y Kamat, 2004).

Figura 7 AgNPs sintetizadas empleando citrato a diferentes velocidades de agitación: **a)** 200 rpm **b)** 400 rpm **c)** 800rpm, y **cond)** Ultrasonido a 37KHz.

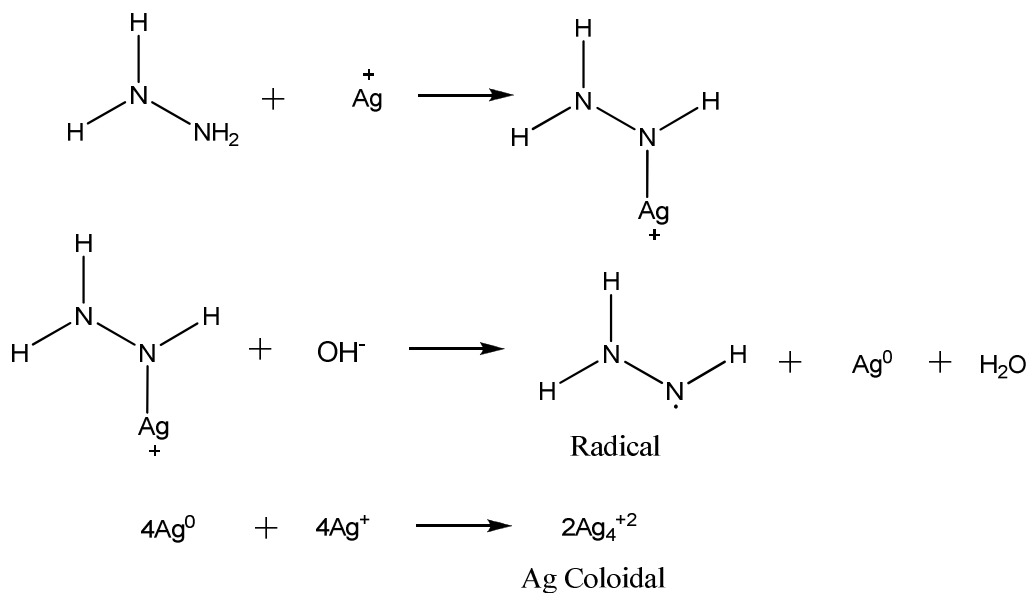


Se puede apreciar en la **figura 7** que la coloración de las AgNPs obtenidas empleando el anión citrato como agente reductor fue amarillo oscuro debido a la concentración de las AgNPs presentes en la solución coloidal. Es probable que la reducción haya sido efectuada tanto por los aniones citrato como por el ácido tánico, pues existen publicaciones que muestran que a pH ácido, el ácido tánico es conocido por comportarse como agente reductor débil capaz de aumentar el tamaño de las AgNPs a temperatura ambiente (Sivaraman *et al.*, 2009). Por lo tanto, es posible que para este método de síntesis estuvieran involucrados dos agentes reductores que conducirían a una mayor población de AgNPs en

comparación con los otros dos métodos, que provocarían una coloración mucho más oscura.

5.1.3 AgNPs empleando hidracina. Se realizaron doce síntesis de nanopartículas empleando como agente reductor hidracina variando la agitación posterior a la reacción empleando agitación magnética y ultrasonido con el fin de observar el efecto sobre la estabilidad. Las reacciones de formación de las AgNPs se esquematizan en la **figura 7**.

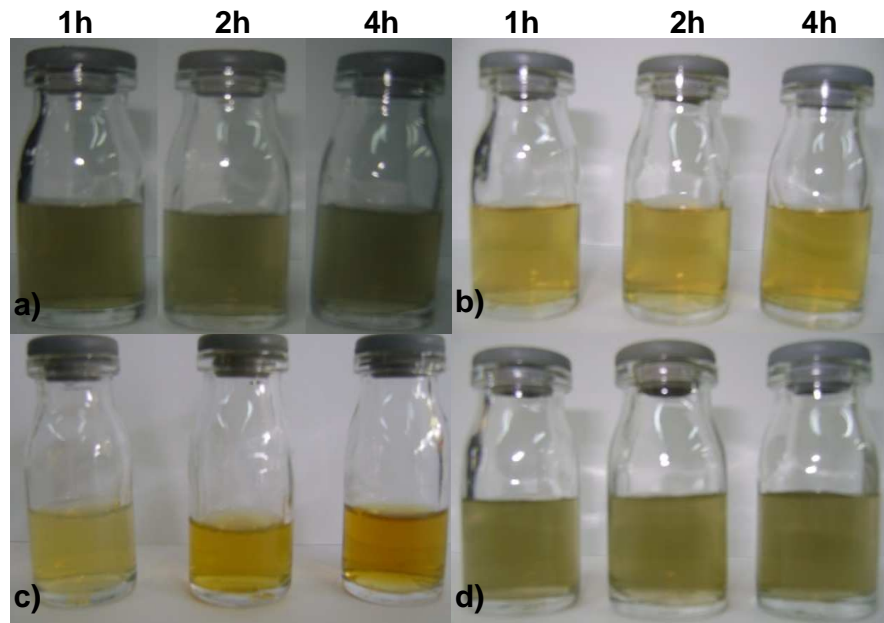
Figura 8 Mecanismo propuesto para la formación de AgNPs empleando hidracina como agente reductor.



En la **figura 8** se observa como primer paso de la reacción la formación de un complejo entre la Ag^+ y la hidracina. A continuación, se supone que el complejo se descompone en etapas. En primer lugar, se produce la transferencia desde hidracina de un par de electrones hacia Ag^+ para formar Ag^0 , lo cual genera una especie hidracil radical. El radical posteriormente puede formar una imida como intermediario. La imida es un intermediario muy inestable y rápidamente se convierte en un estado más estable (N_2). Por otro lado, cuatro átomos de

Ag^0 reaccionan rápidamente con iones de Ag^+ libres para producir 2Ag_4^{+2} , especie que finalmente se encuentra en estado coloidal (Khan *et al.*, 2009).

Figura 9 AgNPs sintetizadas empleando hidracina a diferentes velocidades de agitación **a)** 200 rpm **b)** 400 rpm **c)** 800rpm, y **cond)** Ultrasonido a 37KHz.



El color de las nanopartículas de plata depende de las condiciones experimentales, es decir, la naturaleza del agente reductor, el método de preparación, agitación, la acidez de la mezcla de reacción y la ausencia o presencia de agentes estabilizantes (polímeros, surfactantes, ligandos, proteínas). Se utilizó CTAB como agente estabilizante (surfactante catiónico) para la síntesis de AgNPs empleando sólo hidracina, y la coloración resultante fue amarilla-verdosa (ver **figura 9**) de diferentes tonalidades dependiendo de la velocidad de agitación aplicada tras la reacción, lo cual indicaría diferentes propiedades ópticas de estas nanopartículas sintetizadas y que la cantidad reaccionante del agente reductor también está cambiando (Zielinska *et al.*, 2009).

5.2 CARACTERIZACIÓN DE AgNPs

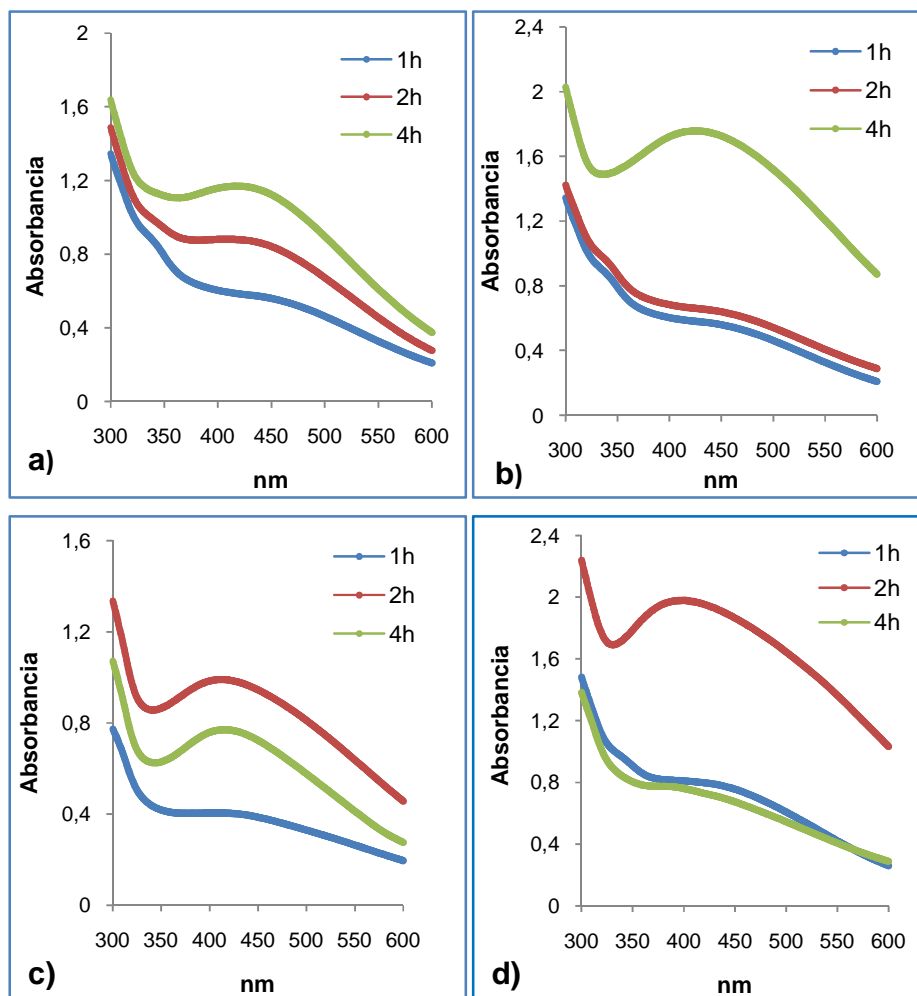
A fin de establecer una buena correlación entre la actividad antibacteriana y las propiedades de los nano materiales, es necesario conocer la composición química, estructura y morfología de los nano materiales. Este es un punto clave para las AgNPs, ya que sus propiedades están determinadas principalmente por su tamaño y morfología, incluso cuando tienen la misma composición química (Bhui *et al.*, 2009; Dadosh, 2009). Las caracterizaciones físicas son muy importantes para comparaciones posteriores con los resultados obtenidos por otros grupos y pueden dar luces sobre el posible mecanismo de inhibición bacteriana de las AgNPs.

5.2.1 Espectrofotometría UV-VIS. La primera técnica de caracterización empleada fue espectrofotometría UV-VIS, donde se obtuvieron los espectros que confirmaron la formación de las AgNPs sintetizadas (**figura 10**). La síntesis de AgNPs empleando cisteína conduce a la aparición de un hombro de absorción en la región comprendida entre 400-450 nm.

El aumento en la absorbancia en el espectro indica que existió una agregación de AgNPs, lo que se puede apreciar para las nano partículas agitadas a mayor tiempo (2h y 4h). Así mismo, se observa que el pico es amplio en todos los casos revelando una distribución de tamaños heterogénea.

Se puede observar cualitativamente que el máximo de absorción se conserva en todas las síntesis de AgNPs, lo que indica la formación presumiblemente de AgNPs de forma esférica. La **figura 10** muestra los espectros de las AgNPs obtenidas inmediatamente después de la reacción de formación. Se ha establecido que el incremento de la intensidad de la absorbancia refleja que existe una mayor población de AgNPs con tamaños diferentes (Khan *et al.*, 2009).

Figura 10 Espectro de absorción de las AgNPs empleando Cisteína a diferentes velocidades de agitación a) 200 rpm b) 400 rpm c) 800rpm d) Ultrasonido a 37KHz.



Los espectros de absorción UV-VIS para las AgNPs sintetizadas empleando aniones citrato como agente reductor revelan un pico gaussiano de absorción a 400-410 nm aproximadamente (ver **figura 11**), el cual es característico para este tipo de nanopartículas. Este comportamiento indica la formación de AgNPs de una sola población de tamaño homogéneo. Adicionalmente, se observa que el cambio en la velocidad de agitación posterior a la reacción no representa una variación significativa en el espectro UV-VIS, puesto que en la mayoría de casos los

espectros alcanzan la misma intensidad en la absorbancia y la misma forma superponiéndose entre sí (ver **figura 11**).

Figura 11 Espectro de absorción de las AgNPs empleando aniones citrato a diferentes velocidades de agitación **a)** 200 rpm **b)** 400 rpm **c)** 800rpm y con **d)** Ultrasonido a 37KHz.

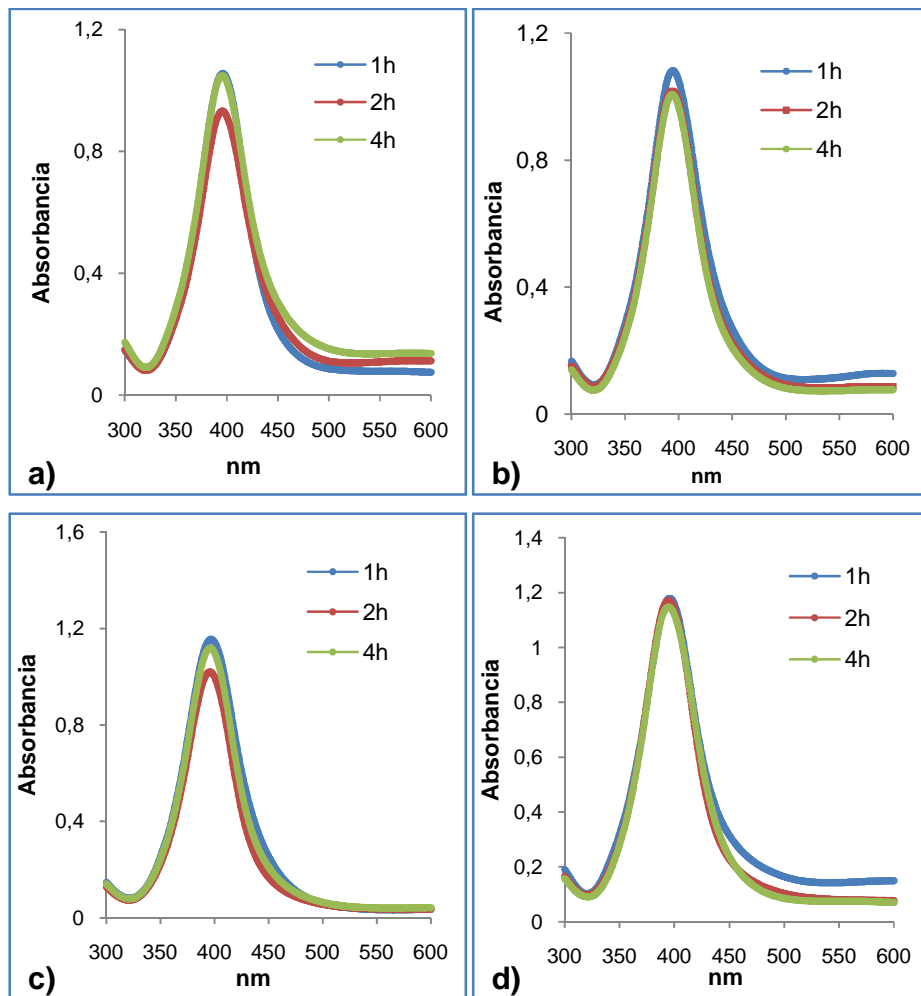
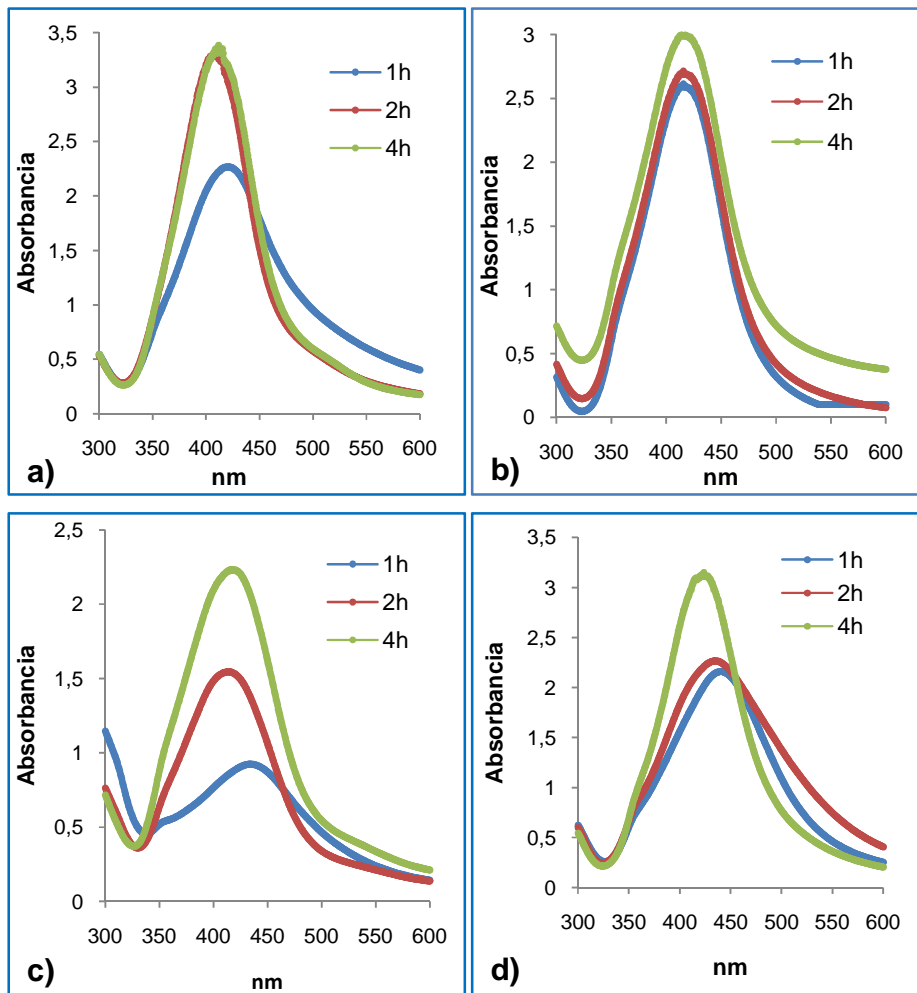
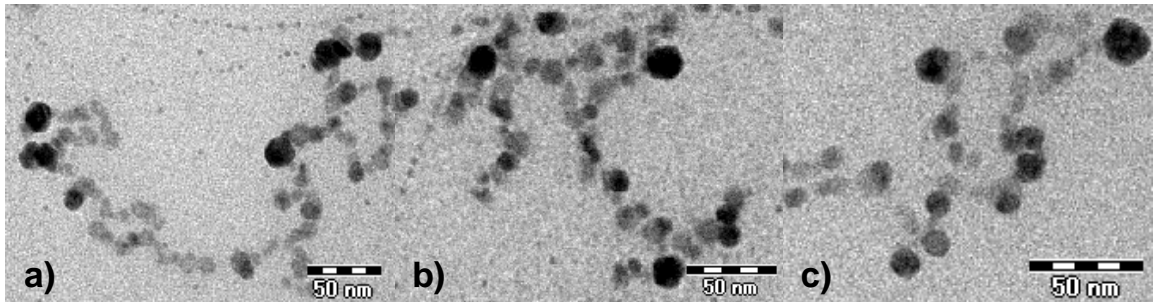


Figura 12 Espectro de absorción de las AgNPs empleando hidracina a diferentes velocidades de agitación **a)** 200 rpm **b)** 400 rpm **c)** 800rpm y con **d)** Ultrasonido a 37KHz.



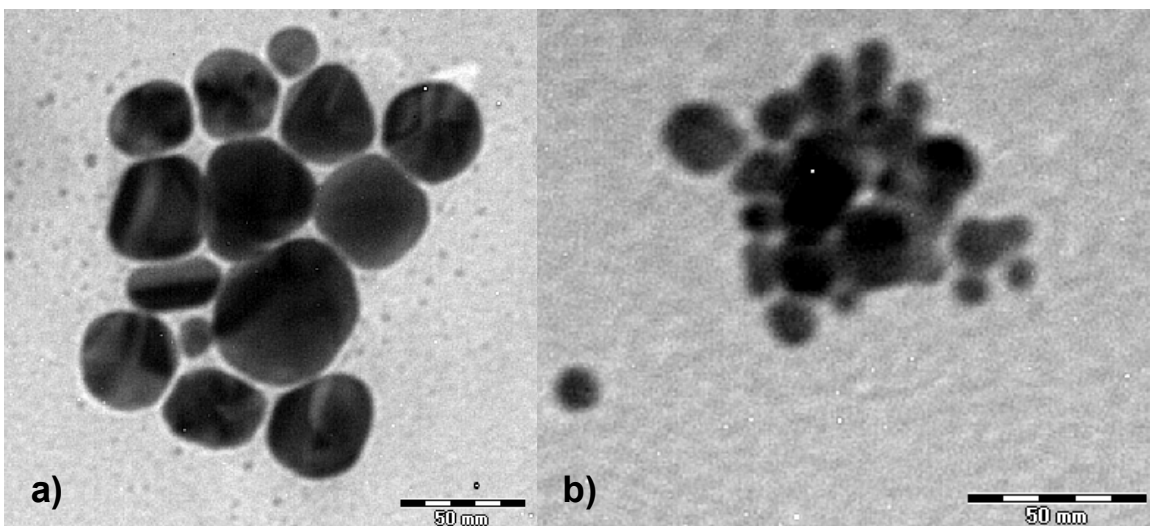
5.2.2 Microscopía de transmisión electrónica. Se realizó la caracterización de las AgNPs empleando microscopía de transmisión electrónica (TEM) con el fin de observar tanto el tamaño y forma de las nanopartículas sintetizadas. Las imágenes de microscopía se obtuvieron para tres tipos de AgNPs teniendo en cuenta la estabilidad en el tiempo de las mismas.

Figura 13 TEM de AgNPs sintetizadas empleando cisteína como agente reductor. **a)** Bajo agitación de 200 rpm a 2h. **b)** Bajo agitación de 800 rpm a 4h. **c)** Bajo ultrasonido a 37KHz durante 1h.



A partir de las imágenes presentadas en la **figura 13** se puede observar que la variación de la agitación aplicada posterior a la reacción de formación de las AgNPs no revela un cambio significativo en el tamaño de las nano partículas. Las AgNPs obtenidas son de forma esférica en su mayoría y se observa la presencia de cadenas agregadas no lineales, lo que representa la existencia de una interacción entre partículas que genera una agregación de partículas de menor tamaño inicial (ver **figura 13**).

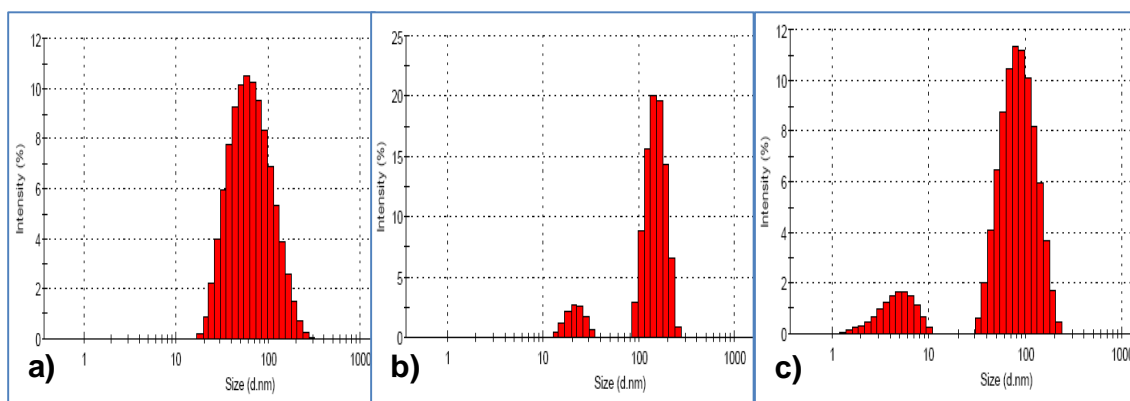
Figura 14 TEM de AgNPs sintetizadas empleando diferentes agentes reductores. **a)** Agente reductor hidracina **b)** Agente reductor iones citrato.



La **figura 14** revela la forma y tamaño de las AgNPs sintetizadas empleando como agente reductor hidracina e iones citrato, respectivamente. En la microscopía de las AgNPs sintetizadas con hidracina se observan mono dispersas con un tamaño definido esférico en su mayoría, con un tamaño promedio que no supera los 50nm. Aunque están muy cerca no presentan agregación. Por el contrario, las AgNPs sintetizadas con iones citrato no presenta una forma definida exhibiendo agregados en forma de “clústers” de tamaños cercanos a 100nm lo que podría afectar tanto sus propiedades físicas, químicas como antibacterianas.

5.2.3 Dispersión de luz en modo dinámico. El análisis de distribución de tamaño empleando dispersión de luz en modo dinámico (DLS) mostró cambios drásticos entre las AgNPs sintetizadas empleando diferentes tipos de agentes reductores (ver **figura 15**). En primer lugar, las AgNPs sintetizadas empleando cisteína presentaron tamaños promedios intermedios y sin polidispersión, es decir, que sólo se observó un tipo de población con una distribución de tamaños homogénea.

Figura 15 DLS de AgNPs sintetizadas empleando diferentes agentes reductores. a) Agente reductor cisteína. b) Agente reductor iones citrato. c) Agente reductor hidracina.



Las AgNPs sintetizadas empleando aniones citrato presentaron el mayor diámetro y dos poblaciones que en promedio representan nanopartículas de más de 100nm

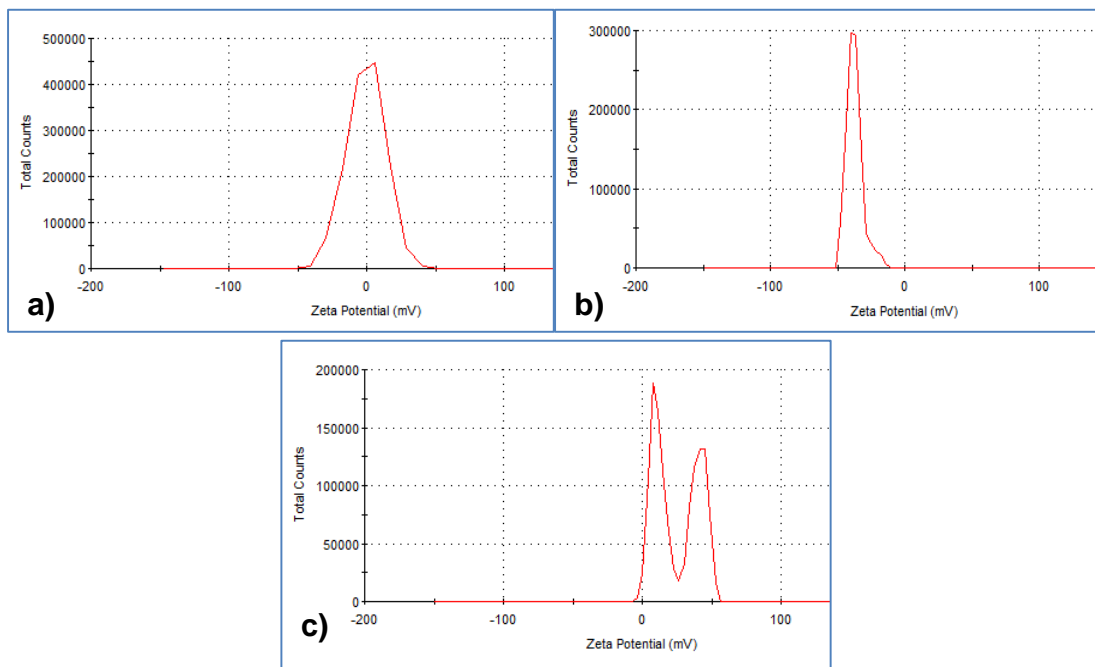
(**tabla 3**). Estos resultados indican que la síntesis podría ser ineficiente para aplicaciones que requieran control de tamaño. Por el contrario, las AgNPs sintetizadas empleando hidracina como agente reductor, mostraron el menor tamaño promedio de todas las síntesis realizadas (Ver **tabla 3**). Sin embargo, la **figura 15** reveló que no se obtuvo una distribución homogénea en el tamaño de las AgNPs, sino dos poblaciones bien definidas, una con un tamaño menor de 10nm y otra en un rango entre 50-100nm.

Tabla 3 Tamaños promedio de AgNPs sintetizadas empleando diferentes agentes reductores.

AGENTE REDUCTOR	TIPO DE AgNPs	TAMAÑO PROMEDIO (d, nm)
Cisteína	Ia-2	55.29
	Ic-3	97.22
	Id-1	64.77
Citrato	IIC-2	127.60
	IId-1	202.5
Hidracina	IIIa-2	79.38
	IIId-2	48.77

5.2.4 Potencial Z. El potencial zeta es una medida de la estabilidad de una partícula e indica el potencial que se requiere para penetrar la capa de iones circundante en la partícula para desestabilizarla. Por lo tanto, el potencial zeta es la potencia electrostática que existe entre la separación de las capas que rodean a la partícula (Sandoval *et al.* 2003). En la **figura 16**, se aprecian los picos en conteos totales del potencial zeta medido para las AgNPs sintetizadas empleando tres diferentes agentes reductores.

Figura 16 Potencial Zeta de AgNPs sintetizadas empleando diferentes agentes reductores. a) Cisteína b) Iones citrato c) Hidracina.



De acuerdo con lo presentado en la **figura 16**, para las AgNPs sintetizadas empleando cisteína con la más baja agitación, se observó una carga superficial ligeramente negativa (ver **tabla 4**), mientras que para la solución coloidal que se agitó más fuertemente (I-c-3) se presentó una carga superficial negativa mayor. Así mismo, las AgNPs obtenidas empleando aniones citrato mostraron la mayor carga superficial negativa para el caso de la síntesis realizada en ultrasonido (II-d-1) mientras que para la síntesis que se agitó fuertemente (II-c-2) la carga superficial fue cero. Estos resultados demuestran que la variación en el método de agitación empleado (magnética o ultrasónica) ejerce un efecto sobre la carga superficial de las AgNPs. Finalmente, las AgNPs sintetizadas empleando hidracina exhibieron una carga superficial positiva superior a 20mV, lo que indica que estas nano partículas son más estables. Valores que se encuentren en un rango por fuera de -20mV a 20mV reflejan una mayor estabilidad de las soluciones

coloidales. La estabilidad de las soluciones coloidales indica si las partículas de un líquido tienden a asociarse o a formar sedimentos (Petica *et al.*, 2008).

Tabla 4 Carga superficial de AgNPs sintetizadas empleando diferentes agentes reductores.

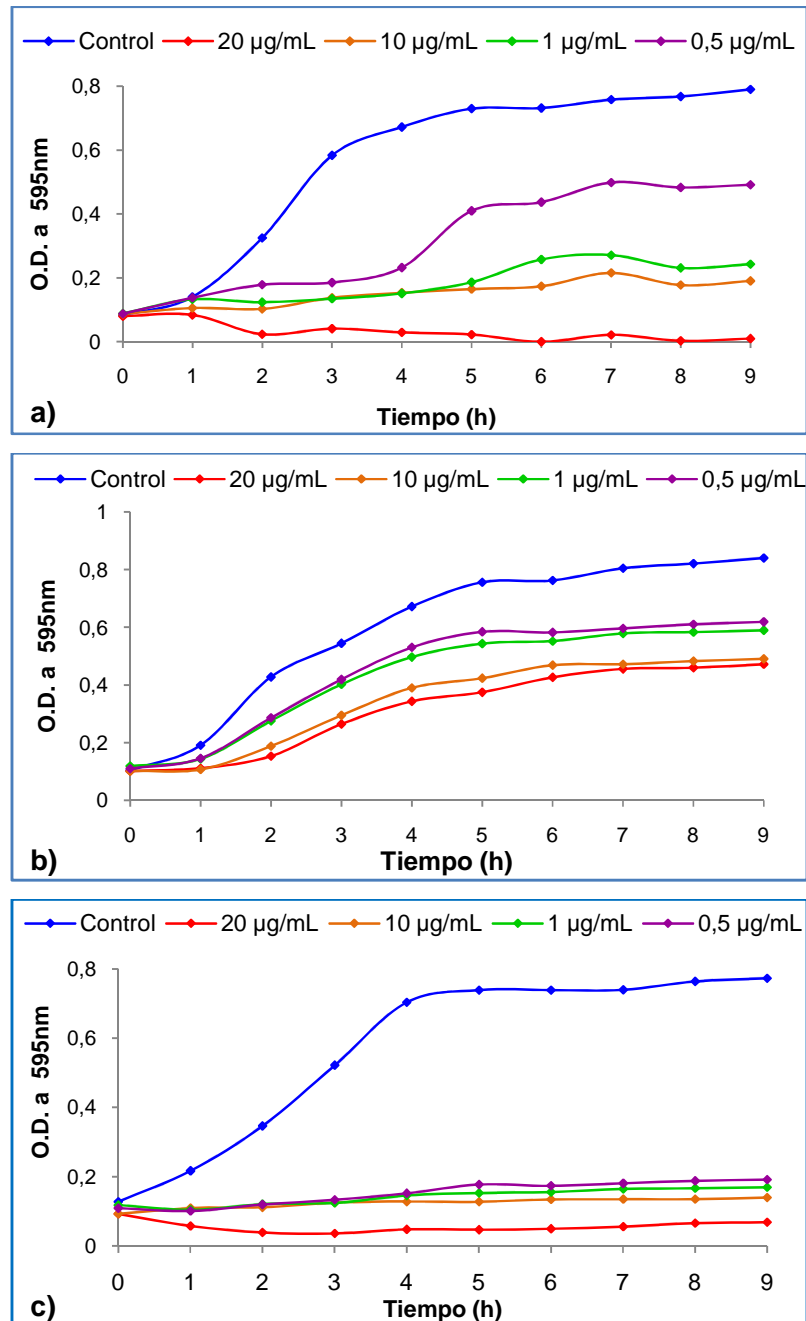
Agente reductor	Tipo de AgNPs	Carga superficial (mV)
Cisteína	I a-2	-0.51
	I c-3	-8.70
	I d-1	-2.29
Citrato	IIc-2	0.00
	IIId-1	-37.30
Hidracina	IIIa-2	24.80
	IIIId-2	24.30

5.3 PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS

Se realizó la evaluación de las propiedades antibacterianas de las AgNPs frente a dos cepas patógenas: *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) como modelos de bacterias Gram-negativa y Gram-positiva, respectivamente. La determinación del efecto antibacteriano se llevó a cabo empleando dos diferentes métodos: en medio líquido por microdilución y por difusión de disco (método de Kirby-Bauer). A continuación, se presentan los resultados obtenidos de inhibición del crecimiento bacteriano en presencia de AgNPs.

5.3.1 Determinación de CMI y CMB contra *Escherichia coli* O157:H7. Se evaluó la cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 en presencia de diferentes concentraciones de AgNPs. La **figura 17** muestra que a medida que se aumenta la concentración de AgNPs, es mayor el efecto inhibitorio frente a *E. coli* O157:H7.

Figura 17 Cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 en presencia de AgNPs a) Sintetizadas con cisteína b) Sintetizadas con citrato c) Sintetizadas con hidracina.



Las curvas de crecimiento bacteriano se dividen en cuatro fases: fase de latencia, donde las células bacterianas aumentan de tamaño para comenzar la división

celular; la fase logarítmica, donde las células doblan su población a un ritmo constante y exponencial; la fase estacionaria, donde algunas células mueren y otras siguen creciendo y dividiéndose, por lo tanto no hay aumento o disminución en el número de células; y la fase de muerte, donde la velocidad de muerte celular es cada vez mayor a medida que transcurre el tiempo (Amin *et al.*, 2009). En la **figura 16** se observa que para *E. coli* O157:H7 el tiempo necesario para cursar la fase de latencia es solo una hora, y en presencia de las AgNPs sintetizadas con cisteína y citrato no se evidencia aún un efecto inhibitorio. Sin embargo, en presencia de las AgNPs sintetizadas con hidracina desde esa fase se presentó una disminución en el crecimiento bacteriano. Aun así, se evidencia una inhibición en el crecimiento bacteriano desde 30% para las AgNPs sintetizadas con citrato hasta 50% para las AgNPs sintetizadas con cisteína e hidracina a partir de la fase logarítmica.

Tabla 5 Resultados obtenidos de CMI y CMB de las AgNPs sintetizadas contra *E. coli* O157:H7 (ver convenciones tabla 2).

Agente reductor	Tipo de AgNPs	CMI ₅₀ µg/mL	CMI ₉₀ µg/mL	CMI ₉₉ µg/mL	CMB µg/mL
Cisteína	I-a-2	<0.25	0.25	0.50	0.50
	I-c-3	1	10	20	20
	I-d-1	0.5	10	20	1
Citrato	II-c-2	20	>80	>80	---
	II-d-1	>80	>80	>80	---
Hidracina	III-a-2	<0.25	5	1	10
	III-d-2	<0.25	1	5	5

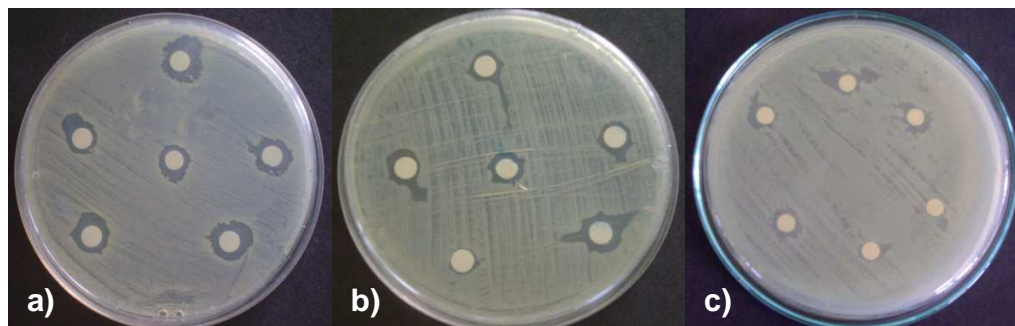
En la **tabla 5** se resumen los resultados de inhibición del crecimiento bacteriano por el método de microdilución. Se puede apreciar que se presentó una mayor actividad de las AgNPs sintetizadas con hidracina, seguidas por las AgNPs sintetizadas con cisteína y finalmente las AgNPs con citrato. Estos resultados están acorde con las propiedades físicas de las mismas, ya que las AgNPs sintetizadas con hidracina tienen el menor tamaño y la mayor actividad.

Ha sido ampliamente publicado que el efecto antibacteriano de las AgNPs depende, entre otros factores, del tamaño de las mismas (Morones *et al.*, 2005; Baker *et al.*, 2005; Lok *et al.*, 2007; Martinez *et al.*, 2010). Así pues se ha establecido que las nanopartículas de tamaños más pequeños tienen mayor superficie disponible para la interacción con la superficie de la membrana, lo que podría generar una alteración de algunas funciones primarias como la permeabilidad y la respiración (Panacek *et al.*, 2006).

De igual forma, se observa que la concentración mínima inhibitoria de las AgNPs sobre *E. coli* O157:H7 es dosis-dependiente, lo que quiere decir que a mayor concentración de AgNPs se presenta un mayor efecto antibacteriano. Se puede observar que se alcanzaron concentraciones mínimas bactericidas desde 0.50 µg/mL, valores que superan lo publicado en la literatura para *E. coli* O157:H7 (Rastogi *et al.*, 2011).

Otro factor que influye significativamente sobre las propiedades antibacterianas de las AgNPs es la carga superficial. Existen publicaciones en la literatura que muestran que la atracción electrostática entre la carga negativa de la membrana exterior de la bacteria y la carga positiva de las nanopartículas es crucial para la actividad antibacteriana (Stoimenov *et al.*, 2002; Hamounda y Baker, 2000; Sondi y Salopek-Sondi, 2004). La carga global de las células bacterianas es negativa a valores de pH biológicos, lo cual se debe al exceso en número de grupos carboxílicos, y además, a la presencia de residuos de varios aminoácidos (especialmente arginina) cuyas cargas no están neutralizadas por residuos ácidos (Nikaido, 2003). Como se puede observar en la **tabla 4**, los resultados de actividad antibacteriana guardan esta misma relación, pues las AgNPs sintetizadas con hidracina presentaron carga superficial positiva (24.80 y 24.30 mV), y fueron las que exhibieron mayor potencial tanto inhibitorio como bactericida frente a la cepa de interés.

Figura 18 Efecto de inhibición de *E. coli* O157:H7 cultivada en medio Muller-Hilton (MH), utilizando AgNPs sintetizadas con diferentes agentes reductores a) Cisteína b) Iones citrato c) Hidracina.



Para el caso de determinación de la actividad en placas de agar por el método Kirby-Bauer, se observaron halos de inhibición en un rango de valores de 6-9mm (ver **tabla 6**). Estos resultados muestran correlación con los obtenidos por el método de microdilución, siendo más sensible éste último. Debido a que los halos de inhibición fueron medidos sobre las placas de agar con una precisión de 1mm de resolución, existe la posibilidad de errores relativos a la medida. Sin embargo, el método ilustra el efecto potencial de las nanopartículas sobre la cepa de estudio. Ciertos estudios de actividad antibacteriana de AgNPs han empleado estos dos métodos, encontrando resultados similares a los señalados en el presente trabajo (Ruparelia *et al.*, 2007).

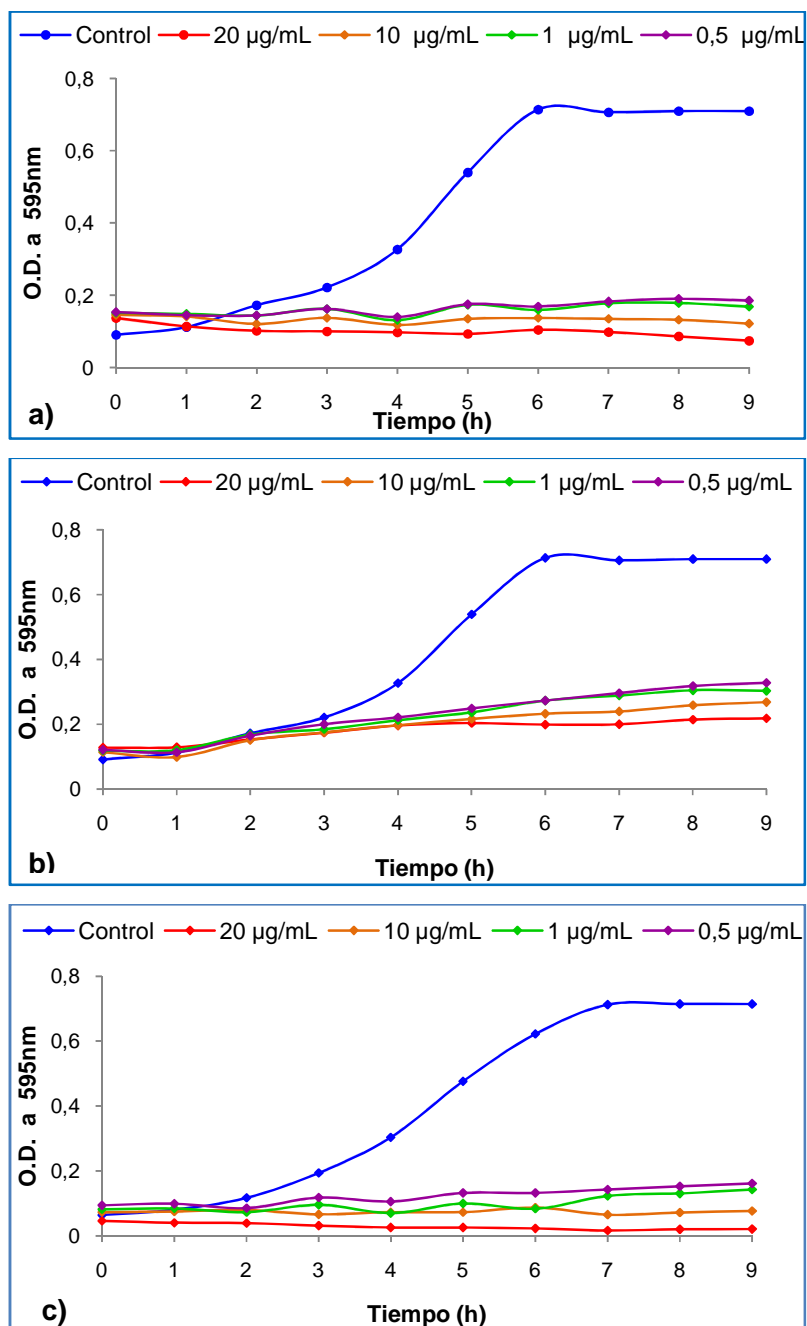
Al comparar los dos métodos, se puede inferir que la mayor sensibilidad del método de microdilución se debe a que en medio líquido existe una mayor interacción entre las células bacterianas y las AgNPs teniendo en cuenta que el ensayo se lleva a cabo a una agitación constante de 200 rpm. Mientras que en los estudios con placas de agar, la baja difusión en el medio sólido dificulta la interacción entre las AgNPs y las bacterias.

Tabla 6 Efecto de inhibición de *E. coli* O157:H7 en presencia de las AgNPs sintetizadas por el método de difusión de disco.

Agente reductor	Tipo de AgNPs	Concentración de AgNPs (µg/mL)	Halo de inhibición (mm)
Cisteína	I-a-2	50	9
		20	6
	I-c-3	50	9
		20	8
		5	7
	I-d-1	50	9
Citrato		5	7
	II-c-2	50	9
		20	8
	II-d-1	20	8
		10	7
Hidracina	III-a-2	20	7
		5	6
	III-d-2	20	8
		5	6

5.3.2 Determinación de CMI y CMB contra *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (SARM). Se realizó la cinética de crecimiento de *S. aureus* resistente a metilina (SARM) en presencia de las AgNPs sintetizadas a diferentes concentraciones siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.3.1.1. La **figura 19** muestra que el efecto inhibitorio se incrementa a medida que se adiciona una concentración mayor de AgNPs. En las cinéticas de crecimiento de *E. coli* O157:H7 en presencia de AgNPs se obtuvo un resultado similar.

Figura 19 Cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (SARM) en presencia de AgNPs a) Sintetizadas con cisteína b) Sintetizadas con citrato c) Sintetizadas con hidracina.



En la **tabla 7** se resumen los resultados de inhibición del crecimiento bacteriano por el método de microdilución en caldo. Al igual que para *E. coli* O157:H7, el efecto inhibitorio y bactericida de las AgNPs contra *S. aureus* resistente a Meticilina presentó un orden descendente de actividad conforme se incrementaba el tamaño promedio de las nanopartículas. De este modo, las AgNPs sintetizadas con hidracina presentaron la mayor actividad teniendo en cuenta las propiedades físicas que indican un menor tamaño y una carga superficial positiva.

Sin embargo, al comparar los resultados de actividad antibacteriana, se observó que los valores de concentración mínima inhibitoria y bactericida fueron menores para la cepa Gram-positiva (*S. aureus*) que para la cepa Gram-negativa (*E. coli*) para todos los tipos de AgNPs evaluados. Se sabe que la diferencia entre la pared externa de las bacterias Gram-positivas y negativas de las bacterias está dada por el grado de permeabilidad, con un límite de exclusión de sustancias con un peso molecular de más de aproximadamente 600 Da para las células Gram-negativas. (Nikaido, 2003; Madigan *et al.*, 2003).

Adicionalmente, las bacterias Gram-positivas tienen una pared celular constituida por un heteropolímero, el peptidoglicano mureína, que está muy desarrollado y puede presentar hasta 40 capas y contiene ácidos teitoicos. Los ácidos teitoicos son cadenas de moléculas de glicerina o ribitol esterificadas entre sí por puentes fosfato, que poseen una fuerte carga negativa y se unen probablemente a la mureína a través del fosfato formando una amida. Por el contrario, la pared celular de las bacterias Gram-negativas contiene grandes cantidades de lipoproteínas y lipopolisacáridos que representan hasta el 80 % del peso seco de la pared celular, y presentan una interna red de peptidoglicano de mureína de una sola capa. La función del lipopolisacárido en las bacterias es la de incapacitar las defensas del huésped, proporcionar carga negativa a la superficie de la membrana y estabilizarla. Así pues, en ambos casos, las bacterias se hacen susceptibles a interacciones electrostáticas cuando están en presencia de agentes

antibacterianos de carga positiva (Strominger *et al.*, 1959; Schleifer y Kandler, 1972; Wal *et al.*, 1997; Wal (2) *et al.*, 1997).

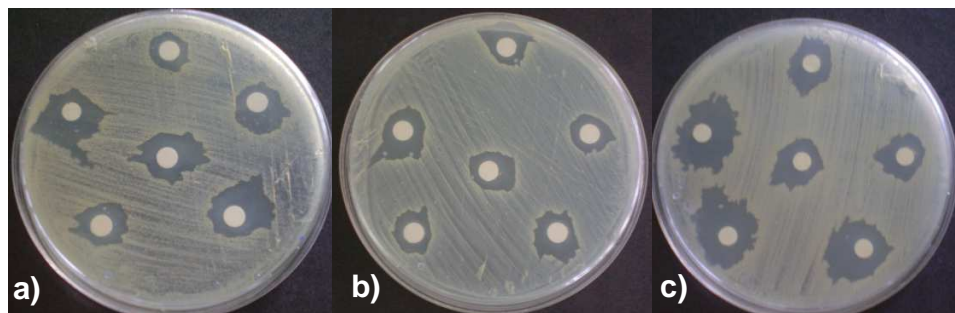
La pared externa de bacterias Gram-negativas actúa como una barrera de permeabilidad debido a la presencia de una capa de lipopolisacáridos que es capaz de excluir a las macromoléculas y las sustancias hidrófilas, por lo tanto puede ser responsable de la resistencia intrínseca de bacterias Gram-negativas (Nikaido, 2003). Por lo tanto, *S. aureus* resistente a meticilina es más susceptible a los efectos bactericidas de las AgNPs sintetizadas que *E. coli* O157:H7. De igual forma, publicaciones preliminares afirman obtener efectos antibacterianos de AgNPs mayores para bacterias Gram-positivas que para Gram-negativos (Amin *et al.*, 2009; Nanda y Saravanan, 2009).

Tabla 7 Resultados obtenidos de CMI y CMB de las AgNPs sintetizadas cisteína contra *S. aureus* resistente a meticilina.

Agente reductor	Tipo de AgNPs	CMI ₅₀ µg/mL	CMI ₉₀ µg/mL	CMI ₉₉ µg/mL	CMB µg/mL
Cisteína	I-a-2	< 0.25	0.25	0.50	1
	I-c-3	< 0.25	0.50	10	10
	I-d-1	< 0.25	0.25	1	5
Cittrato	II-c-2	<0.25	1	20	---
	II-d-1	5	80	>80	---
Hidracina	III-a-2	< 0.25	1	5	5
	III-d-2	< 0.25	0.50	1	1

De igual manera, los resultados obtenidos por el método de Kirby-Bauer mostraron halos de inhibición de mayor tamaño (ver **tabla 8**) en comparación a los logrados para *E. coli* O157:H7. A pesar de no ser halos completamente circulares, (ver **figura 19**) si se aprecia un incremento en la zona de inhibición de la bacteria, lo que indica que es susceptible a las AgNPs probadas y guarda relación con los datos obtenidos en el método de microdilución en caldo.

Figura 20 Efecto de inhibición de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) cultivada en medio Muller-Hilton (MH), utilizando AgNPs sintetizadas con diferentes agentes reductores a) Cisteína b) Iones citrato c) Hidracina.



Adicionalmente, teniendo en cuenta que el método de Kirby-Bauer fue menos sensible que el método de microdilución, sólo se pudieron observar halos de inhibición medibles para ambas cepas estudiadas sólo cuando se adicionaron concentraciones de AgNPs muy por encima de las concentraciones mínimas inhibitorias al 50%.

Tabla 8 Diámetros de inhibición de *S. aureus* resistente a meticilina en presencia de las AgNPs sintetizadas por el método de difusión de disco.

Agente reductor	Tipo de AgNPs	Concentración de AgNPs (µg/mL)	Halo de inhibición (mm)	
Cisteína	I-a-2	50	14	
		20	12	
	I-c-3	50	10	
		20	11	
		10	10	
	Citrato	I-d-1	20	12
10			11	
II-c-2		50	10	
		20	9	
		II-d-1	20	10
			10	9
Hidracina	III-a-2	50	12	
		20	12	
	III-d-2	50	11	
		10	10	

Algunas publicaciones se han enfocado en la elucidación del mecanismo de acción bacteriostático y bactericida de las AgNPs. Se ha propuesto la formación de “piscinas” en la superficie de bacteria que altera la permeabilidad, así como demás funciones básicas celulares como la respiración, desencadenando la muerte celular. Otros estudios demuestran que la plata coloidal puede reaccionar con sulfhidrilos (-S-H) en los grupos de la pared celular para formar puentes R-S-S-R que conducirían al bloqueo celular y la muerte de la bacteria. Así mismo, micrografías de *E. coli* después de ser tratada con AgNPs revelan que se causa un daño significativo sobre la pared celular y la posterior ruptura de la misma.

Adicionalmente, se ha encontrado evidencia de que la unión de las AgNPs a la membrana exterior causa acumulación de precursores de proteínas lo que da lugar a la disipación de la fuerza motriz de los protones de intercambio presentes en la membrana celular. No obstante, aún existe controversia sobre si al romper la membrana, las AgNPs pueden ingresar al citoplasma bacteriano e interactuar con el ADN citoplasmático directamente evitando así su replicación (Sondi y Salopek-Sondi, 2004; Kumar *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2005; Lok *et al.*, 2006; Ruparelia *et al.*, 2008).

Sin embargo, lo que sí está claro, es que existe una afinidad por la membrana celular bacteriana, ya sea por unión a grupos sulfhidrilos, o por interacción electrostática o por la formación de piscinas de plata, que causa finalmente el colapso de la misma permitiendo la entrada de las AgNPs a la zona intracelular de la bacteria provocando la muerte celular. Aunque en el presente estudio no se implementaron técnicas para determinar a fondo el mecanismo de las AgNPs frente a las dos cepas estudiadas, si se puede asumir que es probable que el mecanismo de acción de las AgNPs esté relacionado con la afinidad que presentaron por la membrana celular, tanto por la carga superficial positiva y neta de las AgNPs obtenidas en algunos casos, como por el pequeño tamaño promedio

de las mismas, lo que permitió que interactuaran con la membrana celular para causar el efecto bactericida.

5.4 ANÁLISIS DEL EFECTO SINÉRGICO DE AGNPS CON ANTIBIÓTICOS

Con el fin de confirmar la existencia de un efecto sinérgico entre las AgNPs sintetizadas y los cuatro antibióticos elegidos: Ampicilina, Kanamicina, Eritromicina y Ofloxacin en estos estudios se llevó a cabo una cinética de crecimiento para cada cepa de acuerdo con los parámetros establecidos para un diseño experimental de Plackett-Burman y siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.4.1.1 (Plackett-Burman, 1946; John, 1996)

5.4.1 Diseño experimental de Plackett-Burman. Se realizó una serie de doce experimentos para cada cepa, empleando cuatro antibióticos: Ampicilina, Eritromicina, Kanamicina y Ofloxacin para *E. coli*. mientras que para *S. aureus* sólo se emplearon tres: Eritromicina, Kanamicina y Ofloxacin. Las matrices y niveles seleccionados se muestran en las **tablas 1, 2 y 3** del Anexo C. En la **tabla 9** se muestran las AgNPs seleccionadas para esta serie de experimentos que presentaron bajas concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) al 50% para cada cepa patógena.

Tabla 9 Nomenclatura implementada para las AgNPs seleccionadas en el diseño experimental de Plackett-Burman.

TIPO DE AgNPs		AgNPs EVALUADA CONTRA <i>E. coli</i>	AgNPs EVALUADA CONTRA <i>S. aureus</i>
NOMENCLATURA	AGENTE REDUCTOR		
AgNPs (1)	Cisteína	I-b-3	I-d-3
AgNPs (2)	Citrato	II-b-3	II-d-1
AgNPs (3)	Hidracina	III-d-1	III-a-2

En la **tabla 10** se muestran los porcentajes de inhibición de crecimiento bacteriano obtenidos para *E. coli* y *S. aureus* bajo las mismas condiciones experimentales. Los

porcentajes de inhibición revelan un efecto sinérgico combinado pues cada variable por separado sólo presentaba porcentajes de inhibición de 50%. Por otra parte, se puede apreciar que la inhibición fue mayor para *S. aureus* resistente a meticilina que para *E. coli* O157:H7 en la mayoría de los casos, lo cual se corresponde con lo obtenido para las AgNPs (3) sintetizadas en ausencia de antibióticos en el medio.

Tabla 10 Porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano en los doce experimentos frente *E. coli* y *S. aureus*.

EXPERIMENTO	% INHIBICIÓN CONTRA <i>E. coli</i>	% INHIBICIÓN CONTRA <i>S. aureus</i>
PB1	58.56	85.74
PB2	86.42	93.93
PB3	91.93	90.55
PB4	91.87	88.75
PB5	76.96	78.67
PB6	37.55	33.37
PB7	84.73	96.73
PB8	79.45	97.31
PB9	13.11	33.66
PB10	56.35	97.81
PB11	28.76	98.94
PB12	92.88	98.31

Para evaluar los resultados de los ensayos del diseño experimental se determinó el efecto de la variable, el valor de *t-student* y el nivel de confianza empleando como variable de respuesta el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano. Estos valores se pueden apreciar en las **tablas 11 y 12**. El parámetro de efecto de variable muestra que entre los antibióticos más significativos se encuentra la Kanamicina y entre las nanopartículas, las AgNPs proveniente de la síntesis con hidracina para el caso la inhibición del crecimiento de *E. coli* O157:H7. Así mismo, el nivel de confianza permite corroborar la significancia en el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de estas dos variables, pues en ambos casos superaron el 90% y presentaron la mayor actividad antibacteriana frente a *E. coli* O157:H7.

Por otro lado, la Kanamicina es un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro bacteriano, que tiene como mecanismo de acción unirse irreversiblemente a la subunidad 30S de los ribosomas con el fin de evitar la síntesis proteica. Es probable que se presente un efecto sinérgico entre el antibiótico y las nanopartículas sintetizadas con hidracina debido a que éstas podrían facilitarle la entrada en el citoplasma bacteriano, permitiéndole actuar más eficazmente sobre los ribosomas inhibiendo la síntesis de nuevas proteínas en la bacteria (Semenkov *et al.*, 1982; Barranco, 1998).

Tabla 11 Resultados del análisis estadístico del efecto de AgNPs y diferentes antibióticos sobre el porcentaje de inhibición contra *E. coli* O157:H7.

	EFFECTO DE VARIABLE	VALOR- t	NIVEL DE CONFIANZA (%)
Ampicilina	-0.174	-0.054	---
Kanamicina	19.756	6.1032	99.75-99.9
Eritromicina	11.763	3.634	99-99.5
Ofloxacina	7.124	2.201	95-97.5
AgNPs (1)	-3.429	-1.059	---
AgNPs (2)	3.831	1.183	80-90
AgNPs (3)	6.443	1.990	90-95

Se determinaron los mismos parámetros para las seis variables frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (ver **tabla 12**). De estos resultados, se encontró que las variables más significativas fueron Eritromicina y las AgNPs (3).

De igual manera, como se observó en los resultados para *E. coli* O157:H7, se evidenció un efecto sinérgico entre AgNPs (3), Kanamicina y adicionalmente Eritromicina frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Dado que el mecanismo de la Eritromicina es unirse reversiblemente a la subunidad 50S del ribosoma que inhibe la translocación del aminoacil RNA de transferencia, y por

ende la síntesis de péptidos bacterianos, es posible que la sinergia presentada se deba a que cada tipo de antibiótico actúa sobre una parte diferente del ribosoma, lo cual incrementa su actividad antibacteriana gracias a que las AgNPs (3) permiten un más fácil acceso a los ribosomas (González *et al.*, 1998; Álvarez y García, 2002).

Tabla 12 Resultados del análisis estadístico del efecto de AgNPs y diferentes antibióticos sobre el porcentaje de inhibición contra *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina.

	EFFECTO DE VARIABLE	VALOR- t	NIVEL DE CONFIANZA (%)
Kanamicina	8.906	1.357	80-90
Eritromicina	9.437	1.438	90
Ofloxacina	-1.007	-0.153	---
AgNPs (1)	2.671	0.407	<70
AgNPs (2)	2.491	0.379	<70
AgNPs (3)	11.016	1.678	90-95

El diseño experimental de Plackett-Burman (PB) se ha utilizado frecuentemente para la selección de las variables que tengan el mayor impacto en un proceso. Aunque ha sido aplicada a una gran variedad de bioprocesos, no existe referencia alguna que emplee este diseño para evaluar el efecto sinérgico entre AgNPs y antibióticos. Sin embargo, en una comparación de varios diseños experimentales con muchas variables, se encontró que el diseño PB era el más adecuado para la elección de las variables importantes, ya que con un diseño PB se puede obtener información del efecto de las variables sólo con dos niveles. Otra consideración en la elección del diseño del PB en estudios de optimización es la relación entre el número de experimentos que se llevó a cabo con el número de variables analizadas. Mientras que el diseño de PB es un diseño factorial fraccional de bloques incompletos, que permite el análisis eficiente de (N-1) variables en los N experimentos, un diseño factorial completo de 11 variables en dos niveles

requeriría 2.048 experimentos (Williams, 1963; AkImazarova, 1982; Rao y Divakar, 2001; Cho *et al.*, 2009; Ali y Haq, 2010).

Este método sirve como un método de optimización preliminar, puesto que sólo se puede aplicar de manera eficiente a los sistemas donde las interacciones entre las variables son pequeñas en comparación con su impacto en el proceso en estudio. Aun así, a través de este diseño experimental se pudo observar claramente como cada una de las combinaciones de las variables afecta de manera directa el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano en cada caso.

5.4.2 Optimización del diseño. Para la realización de la optimización del diseño experimental se eligieron las variables que mostraron un nivel de confianza igual o superior a 90% usando un diseño centrado en las caras compuesto (CCD). Por lo tanto, para el porcentaje de inhibición contra *E. coli* O157:H7 se emplearon cuatro variables: AgNPs (3), Kanamicina, Eritromicina y Ofloxacina, mientras que para el caso el porcentaje de inhibición contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina se utilizaron tres variables: AgNPs (3), Kanamicina y Eritromicina. Los niveles de las variables probadas en la optimización por el diseño centrado en las caras compuesto (CCD) contra ambas cepas patógenas se describen en las **tablas 4 y 5** del anexo D.

Tabla 13 Resultados de la variable respuesta aplicada a las dos cepas de interés en los experimentos de optimización.

EXPERIMENTO	% INHIBICIÓN CONTRA <i>E. coli</i>	% INHIBICIÓN CONTRA <i>S. aureus</i>	EXPERIMENTO	% INHIBICIÓN CONTRA <i>E. coli</i>	% INHIBICIÓN CONTRA <i>S. aureus</i>
OPB1	89.45	93.13	OPB17	92.69	76.80
OPB2	89.45	94.43	OPB18	88.82	73.50
OPB3	90.51	93.35	OPB19	87.55	80.81
OPB4	88.77	95.23	OPB20	87.76	86.75
OPB5	88.71	94.21	OPB21	92.47	
OPB6	89.14	96.38	OPB22	90.67	
OPB7	90.30	99.22	OPB23	100	
OPB8	89.77	97.24	OPB24	100	

EXPERIMENTO	% INHIBICIÓN CONTRA <i>E. coli</i>	% INHIBICIÓN CONTRA <i>S. aureus</i>	EXPERIMENTO	% INHIBICIÓN CONTRA <i>E. coli</i>	% INHIBICIÓN CONTRA <i>S. aureus</i>
OPB9	91.94	98.75	OPB25	100	
OPB10	97.99	89.02	OPB26	100	
OPB11	100	96.48	OPB27	94.49	
OPB12	95.23	100	OPB28	91.04	
OPB13	100	73.14	OPB29	99.68	
OPB14	100	78.29	OPB30	97.30	
OPB15	100	80.86	OPB31	74.62	
OPB16	99.31	78.64			

Como resultado de los porcentajes de inhibición obtenidos para cada caso, se realizó el análisis posterior en el Software STATISTICA versión 8.0, con el fin de hallar los coeficientes de regresión empleando un modelo de regresión múltiple. El análisis arrojó las siguientes ecuaciones polinómicas de pseudo-segundo orden:

$$Y = 82,73 + 13,37X_1 - 3,53X_1^2 + 0,059X_2 - 0,0001X_2^2 + 0,26X_3 - 0,0065X_3^2 - 10,99X_4 + 2,73X_4^2$$

Ecuación 1.

$$Y = 44 + 3770X_1 - 177809X_1^2 + 2X_2 + X_3$$

Ecuación 2.

Las dos ecuaciones permiten obtener los valores óptimos de cada variable que conducen a un máximo en la variable de respuesta, es decir, un 100% de inhibición del crecimiento bacteriano para cada cepa patógena.

La ecuación 1 revela los efectos de las interacciones entre las cuatro variables optimizadas para el porcentaje de inhibición, como variable de respuesta (Y) contra *E. coli* O157:H7. De allí se puede observar que la variable X₂ (Kanamicina) y X₃ (Eritromicina) no representan valores determinantes, mientras que las variables X₁(AgNPs (3)) y X₄(Ofloxacina), al igual que el intercepto, muestran

valores grandes, lo que significa que los valores óptimos para una variable de respuesta del 100% dependerá principalmente de ellas.

De igual manera, la ecuación 2 muestra los efectos de las interacciones entre las tres variables optimizadas para el caso de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y permite demostrar que la variable determinante será la variable X_1 (AgNPs (3)) para la obtención de un 100% de inhibición del crecimiento bacteriano, lo que indica que es la variable que más influye en la inhibición con respecto a las otras dos.

Así mismo, se realizaron las gráficas 3D de superficie de respuesta para cada dos variables con respecto a la variable de respuesta, para cada caso (ver anexo C **figuras 1 y 2**).

De las gráficas tridimensionales se puede apreciar que las interacciones que arrojan un solo máximo en la variable de respuesta se encuentran entre AgNPs (3)- Eritromicina, AgNPs (3)-Kanamicina, Eritromicina-Kanamicina. Sin embargo, para las interacciones entre Ofloxacina y cualquiera de las otras variables, no se aprecia un único máximo de porcentaje de inhibición del crecimiento de *E. coli* O157:H7. Para las interacciones entre Eritromicina y Kanamicina con AgNPs (3) se observa que el porcentaje de inhibición aumenta conforme se incrementan los valores de ambas variables llegando a valores cercanos a 100% de inhibición. Estos resultados demuestran que las AgNPs (3) es una variable importante e influyente en el proceso, y que presenta sinergia con cada uno de estos dos antibióticos de mecanismos de acción diferentes.

Por otra parte, cuando la variable de respuesta fue el porcentaje de inhibición del crecimiento de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM), se encontró que en todos los casos sólo se presenta un máximo centrado en la superficie. A pesar de que se observa la existencia de un efecto sinérgico entre las tres variables evaluadas,

ninguna combinación supera un 90% de porcentaje de inhibición del crecimiento *S. aureus* resistente a meticilina (SARM).

El diseño compuesto centrado en las caras (CCD) es un diseño de superficie de respuesta muy utilizado cuando la región experimental se define por los límites superior e inferior de cada factor y no se extiende más allá de ellos. Este diseño permite identificar una combinación de factores que generen una respuesta óptima en la variable de respuesta, en este caso, el porcentaje de inhibición. Adicionalmente, se pueden identificar y cuantificar las interacciones significativas entre las variables a través de esta técnica (Neter *et al.*, 1996; Roukas *et al.*, 2011).

6. CONCLUSIONES

El uso de agitación después de la reacción de formación de AgNPses un parámetro importante en el proceso de obtención de las AgNPs, debido a que una agitación de 200 rpm durante una hora, favorece la obtención de nanopartículas de menor tamaño y carga superficial positiva.

Las AgNPs presentaron actividad antibacteriana con valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) desde 0.25 µg/mL y 1 µg/mL de AgNPs, respectivamente, tanto para *E. coli* O157:H7 como para *S. aureus* resistente a meticilina (SARM); estos valores son menores, y por tanto mejores, que los publicados en la literatura.

Las AgNPs sintetizadas empleando hidracina como agente reductor y CTAB como agente estabilizante exhibieron las mejores propiedades antibacterianas frente a *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* resistente a meticilina (SARM). Esto se debe probablemente a las propiedades físicas de las nanopartículas, tales, como el menor tamaño promedio y la mayor carga superficial positiva.

Las AgNPs sintetizadas bajo diferentes metodologías mostraron mayor actividad bacteriostática y bactericida frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) que frente a *E. coli* O157:H7.

El método de microdilución en caldo fue más sensible que el método por difusión de disco (Kirby-bauer) para determinar la actividad antibacteriana de las AgNPs. Esto se debe fundamentalmente a que se requirieron mayores concentraciones de AgNPs en el método de difusión de disco para observar un efecto inhibitorio significativo del crecimiento bacteriano con *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* resistente a meticilina (SARM)

El uso del diseño experimental del tipo Plackett-Burman fue una herramienta estadística adecuada para el estudio del efecto sinérgico entre AgNPs y antibióticos. Con este método se pudieron determinar las variables más significativas que afectaban la inhibición del crecimiento bacteriano de *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* resistente a meticilina.

A través del diseño experimental de Plackett-Burman se comprobó el efecto sinérgico entre las AgNPs y los antibióticos probados. Adicionalmente, el mayor efecto sinérgico se consiguió entre las AgNPs sintetizadas empleando hidracina como agente reductor y dos antibióticos de diferentes mecanismos de acción, Kanamicina y Eritromicina. Con estas combinaciones se alcanzaron porcentajes de inhibición superiores al 90% para *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* resistente a meticilina (SARM).

7. RECOMENDACIONES

Se requiere hacer un seguimiento del cambio en el tamaño promedio de las nanopartículas de acuerdo con los parámetros de reacción y en función del tiempo empleando técnicas experimentales como dispersión de luz en modo dinámico (DLS) o microscopía de transmisión electrónica (TEM).

Es necesario realizar estudios posteriores más especializados que permitan establecer las interacciones directas entre la membrana exterior de la bacteria y las AgNPs, empleando diferentes técnicas de separación como electroforesis en dos dimensiones y posterior análisis por espectrometría de masas.

Evaluar la actividad antibacteriana de las AgNPs sintetizadas bajo diferentes metodologías sobre otras bacterias de gran relevancia e interés clínico Gram-negativas, tales como *Pseudomona aeruginosa* o Gram-positivas como *Streptococcus pneumoniae*, este último agente causante de neumonía.

BIBLIOGRAFIA

Abou, Kholoud. Eftaiha, Ala'a. Al-Warthan, Abdulrhman.Ammar, Reda. **Synthesis and applications of silver nanoparticles.***Arabian J Chem.* 2010; 3, 135–140.

Ali, S. Haq, I. **Production of 3,4-dihydroxy L-phenylalanine by a newly isolated *Aspergillus niger* and parameter significance analysis by Plackett-Burman design.***BMC Biotechnology* 2010; 10(86), 2-8.

Álvarez, Marta. García, José. **Eritromicina. Descubrimiento, características y aplicaciones.** *OFFARM.* 2002; 21(2), 78-82.

Álvarez, Carlos. Yomayusa, Nancy. Leal, Aura. Moreno, Jaime. Méndez, Sebastian. Ibáñez, Milciades. Vanegas, Natasha. **Nosocomial infections caused by community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Colombia.***AJIC.* 2010; 38(4), 315-318.

Aklmazarova, S. Katarov, V. **Experiment optimization in Chemistry and Chemical Engineering.** Moscow: Mir editorial, 1982.

Amin, Rehab. Mohamed, Mona. Ramadan, Marwa. Verwanger, Thomas. Krammer, Barbara. **Rapid and Sensitive Microplate Assay for Screening the Effect of Silver and Gold Nanoparticles on Bacteria.** *Nanomedicine.* 2009; 4(6), 637-643.

Atiyeh, Bishara. Costagliola, Michael. Hayek, Shady. Dibo, Saad. **Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature.** *Burns.* 2007; 33, 139-48.

Ayala-Nuñez, Nilda. Lara, Humberto. Ixtepan, Liliana. Rodríguez, Cristina. **Silver Nanoparticles Toxicity and Bactericidal Effect Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Nanoscale Does Matter.***Nanobiotechnol.*2009; 5, 2–9.

Bai, Jie. Li, Yaoxian. Du, Jianshi. Wang, Shugang. Zheng, Jifu. Yang, Qingbiao. Chen, Xuesi. **One-pot synthesis of polyacrylamide-gold nanocomposite.***Mater Chem Phys.*2007; 106, 412–15.

Baker, C. Pradhan, A. Pakstis, L. Pochan, D. Shah S. **Synthesis and Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles.***J Nanosci Nanotechnol.*2005; 5, 244–9.

Barranco, Eva. **Aminoglucósidos.***Acta medic.* 1998; 8(1), 48-53.

Bauer, A. Kirby, W. Sherris, J. Turck M. **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.***Am J Clin Pathol.* 1966; 45(4), 493–496.

Bhui, Dipak. Bar, Harekrishna. Sarkar, Priyanka. Sahoo, Gobinda. Prasad, Sankar. Misra, Ajay. **Synthesis and UV–VIS spectroscopic study of silver nanoparticles in aqueous SDS solution.***J Mol Liq.* 2009;145, 33-37.

Blanco, J. Blanco, M. Blanco, J. Alonso, M. Escribano A. **Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico de las infecciones producidas por *Escherichia coli* enterohemorrágicas productores de verotoxinas.** *Enferm Infec Microbiol Clin.* 1993; 11, 325-334.

Burda, Clemens. Chen, Xiaobo. Narayanan, Radha. El-Sated, Mostafa. **Chemistry and properties of nanocrystals of different Shapes.***Chem Rev.* 2005; 105(4), 1025-1102.

Callegari, A. Tonti, D. **Chergui, M. Photochemically Grown Silver Nanoparticles with Wavelength-Controlled Size and Shape.***Nano Lett.* 2003; 11, 1565-68.

Carlson, C. Hussain, S. Schrand, A. Braydich-Stolle, L. Hess, K. Jones, R. Schlager, J. **Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of ReactiveOxygen Species.** *J Phys Chem B.* 2008; 112, 13608–19.

Chaloupka, Karla. Malam, Yogeshkumar. Seifalian, Alexander. **Nanosilver as a new generation of nanoprodukt in biomedical applications.***Trends in Biotechnology.*2010; 28 (11), 580-8.

Chen, X. Schluesener, H. Nanosilver: **A nanoprodukt in medical application.***Toxicol Lett.* 2008; 176(1), 1-12.

Cho, Kyung-Hwan.Park, Jong-Eun. Osaka, Tetsuya. Park, Soo-Gil.**The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient.***Electrochim Acta.*2005; 51, 956-60.

Choi, Okkyoung. Deng, Kathy. Kim, Nam-Jung. Ross, Louis. Surampalli, Rao. Hu, Zhiqiang. **The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth.***Water Res.* 2008; 42, 3066 – 74.

Cuesta, Joao. Mattar, Salim. Parra, Miguel. **Caracterización molecular de cepas de E. coli 0157: H7 aisladas de humanos en Bogotá, D.C.** *Salud UIS.* 2003; 35, 116-121.

Cushing, Brian. Kolesnichenko, Vladimir. O'Connor, Charles. **Recent Advances in the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles.***Chem Rev.* 2004; 104(9), 3893-3946.

Dadosh, Tali. **Synthesis of uniform silver nanoparticles with a controllable size.** *Mater lett.* 2009; 63, 2236-38.

Daxboeck, F. Budic, T. Assadian, O. Reich, M. Koller, W. **Economic burden associated with multi-resistant Gram-negative organisms compared with that formethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university teaching hospital.** *J Hosp Infect.* 2006; 62, 214–8.

Dibrov, Pavel. Dzioba, Judith. Gosink, Khoosheh. Häse, Claudia. **Chemiosmotic Mechanism of Antimicrobial Activity of Ag⁺ in *Vibrio cholerae*.** *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46 (8), 2668-70.

Evanoff, David. Chumanov, George. **Synthesis and Optical Properties of Silver Nanoparticles and Arrays.** *Chem Phys Chem.* 2005; 6, 1221 – 31.

García-Barrasa, Jorge. López-de-Luzuriaga, José. Monge, Miguel. **Silver nanoparticles: synthesis through chemical methods in solution and biomedical applications.** *Cent Eur J Chem.* 2011; 9 (1), 7-19.

Gonzalez, José. Barreto, Jesús. Rodríguez, Miguel. Pino, Pedro. Lima, Nora. **Macrólidos.** *Acta medic.* 1998; 8(1), 71-4.

Guignard, Bertrand. Entenza, José. Moreillon, Philippe. **β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Curr Opin Pharmacol.* 2005; 5, 479-89.

Hamouda, T. Baker, J. **Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in enteric Gram-negative bacilli.** *J Appl microbiol.* 2000; 89, 397-403.

He, Baolin. Tan, Juei. Liew, Kong. Liu, Hanfan. **Synthesis of size controlled Ag nanoparticles.** *J MolCatal A: Chem.* 2004; 221, 121-26.

Henglein, Arnim. **Colloidal Silver Nanoparticles: Photochemical Preparation and Interaction with O₂, CCl₄, and Some Metal Ions.** *Chem. Mater.* 1998;10, 444-450.

Henglein, Arnim. Giersig, Michael. **Formation of Colloidal Silver Nanoparticles: Capping Action of Citrate.** *J Phys Chem B.*1999;103, 9533-39.

Henglein, Arnim. **Physicochemical properties of small metal particles in solution: "microelectrode" reactions, chemisorption, composite metal particles, and the atom-to-metal transition.** *J Phys Chem.* 1993; 97(21), 5457-71.

Huang, H. Ni, X. Loy, G. Chew, C. Tan, K. Loh, F. Deng, J. Xu, G. **Photochemical Formation of Silver Nanoparticles in Poly(N -vinylpyrrolidone).***Langmuir.* 1996; 12(4), 909-12.

John, Peter. **Nesting Plackett-Burman designs.***Stat Probab Lett.* 1996; 27, 221-223.

Kamat, Prashant.**Photophysical, Photochemical and Photocatalytic Aspects of Metal Nanoparticles.***J Phys Chem B.* 2002; 106, 7729-44.

Khan, Zaheer.Al-Tnabaiti, Shaeel.El-Mossalamy, E. Obaid, Abdullah.**Effect of macromolecule poly(vinyl alcohol) on the growth of cetyltrimethylammonium bromide stabilized Ag-nanoparticles.***Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects.* 2009; 352, 31-37.

Khan, Zaheer. Al-Tnabaiti, Shaeel. El-Mossalamy, E. Obaid, A. **Studies on the kinetics of growth of silver nanoparticles in different surfactant solutions.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009; 73, 284-8.

Klasen, H. **Historical review of the use of silver in the treatment of burns I. Early uses.** *Burns*. 2000; 26, 117-130.

Kreibig, Uwe. Vollmer, Michael. **Optical Properties of Metal Clusters; Vol 25.** (1995): Springer Series in Materials Science.

Krutyakov, Yu. Olenin, A. Kudrinskii, A. Dzhurik, P. Lisichkin, G. **Aggregative stability and polydispersity of silver nanoparticles prepared using two-phase aqueous organic systems.** *Nanotechnologies in Russia*. 2008; 3 (5-6), 303-310.

Kumar, Siva. Nagaraja, B. Shashikala, V. Padmasri, A. Madhavendra, S. Raju, B. Rao, K. **Highly efficient Ag/C catalyst prepared by electro-chemical deposition method in controlling microorganisms in water.** *J Mol Catal A Chem*. 2004; 223, 313–9.

Kumar, Sanjeev. Gandhi, K. Kumar, R. **Modeling of Formation of Gold Nanoparticles by Citrate Method.** *Ind. Eng. Chem. Res*. 2007; 46, 3128-36.

Lee, P. Meisel, D. **Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols.** *J Phys Chem*. 1982; 86(17), 3391-5.

Leff, Daniel. Ohara, Pamela. Heath, James. Gelbart, William. **Thermodynamic Control of Gold Nanocrystal Size: Experiment and Theory.** *J Phys Chem*. 1995; 99, 7036-41.

Liu, Wen. **Nanoparticles and Their Biological and Environmental Applications.** *J Biosci Bioeng.* 2006; 102(1), 1-7.

Liz-Marzán, Luis. **Nanometals: formation and color.** *Materials today.* 2004; Feb, 26-31.

Lok, Chun-Nam. Ho, Chi-Ming. Chen, Rong. He, Qing-Yu. Yu, Wing-Yiu. Sun, Hongzhe. Tam, Paul. Chiu, Jen-Fu. Che, Chi-Ming. **Proteomic Analysis of the Mode of Antibacterial Action of Silver Nanoparticles.** *J Proteome Res.* 2006; 5, 916-24.

Lok, Chun-Nam. Ho, Chi-Ming. Chen, Rong. He, Qing-Yu. Yu, Wing-Yiu. Sun, Hongzhe. Tam, Paul. Chiu, Jen-Fu. Che, Chi-Ming. **Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities.** *J Biol Inorg Chem.* 2007; 12, 527-34.

Madigan, Michael. Martinko, Jhon. Parker, Jack. Brock **Biología de los microorganismos. Capítulo 12: La diversidad procariótica: bacteria.** Pearson Education. Décima edición (2003).

Maillard, Mathieu. Huang, Pinray. Brus, Louis. **Silver Nanodisk Growth by Surface Plasmon Enhanced Photoreduction of Adsorbed [Ag⁺].** *Nanoletters.* 2003; 3(11), 1611-15.

Mann, Nicholas. **The potential of phages to prevent MRSA infections.** *Res Microbiol.* 2008; 159, 400-405.

Martinez, Fidel. Olive, Peggy. Banuelos, Adriana. Orrantia, Erasmo. Niño, Nereyda. Morales, Elpidio. Ruiz, Facundo. Bach, Horacio. Av-Gay, Yossef. **Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and**

cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. *Nanomedicine: NBM.* 2010; 6(5), 681-8.

Maturana, Rossmery. **Síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas para aplicaciones biomédicas** [Tesis de pregrado] Universidad Industrial de Santander, escuela de ingeniería química, 2009.

McFarland, Joseph. **The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines.** *J Am Med Assoc.* 1907; 49, 1176-8.

Morones, Jose. Elechiguerra, Jose. Camacho, Alejandra. Holt, Katherine. Kouri, Juan. Ramirez, Jose. Yacaman, Miguel. **The bactericidal effect of silver nanoparticles.** *Nanotechnology.* 2005; 16, 2346-53.

Nagarajan, R. **Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization. Chapter 1: Nanoparticles: Building Blocks for Nanotechnology.** *ACS Symposium Series*, Vol. 996. (2008).

Nanda, Anima. Saravanan, M. **Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE.** *Nanomedicine: NBM.* 2009; 5(4), 452-6.

Neter, J. Kutner, M. Nachtsheim, C. Wasserman, W. **Applied linear statistical models.** *McGraw-Hill Inc*, Chicago. Edition fourth (1996).

Nikaido, Hiroshi. **Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited.** *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003; 67(4), 593-656.

Oliveira, Marcela. Ugarte, Daniel. Zanchet, Daniela. Zarbin, Aldo. **Influence of synthetic parameters on the size, structure, and stability of dodecanethiol-stabilized silver nanoparticles.** *J Colloid Interface Sci.* 2005; 292, 429–35.

Panacek, Ales. Kvitek, Libor. Pucek, Robert. Kolar, Milan. Vecerova, Renata. Pizurova, Nadezda. Sharma, Virender. Nevecna, Tatjana. Zboril, Radek. **Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity.** *J Phys Chem B.* 2006; 110, 16248-53.

Petica, A. Gavrilu, S. Lungu, M. Buruntea, N.Panzaru, C.**Colloidal silver solutions with antimicrobial properties.***Mater Sci Eng B.* 2008; 152, 22-27.

Pillai, Zeena. Kamat, Prashant. **What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method?** *J Phys Chem B.* 2004;108,945-51.

Plackett, R. Burman, J. **The Design of Optimum Multifactorial Experiments.***Biometrika.*1946; 33(4), 305-25.

Rai, Mahendra. Yadav, Alka. Gade, Aniket. **Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials.***Biotechnol Adv.* 2009; 27, 76-83.

Rao, Pramila. Divakar, S. **Lipase catalyzed esterification of α -terpineol with various organic acids: application of the Plackett–Burman design.***Process Biochem.* 2001; 36, 1125-28.

Rastogi, Shiva. Rutledge, Veronica. Gibson, Charlene. Newcombe, David. Branen, Josh. Branen, Larry. **Ag colloids and Ag clusters over EDAPTMS-coated silica nanoparticles: synthesis, characterization, and antibacterial activity against *Escherichia coli*.** *Nanomedicine: NBM.* 2011; 7, 305–314.

Roukas, Triantafyllos. Niavi, Panagiota. Kotzekidou, Parthena. **A new medium for spore production of *Blakeslea trispora* using response surface methodology.** *World J Microbiol Biotechnol.* 2011; 27, 307-17.

Ruiz, Juan. Mattar, Salim. **Accuracy of fecal lactoferrin and other stool tests for diagnosis of invasive diarrhea at a Colombian pediatric hospital.** *Ped Infect Dis J.* 1999; 18(4), 342-6.

Ruparelia, Jayesh. Chatterjee, Arup. Duttgupta, Siddhartha. Mukherji, Suparna. **Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles.** *Acta Biomater.* 2008; 4, 707–716.

Sánchez, Sergio. Martínez, Remigio. Alonso, Juan. Rey, Joaquín. **Aspectos clínicos y patogénicos de las infecciones por *Escherichia coli* O157:H7 y otros *E. coli* verotoxigénicos.** *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009, 28(6), 370-374.

Sandoval, Luciano. Montellano, Leticia. Piña, Martin. Sánchez, Laura. **Potencial zeta como una herramienta para determinar la aglomeración de las partículas en la reducción del volumen del lodo a disponer.** Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, 2003.

Schleifer, Karl y Kandler, Otto. **Peptidoglycan Types of Bacterial Cell Walls and their Taxonomic Implications.** *Bacteriol Rev.* 1972; 36(4), 407-77.

Semenkov, Yu. Katunin, V. Makarov, E. Kirillov. S. **Quantitative study of kanamycin action on different functions of *Escherichia coli* ribosomes.** *FEBS Lett.* 1982; 144(1), 121-4.

Seney, Caryn. Gutzman, Brittany. Goddard, Russell. **Correlation of Size and Surface-Enhanced Raman Scattering Activity of Optical and Spectroscopic Properties for Silver Nanoparticles.***J Phys Chem C.* 2009; 113(1), 74-80.

Sharma, Virender. Yngard, Ria. Lin, Yekaterina. **Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities.** *Adv Colloid Interface Sci.* 2009; 145, 83-96.

Shenhar, Roy. Norsten, Tyler. Rotello, Vincent. **Polymer-mediated nanoparticle assembly: structural control and applications.***Adv Mater.* 2005; 17(6), 657-669.

Sivaraman, Sankar. Elango, Iniyan. Kumar, Sanjeev. Santhanam, Venugopal. **A green protocol for room temperature synthesis of silver nanoparticles in seconds.***Curr sci.* 2009; 97(7), 1055-59.

Shrivastava, Siddhartha. Bera, Tanmay. Roy, Arnab. Singh, Gajendra. Ramachandrarao, P. Dash, Debabrata. **Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles.***Nanotechnology.* 2007; 225103(18), 1-9.

Sondi, Ivan. Goia, Dan. Matijevic. **Preparation of highly concentrated stable dispersions of uniform silver nanoparticles.***J Colloid Interface Sci.* 2003; 260, 75-81.

Sondi, Ivan. Salopek-Sondi, Branka. **Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria.** *J Colloid Interface Sci.* 2004; 275, 177-82.

Stoimenov, Peter. Klinger, Rosalyn. Marchin, George. Klabunde, Kenneth. **Metal Oxide Nanoparticles as Bactericidal Agents.***Langmuir.* 2002; 18, 6679-86.

Strominger, Jack. Park, James. Thompson, Richard. **Composition of the Cell Wall of *Staphylococcus aureus*: Its Relation to the Mechanism of Action of Penicillin.** *J Biol Chem.* 1959; 234(12), 3263-68.

Tao, Andrea. Sinsermsuksakul, Prasert. Yang, Peidong. **Polyhedral silver nanocrystals with distinct scattering signatures.** *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006; 45, 4597-4601.

Usera, Miguel. ***Escherichia coli* O157 productor de verotoxina: un resumen práctico.** Instituto de Salud Carlos III, Madrid. Disponible en <http://www.seimc.org/control/revisiones/bacteriologia/o157.pdf>.

Yamanaka, Mikihiro. Hara, Keita. Kudo, Jun. **Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by Energy-Filtering Transmission Electron Microscopy and Proteomic Analysis.** *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71(11), 7589-93.

Yang, Chi-Yea. **Cutting Edge Nanotechnology; Charper 20: Anti Silver Nanoparticle Bacteria.** (2010) Publisher:InTech.

Wal, Albert. Norde, Willem. Bendinger, Bernd. Zehnder, Alexander. Lyklema, Johannes. **Chemical analysis of isolated cell walls of Gram-positive bacteria and determination of the cell wall to cell mass ratio.** *J Microbiol Methods.* 1997; 28, 147-57.

Wal, Albert. Norde, Willem. Zehnder, Alexander. Lyklema, Johannes. **Determination of the total charge in the cell walls of Gram-positive bacteria.** *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1997; 9, 81-100.

Wayne. **Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardia, and other aerobic actinomycetes.** CLSI (2003).

Williams, K. **Statistical approaches to experimental data comparing screening designs.** *Ind Eng Chem.* 1963;55(6), 29-32.

Witte, Wolfgang. Cuny, Christiane. Klare, Ingo. Nübel, Ulrich. Strommenger, Birgit. Werner, Guido. **Emergence and spread of antibiotic-resistant Gram-positive bacterial pathogens.** *Int J Med Microbiol.* 2008; 298, 365–377.

Zielinska, Anna. Skwarek, Ewa. Zaleska, Adriana. Gazda, Maria. Hupka, Jan. **Preparation of silver nanoparticles with controlled particle size.** *Proc Chem 1.* 2009; 11, 1560-66.

Zurita, Jeannete. Mejía, Carlos. Guzmán, Manuel. **Diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America.** *Braz J Infect Dis.* 2010; 14(2), S97-S106.

ANEXOS

ANEXO A CÁLCULO DE PORCENTAJE DE INHIBICIÓN BACTERIANA

Al realizar la cinética de crecimiento bacteriano en presencia de AgNPs, se midió la absorbancia cada hora determinando con punto final $t = 9h$, con el fin de aplicar la siguiente ecuación para el cálculo del porcentaje de inhibición:

$$Y = 100 - \frac{(A_f - A_0) * 100}{A_c}$$

Ecuación 3.

Donde:

A_f = Absorbancia a $t=9$ de la bacteria en presencia de las AgNPs.

A_0 = Absorbancia a $t=0$ de la bacteria en presencia de las AgNPs.

A_c = Absorbancia control de la bacteria en ausencia de las AgNPs.

ANEXO B ECUACIONES UTILIZADAS PARA LA EVALUACIÓN DEL EFECTO SINÉRGICO ENTRE AgNPs Y ANTIBIÓTICOS DE ACUERDO CON EL MÉTODO PLACKETT-BURMAN.

Los parámetros más importantes evaluados en el diseño experimental de Plackett-Burman necesarios para la evaluación de la variable de respuesta, son:

Efecto de una variable

El efecto de una variable sobre la respuesta es simplemente la diferencia entre el valor medio de la respuesta de los doce experimentos en el nivel alto y el valor promedio de la respuesta de los doce experimentos en el nivel bajo, como se muestra en la ecuación:

$$E_a = \frac{R_a(+)}{n} - \frac{R_a(-)}{n}$$

Ecuación 4.

Donde:

E_a = Efecto de la variable "a".

$R_a (+)$ = Respuesta o resultado de la variable "a" (porcentaje de inhibición) en el nivel alto.

$R_a (-)$ = Respuesta o resultado de la variable "a" (porcentaje de inhibición) en el nivel bajo.

n = Número de experimentos realizados en cada nivel.

Varianza del efecto

La ecuación de varianza muestra que la variación es igual a la media de los cuadrados de los efectos de las variables nulas, que se calculan como se especificó anteriormente:

$$V_{eff} = \frac{\sum(E_n)^2}{n}$$

Ecuación 5.

Donde:

V_{eff} = Varianza de un efecto.

E_n = Efecto de la variable nula.

n = Número de variables nulas en el experimento.

Error estándar del efecto

La relación entre la varianza del efecto y el error estándar se muestra en la siguiente ecuación:

$$E.S. = \sqrt{V_{eff}}$$

Ecuación 6.

t-student

La significancia de cada efecto fue determinada através del valore de la t-student para cada variable, de acuerdo a:

$$t_a = \frac{E_a}{E.S.}$$

Ecuación 7.

Al relacionar el valor de t-student obtenido para cada variable con los valores estadísticos tabulados se consideraron tantos grados de libertad como variables nulas se emplearon.

**ANEXO C NIVELES Y MATRICES EMPLEADOS EN EL DISEÑO
EXPERIMENTAL DE PLACKETT-BURMAN.**

Tabla1 Variables y niveles definidos de acuerdo con el diseño Plackett-Burman para la determinación del efecto sinérgico entre AgNPs y antibióticos contra *E. coli* O157:H7.

VARIABLES	SÍMBOLO	VALORES EXPERIMENTALES*	
		NIVEL BAJO (-1)	NIVEL ALTO (+1)
Ampicilina	A	0	5,5
Kanamicina	B	0	33
Nula	C	---	---
Eritromicina	D	0	555
Ofloxacina	E	0	3
Nula	F	---	---
AgNPs (1)	G	0	0,5
AgNPs (2)	H	0	5
Nula	I	---	---
AgNPs (3)	J	0	1
Nula	K	---	---

*CMI₅₀ en µg/mL

Tabla 2 Variables y niveles definidos de acuerdo con el diseño Plackett-Burman para la determinación del efecto sinérgico entre AgNPs y antibióticos contra *S. aureus* resistente a Meticilina (SARM).

VARIABLES	SÍMBOLO	VALORES EXPERIMENTALES*	
		NIVEL BAJO (-1)	NIVEL ALTO (+1)
Nula	A	---	---
Kanamicina	B	0	51,2
Nula	C	---	---
Eritromicina	D	0	10
Ofloxacina	E	0	0,3
Nula	F	---	---
AgNPs (1)	G	0	0,2
AgNPs (2)	H	0	0,05
Nula	I	---	---
AgNPs (3)	J	0	0,01
Nula	K	---	---

*CMI₅₀ en µg/mL

Tabla 3 Matriz combinatoria de las variables a estudiar en los doce experimentos para determinar el efecto sinérgico entre AgNPs y los antibióticos elegidos.

EXPERIMENTO	VARIABLES										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
PB1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
PB2	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1
PB3	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1
PB4	-1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1
PB5	1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1
PB6	-1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1
PB7	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1
PB8	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1
PB9	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
PB10	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1
PB11	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1
PB12	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1

ANEXO D NIVELES Y MATRICES SELECCIONADOS EN LA OPTIMIZACIÓN DEL DISEÑO CENTRADO EN LAS CARAS COMPUESTO (CCD)

Tabla 4 Niveles de las variables probadas en la optimización por el diseño centrado en las caras compuesto (CCD) contra *E. coli* O157:H7

VARIABLE	SÍMBOLO	NIVELES*				
		-2	-1	0	1	2
AgNPs (3)	X ₁	0,2	1	1	1,4	1,8
Kanamicina	X ₂	60	183	305	427,5	550
Eritromicina	X ₃	3,5	11	18,3	25,7	33
Ofloxacina	X ₄	0,4	1	2	2,8	3,6

*CMI₅₀ en µg/mL

Tabla 5 Niveles de las variables probadas en la optimización por el Diseño Centrado en las Caras (CCD) contra *S. aureus* resistente a meticilina (SARM).

VARIABLE	SÍMBOLO	NIVELES*				
		-2	-1	0	1	2
AgNPs (3)	X ₁	0,002	0,006	0,01	0,014	0,018
Eritromicina	X ₂	2	6	10	14	18
Kanamicina	X ₃	10,24	30,72	51,2	71,68	92,16

*CMI₅₀ en µg/mL

Tabla 6 Matriz utilizada para la optimización de cuatro variables frente a porcentaje de inhibición como variable de respuesta contra *E. coli* O157:H7.

EXPERIMENTO	VARIABLE*			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
OPB1	0,6	182,5	10,9	1,2
OPB2	0,6	182,5	10,9	2,8
OPB3	0,6	182,5	25,7	1,2
OPB4	0,6	182,5	25,7	2,8

EXPERIMENTO	VARIABLE			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
OPB5	0,6	427,5	10,9	1,2
OPB6	0,6	427,5	10,9	2,8
OPB7	0,6	427,5	25,7	1,2
OPB8	0,6	427,5	25,7	2,8
OPB9	1,4	182,5	10,9	1,2
OPB10	1,4	182,5	10,9	2,8
OPB11	1,4	182,5	25,7	1,2
OPB12	1,4	182,5	25,7	2,8
OPB13	1,4	427,5	10,9	1,2
OPB14	1,4	427,5	10,9	2,8
OPB15	1,4	427,5	25,7	1,2
OPB16	1,4	427,5	25,7	2,8
OPB17	0,2	305,0	18,3	2
OPB18	1,8	305,0	18,3	2
OPB19	1,0	60,0	18,3	2
OPB20	1,0	550,0	18,3	2
OPB21	1,0	305,0	3,5	2
OPB22	1,0	305,0	33	2
OPB23	1,0	305,0	18,3	0,4
OPB24	1,0	305,0	18,3	3,6
OPB25	1,0	305,0	18,3	2
OPB26	1,0	305,0	18,3	2
OPB27	1,0	305,0	18,3	2
OPB28	1,0	305,0	18,3	2
OPB29	1,0	305,0	18,3	2
OPB30	1,0	305,0	18,3	2
OPB31	1,0	305,0	18,3	2

* En µg/mL

Tabla 7 Matriz utilizada para la optimización de cuatro variables frente a porcentaje de inhibición como variable de respuesta contra *S. aureus* resistente a meticilina (SARM).

EXPERIMENTO	VARIABLE*		
	X ₁	X ₂	X ₃
OPB1	0,006	6	30,72
OPB2	0,014	6	30,72
OPB3	0,006	14	30,72
OPB4	0,014	14	30,72
OPB5	0,006	6	71,68
OPB6	0,014	6	71,68
OPB7	0,006	14	71,68
OPB8	0,014	14	71,68
OPB9	0,01	10	51,2
OPB10	0,01	10	51,2
OPB11	0,01	10	51,2
OPB12	0,01	10	51,2
OPB13	0,002	10	51,2
OPB14	0,018	10	51,2
OPB15	0,01	2	51,2
OPB16	0,01	18	51,2
OPB17	0,01	10	10,24
OPB18	0,01	10	92,16
OPB19	0,01	10	51,2
OPB20	0,01	10	51,2

* En µg/mL

**ANEXO E SUPERFICIES DE RESPUESTA DE CADA DOS VARIABLES CON
RESPECTO AL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN PARA CADA CEPA
PATÓGENA.**

Figura 1 de respuesta para las variables dos variables con respecto a la variable de respuesta (% inhibición) frente a *E. coli* O157:H7

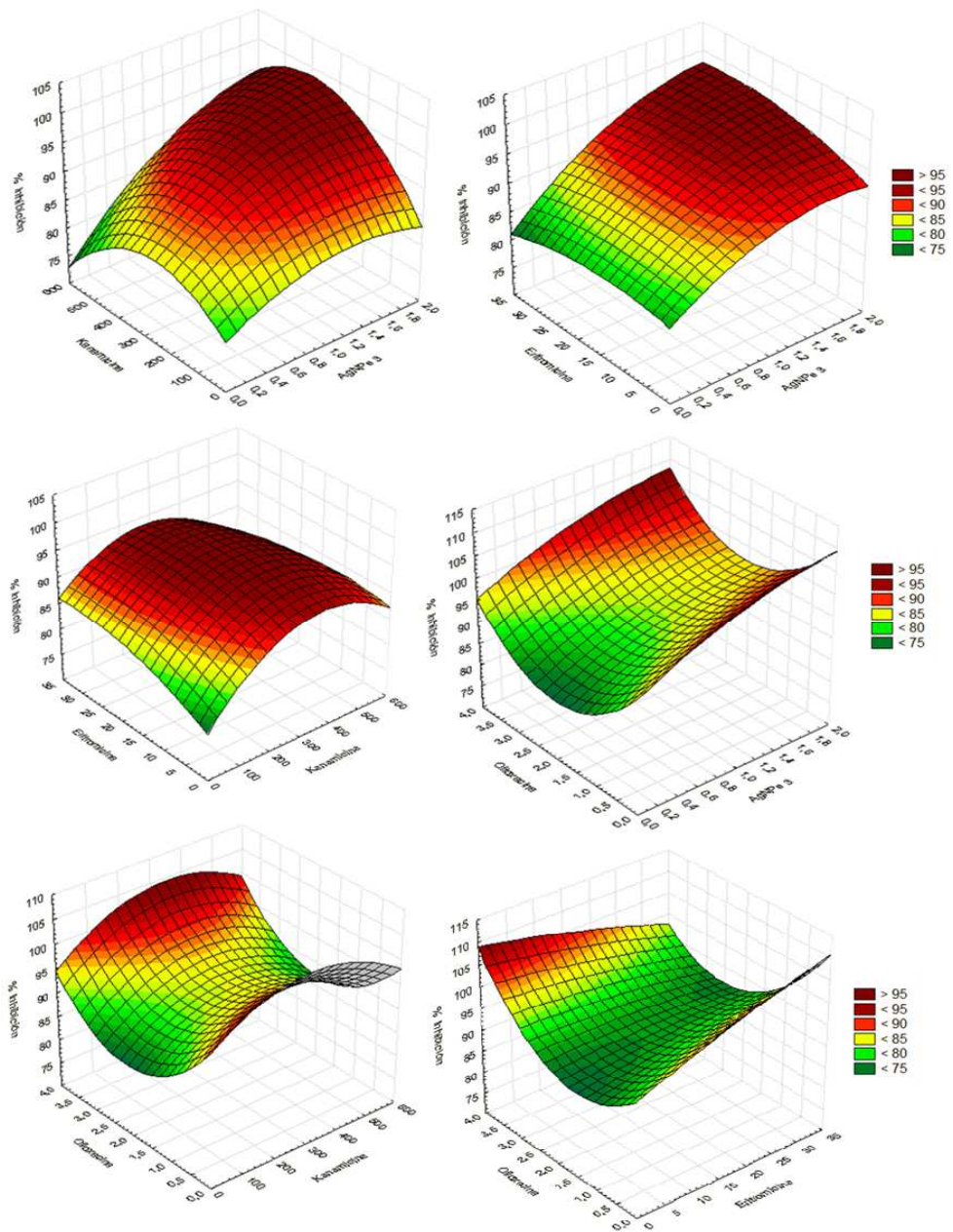


Figura 2 Superficie de respuesta para las variables dos variables con respecto a la variable de respuesta (% inhibición) frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM).

