

**ESTUDIO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE NANOPARTICULAS DE Fe@Ag
FUNCIONALIZADAS CON LECTINAS SOBRE *Escherichia coli* O157:H7 y
*Staphylococcus aureus***

JENNY LISET RODRÍGUEZ ARDILA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2012**

**ESTUDIO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE NANOPARTICULAS DE Fe@Ag
FUNCIONALIZADAS CON LECTINAS SOBRE *Escherichia coli* O157:H7 y
*Staphylococcus aureus***

JENNY LISET RODRÍGUEZ ARDILA

Trabajo de investigación para optar el título de:
MAGISTER EN QUÍMICA

DIRECTOR

RODRIGO TORRES SAEZ, Ph.D.
Escuela de Química

CO DIRECTORA

CLAUDIA ORTIZ LÓPEZ, Ph.D.
Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico

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

2012

DEDICATORIA

A Dios por darme fuerza y paciencia para sobrellevar todos los altibajos presentados y regalarme finalmente el triunfo,

A la bendición más grande que Dios me dio, Juan David, porque por él y para él son todos los esfuerzos hechos en busca de un mejor vivir,

A mí amado esposo, César Ariza, por su confianza y apoyo por encima de cualquier circunstancia,

A mi familia por todo su apoyo,

A quienes me brindaron una amistad verdadera y me apoyaron incondicionalmente.

Jenny Liset Rodriguez Ardila

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rodrigo Torres, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, por compartir conmigo todo su conocimiento y apoyarme incondicionalmente.

A la Dra. Claudia Ortiz por su apoyo, paciencia y guía durante todo el transcurso de esta investigación.

A los calificadores de mi tesis por sus sabios consejos con el fin de aportarme conocimiento para mejores resultados.

A mis amigos Jessika Hernández, Johanna Flórez, Angela Vásquez, José Roper, Ruth Carvajal y Andrés Escorcia por su sincera amistad, por el apoyo constante y por compartir juntos muchos momentos agradables e inolvidables.

A mis compañeros de laboratorio Daissy Paredes, Marlon Cáceres y Jhon Artuanduaga por apoyarme de una u otra manera en el desarrollo de mi trabajo de investigación.

Al Dr. Arnold Romero por todo su apoyo incondicional como amigo y en la elaboración del documento final.

A todas las personas que me apoyaron de una u otra manera hasta alcanzar este gran triunfo.

GRACIAS Y LOS LLEVO EN EL CORAZÓN!!!

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	20
1. GENERALIDADES DE LAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	22
1.1 Síntesis de las nanopartículas magnéticas	22
1.2 Nanopartículas bimetálicas de Fe/Ag	24
1.2.1 Propiedades de las nanopartículas bimetálicas	25
1.3 Nanopartículas Funcionalizadas con biomoléculas	25
1.3.1 Nanopartículas acopladas con Lectinas	27
1.4 Efecto antibacteriano de nanopartículas sobre enfermedades infecciosas generadas por microorganismos patógenos	30
2. MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 Materiales	35
2.2 Síntesis de nanopartículas bifuncionales de Fe@Ag	36
2.2.1 Síntesis de nanopartículas de Fe ₃ O ₄	36
2.2.2 Síntesis de nanopartículas bifuncionales de Fe ₃ O ₄ @Ag	36
2.2.3 Síntesis de nanopartículas bifuncionales de Fe@Ag	36
2.3 Caracterización de las nanopartículas bifuncionales	37
2.3.1 Espectrometría UV-VIS	37
2.3.2 Microscopía electrónica de transmisión	37
2.3.3 Dispersión de luz en modo dinámico	37

2.3.4 Potencial Z	38
2.4 Funcionalización de las NPs sintetizadas con las lectinas	38
2.4.1 Extracción y purificación de lectina de banano (BanLec)	38
2.4.2 Ensayo de hemaglutinación	39
2.4.3 Funcionalización de las NPs sintetizadas con las lectinas (ConA y BanLec)	39
2.5 Determinación de la actividad antibacteriana de las NPs de hierro sin funcionalizar y funcionalizadas con lectinas (ConA y BanLec) contra <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>S. aureus</i>	40
2.5.1 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	40
2.5.2 Concentración Mínima Bactericida (CMB)	41
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
3.1 Síntesis de Nanopartículas de Fe ₃ O ₄	42
3.2 Síntesis de Nanopartículas bimetálicas de Fe/Ag	46
3.2.1 Caracterización de las NPs bimetálicas sintetizadas	48
3.2.1.1 Espectrometría UV-vis	48
3.2.1.2 Microscopía de transmisión electrónica TEM	49
3.2.1.3 Dispersión de Luz en modo dinámico (DLS)	50
3.2.1.4 Potencial Z	52
3.3 Efecto antibacteriano de las nanopartículas bimetálicas de Fe/Ag sobre <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>S. aureus</i>	53

3.4 Funcionalización de las NPs sintetizadas con lectinas (ConA y BanLec)	60
3.4.1 Purificación de la lectina de banano (LecBan)	60
3.4.2 Modificación de la superficie de las NPs bimetálicas	64
3.5 Efecto antibacteriano de las lectinas Concavalina A y Lectina de banano sobre <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>S. aureus</i>	69
3.5.1 Efecto antibacteriano de la Concavalina A sobre <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>S. aureus</i>	70
3.5.2 Efecto antibacteriano de la LecBan sobre <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>S. aureus</i>	71
3.6 Efecto antibacteriano de las nanopartículas bimetálicas de Fe/Ag funcionalizadas con lectinas sobre <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>S. aureus</i>	73
3.6.1 Efecto antibacteriano de las NPs bimetálicas funcionalizadas con la Concavalina A sobre <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>S. aureus</i>	73
3.6.2 Efecto antibacteriano de las NPs bimetálicas funcionalizadas con la LecBan sobre <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>S. aureus</i>	76
3.7 Efecto antibacteriano de las nanopartículas magnéticas (Fe ₃ O ₄) funcionalizadas con lectinas sobre <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>S. aureus</i>	79
3.7.1 Efecto antibacteriano de las NPs magnéticas funcionalizadas con la Con A sobre <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>S. aureus</i>	79
3.7.2 Efecto antibacteriano de las NPs magnéticas funcionalizadas con la LecBan sobre <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>S. aureus</i>	80
4. CONCLUSIONES	83
RECOMENDACIONES	85
BIBLIOGRAFÍA	86

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1: Mecanismo de formación de AgNPs por medio de reducción química.	26
Fig. 2: Una nanopartícula de óxido de hierro recubierta con un polímero biocompatible y funcionalizada con un péptido.	28
Fig. 3: Estructura de la Concavalina A, código 3CNA, PDB.	30
Fig. 4: Estructura de la lectina de banana BanLec. Tomada de Swanson, M. D. 2010.	31
Fig. 5: NPs magnéticas (Fe_3O_4) obtenidas por co-precipitación. A) NPs en solución acuosa sin dispersante (PEG). B) NPs en solución acuosa en presencia de dispersante. 1) 0.3 M, 2) 0.15 M y 3) 0.075 M de FeCl_3 .	47
Fig. 6: DLS de NPs Fe_3O_4 sintetizadas por co-precipitación utilizando FeCl_3 0.03M; FeCl_2 0.015M; NH_4OH 1.5M como agente reductor (temperatura ambiente y atmósfera de nitrógeno).	48
Fig. 7: Potencial Zeta de NPs Fe_3O_4 sintetizadas por co-precipitación utilizando FeCl_3 0,03M; FeCl_2 0,015M; NH_4OH 1,5M como agente reductor (temperatura ambiente y atmosfera de nitrógeno).	49
Fig. 8: NPs bimetalicas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ sintetizadas empleando el método de micela reversa usando ciclohexano como fase oleosa, el Triton X-100 como surfactante y n-butanol como co-surfactante (NPb1).	51
Fig. 9: Mecanismo de formación de las NEs núcleo/capa (NPb2)	52

- Fig. 10:** Espectros de absorción UV-vis de las NPs bimetálicas sintetizadas. (---) 53
 NPs de Fe₃O₄ obtenidas por co-precipitación. (→) NPs de Fe₃O₄@Ag
 sintetizadas mediante micela reversa. (—) NPs de Fe@Ag con estructura
core/shell.
- Fig. 11:** TEM de NPs bimetálicas de: a) Fe₃O₄@Ag obtenidas por micela 54
 reversa, NPb1 y b) NPs *core/shell* Fe@Ag , NPb2.
- Fig. 12:** DLS de las NPs bimetálicas de: a) Fe₃O₄@Ag obtenidas por micela 56
 reversa, Tipo 1 y b) NPs *core/shell* Fe@Ag, Tipo 2.
- Fig.13:** Potencial Z de las NPs bimetálicas de: a) Fe₃O₄@Ag obtenidas por 57
 micela reversa, NPb1 y b) NPs *core/shell* Fe@Ag, NPb2.
- Fig.14:** Cinética de crecimiento de a) *E. coli* O157:H7 5x10⁸ UFC/ml de 60
 concentración en medio Luria-bertani (LB) y b) *S. aureus* SARM 7x10⁶ UFC/ml
 de concentración en medio Muller-Hilton (MH), en presencia en presencia de
 100 µl de diferentes concentraciones de NPb1. Temperatura de 37°C, 200 rpm
 durante 8 horas, OD medida a 595 nm.
- Fig.15:** Cinética de crecimiento de a) *E. coli* O157:H7 5x10⁸ UFC/ml de 62
 concentración en medio Luria-bertani (LB) y b) *S. aureus* SARM 7x10⁶ UFC/ml
 de concentración en medio Muller-Hilton (MH), en presencia en presencia de
 100 µl de diferentes concentraciones de NPb1. Temperatura de 37°C, 200 rpm
 durante 8 horas, OD medida a 595 nm.
- Fig.16:** SDS-PAGE de las fracciones de proteínas obtenidas eluidas de la 67
 columna Sephadex G-75. Tinción con Sypro. Carril 1: Primera fracción de
 proteínas eluida de la columna; Carril 2: segunda fracción de proteínas eluida
 de la columna; Carril 3: Primera fracción retenida en la columna y eluida con
 buffer fosfato (50 mM, pH 7) y Carril 4: Segunda fracción retenida en la columna
 y eluida con buffer fosfato (50 mM, pH 7).

Fig. 17: Esquema ilustrativo del ensayo de Hemaglutinación utilizando una suspensión de 2% de eritrocitos realizado para confirmar la presencia de la lectina.	68
Fig. 18: Procedimiento sistemático para la modificación del soporte Eupergit-c con manosa.	69
Fig. 19: Ilustración de la técnica de ultrafiltración.	69
Fig. 20: a) SDS-PAGE y b) Electroforesis nativa de las fracciones eluidas con buffer fosfato (50 mM, pH 7, 0.5 M de manosa) de la columna Eupergit-C-manosa. Tinción con Sypro.	70
Fig. 21: Modificación de la superficie de las NPs de magnetita con APTS	71
Fig. 22: Espectros IR de las NPs a) sin modificar y b) modificadas con APTS	72
Fig. 23: Esquema general de la modificación de los grupos aminos de la superficie de las NPs mediante el uso del anhídrido succínico 10% (p/v). Tiempo de reacción 12 horas a temperatura ambiente y 600 rpm	74
Fig. 24: Espectros IR de las NPs modificadas con anhídrido succínico 10% (p/v). Tiempo de reacción 12 horas a temperatura ambiente y 600 rpm	74
Fig. 25: Esquema general para la inmovilización de lectinas sobre NPs de Fe/Ag	76
Fig. 26: Cinética de crecimiento, en presencia de la Con A, de: A) <i>E. coli</i> O157:H7 y B) <i>S. aureus</i> SARM. Temperatura de 37°C, 200 rpm durante 8 horas, OD medida a 595 nm.	78
Fig. 27: Cinética de crecimiento, en presencia de LecBan, de: A) <i>E. coli</i>	80

O157:H7 y B) *S. aureus* SARM. Temperatura de 37°C, 200 rpm durante 8 horas, OD medida a 595 nm.

Fig. 28: Cinética de crecimiento, en presencia de la $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{ConA}$, de: A) *E. coli* O157:H7 y B) *S. aureus* SARM. Temperatura de 37°C, 200 rpm durante 8 horas, OD medida a 595 nm. 82

Fig. 29: Cinética de crecimiento, en presencia de la $\text{Fe}@\text{Ag}@\text{ConA}$, de: A) *E. coli* O157:H7 y B) *S. aureus* SARM. Temperatura de 37°C, 200 rpm durante 8 horas, OD medida a 595 nm. 84

Fig. 30: Cinética de crecimiento, en presencia de la $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{LecBan}$, de: A) *E. coli* O157:H7 y B) *S. aureus* SARM. Temperatura de 37°C, 200 rpm durante 8 horas, OD medida a 595 nm. 85

Fig. 31: Cinética de crecimiento, en presencia de la $\text{Fe}@\text{Ag}@\text{LecBan}$, de: A) *E. coli* O157:H7 y B) *S. aureus* SARM. Temperatura de 37°C, 200 rpm durante 8 horas, OD medida a 595 nm. 86

Fig. 32: Cinética de crecimiento, en presencia de la $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{ConA}$, de: A) *E. coli* O157:H7 y B) *S. aureus* SARM. Temperatura de 37°C, 200 rpm durante 8 horas, OD medida a 595 nm. 88

Fig. 33: Cinética de crecimiento, en presencia de la $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{LecBan}$, de: A) *E. coli* O157:H7 y B) *S. aureus* SARM. Temperatura de 37°C, 200 rpm durante 8 horas, OD medida a 595 nm. 89

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Estudios realizados sobre la actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata.	33
Tabla 2. Concentraciones mínimas inhibitorias de NPb sobre <i>E. coli</i> O157:H7 a una concentración de 5×10^8 UFC/ml en medio LB y <i>S. aureus</i> SARM a una concentración de 7×10^6 UFC/ml en medio MH, a una temperatura de 37 °C durante 8 horas con una agitación de 200 rpm.	65
Tabla 3. Concentraciones mínimas inhibitorias de NPb funcionalizadas con Con A y LecBan sobre <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>S. aureus</i> SARM.	90

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

λ	Longitud de onda
AS	Anhidrido succínico
GA	Glutaraldehído
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
Con A	Concavalina A
CRDs	Dominios de reconocimiento de carbohidratos
DLS	Dispersión de luz dinámica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDA	Enfermedad Diarreica Aguda
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida)
Fe@AgNPs	Nanopartículas de hierro y plata
Fe@Ni	Nanopartículas de hierro y Níquel
Fe ₃ O ₄ @TiO ₂	Nanopartículas de magnetita y óxido de titanio
Fe ₃ O ₄ @AgNPs	Nanopartículas de magnetita y plata
IR	Infrarrojo
LecBan	Lectina de banano
LPS	Lipopolisacárido

NCs	Nanocompuestos
NPs	Nanopartículas
NPb1	Nanopartícula bifuncional tipo 1
NPb2	Nanopartícula bifuncional tipo 2
PEG	Polietilenglicol
PVA	Polivinilalcohol
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SPR	Superficie de plasmones de resonancia
TEM	Microscopia de Transmisión Electrónica
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
UV-vis	Ultravioleta visible

RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE NANOPARTICULAS DE Fe@Ag FUNCIONALIZADAS CON LECTINAS SOBRE *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* □ .

AUTOR: RODRÍGUEZ ARDILA, Jenny Liset **

PALABRAS CLAVES: Nanopartículas de hierro y plata, *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, lectinas, actividad antibacteriana.

DESCRIPCIÓN

En este trabajo de investigación se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas bifuncionales (NPb) de Fe/Ag combinan la no toxicidad del hierro con las propiedades bactericidas de la plata generando nanoestructuras con interesante propiedades antibacterianas. Las nanopartículas se sintetizaron utilizando el método de micela reversa y el método núcleo/capa. Las NPb obtenidas fueron caracterizadas por espectroscopia UV-vis encontrando una banda de absorción a 397 nm que confirma la presencia de átomos de plata. La El tamaño y la morfología se analizó mediante las técnicas de microscopía de transmisión electrónica (TEM) y dispersión de la luz dinámica (DLS), obteniéndose nanopartículas esféricas con tamaños entre 90-100 nm. Para determinar la actividad antibacteriana de las NPb sintetizadas, se evaluaron diferentes concentraciones de NPb, entre 1 y 80 µg/mL, con el fin de encontrar la concentración mínima inhibitoria (CMI) sobre *E coli* O157:H7 (Bacteria Gram-negativa) y *S. aureus* (bacteria Gram-positiva). Todas las concentraciones evaluadas presentaron efecto inhibitorio sobre el crecimiento normal de la bacteria, encontrando CMI de 1 µg/mL sobre las bacterias en estudio.

Adicionalmente, las NPb que exhibieron las actividades antibacterianas más altas se funcionalizaron con lectinas como Concavalina A y Lectina de banano generando nanocompuestos con potencial actividad antibacteriana. Estos bioconjugados logran un 99% de inhibición sobre el crecimiento normal de las bacterias a concentraciones de tan solo 1 µg/mL.

Los valores de CMI hallados en este estudio, son menores a los datos reportados para NPb de Fe@Ag sintetizadas por otros autores. De esta forma, el estudio y desarrollo de nanopartículas magnéticas bifuncionales funcionalizadas con lectinas puede servir como un modelo interesante para el desarrollo de agentes antibacterianos con gran potencial y en el futuro ser para uso clínico.

* Tesis de Maestría

** Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Director: TORRES, R. Co-directora: ORTIZ, C.

ABSTRACT

TITLE: STUDY OF ANTIMICROBIAL EFFECT OF FE @ AG NANOPARTICLES FUNCTIONALIZED WITH LECTINS ON *Escherichia coli* O157: H7 AND *Staphylococcus aureus* [□].

AUTHOR: RODRÍGUEZ ARDILA, Jenny Liset**

KEYWORDS: Iron and silver nanoparticles, *E. coli* O157: H7, *S. aureus*, lectins, antibacterial activity.

DESCRIPTION

In this research work was carried out the synthesis of bifunctional nanoparticles (NPb) of Fe/Ag combine the iron not toxicity and bactericidal properties of silver generating nanostructures with interesting antibacterial properties. The nanoparticles were synthesized using the method of reverse micelle method and the *core/shell*. The NPb obtained were characterized by UV-vis spectroscopy finding an absorption band at 397 nm confirming the presence of silver atoms. The size and morphology was analyzed by the techniques of transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS) obtaining spherical nanoparticles with sizes between 90-100 nm. To determine the antibacterial activity of the synthesized NPb were evaluated NP different concentrations of between 1 and 80 µg/mL, in order to find the minimum inhibitory concentration (MIC) on *E. coli* O157:H7 (Gram-negative) and *S. aureus* (Gram-positive bacteria). All concentrations tested showed inhibitory effect on the normal growth of the bacterium, finding MIC of 1 µg/mL of the bacteria under study.

Additionally, the NPb that exhibited the highest antibacterial activities were functionalized with lectins as lectin Concanavalin A and banana lectin producing nanocomposites with potential antibacterial activity. These bioconjugates achieve a 99% inhibition on the normal growth of the bacteria at concentrations as low as 1 µg/mL.

The MIC values found in this study are lower than those reported for NPb data of Fe@Ag synthesized by other authors. Thus, the study and development of bifunctional magnetic nanoparticles functionalized with lectins can serve as an interesting model for the development of antibacterial agents with great potential in the future be for clinical use.

* Master Thesis

** Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Research advisors: TORRES, R., ORTIZ, C.

ESPECIFICACIONES DEL PROYECTO

TRABAJO PRESENTADO EN PROYECTOS NACIONALES

Rodríguez, J., Ortiz, C., Torres, R. Estudio preliminar del efecto antibacteriano de nanoestructuras bifuncionales de Fe@Ag sobre *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus*, *in vitro*. PONENCIA ORAL. CONGRESO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIODIVERSIDAD. MANIZALES COLOMBIA. 2011

INTRODUCCION

Las enfermedades infecciosas son consideradas como una de las principales causas de mortalidad en el mundo. Este tipo de enfermedades es provocado por microorganismos como hongos, bacterias y virus. Una de las patologías infecciosas con mayor relevancia e incidencia es la enfermedad diarreica aguda (EDA), la cual es considerada un grave problema de salud pública en el mundo, ya que afecta a todas las personas sin discriminar la edad, siendo los niños la población más susceptible a dicha enfermedad [1]. Según la organización mundial de la salud, la EDA afecta a 750 millones de niños anualmente, siendo una patología predominante en niños menores de 5 años y una de las principales causas de muerte infantil [2].

La EDA puede ser provocada por bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, entre otros microorganismos, siendo *E. coli* la que presenta mayor incidencia. En Colombia, una cepa de *E. coli* O157:OH7 fue detectada en 1996, y se sabe que este patógeno, transmitido por ingesta de alimentos contaminados, es uno de los más peligrosos para el aparato digestivo, debido a los graves síntomas que produce en el paciente, como diarrea sanguinolenta con predominancia en enfermedad del colón, entre otros síntomas [3]. Por otra parte, *S. aureus* además de ser un causante de EDA, es uno de los agentes predominantes en las infecciones nosocomiales o intrahospitalarias. Este tipo de infecciones es muy frecuente en todos los hospitales del mundo, y aunque existen protocolos de prevención y control, pueden ser difíciles de tratar [4].

Actualmente, se observa un fenómeno creciente de resistencia bacteriana debido al uso indiscriminado de los antibióticos, razón por la cual se ha generado la necesidad de desarrollar tratamientos alternativos que sean eficientes, eviten generar resistencia bacteriana y estén al alcance de la sociedad [5, 6]. Estudios previos han mostrado que el desarrollo de compuestos antimicrobianos en forma de nanopartículas (NPs) pueden ser una estrategia antibacteriana eficaz, esencialmente gracias a sus particulares características como tamaño, forma y propiedades químicas [4, 5, 6]. Estas NPs pueden ser funcionalizadas con grupos reactivos y biocompatibles con el fin de mejorar la

estabilidad de las biomoléculas inmovilizadas e incrementar la cantidad de éstas en la superficie de la partícula [7].

Entre las nanopartículas (NPs) más estudiadas por su potencial antibacteriano se encuentran las de plata (Ag) metálica [8]. Sin embargo, se ha demostrado que las NPs de plata poseen efectos tóxicos sobre las células de mamíferos [9]. Por esta razón, se utiliza en algunos casos un núcleo nanomagnético, el cual posibilita la eliminación de dichos compuestos con la aplicación de un campo magnético externo [10].

Por otra parte, muchos de los patógenos como *S. aureus* resistente a meticilina (SARM), *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y *Candida albicans*, entre otros, utilizan la superficie celular de los glicanos para iniciar el proceso de infección [11]. Estos procesos biológicos pueden ser estudiados en detalle mediante el uso de un tipo de glicoproteínas denominadas lectinas. Las lectinas son proteínas o glicoproteínas naturales de origen no inmune. Se emplean para caracterizar los carbohidratos presentes en la superficie celular de muchos organismos, y debido a que tienen la capacidad de reconocer por unión reversible un determinado carbohidrato sin alterar la estructura covalente de los ligandos glicosídicos reconocidos [11]. Por esta razón, se han usado en la industria farmacéutica para administración de fármacos pulmonares, orales, y para reparto de fármacos [12], como sensores de glucosa [13], entre otras aplicaciones. Adicionalmente, las lectinas afines a la manosa, carbohidrato presente en la membrana celular bacteriana [11], pueden ser una alternativa interesante para mejorar la especificidad de las nanopartículas antibacterianas.

En el presente trabajo de investigación se planteó como objetivos evaluar la actividad antibacteriana de nanopartículas de Fe/Ag funcionalizadas con lectinas contra *E. coli* y *S. aureus*. Para ello, las NPs de Fe/Ag sin funcionalizar y funcionalizadas con lectinas (Concavalina A y lectina de banano), se sometieron a pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano utilizando como modelos bacterianos *E. coli* O157:OH7 y *S. aureus*, determinando concentraciones mínimas inhibitorias (CMI). Adicionalmente, las NPs con mayor actividad fueron caracterizadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM), potencial Z y dispersión de luz en modo dinámico (DLS).

1. GENERALIDADES DE LAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Una nanopartícula (NP) se define, según el sistema internacional de unidades, como cualquier partícula con un tamaño que oscila entre 1 a 1000nm. Sin embargo, la mayoría de los autores consideran nanopartículas aquellas con un tamaño entre 1 y 100nm. También son conocidas como partículas ultrafinas [14].

Las nanopartículas difieren de las partículas o pequeños agregados en sus características físicas, ópticas y químicas. Esto hace que sean materiales con diferentes aplicaciones, entre las cuales cabe resaltar su utilidad como agentes antimicrobianos, ya que muestran una importante actividad biocida [5, 6, 15]. Un tipo de nanocompuesto frecuentemente usado en la biomedicina lo constituye las nanopartículas (NPs) magnéticas, las cuales pueden ser influenciadas por un campo magnético. Las NPs magnéticas como la maghemita (Fe_2O_3) y la magnetita (Fe_3O_4) exhiben propiedades eléctricas y magnéticas únicas, debido a la transferencia de electrones entre los iones Fe^{3+} y Fe^{2+} . Además, poseen un fenómeno superparamagnético debido a que cada partícula puede considerarse como un dominio magnético individual [14, 16, 17].

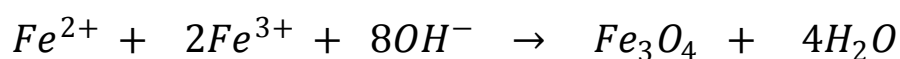
1.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas

La preparación de NPs magnéticas puede llevarse a cabo mediante métodos físicos y químicos. Los métodos químicos se basan en la reducción de los iones metálicos o descomposición de los precursores para formar átomos, los cuales, se agregan entre sí [18] constituyendo estructuras complejas como tubos, esferas, rombos, etc.

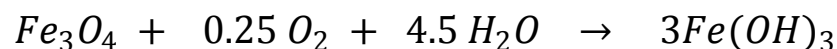
En particular, las partículas de óxido de hierro como la magnetita (Fe_3O_4) y su forma oxidada, la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), son comúnmente empleadas en el campo de la biomedicina. En casi todas las aplicaciones, el método de síntesis de estos nanocompuestos (NCs) determina el tamaño y forma de la partícula, la distribución del tamaño, la superficie química y sus propiedades magnéticas [19].

Generalmente, las NPs de óxido de hierro pueden ser sintetizadas por co-precipitación de iones Fe^{2+} y Fe^{3+} en solución acuosa por adición de una base. En este caso, el tamaño, forma y composición de las NPs dependen de los tipos de sales utilizadas (cloruros, sulfatos, nitratos, percloratos), la relación de los iones Fe^{2+} y Fe^{3+} , el pH y la fuerza iónica del medio.

La magnetita precipitada es de color negro y su reacción química, bajo un ambiente libre de oxígeno, está dada por:



Si el ambiente no es libre de oxígeno, las partículas de Fe_3O_4 pueden ser oxidadas como:



La oxidación de las partículas de Fe_3O_4 puede afectar las propiedades físicas y químicas de las nanopartículas magnéticas e inducir la agregación de éstas. Las NPs obtenidas son inestables y necesitan ser recubiertas con una capa de polímeros evitando así su aglomeración, que a su vez es producida por las interacciones hidrofóbicas generadas por la atracción dipolar magnética [14, 19].

Actualmente, las nanopartículas se han convertido en un material importante en el desarrollo de la nanotecnología, ya que pueden ser usadas en numerosas aplicaciones como sistema de reparto de fármacos, tratamientos térmicos y sensores químicos, entre otras [14, 19, 20, 21]. Una ventaja de los compuestos a nanoescala es que permiten la modificación química de la superficie para hacerlos más estables, biocompatibles, menos tóxicos y así ampliar su rango de aplicación.

Las NPs magnéticas pueden combinarse con otros metales generando NCs bimetalicos para diversos fines. Se han sintetizado nanopartículas de: $Fe_3O_4@TiO_2$ para análisis de fosfolípidos [22], $Fe_3O_4@SiO_2@Ag$ con aplicación en la espectroscopia Raman [23],

Fe@Ni para la degradación del tricloroetileno [24] y NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{ZnO}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ con propiedades antimicrobianas [15, 25, 26], entre otras.

1.2 Nanopartículas bimetálicas de Fe/Ag

La plata ha presentado ventajas importantes sobre los antibióticos convencionales, ya que este metal tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de organismos patógenos hasta causar su muerte. La actividad bactericida de las nanopartículas de plata sobresale entre todos los demás nanocompuestos metálicos estudiados. Sin embargo, se ha demostrado el efecto tóxico de este tipo de NPs sobre células de mamíferos [10]. Una alternativa es emplear un núcleo nanomagnético para obtener NPs bifuncionales o bimetálicas que combinen la actividad antimicrobiana de la plata y las propiedades no tóxicas y magnéticas del hierro, posibilitando la eliminación de estos NPs del medio al aplicar un campo magnético externo [9, 15, 26].

Generalmente, las NPs de plata son sintetizadas utilizando el método de reducción química, empleando AgNO_3 como precursor y NaBH_4 como agente reductor (Ver **Figura 1**). En este proceso de reducción se forman inicialmente átomos de plata (Ag^0), los cuales posteriormente se aglomeran en grupos oligoméricos, dando lugar a la formación de NPs coloidales de plata [27, 28, 29].

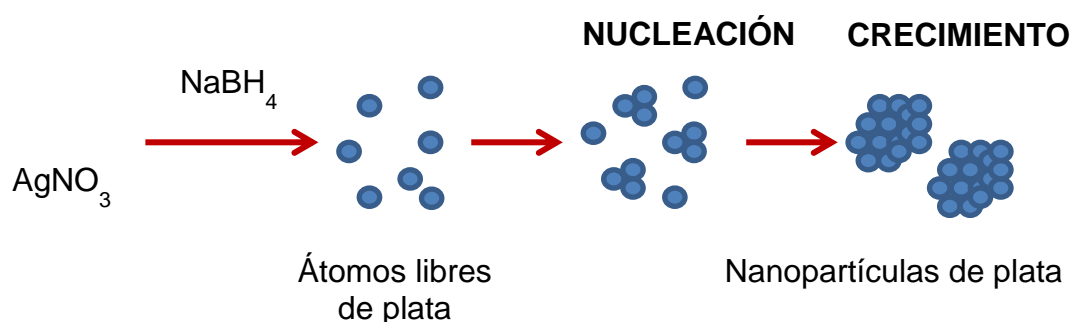


Figura 1: Mecanismo de formación de AgNPs por medio de reducción química [30].

Por otra parte, el método de microemulsión o micela inversa es el más empleado para la obtención de NPs bimetálicas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$. El método de micela inversa es de especial

interés ya que permite controlar la forma y tamaño de las NPs a sintetizar. Generalmente, se utiliza una fase oleosa, un surfactante y un co-surfactante como agente estabilizador de las interfases de las partículas. Una vez se forma la micela (de lo cual depende la forma y tamaño de la partícula), se introducen los reactantes dentro de estos dominios donde se lleva a cabo la reacción. Las NPs formadas se estabilizan debido a que la superficie se recubre con moléculas estabilizantes en el medio acuoso no polar [14, 31].

1.2.1 Propiedades de las nanopartículas bimetálicas

Las NPs bimetálicas presentan una superficie de plasmones resonantes (SPR) la cual se ve reflejada en fuertes bandas de absorción en las regiones ultravioleta y visible (UV-VIS) del espectro electromagnético. Además, la longitud de onda y la intensidad de la banda de absorción se pueden correlacionar con el tamaño, forma, concentración y propiedades dieléctricas de las nanopartículas [20, 32].

En cuanto al potencial iónico y propiedades electrónicas de las NPs, pueden verse influenciados por el tamaño de las partículas y la naturaleza química de la superficie. Para el caso de los materiales magnéticos nanoparticulados, una disminución en el tamaño de la partícula hace que las nanopartículas magnéticas individuales exhiban un comportamiento superparamagnético ya que cada partícula se considera un solo dominio [14, 18, 19].

1.3 Nanopartículas Funcionalizadas con biomoléculas

Las NPs magnéticas pueden ser recubiertos por matrices de polímeros orgánicos o matrices inorgánicas, que brindan estabilidad y facilitan una subsecuente funcionalización con diferentes moléculas bioactivas [14, 17]. Las NPs modificadas con compuestos orgánicos han tenido relevancia en el campo de la biotecnología y biomedicina, ya que pueden ser controladas magnéticamente por campos externos, lo cual hace que sean de gran aplicabilidad en el tratamiento contra el cáncer [19]. Otras aplicaciones biomédicas

incluyen: terapia celular, reparación de tejidos, entrega de fármacos, imágenes de resonancia magnética, hipertemia y magnetofección [14, 17, 18].

A menudo, las NPs son acopladas a moléculas biocompatibles como dextranos, anticuerpos, péptidos o DNA [14, 17, 33, 34] (Ver **Figura 2**). La funcionalización puede realizarse mediante diferentes métodos de bioconjugación covalente tales como el método de la carbodiimida [14, 35], acople con puentes disulfuro e hidrólisis de los ésteres succinimidílicos, entre otros. Igualmente, se pueden ensamblar mediante las interacciones electrostáticas [36].



Figura 2: Una nanopartícula de óxido de hierro recubierta con un polímero biocompatible y funcionalizada con un péptido [19].

Adicionalmente, se han desarrollado materiales híbridos sintetizados a partir de NPs inorgánicas y moléculas biológicamente relevantes como oligosacáridos. Este tipo de nanocompuestos se denominan “Gliconanopartículas”, y constituyen una herramienta útil e importante en el campo de la glicobiología, la cual tiene como objeto de estudio los procesos fisiológicos que involucran carbohidratos o glicanos [37]. Los carbohidratos pueden encontrarse acoplados a proteínas (glicoproteínas) o a lípidos (glicolípidos) en la superficie de las células, lo que hace que presenten gran variabilidad y complejidad estructural [38]. Por esta razón, los oligosacáridos están implicados en importantes funciones fisiológicas, dentro de las cuales cabe resaltar: el reconocimiento célula-célula, interacción patógeno-huésped, respuesta inmune del huésped [39], adhesión celular, entre otras [35].

1.3.1 Nanopartículas acopladas con Lectinas

Cuando se habla de carbohidratos o glicanos, es necesario mencionar las lectinas. Las lectinas son un grupo heterogéneo de proteínas o glicoproteínas de origen no-inmune, que se enlazan específica y reversiblemente a carbohidratos de glicoconjugados, a través de sus dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRDs) [35, 39, 40]. Las interacciones de las lectinas con ciertos carbohidratos pueden ser tan específicas como una interacción antígeno-anticuerpo o enzima-sustrato [39]. La mayoría de las lectinas juegan un rol importante en procesos biológicos, particularmente en los mecanismos de defensa del huésped, inflamación y metástasis [41]. Se han aislado varias lectinas provenientes de hongos como *Agaricus bisporus* y *Volvariella volvacea*, las cuales presentan actividades inmunomoduladoras, mitogénicas y antitumorales [42].

Por otro lado, las lectinas provenientes de animales han sido clasificadas en varias familias y superfamilias relacionadas estructuralmente, según su estructura y requerimiento de cationes divalentes. Las lectinas tipo-C son las más abundantes de todas las lectinas de animales. Son grandes, asimétricas, presentan una dependencia a iones calcio y poseen uno o más CRDs [43]. Otro tipo de lectinas son las tipo-S conocidas como galectinas, estas son proteínas pequeñas, no glicosiladas, solubles y también dependientes de los iones calcio. La mayoría de las galectinas identificadas se unen a *N*-acetilactosamina mediante el reconocimiento de residuos de β -galactosa [39]. En general, las lectinas presentan muchas propiedades biológicas en común, no obstante son un grupo de proteínas con gran diversidad con respecto al tamaño, composición y estructura [44].

Se han publicado varias funcionalizaciones de NP con proteínas, péptidos, DNA y RNA. Sin embargo, se conoce muy poco sobre NPs ligadas con lectinas o carbohidratos [39, 45]. Los estudios basados en la estructura de las lectinas sugieren que estas proteínas reconocen el terminal no reductor de los carbohidratos que constituyen los glicolípidos o glicoproteínas de la membrana celular [44]. Kataoka y col. fueron los pioneros en estudiar este tipo de interacciones usando NPs de oro funcionalizadas con carbohidratos. Las NPs de oro funcionalizadas con lactosa presentaron una selectividad para unirse con la lectina

Ricina aglutina (RCA_{120}), la cual reconoce específicamente los residuos β -D-galactosa [46].

Wang y col. también desarrollaron NPs de oro funcionalizadas con lectinas como la Concavalina A (Con A) y Ricina aglutina (RCA_{120}) para evaluar la interacción de estas proteínas con complejos glicosílicos. Los resultados obtenidos sugieren que las NPs conjugadas con lectinas pueden ser usadas como biosensores para detectar la expresión diferencial de los complejos glicosílicos en la superficie celular [35].

Por otra parte, la Con A, proteína globular obtenida a partir del frijol *Canavalia ensiformis*, es un tetrámero de peso molecular de 104 KDa capaz de reconocer la mayoría de glicoproteínas que presentan residuos de D-manosa (Ver **Figura 3**). Debido a su versatilidad para inmovilizar glicoproteínas, o enzimas, en un soporte sólido, esta lectina brinda gran variedad de aplicaciones como detección de biomarcadores de varias enfermedades inflamatorias crónicas y purificación o detección de glicoproteínas y azúcares en suero [47, 48]. Ding y col. funcionalizaron NPs de oro con la ConA para detectar células de leucemia K562 [47].

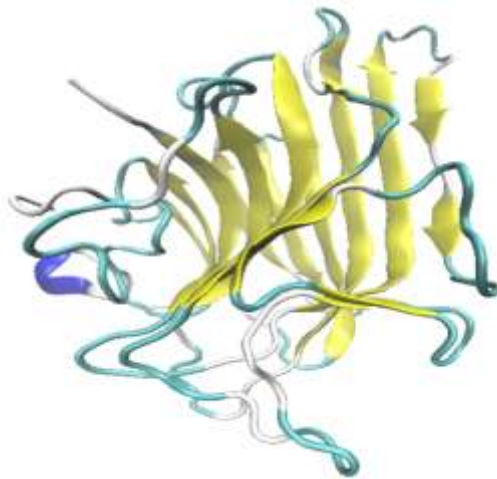


Figura 3: Estructura de la Concavalina A, código 3CNA, PDB.

Recientemente, se ha generado un gran interés por una lectina conocida como BanLec o lectina de banano debido a su capacidad de inhibir la replicación del virus de

inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). Esta glicoproteína está presente en la pulpa de banano (*Musa accuminata spp.*) y se indentificó por primera vez en 1990 como resultado de una investigación sobre respuestas de anticuerpos a ciertos alimentos [49]. La BanLec existe como un dímero de aproximadamente 30 KDa, pertenece a la familia de proteínas relacionadas a las jacalinas (JRL) y posee afinidad o especificidad hacia los residuos glicosílicos de la manosa (Ver **Figura 4**) [52].

Swanson y col. en el 2010 mostraron la actividad inhibitoria de la BanLec sobre la infección del VIH-1. Esta inhibición se da gracias a la unión, de esta lectina, a la proteína glicosilada gp120, la cual posee en su estructura alto contenido de manosa y es importante en el desarrollo del virus. Esta unión bloquea la entrada del VIH-1 en las células, y disminuye notablemente la replicación de una amplia gama de cepas de VIH-1 [50].

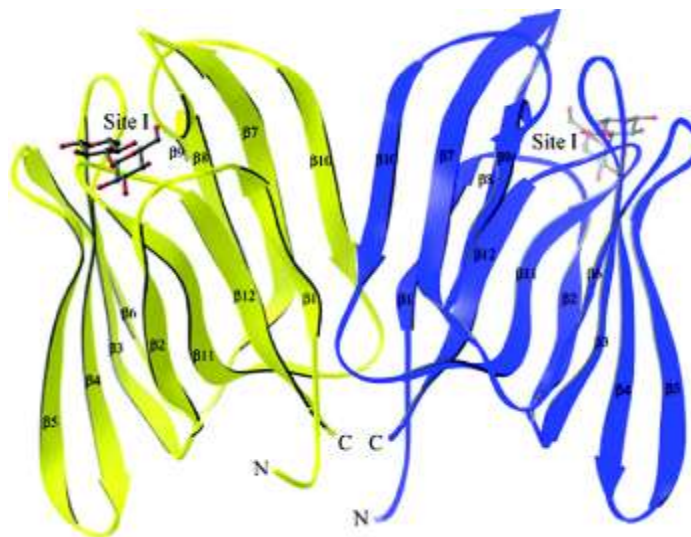


Figura 4: Estructura de la lectina de banano BanLec. Tomada de Swanson, M. D. 2010 [61].

1.4 Efecto antibacteriano de nanopartículas sobre enfermedades infecciosas generadas por microorganismos patógenos

Las enfermedades infecciosas son consideradas como una de las principales causas de mortalidad en el mundo. Este tipo de enfermedades son provocadas por microorganismos como hongos, bacterias y virus. Una de las patologías infecciosas con gran relevancia e incidencia es la enfermedad diarreica aguda (EDA) considerándose un grave problema de salud pública. La EDA puede ser producida por bacterias como *E. coli* y *S. aureus*, siendo *E. coli* la causante del 70% de los casos encontrados en la literatura [51]. Esta enfermedad, con síntomas característicos de diarrea sanguinolenta puede pasar a una fase aguda denominada síndrome urémico hemolítico (SUH), que en algunos casos puede provocar la muerte [52].

Existen diferentes serotipos de *Escherichia coli*, bacteria Gram-negativa, que pueden ser patógenos como el caso de *E. coli* O157:H7. Este serotipo fue reportado por primera vez en Colombia en 1996, y se sabe que este patógeno, transmitido por ingesta de alimentos contaminados, es uno de los más peligrosos para el aparato digestivo [3]. Por su parte, *S. aureus* es una bacteria Gram-positiva y agente etiológico de diversas patologías incluyendo infecciones en la piel y tejidos blandos, del sistema nervioso central (SNC) y del tracto genitourinario. Pero quizás su relevancia radica en que es el causante de las enfermedades nosocomiales o intrahospitalarias, las cuales son inevitables e incontrolables en la mayoría de hospitales y clínicas a nivel mundial [4].

Aunque existen medicamentos para tratar dichas infecciones microbianas, la aparición y el continuo aumento de cepas resistentes a la acción de diferentes antibióticos, ha generado la necesidad de desarrollar nuevas formas efectivas de prevención. En este sentido, la nanotecnología con el fin de desarrollar posibles tratamientos para este tipo de infecciones, ha planteado nuevas estrategias basadas en nanocompuestos, ya que su estructura a escala nano le confiere excelentes propiedades.

Gracias a sus propiedades físicas y químicas, las nanopartículas metálicas constituyen un grupo de posibles agentes antimicrobianos puesto que exhiben importante actividad

bactericida. Además, el tamaño de las NPs proporciona un gran área superficial de contacto con las células bacterianas, y por ende, permite tener un mayor porcentaje de interacción si se compara con partículas más grandes [6].

Actualmente, se han desarrollado varios tipos de nanocompuestos antibacterianos tales como TiO₂ [53], ZnO [54], MgO [55], quitosano [56, 57], cobre, oro y plata [15, 25], siendo estas últimas las mejores en cuanto a la eficiencia antimicrobiana contra bacterias como *E. coli* [6, 58], virus y otros microorganismos [18] (Ver **Tabla 1**).

Tabla 1: Estudios realizados sobre la actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata.

AUTORES	MICROORGANISMOS	CMI	REFERENCIA
Shrivastava et al.	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> y <i>Salmonella typhi</i>	5 mg/L, >100 mg/L y 10 mg/L, respectivamente	Shrivastava, S. et al. Nanotechnology Vol. 18 (2007) 225103- 225111.
Raffi, M. et al.	<i>E. coli</i>	≥ 60 mg/L	Raffi, M. et al. J. Mater. Sci. Technol., Vol. 24 (2008) 192-196.
Espinosa-Cristóbal, L.F. et al.	<i>Streptococcus spp.</i>	>100 mg/L	Espinosa-Cristóbal, L.F. et al. Materials Letters Vol. 63 (2009) 2603–2606
Sotiriou, G. et al.	<i>E. coli</i>	1 mg/L	Sotiriou, G. et al. Environ. Sci. Technol. Vol. 44 (2010), 5649–5654.
Zhang, H. et al.	<i>E. coli</i>	1.2 mg/L	Zhang, H. et al. Environ. Sci. Technol. Vol. 43 (2009), 2905–2910
Sanpui, P. et al.	<i>E. coli</i>	100 mg/L	Sanpui, P. et al. Int. J. Food Microbiology Vol. 124 (2008) 142-146
Morones, J. R. et al.	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella typhi</i> y <i>P. aeruginosa</i>	75 mg/L	Morones, J. R. et al. Nanotechnology Vol. 16 (2005) 2346–2353

Una ventaja importante de las NPs de plata es que aún no se ha generado resistencia bacteriana contra ellas, debido esencialmente a que este metal ataca un amplio rango de blancos o dianas en el organismo, lo cual hace que el microorganismo tenga que desarrollar una serie de mutaciones simultáneas [59]. Esto hace de la plata un componente importante en el tratamiento de una variedad de infecciones y en el tratamiento de quemaduras [41].

En el 2009, Du y col. [60] determinaron concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y concentraciones mínimas bactericidas (CMB) de nanopartículas de quitosano conjugadas con diferentes iones metálicos (plata, cobre, zinc, manganeso, Fe^{2+}). Ellos reportan que los nanocompuestos biofuncionalizados de quitosano-Ag exhiben la mejor actividad antibacteriana con una CMI de 3 y 6 $\mu\text{g/ml}$ contra *E. coli* 25922 and *S. aureus*, respectivamente.

El efecto bactericida de los nanocompuestos de plata ha sido atribuido a su gran área superficial en relación a su volumen, lo cual permite mejor interacción con las membranas bacterianas. Sin embargo, su mecanismo de acción aun no es claro. Existen diferentes hipótesis entre las cuales sugieren que su acción se debe a la formación de unas denominadas piscinas alrededor de la membrana, alterando su permeabilidad y permitiendo el ingreso de estas partículas al interior de la célula donde estas pueden reaccionar con grupos fosfato como el ADN inhibiendo su replicación o con proteínas claves en procesos tales como respiración o síntesis de proteínas [15, 25, 60, 61].

Diferentes autores plantean que un posible mecanismo por el cual ocurre este efecto bactericida es el estrés oxidativo, generado por radicales superóxidos (O_2^-), radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), ya que estas especies pueden dañar las proteínas y el DNA de las bacterias [61]. Otro mecanismo propuesto es mediante la reacción de Fenton. Esta fue descrita por Keenan y col. 2000 y consiste en que el ión Fe^{2+} reacciona con el oxígeno para crear peróxido de hidrógeno, que reacciona con iones ferrosos produciendo radicales hidroxilos, los cuales dañan las macromoléculas biológicas [62]. Debido a que la formación de los radicales ocurre en la superficie de las nanopartículas, su efecto antibacteriano está relacionado con el área

superficial que presente la partícula sintetizada, de tal manera que a mayor área superficial mayor será su efecto antibacteriano [63, 64].

Aunque los nanocompuestos de plata son excelentes antimicrobianos, presentan cierto grado de citotoxicidad especialmente en dosis altas. No obstante, este problema puede ser minimizado utilizando nanopartículas magnéticas, como núcleo, con un recubrimiento de plata, lo que se conoce como NPs núcleo/capa o *core/shell*. Esta combinación disminuye la toxicidad de la plata gracias a las propiedades magnéticas de los compuestos de óxido de hierro, ya que éstos permiten ser removidos del medio acuoso mediante el uso de un campo magnético externo, evitando contaminar el ambiente con productos antibacterianos a base de plata.

Gong y col. [15] (2007) evaluaron la actividad antibacteriana de nanoestructuras bifuncionales de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ y encontraron que la presencia de los iones plata es la responsable de la acción antimicrobiana en los nanocompuestos. Esto se refleja en los valores de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) contra *E. coli*. Un dato interesante en este estudio, es que al comparar la actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata con las nanopartículas bifuncionales se observa una disminución en los valores de CMI con las nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$. Estos resultados sugieren que la presencia de magnetita (Fe_3O_4) tiene un efecto adicional en el efecto inhibitorio de la plata en los microorganismos Gram-negativos estudiados.

En el 2009, Chudasama y col. [25] sintetizaron NPs *core/shell* de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ mediante el método de descomposición térmica. Estas nanoestructuras presentaron propiedades antibacterianas sobre bacterias Gram negativas (*E. coli*, *Proteus vulgaris*) y Gram positivas (*S. aureus*, *Bacillus maegaterium*) presentando un mejor efecto sobre las primeras. En este estudio se encontraron concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 76 $\mu\text{g/ml}$ para *E. coli* y 356 $\mu\text{g/ml}$ para *S. aureus*.

En la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos, se ha estudiado si esta actividad está presente en algunas lectinas. En el 2008, Wellman-Labadie y col. [65] purificaron dos lectinas presentes en la cáscara de huevo, la ovocleidina-17 y la ansocalcina. Estas lectinas mostraron actividades antimicrobianas contra *B. subtilis* y *S. aureus*, siendo más

activas contra *B. subtilis*. Adicionalmente, la ovocleidina-17 exhibe una actividad bactericida más marcada que la ansocalcina, al evaluarlas contra *Pseudomona aeruginosa*.

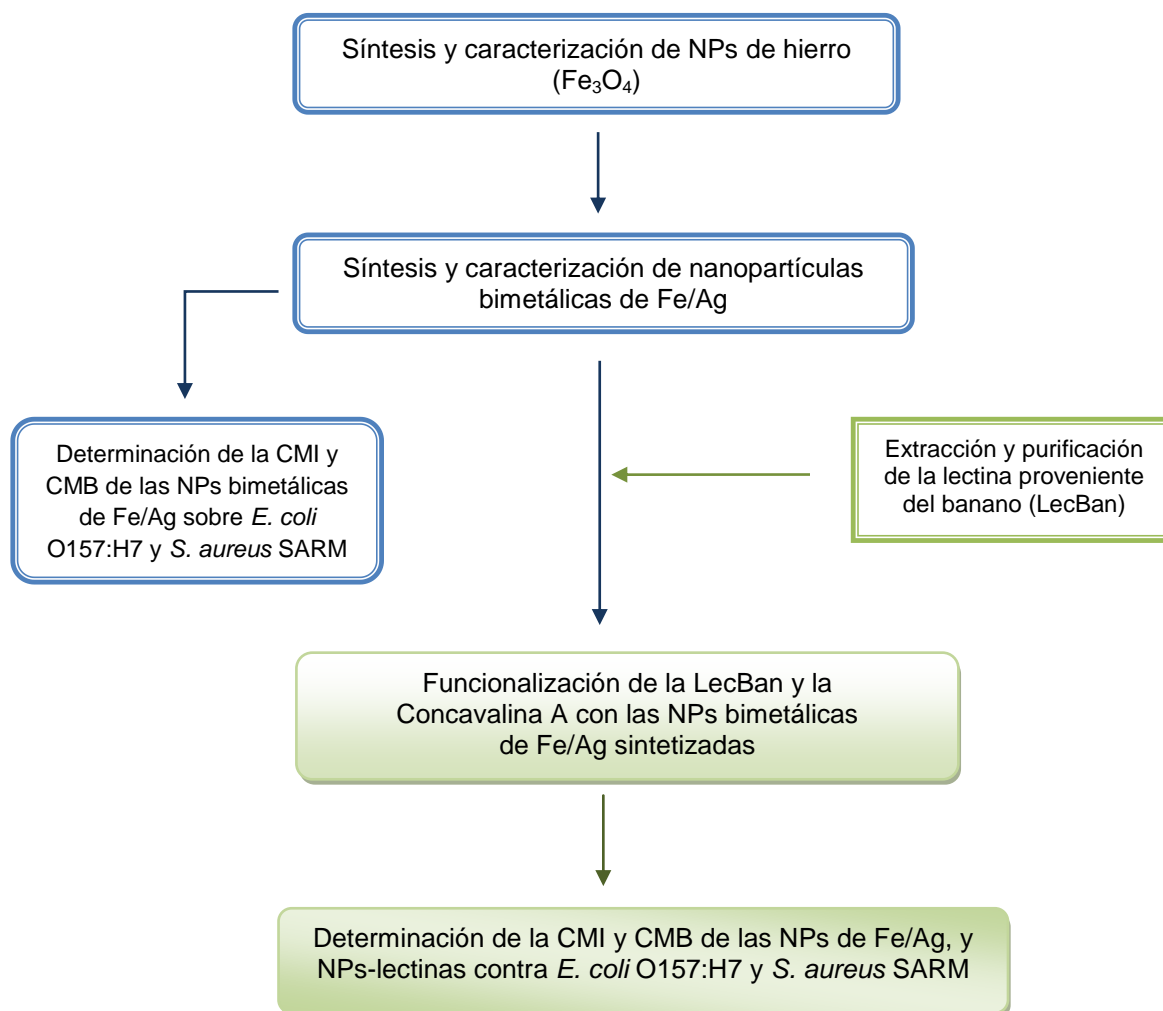
Las interacciones lectina-glicoconjugado juegan un rol importante en la adhesión de las bacterias y su interacción con el huésped ya que estos microorganismos usan proteínas de unión a azúcares como estrategia infectiva, para reconocer y enlazarse a glicoconjugados del huésped. La mayoría de los residuos de carbohidratos presentes en la superficie celular de los parásitos son específicamente reconocidos por lectinas del huésped, por tanto las estructuras de estos carbohidratos pueden servir como modelos para la síntesis de nuevos compuestos con actividad inhibitoria sobre la biosíntesis de los glicanos [11, 44, 66].

En general, el estudio y desarrollo de NPs bimetálicas de Fe/Ag funcionalizadas con lectinas como Con A y BanLec, puede servir como modelo para generar una serie de nuevos agentes antibacterianos, los cuales pueden ser útiles para el control de microorganismos, y por ende, prevenir cierto tipo de enfermedades infecciosas bacterianas de alta incidencia en la población colombiana.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

Los reactivos para la síntesis de las NPs de hierro fueron todos de grado analítico (Sigma-Aldrich). Para la extracción y purificación de la lectina se usaron columnas Sephadex G-75 (Sigma-Aldrich). Las fracciones de proteína se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (Biorad). La funcionalización de las NPs se hizo con la LecBan purificada en nuestro laboratorio y Concavalina A (Sigma), utilizando como agentes acoplantes la N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida y N-hidroxisuccinimida (Sigma-Aldrich).



2.2. Síntesis de nanopartículas bifuncionales de Fe@Ag

2.2.1 Síntesis de nanopartículas de Fe₃O₄

Las nanopartículas (NPs) de Fe₃O₄ se sintetizaron por co-precipitación [15, 60]. Se mezclaron, bajo atmósfera de nitrógeno, 0.3 M de FeCl₃ (variando la concentración en un rango de 0.3 a 0.15M) y 0.15M de FeSO₄*7H₂O (0.15-0.075M) en una relación 2:1 mediante agitación magnética. Con el fin de prevenir la agregación de las NPs, la síntesis se llevó a cabo en presencia 50 mg de polietilenglicol (PEG). Posteriormente, se adicionó a la mezcla, NH₄OH 1.5M, agregado gota a gota, hasta alcanzar un pH igual a 12. Se observó la formación de un precipitado, el cual corresponde a la magnetita (Fe₃O₄). A continuación, se dejó reaccionar por 30 minutos y luego se realizaron lavados con agua desionizada hasta alcanzar un pH neutro. Las NPs obtenidas fueron dispersadas en 100 ml de agua desionizada.

2.2.2 Síntesis de nanopartículas bifuncionales de Fe₃O₄@Ag

Las NPs de Fe₃O₄@Ag fueron sintetizadas mediante el método de micela reversa, publicado en la literatura, con ciertas modificaciones [15]. Para la formación de la micela se utilizó Tritón X-100, ciclohexano y n-butanol. Una vez formada la micela se adicionaron 100µl de NPs de Fe₃O₄ manteniendo una agitación de 600 rpm. Luego se agregaron 200µl de AgNO₃ 0.1M y se dejó reaccionar por 30 minutos. Pasado este tiempo, se adicionaron 200µl de NaBH₄ 0.2M y se dejó en agitación (600 rpm) durante 4.5 horas. Posteriormente, las NPs formadas se precipitaron utilizando un exceso de acetona. Finalmente, se centrifugaron y se lavaron 4 veces con etanol y agua. Las NPs obtenidas se dispersaron en 20 ml de agua desionizada.

2.2.3 Síntesis de nanopartículas bifuncionales de Fe@Ag

Se sintetizaron NPs de Fe partiendo de FeSO₄*7H₂O 4.6mM y citrato de sodio dihidratado 0.46mM. A esta mezcla se le adicionó NaBH₄ 8.8 mM manteniendo agitación de 600 rpm

durante 5 minutos. Posteriormente, se agregó a la mezcla AgNO_3 0.1M con el fin de obtener NPs de tipo Fe/Ag núcleo/capa de acuerdo con el protocolo descrito en la literatura [70].

2.3 Caracterización de las nanopartículas bifuncionales

2.3.1 Espectrometría UV-VIS

Todas 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 700 nm. Se determinó la longitud de onda máxima característica para cada tipo de nanopartículas bifuncionales de Fe@Ag. Para su medición se introdujeron 3 mL de la solución coloidal de NPs en una cubeta de cuarzo y la absorbancia resultante se calculó empleando la Ley de Lamber-Beer.

2.3.2 Microscopía electrónica de transmisión

Las nanopartículas se prepararon dejando caer 10 μL de cada solución sobre una celdilla circular de cobre cubierta por carbón y se enviaron para su caracterización por microscopía electrónica de transmisión (TEM) en el Centro de Materiales de la Universidad de Cornell, Ithaca, Nueva York (EE UU), y al Laboratorio de Microscopía electrónica de transmisión de la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (Colombia) en un equipo TECNAI 20 Twin de alta resolución con voltaje de 200kV.

2.3.3 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, Ítaca, Nueva York (EE UU) y un equipo Mastersizer 2000 de Malvern (UK) de la Universidad Industrial de Santander (Colombia).

2.3.4 Potencial Z

Las nanopartículas también fueron pasadas por un zetámetro y analizadas con 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.

2.4 Funcionalización de las NPs sintetizadas con las lectinas

2.4.1 Extracción y purificación de lectina de banano (BanLec)

Se obtuvo un homogeneizado a partir de 1 Kg de pulpa de banano. Se centrifugó a 15000 g por 3 minutos y al sobrenadante se le adicionó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta alcanzar 10% de saturación. Se centrifugó, nuevamente a 15000 g durante 3 minutos y el sobrenadante se llevó hasta 80% de saturación. Posteriormente, se centrifugó y el sobrenadante obtenido se dializó con agua destilada a 4°C para retirar todo el sulfato de amonio. Luego se analizó el sobrenadante por electroforesis SDS-PAGE-1D para caracterizar el extracto de proteínas presentes en el homogeneizado de banano. El sobrenadante dializado se cargó en una columna Sephadex G-50 equilibrada con buffer PBS 20 mM, pH 7.4. Después de remover las fracciones no adsorbidas, las fracciones adsorbidas fueron eluidas con 40 ml del mismo buffer [71].

Posteriormente, se llevó a cabo una cromatografía de afinidad. El procedimiento es similar al descrito por Ersonn [72]: 18 g de eupergit-C fueron lavados, tres veces, con agua destilada y mezclados con 100 ml de una solución 0.3 M de manosa. Esta mezcla se dejó reaccionar durante 15 horas a temperatura ambiente. Una vez terminado el tiempo de acoplamiento el soporte fue lavado con agua destilada, para remover el exceso de manosa no reaccionante. Una vez obtenido el soporte modificado se procedió a empacar una columna de 100 ml de volumen de lecho (50 cm x 1.3 cm). La fracción retenida en la columna fue eluida con 0,25 M de manosa en buffer fosfato (50 mM pH 7.0, 0.1M de NaCl y 0.01%(p/v) de NaN_3). Cada fracción recolectada fue analizada por electroforesis de proteína SDS-PAGE [71].

Con el fin de concentrar el contenido de lectina obtenido en los procesos de purificación anteriores, se realizó ultrafiltración utilizando amicones de 30 y 10 KDa. Igualmente, a cada fracción obtenida, se le realizó un perfil electroforético de proteínas.

2.4.2 Ensayo de hemaglutinación

Para confirmar que la fracción purificada corresponde a la lectina de banano se realizó el ensayo de hemaglutinación. Para ello, se mezclaron: 100µL de una serie de diferentes diluciones de las lectinas en una placa tipo micropocillo de ELISA, con 50 µl de una suspensión de 2% de eritrocitos, los cuales fueron previamente separados de una muestra de sangre humana. La mezcla de ensayo se incubó durante una 1h a temperatura ambiente hasta observar una sedimentación completa en el blanco. A continuación, se procedió a identificar cuáles diluciones de lectina presentaron la misma sedimentación. Los resultados obtenidos son expresados como el inverso de la dilución más alta que presentó aglutinación, en unidades de hemaglutinación (H.U/ml) [71].

2.4.3 Funcionalización de las NPs sintetizadas con las lectinas (ConA y BanLec)

Se diluyeron 5 ml de las NPs sintetizadas dispersas en etanol en 30 ml de etanol y 1 ml de H₂O. La solución fue sometida a un baño ultrasonido 50/60 Hz por 30 minutos y posteriormente se le adicionó 20µl de 3-aminopropiltriétoxilano (APTS) con agitación fuerte durante toda la noche [73].

El acoplamiento de las lectinas con las NPs sintetizadas se llevó a cabo mediante el método de la carbodiimida [12, 13, 37, 74]. Las carbodiimidias son agentes acoplantes que activan grupos carboxílicos para lograr la unión con grupos aminos libres de la proteína. Para ello se convirtieron los grupos –NH₂, obtenidos de la aminación, en grupos –COOH, utilizando dos metodologías, (anhídrido succínico (AS) y glutaraldehído), las cuales se describen a continuación:

Carboxilación de los grupos -NH₂ con Anhídrido succínico: Se mezclaron 2 ml de las dispersiones aminadas con 2 ml de una solución al 2 %v/v de AS en Dimetilformamida (DMF). Se dejó reaccionar durante la noche, y posteriormente se realizaron 3 lavados con agua y buffer fosfato (50mM, pH 7) para eliminar las especies sin reaccionar. Las NPs carboxiladas se dispersaron en buffer fosfato para su posterior acople [75].

Carboxilación de los grupos -NH₂ con Glutaraldehído: Se mezclaron 2 ml de las dispersiones aminadas con 2 ml de una solución al 10 %(v/v) de glutaraldehído. Esta mezcla se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de reaccionar se realizaron 3 lavados con buffer fosfato (50 mM, pH 7). Finalmente, se resuspendieron las NPs modificadas en 2 ml del mismo buffer [76].

Una vez obtenidos los grupos -COOH, fueron activados con 5 mg de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil carbodiimida) (EDC) y 5 mg de *N*-hidroxi-succinimida. Esta mezcla se dejó reaccionar durante 2 horas con agitación suave y al finalizar la reacción se realizaron lavados (3 veces) con buffer PBS (0.5 M pH 7). Se dispersaron las NPs en 2 ml de buffer y se adicionó 2 ml de una solución de 20 µg/ml de la lectina de banano (LecBan). Nuevamente se realizaron lavados y se redispersaron en 2 ml de buffer. Se realizó el mismo procedimiento para acoplar la Concaivalina A (Con A) a las nanopartículas [74].

2.5 Determinación de la actividad antibacteriana de las NPs de hierro sin funcionalizar y funcionalizadas con lectinas (ConA y BanLec) contra *E. coli* O157:H7 y *S. aureus*

2.5.1 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se prepararon diferentes concentraciones de Fe@AgNPs sin funcionalizar y funcionalizadas (desde 1 hasta 80 µg/mL), y se adicionó 100 µl directamente en los 96 pozos de la microplaca de Elisa que contenían una suspensión bacteriana crecida en medio Luria Bertani (LB) a una concentración de 5×10^8 UFC/ml para *Escherichia coli* O157:H7, y en medio Muller-Hilton (MH) a una concentración de 7×10^6 UFC/ml para *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (SARM). La cinética de crecimiento se

realizó a 37 °C durante 8 horas con una agitación de 200 rpm. Con el fin de determinar la CMI se realizaron lecturas de densidad óptica a 595 nm en microplacas multipocillo tipo ELISA en un equipo "Biorad microplate reader. La CMI se definió como la mínima concentración de NP (en µg/mL) a la cual no hubo un crecimiento bacteriano y adicionalmente, los valores de CMI₉₉, CMI₉₀ CMI₅₀ corresponde a la concentración mínima de NP (en µg/mL) con la cual se logra un 99%, 90% y 50% de inhibición, respectivamente.

2.5.2 Concentración Mínima Bactericida (CMB)

A partir de los tubos en los cuales no se observó crecimiento, se tomó una alícuota de 100 µl los cuales se mezclaron con 900 µl de caldo BHI (Infusion brain-heart); estas muestras fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se transfirió una alícuota de 10 µl sobre la superficie de una placa de agar-BHI y se observó si había crecimiento. La concentración mínima bactericida (CMB) se determinó como concentración más baja a la cual se inhibe el 100% del crecimiento bacteriano.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Síntesis de Nanopartículas de Fe_3O_4

La preparación de este tipo de nanopartículas (NPs) puede llevarse a cabo mediante métodos físicos y químicos siendo los últimos los más empleados. Entre los métodos químicos el más utilizado es la co-precipitación en medio acuoso debido a su simplicidad, eficiencia y a que es un proceso fácilmente escalable [70, 71]. Esto lo hace muy útil para el diseño y fabricación de nanopartículas de óxido de hierro en la industria como agentes de contraste. En este trabajo de investigación las NPs de magnetita (Fe_3O_4) fueron obtenidas mediante el método de co-precipitación utilizando FeCl_3 y FeCl_2 como fuente de iones Fe^{+3} y Fe^{+2} , respectivamente, y NH_4OH como agente reductor. La relación de las sales empleadas fue de 2:1 (FeCl_3 : FeCl_2) variando la concentración inicial de FeCl_3 entre 0.03 y 0.3 M. La mejor dispersión de NPs de magnetita, en cuanto a estabilidad en función del tiempo, fue obtenida empleando FeCl_3 a una concentración de 0.03 M. Esto se debería a que a concentraciones altas de los precursores es mayor la cantidad de NPs obtenidas, con lo cual se genera en la dispersión un aumento de la atracción magnética entre las partículas, lo cual causa una aglomeración y sedimentación de las NPs a tiempos prolongados de conservación.

Con el objetivo de obtener partículas monodispersas y estables, la síntesis de las NPs se llevó a cabo en presencia de diferentes agentes dispersantes. Para ello, se utilizó el polivinilalcohol (PVA, $(\text{CH}_2\text{CHOH})_n$) y el polietilenglicol (PEG, $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$), siendo este último el que proporcionó mejor estabilidad utilizando 0,25% durante el proceso de co-precipitación (Ver **Figura 5**). El PEG genera, en este tipo de NPs magnéticas, mejor estabilidad gracias a que su estructura, posiblemente, proporciona mayor estabilidad estérica en comparación con el PVA, probablemente debido a su mejor capacidad de dispersión de nanopartículas metálicas y formación de enlaces hidrógeno en soluciones acuosas [14]. Además, el PEG es un polímero ampliamente utilizado en el campo de la biomedicina porque no solo ofrece estabilidad sino que proporciona mayor biocompatibilidad [14, 73, 77].

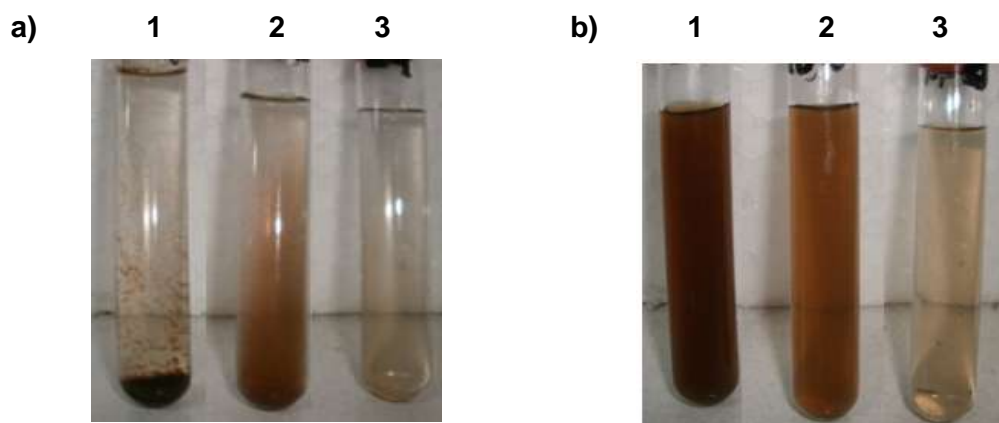


Figura 5: NPs magnéticas (Fe_3O_4) obtenidas por co-precipitación. A) NPs en solución acuosa sin dispersante (PEG). B) NPs en solución acuosa en presencia de dispersante. 1) 0.3 M, 2) 0.15 M y 3) 0.075 M de FeCl_3 .

El análisis por DLS (*Dinamic Light Scattering*) de estas partículas se muestra en la **Figura 6**. Las NPs magnéticas (Fe_3O_4) que mostraron mejor estabilidad en los ensayos preliminares, presentaron un tamaño de partícula de 110 nm. El tamaño de partícula obtenido es debido, posiblemente, a la presencia del agente estabilizante (PEG) que se sitúa en la superficie de la partícula para proporcionar estabilidad a la dispersión. Este diámetro de partícula es aceptable ya que está dentro del rango de tamaños publicados en la literatura para NPs de Fe_3O_4 con recubrimiento polimérico (50-200 nm) [21, 78, 79]. La variación de tamaños está relacionada con el agente estabilizante empleado encontrándose que el recubrimiento de las NPs con PEG aumenta el tamaño hidrodinámico de las partículas [78, 79].

Otro factor que pudo influir en el tamaño de las NPs magnéticas, fue la presencia de pequeñas cantidades de oxígeno durante el proceso de formación de las partículas, ya que si la reacción no se lleva a cabo en un ambiente 100% libre de oxígeno, la oxidación de la magnetita puede ocurrir en el mismo medio de reacción, generando partículas con una mayor distribución de tamaño [13].

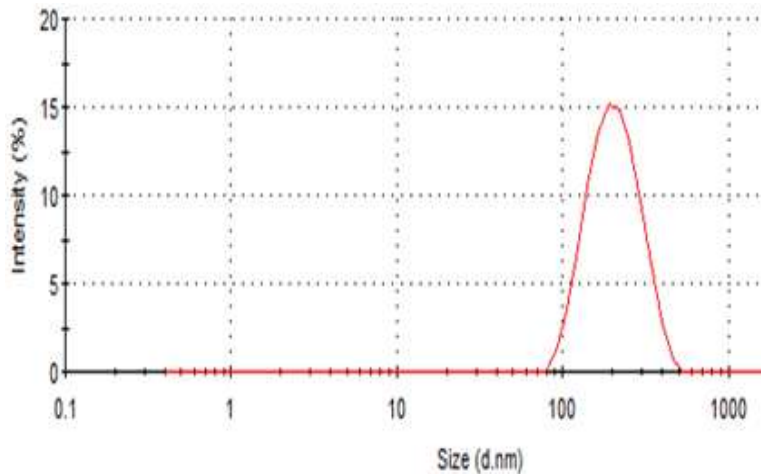


Figura 6: DLS de NPs Fe_3O_4 sintetizadas por co-precipitación utilizando FeCl_3 0.03M; FeCl_2 0.015M; NH_4OH 1.5M como agente reductor (temperatura ambiente y atmósfera de nitrógeno).

Aunque el método de co-precipitación es el más empleado por su simplicidad, alta producción y bajo costo, presenta una desventaja al compararlo con otras metodologías. Esta desventaja consiste en el gran número de variables que se deben controlar y la obtención de una ancha distribución de tamaños de las partículas. Esto hace que se requiera utilizar agentes dispersantes o realizar ultrasonido, como pasos adicionales para evitar la agregación en la dispersión de NPs [13, 15, 60].

Las nanoestructuras magnéticas de Fe_3O_4 sintetizadas alcanzaron dimensiones de 110 nm, indicando que durante la síntesis hubo poco control de tamaño. Sin embargo, este tipo de NPs sirve para los procedimientos posteriores, pues su tamaño está dentro del rango encontrado en la literatura. Osaka y col. 2006, sintetizaron NPs de magnetita para detectar biomoléculas mediante el método de microemulsión obteniendo NPs de 200 nm [79]. Otros autores prepararon este tipo de NCs, empleando procesos térmicos, con un tamaño de 210nm [80] mientras que Telang y col. 2007 utilizaron el método de co-precipitación obteniendo partículas de 40 nm de diámetro, para funcionalizarlas covalentemente con la fosfatasa alcalina (ALP) [33]. En general, el control del tamaño final, distribución, forma y naturaleza de las partículas depende del método de síntesis, la

naturaleza del precursor del hierro, la relación de sus sales, entre otros factores claves [81].

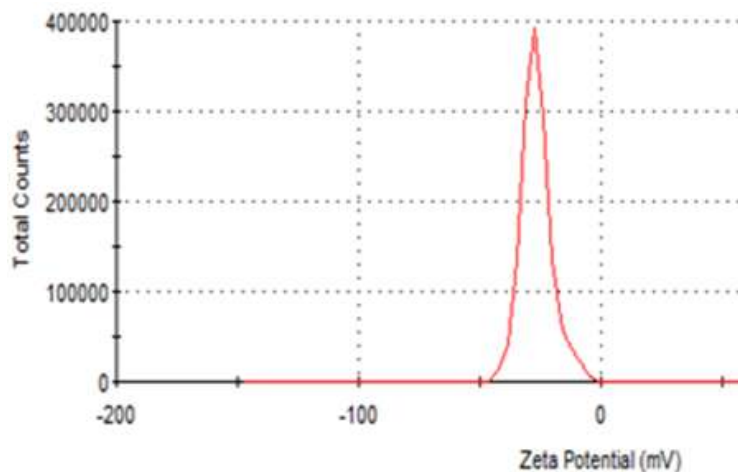


Figura 7: Potencial Zeta de NPs Fe₃O₄ sintetizadas por co-precipitación utilizando FeCl₃ 0,03M; FeCl₂ 0,015M; NH₄OH 1,5M como agente reductor (temperatura ambiente y atmosfera de nitrógeno)

Con respecto a la carga electrostática superficial que presentaron las NPs de magnetita, se observó, mediante el análisis de su potencial Z (Ver **Figura 7**), un valor negativo de -26 mV. Esto indica que este tipo de dispersión no es completamente estable y posee cierta tendencia a flocular formando grandes aglomerados. Aunque la estabilidad de la dispersión magnética se mejoró con el uso del PEG, es normal y aceptable no obtener una dispersión completamente estable ya que todos los óxidos de hierro, en solución acuosa, están cargados negativamente debido a la absorción de grupos -OH en su superficie [73]. Además, las partículas son atraídas magnéticamente ya que cada una de las partículas se comporta como un dominio magnético. Por ello es necesaria la presencia de un agente dispersante para disminuir dichas interacciones entre las partículas. En este sentido, el resultado obtenido es comparable y coherente con lo observado y descrito por otros autores pues se ha publicado que es común, para este tipo de NPs, que se presente cierta inestabilidad debido a que las partículas magnéticas como magnetita (Fe₃O₄) o maghemita (Fe₂O₃), presentan entre ellas interacciones hidrofóbicas formando grandes ramificaciones [13, 18]. Por esta razón, la obtención de una dispersión magnética estable

es un gran obstáculo y reto para muchos investigadores quienes se han dado a la tarea de mejorar y/o probar procesos de obtención de NPs magnéticas monodispersas y estables, pues los nanomateriales magnéticos son de gran importancia en el campo de la biomedicina [13, 17, 18]. Por lo anterior las NPs de magnetita obtenidas fueron útiles para los ensayos posteriores.

3.2 Síntesis de Nanopartículas bimetálicas de Fe/Ag

Las nanoestructuras bimetálicas ofrecen, en general, mejores propiedades que los materiales monometálicos. Por esta razón, en este trabajo se combinó la actividad antibacteriana de la plata y las propiedades magnéticas y no tóxicas del hierro generando nanopartículas bimetálicas (NPb) de Fe/Ag con excelentes propiedades bacteriostáticas. Se logró sintetizar dos tipos de NPb. Una de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ (NPb1) y otras de $\text{Fe}@Ag$ (NPb2).

Se sintetizaron NPs de magnetita combinadas con plata ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ (NPb1)) mediante el método de micela reversa. Las micelas funcionaron como nanoreactores generando partículas de tamaño controlado [14]. Para la formación de las micelas, el ciclohexano fue usado como fase oleosa, el Triton X-100 como surfactante y n-butanol como co-surfactante. Este último tiene como función absorberse en la interfase agua-aceite y mantener una baja viscosidad para evitar la formación de geles [14].

Las micelas inversas son microdominios o agregados que se obtienen al disolver moléculas de surfactante en un solvente orgánico no polar, como por ejemplo, el ciclohexano. La estructura de este tipo de micela es tal que la cabeza polar del surfactante constituye la parte polar del agregado mientras que la cola hidrocarbonada de éste se extiende hacia la solución orgánica no polar. La gran ventaja de la metodología de micela reversa es la posibilidad de controlar el tamaño de las NPs a sintetizar modulando el tamaño del núcleo micelar acuoso [13, 18]. En la **Figura 8** se observan las NPb1 en solución acuosa. La dispersión obtenida para este tipo de NPs presentó una coloración negra con una excelente monodispersidad y estabilidad, ya que no se observó la formación de aglomerados ni agregados.



Figura 8: NPs bimetálicas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ sintetizadas empleando el método de micela reversa usando ciclohexano como fase oleosa, el Triton X-100 como surfactante y n-butanol como co-surfactante (NPb1).

Otro tipo de NPs sintetizadas fueron las obtenidas a partir de la combinación de Fe^0 y Ag^0 (NPs de $\text{Fe}@\text{Ag}$ (NPb2)). En este caso, se empleó el procedimiento descrito por Carroll y col. 2010 [70]. Los autores proponen un procedimiento de un solo paso para la formación de NPs de $\text{Fe}@\text{Ag}$ con una morfología conocida como núcleo/capa o *core/shell* sugiriendo que la composición de la superficie de las NPs va cambiando debido a la formación y crecimiento de NPs de Ag sobre dicha superficie. De tal manera en los primeros 5 minutos de reacción se han formado las NPs de hierro (Fe^0) que actúan como sitios de nucleación para que las NPs de plata se formen y crezcan produciendo nanoestructuras núcleo/capa de $\text{Fe}@\text{Ag}$ (Ver **Figura 9**).

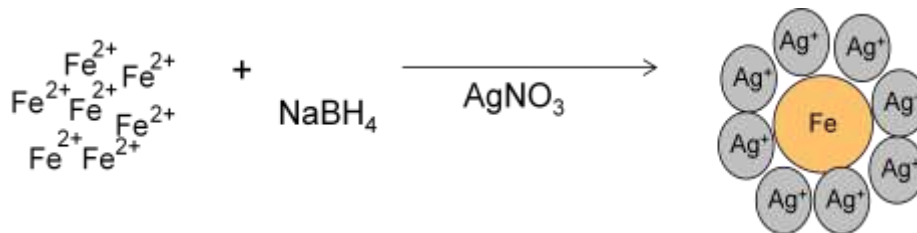


Figura 9: Mecanismo de formación de las NEs núcleo/capa (NPb2). Tomada de [84]

3.2.1 Caracterización de las NPs bimetálicas sintetizadas

A fin de establecer una buena correlación entre la actividad antibacteriana y las propiedades de los nuevos nanomateriales, es necesario conocer la composición química, estructura y morfología de éstos. Las propiedades de las NPs están determinadas principalmente por su tamaño y morfología, incluso cuando tienen la misma composición química [82, 83].

3.2.1.1 Espectrometría UV-vis

Los espectros de absorción UV-vis de las NPs sintetizadas se muestran en el **Figura 10**. Las nanopartículas de Fe_3O_4 presentaron un incremento en la absorbancia de 300 a 700nm sin ningún pico marcado. En cuanto, a las nanopartículas bimetálicas de Fe/Ag presentan, en su espectro de absorción, una banda característica en 397 nm que corresponde a la superficie de plasmón de las nanopartículas de plata, indicando una deposición del elemento plata sobre las nanopartículas de hierro.

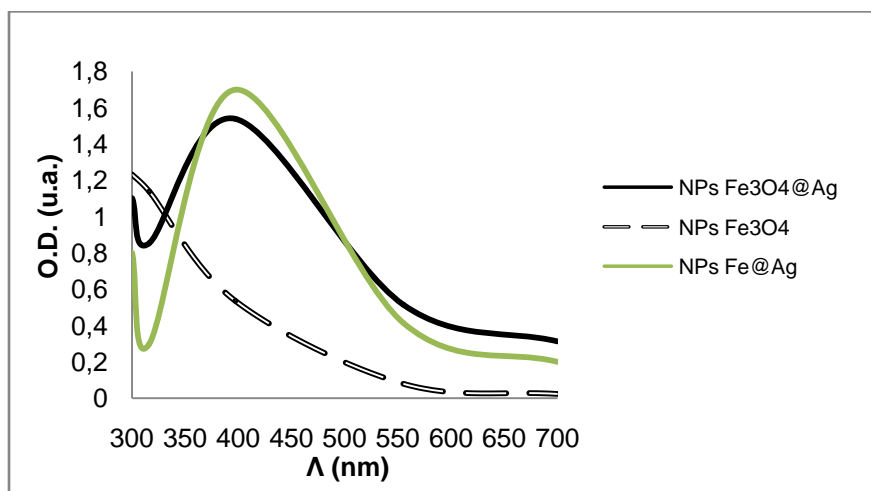


Figura 10: Espectros de absorción UV-vis de las NPs bimetálicas sintetizadas. (- - -) NPs de Fe_3O_4 obtenidas por co-precipitación. (—) NPs de Fe_3O_4 @Ag sintetizadas mediante micela reversa. (—) NPs de Fe@Ag con estructura *core/shell*

Los espectros de los dos tipos de NPb sintetizadas muestran una única banda de absorción, lo cual sugiere que estas partículas pueden ser esféricas, según la teoría de Mie, siendo esta observación consistente con los resultados obtenidos por TEM [5]. La forma y posición de la banda de absorción depende del tamaño de la partícula y de las especies presentes en su superficie [73, 84]. En este sentido, el ancho de banda puede deberse, en este caso, a la presencia de PEG, el agente dispersante, en la superficie de las partículas, o a la polidispersidad del nanomaterial. Estos resultados son comparables y consistentes con las observaciones encontradas en la literatura para este tipo de nanocompuestos metálicos [14, 25, 85, 89].

3.2.1.2 Microscopía de transmisión electrónica TEM

Con el fin de observar tanto su tamaño como su forma, se realizó el análisis por microscopía de transmisión electrónica (TEM). Las imágenes presentadas en la **Figura 11** muestran que las nanopartículas bimetalicas (NPb) sintetizadas de Fe/Ag presentaron en un tamaño uniforme y en su mayoría con una forma aproximadamente esférica. Además, se puede observar cierta aglomeración en las NPb1 y la formación de grandes agregados en las NPb2. La formación de aglomerados o agregados es debida a las fuerzas de atracción entre las partículas, fenómeno común para los nanomateriales que constan de NPs de hierro [14, 25, 80].

La **Figura 11b** confirma la forma de las NPs obtenidas por la metodología núcleo/capa (NPb2), la cual consiste en dos regiones que se diferencian por su color claro/oscuro. Estudios realizados por Chudasama y col. (2009) sugieren que esta variación de contraste se debe a que el núcleo (región más oscura, Región 1) y la capa (región más clara, Región 2) lo constituyen materiales con diferente masa atómica. Estos autores confirman, mediante análisis por EDS (Espectrometría de Dispersión de Energía) de rayos X, que la región 1 está compuesta por elementos de Fe y O mientras que la región 2 se compone de elementos de Ag [25]. El análisis de TEM sugiere que los NMs de Fe@Ag obtenidos en este trabajo, posiblemente, sean de estructura núcleo/capa ya que al ser comparados con los obtenidos por otros autores se encuentra gran similitud en la estructura de las NPs.

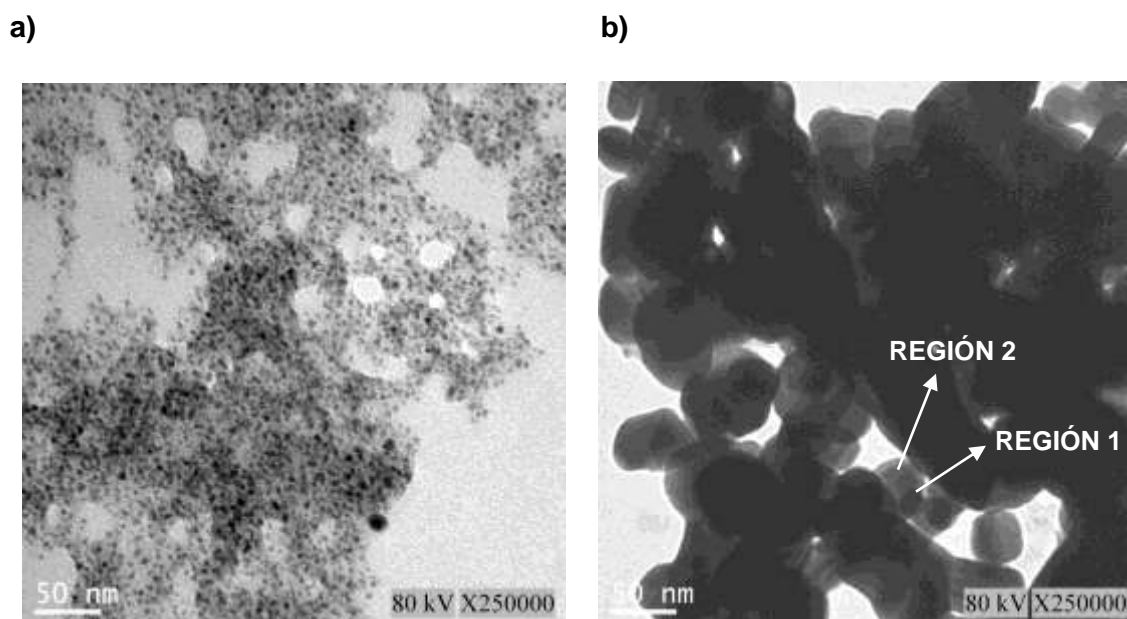


Figura 11: TEM de NPs bimetálicas de: a) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag}$ obtenidas por micela reversa, NPb1 y b) NPs *core/shell* Fe@Ag , NPb2.

3.2.1.3 Dispersión de Luz en modo dinámico (DLS)

El análisis de distribución de tamaño mediante DLS para los dos tipos de NPs bimetálicas sintetizadas, muestra que las dispersiones están constituidas por una sola población de partículas, con una distribución de tamaño homogénea, y un tamaño de 100 nm y 90nm, para las NPb1 y las NPb2, respectivamente (Ver **Figura 12**).

La diferencia entre los tamaños de partículas para los dos tipos de NPb se debería a que cada tipo de NPb se sintetizó con un precursor de hierro diferente, es decir, las NPb1 se obtienen a partir de NPs de Fe_3O_4 con un tamaño de 110 nm mientras que las NPb2 se sintetizan a partir de una fuente de Fe^{+2} en solución. Para la síntesis u obtención de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag}$ (NPb1) se usó como precursor las NPs de Fe_3O_4 , las cuales se mantienen bajo constante agitación durante el tiempo de reacción. La agitación constante puede, probablemente, separar o desligar ciertos aglomerados presentes en las NPs de magnetita, generando partículas más pequeñas que, posteriormente, van a reaccionar

con los núcleos de plata. Por esta razón, se observa una ligera disminución en el tamaño de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ en comparación con las NPs de Fe_3O_4 .

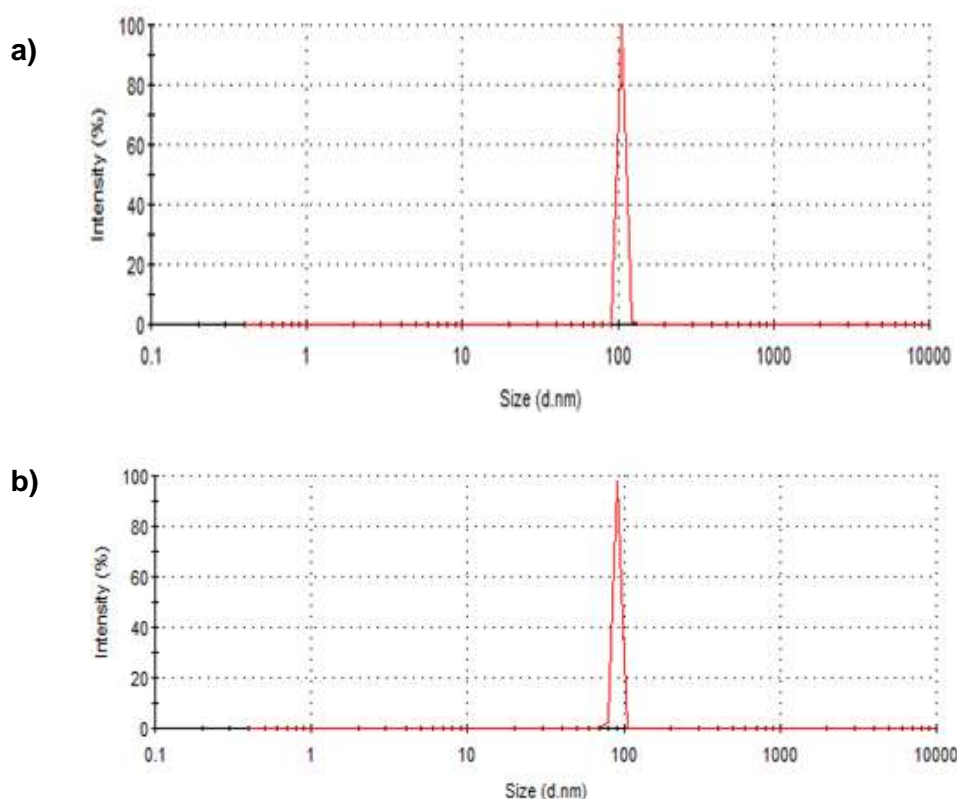


Figura 12: DLS de las NPs bimetálicas de: a) $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ obtenidas por micela inversa, Tipo 1 y b) NPs *core/shell* $\text{Fe}@Ag$, Tipo 2.

Los tamaños obtenidos para los dos tipos de NPs se aproximan a los valores encontrados en la literatura. Algunos autores han obtenido NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ con forma esférica de 72 nm de diámetro empleando la técnica de micela inversa sin agentes dispersantes [14]. En el presente trabajo, se utilizó PEG como agente estabilizante de las NPs de Fe_3O_4 . Por otra parte, Carroll y col. 2010, quienes propusieron la síntesis de NPs de $\text{Fe}@Ag$ con estructura núcleo/capa, obtuvieron tamaños cerca de 50 nm [70]. Sin embargo, las especificaciones descritas por este autor no son reproducibles, ya que al llevar a cabo el mismo procedimiento no se obtienen dispersiones estables. Por esta razón, fue necesario estandarizar la cantidad de citrato utilizada, agente estabilizante en este caso, y el tiempo

de reacción logrando NPs de Fe@Ag estables con 0.1 ml de citrato y un tiempo de reacción de 16 horas, indicaciones que omite el mencionado autor. Lo anterior, puede ser la causa de la diferencia en el tamaño de partícula obtenido en la presente investigación.

3.2.1.4 Potencial Z

En la **Figura 13** se observa el potencial zeta medido para los dos tipos de NPb sintetizadas.

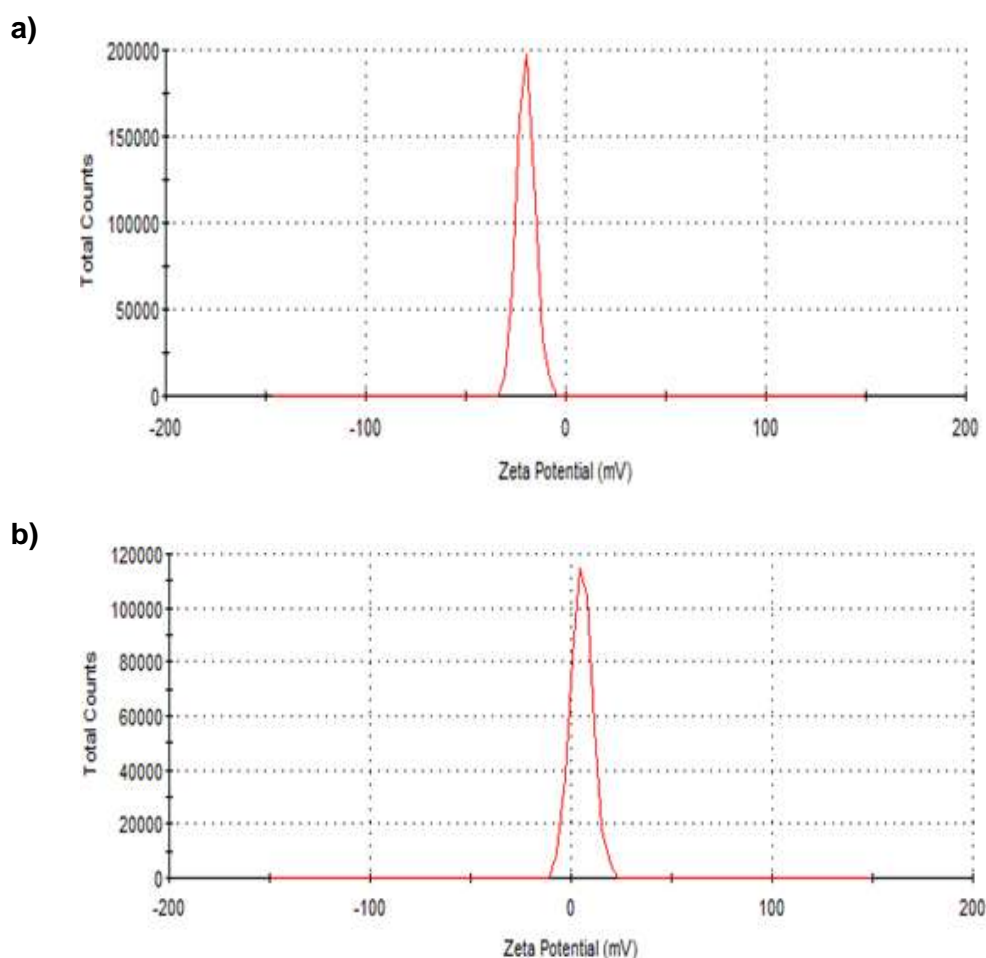


Figura 13: Potencial Z de las NPs bimetálicas de: a) $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ obtenidas por micela reversa, NPb1 y b) NPs *core/shell* Fe@Ag, NPb2.

Las NPb1 presentaron un potencial Z de -10 mV y las NPb2 de 7 mV. Las partículas presentaron un bajo valor de potencial Z indicando que las dispersiones obtenidas no son estables y eventualmente podrían flocular. La inestabilidad es debida a las fuertes atracciones magnéticas entre las partículas, que aunque se disminuyen con el uso de agentes estabilizantes siguen presentes en las dispersiones [13, 18, 85, 86]. Sin embargo, los dos tipos de NPb sintetizadas mostraron ser estables sin presentar ningún tipo de aglomeración o sedimentación durante el desarrollo de la investigación.

La estabilidad y aglomeración de las dispersiones están determinadas por las fuerzas de atracción y repulsión entre las partículas individuales. Si las partículas chocan entre sí con una energía suficiente para superar la barrera de repulsión, las partículas se adhieren fuerte e irreversiblemente aumentando de tamaño al formar agregados. Por el contrario, si las partículas tienen una repulsión suficientemente alta, la dispersión puede ser estable ya que podría resistir a la floculación [13, 18].

Existen dos mecanismos que influyen en la estabilidad de una dispersión: la estabilización electrostática y la repulsión estérica. La repulsión estérica implica el uso de polímeros que son adicionados al sistema para ser absorbidos en la superficie de la partícula y es el mecanismo más empleado debido a que provee la capacidad y facilidad de modificar la superficie de la partícula con el objetivo de enlazarla a biomoléculas como anticuerpos, péptidos, hormonas, lectinas [12, 18, 33, 77]. Si el polímero se absorbe adecuadamente, el espesor del recubrimiento es suficiente para mantener las partículas separadas. En este caso, aunque el potencial Z fue bajo, las NPs físicamente no presentaron aglomerados ni sedimentaciones, por lo tanto, el PEG absorbido en la superficie de las NPs, generó posiblemente un espesor suficiente para evitar la formación de agregados [13, 85].

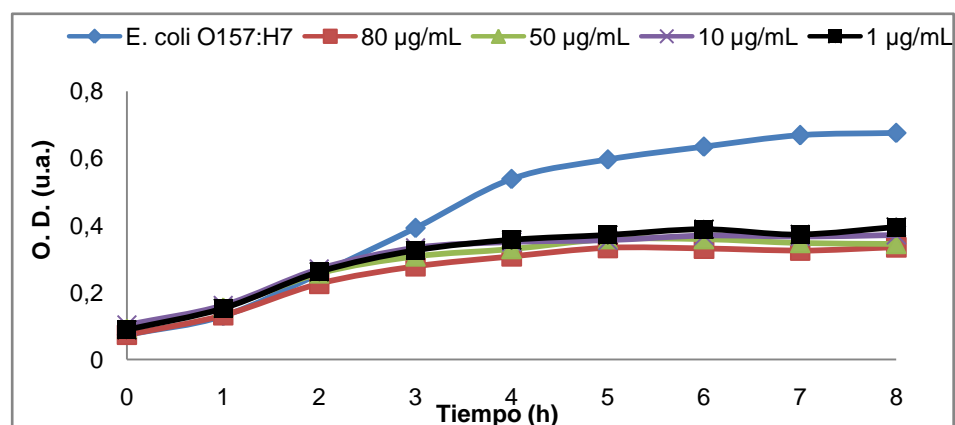
3.3 Efecto antibacteriano de las nanopartículas bimetálicas de Fe/Ag sobre *E. coli* O157:H7 y *S. aureus*

Las nanopartículas bimetálicas (NPb) sintetizadas fueron evaluadas en su actividad antibacteriana contra *E. coli* O157:H7 (Gram-negativa) y *S. aureus* resistente a meticilina

(SARM) (Gram-positiva). Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante ensayos realizados por triplicado. Los estudios demostraron que la presencia de iones Ag en las NPs sintetizadas es la responsable de la acción inhibitoria, ya que al evaluar las NPs de Fe₃O₄ no se observó ninguna inhibición significativa en el rango de concentraciones evaluadas. Aunque las NPs magnéticas no poseen actividad antibacteriana per se, pueden ser útiles para disminuir el efecto citotóxico de las NPs de plata, ya que se ha demostrado que los nanomateriales de hierro u óxidos de hierro no presentan toxicidad sobre las células [9] y debido a las propiedades magnéticas son una excelente estrategia para eliminar o remover residuos de las NPs en el medio en que se encuentren [14, 17, 27]. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por otros autores [14, 85] los cuales no encontraron efectos tóxicos sobre el crecimiento normal de *E. coli* en medio LB con NPs de Fe₃O₄.

En la **Figura 14** se muestra el efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de NPs de Fe₃O₄@Ag (NPb1) sobre el crecimiento de las bacterias. Las curvas de crecimiento bacteriano constan de cuatro fases: fase de latencia o fase de inicio a la división celular; fase logarítmica, en la cual las células se multiplican a un ritmo constante; fase estacionaria y la fase de muerte [86]. A partir de la cinética de crecimiento se puede observar que las NPb1 muestran mayor porcentaje de inhibición sobre *E. coli* O157:H7 al compararse con *S. aureus* (SARM), ya que una concentración de 1 µg/mL provoca un 50% de inhibición sobre el crecimiento normal de *E. coli*, mientras que esta misma concentración solo genera un 40% de inhibición del crecimiento celular de *S. aureus*.

A



B

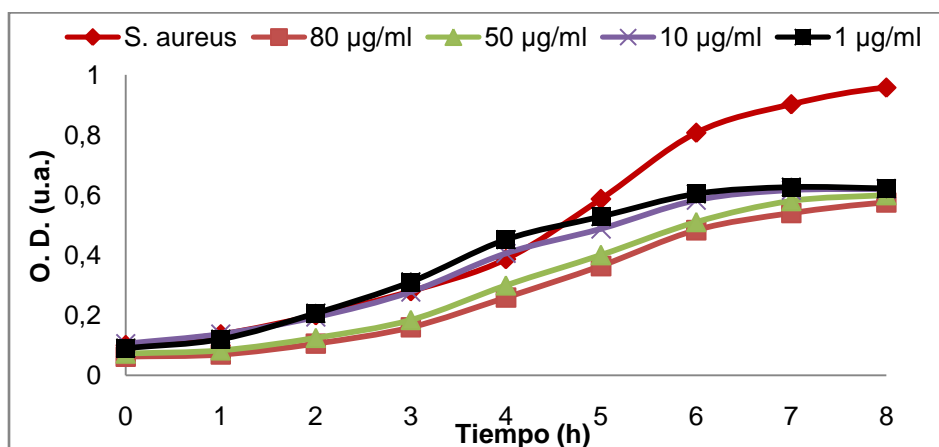


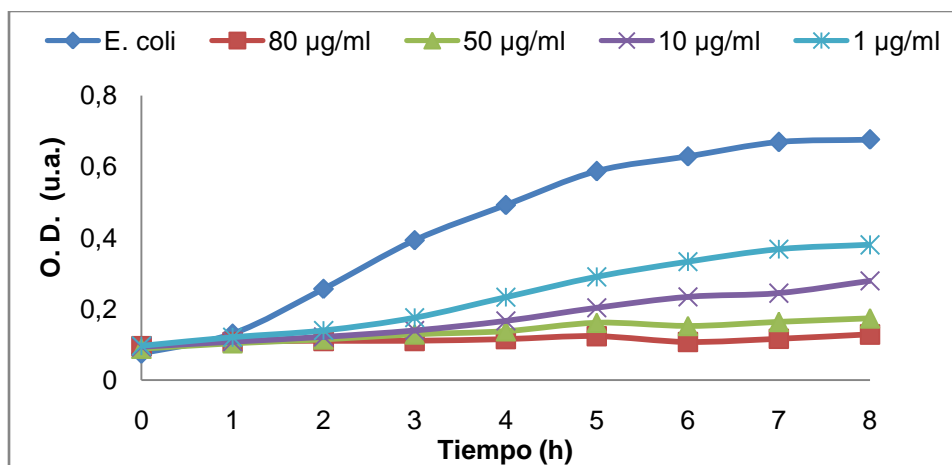
Figura 14: Cinética de crecimiento de a) *E. coli* O157:H7 5×10^8 UFC/ml de concentración en medio Luria-bertani (LB) y b) *S. aureus* SARM 7×10^6 UFC/ml de concentración en medio Muller-Hilton (MH), en presencia en presencia de 100 µl de diferentes concentraciones de NPb1. Temperatura de 37°C, 200 rpm durante 8 horas, OD medida a 595 nm.

Este comportamiento puede explicarse en base a las estructuras de las membranas bacterianas y al tamaño de las NPs sintetizadas. Las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas difieren fundamentalmente en la morfología de sus paredes. Las bacterias Gram-negativas, como el caso de *E. coli* O157:H7, presentan una membrana externa adicional rica en lipopolisacáridos y poseen una capa delgada de peptidoglicanos (PG) entre las dos membranas. Por su parte, la pared celular de las bacterias Gram-positivas como *S. aureus* SARM está constituida por una capa gruesa de PG en donde se unen covalentemente ácidos teicoicos y proteínas [87, 88]. Esta capa de PG es 10 veces más gruesa que en *E. coli*, lo cual es de gran importancia en cuanto a la resistencia de la célula a ser penetrada por los iones Ag evitando su acción biocida [88]. Al observar los tamaños de las partículas se puede inferir que es más fácil para las NPb1 atravesar la membrana de *E. coli* O157:H7, dañando la permeabilidad e integridad de ella, que la gruesa capa de peptidoglicano característica de *S. aureus* [87]. Este resultado es similar al obtenido por otros autores donde obtienen mayor sensibilidad sobre *E. coli* en comparación con *S. aureus*. Chudasama y col. 2009 obtienen CMI de 76 µg/mL y 356 µg/mL para *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente. Sin embargo, el autor no encuentra una

tendencia clara en los valores de CMI para las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas [25].

Con respecto a las NPb2 éstas exhiben gran actividad bacteriostática sobre las dos bacterias evaluadas (Ver **Figura 15**).

A



B

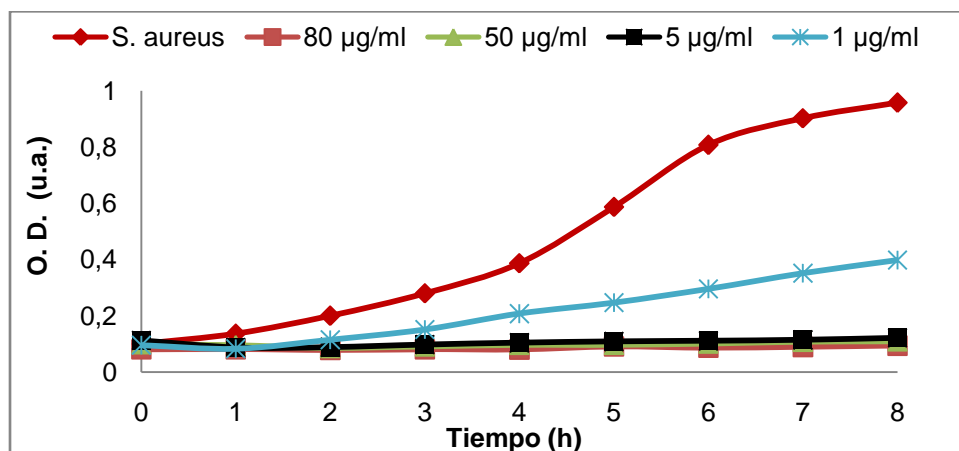


Figura 15: Cinética de crecimiento de a) *E. coli* O157:H7 5×10^8 UFC/ml de concentración en medio Luria-bertani (LB) y b) *S. aureus* SARM 7×10^6 UFC/ml de concentración en medio Muller-Hilton (MH), en presencia en presencia de 100 µl de diferentes concentraciones de NPb1. Temperatura de 37°C, 200 rpm durante 8 horas, OD medida a 595 nm.

Estudios previos sugieren que el efecto antibacteriano de las NPs depende, entre otros factores, del tamaño de las mismas [88]. De esta manera, nanopartículas de tamaños más pequeños poseen mayor área superficial disponible para entrar en contacto con la membrana bacteriana, generando mayor acción biocida [89]. Lo anterior coincide con el comportamiento observado para las NPb2 ya que presentan un menor tamaño de partícula (90 nm) en comparación con las NPb1 (100 nm) proporcionando mayor actividad inhibitoria.

Las NPb2 poseen una actividad variable sobre las dos cepas evaluadas y muestran un efecto de inhibición dosis-dependiente, observándose un mayor efecto antibacteriano a concentraciones más altas de las NPb. La mayor acción inhibitoria de las NPb2, en comparación con las NPb1, podría deberse a la presencia de iones hierro cero valente (Fe^0) que constituyen el núcleo de estas NPs. La propiedad antibacteriana del Fe^0 fue comprobada por Lee y col. [90] encontrando que NPs de Fe^0 , en solución acuosa, inactivan rápidamente el crecimiento de *E. coli*. Estos autores muestran daños físicos en la membrana celular de esta bacteria al ser expuesta a las NPs Fe^0 lo cual atribuyen al poder reductor del hierro que induciría la descomposición reductiva de los grupos funcionales presentes en las proteínas y los LPP de la membrana externa de la bacteria. Adicionalmente, evaluaron el efecto de NPs de Fe_3O_4 y no observaron una inactivación significativa sobre *E. coli*.

Adicionalmente, los datos obtenidos reflejan que *S. aureus* es más sensible que *E. coli* ante la acción de NPb2. Por ejemplo, se logra un fuerte efecto bacteriostático contra la bacteria *S. aureus* con una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ alcanzando 99% de inhibición bacteriana, mientras que para alcanzar una inhibición del 95% sobre *E. coli* se necesita una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de este tipo de NPs.

La variación de la respuesta bacteriana, ante la acción de las NPs, también puede estar relacionada con la polaridad de la membrana celular, ya que ésta facilita o dificulta la interacción con las partículas, que a su vez, presentan normalmente una carga superficial. Las membranas de las bacterias poseen una carga total negativa a pHs biológicos, siendo más susceptible a la interacción con moléculas o partículas cargadas positivamente. Diversos estudios, incluyendo análisis electroforéticos, sugieren que la membrana de *S.*

aureus posee una carga negativa más pequeña que la presente en *E. coli* [91] siendo más sensible ante la actividad bactericida de las NPs con carga superficial negativa o ligeramente positiva. Las NPb2 presentan una carga superficial o potencial Z positivo, por lo tanto, pueden interactuar mejor con la membrana bacteriana, lo que explica la mayor acción inhibitoria por parte de estas NPs en comparación con las NPb1, que poseen un potencial Z negativo.

Los valores de CMI obtenidos para las NPb2 son coherentes con estudios previos que también demuestran que *S. aureus* es más sensible que *E. coli* ante la presencia de diferentes tipos de NPs en el medio, como por ejemplo NCs de Fe@Zn, entre otros [92]. Igualmente, relacionan esta sensibilidad de *S. aureus* con la diferencia en la polaridad de las membranas bacterianas [92].

Debido a que la carga total de las membranas es un factor clave para la eficiencia de los agentes antibacterianos, se ha estudiado la influencia del potencial Z sobre la interacción entre la nanopartícula y la membrana bacteriana. En estos estudios se ha encontrado que el efecto bactericida parece depender de la magnitud de adsorción de la partícula, la cual está relacionada con las fuerzas electrostáticas [85]. En el proceso de sorción son absorbidas principalmente las partículas pequeñas y esta permeabilidad de la membrana celular puede conducir a la muerte celular de los microorganismos. Schwegmann 2010 [85] mostró por isotermas de sorción la formación de una monocapa de NPs de óxidos de hierro sobre microorganismos como *E. coli* y *Staphylococcus cerevisiae*. A mayor fuerza de atracción se cubre con las NPs una mayor proporción de la superficie de los microorganismos, por lo que una disminución de los efectos bacteriostáticos puede ser atribuida a una pérdida en los niveles de sorción.

Los resultados obtenidos muestran que los dos tipos de NPb poseen actividad bacteriostática, la cual puede ser atribuida a la presencia de iones plata en los nanocompuestos, puesto que se ha demostrado que la plata posee propiedades antibacterianas frente a estos microorganismos [5, 6, 89, 93]. La tabla 1 muestra los valores de las CMI para las cepas en estudio. .

Tabla 2: Concentraciones mínimas inhibitorias de NPb sobre *E. coli* O157:H7 a una concentración de 5×10^8 UFC/ml en medio LB y *S. aureus* SARM a una concentración de 7×10^6 UFC/ml en medio MH, a una temperatura de 37 °C durante 8 horas con una agitación de 200 rpm.

MICROORGANISMO	<i>E. Coli</i> O157:H7			<i>S. aureus</i> SARM		
CMI ($\mu\text{g/mL}$)	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMB	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMB
TIPO DE NPs						
Fe_3O_4	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80
$\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$	1	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80
$\text{Fe}@Ag$	1	50	> 80	1	5	> 80

*CMI₅₀: Concentración de las NPb que inhibe el 50% del crecimiento normal de las bacterias

*CMI₉₀: Concentración de las NPb que inhibe el 90% del crecimiento normal de las bacterias

*CMB: Concentración de las NPb que causa un efecto letal sobre las bacterias

Las NPb de Fe/Ag son nanoestructuras que combinan las propiedades biocidas de la plata con la no toxicidad y propiedades magnéticas del hierro, ofreciendo la posibilidad de remover del medio este tipo de nanocompuestos con la aplicación de un campo magnético adecuado. Al comparar los valores de CMI obtenidos con las NPb, con los publicados en la literatura para estas mismas cepas [14, 25], las concentraciones halladas son menores, incluyendo las concentraciones de los agentes disponibles comercialmente que son de 800 $\mu\text{g/mL}$. En otros estudios se han encontrado $\text{CMI} \geq 70 \mu\text{g/mL}$ y 356 $\mu\text{g/mL}$ para *E.coli* y *S. aureus*, respectivamente [25]. Esto sugiere que las NPb sintetizadas en este estudio presentan mayor efecto inhibitorio con concentraciones de tan solo 1 $\mu\text{g/mL}$.

3.4 Funcionalización de las NPs sintetizadas con lectinas (ConA y BanLec)

Las nanopartículas se caracterizan por tener gran área superficial en relación a su volumen y un gran número de átomos en su superficie, tender a adsorber iones o moléculas en solución. Para el caso de las NPs de hierro, los átomos de Fe y O, presentes en la superficie, podrían absorber -OH y H^+ , respectivamente. Esto genera una superficie rica en grupos -OH y fácilmente modificable mediante enlaces covalentes con diferentes fines [73, 77].

En este trabajo se modificó la superficie de las NPs sintetizadas (Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ y $\text{Fe}@\text{Ag}$) generando grupos carboxílicos (-COOH) para formar, mediante el método de la carbodiimida, enlaces amidas con los grupos aminos libres de las lectinas Concavalina A (Con A) y lectina de banano (LecBan).

3.4.1 Purificación de la lectina de banano (LecBan)

Como primer paso, antes de iniciar el proceso de funcionalización, se llevó a cabo la purificación de la lectina de banano a partir de 1 Kg de pulpa de esta fruta. Con el fin de eliminar las proteínas de alto peso molecular se realizó una cromatografía de exclusión de tamaño usando una columna Sephadex G-75. Este tipo de columna separa las proteínas según su peso molecular de tal manera que primero eluyen las proteínas más grandes quedando retenidas las proteínas de menor tamaño. Las diferentes fracciones obtenidas se analizaron mediante electroforesis unidimensional (SDS-PAGE) para conocer su perfil proteico. En la imagen del gel (12% de poliacrilamida, tinción con Sypro) se observa que las fracciones 1 a 3, ubicadas en orden de elución, presentan proteínas con pesos moleculares de hasta 150 KDa (ver **Figura 16**). La fracción retenida en la columna fue eluida con buffer fosfato (50 mM, pH 7) y su perfil proteico se observa en el carril 4. Esta fracción contiene proteínas entre 15 y 60 KDa, por lo cual fue seleccionada para las etapas posteriores de purificación.

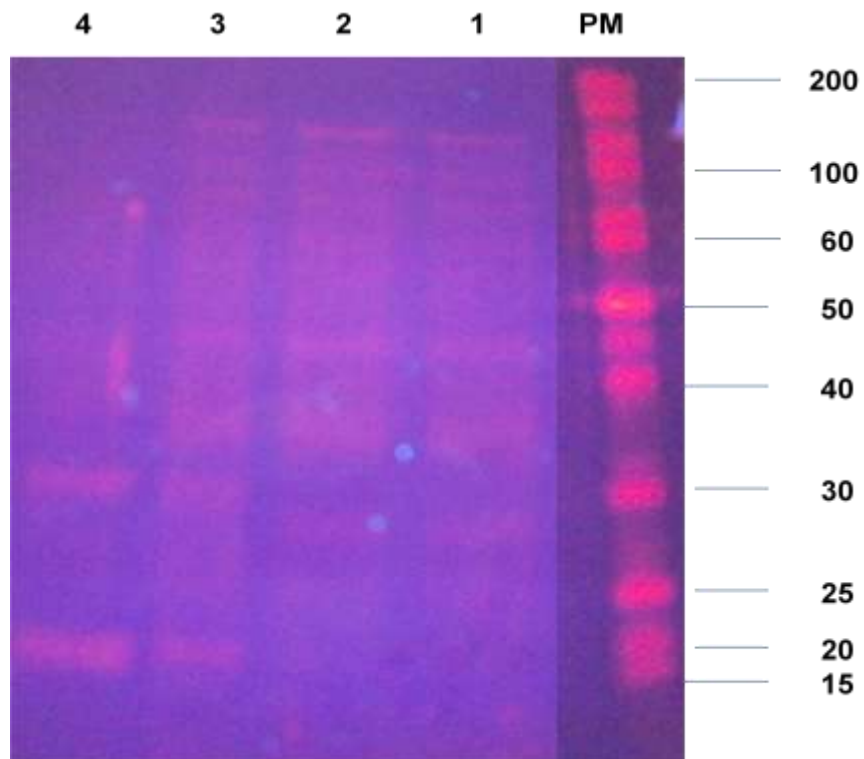


Figura 16: SDS-PAGE de las fracciones de proteínas obtenidas eluidas de la columna Sephadex G-75. Tinción con Sypro. Carril 1: Primera fracción de proteínas eluida de la columna; Carril 2: segunda fracción de proteínas eluida de la columna; Carril 3: Primera fracción retenida en la columna y eluida con buffer fosfato (50 mM, pH 7) y Carril 4: Segunda fracción retenida en la columna y eluida con buffer fosfato (50 mM, pH 7).

Adicionalmente, se realizó el ensayo de hemaglutinación a cada fracción de proteína obtenida de la columna. Este ensayo se lleva a cabo para confirmar la presencia de lectinas en la muestra, ya que las lectinas tienen la capacidad de unirse y aglutinar eritrocitos humanos o animales [71, 94] (Ver **Figura 17**). Según esta prueba, solo las fracciones 3 y 4 presentaron aglutinación, sugiriendo que en éstas estaba presente la lectina. Sin embargo, la fracción 3 se descartó por la presencia de proteínas de alto peso molecular, dificultando la obtención y purificación de la proteína deseada (Ver **Figura 16**).

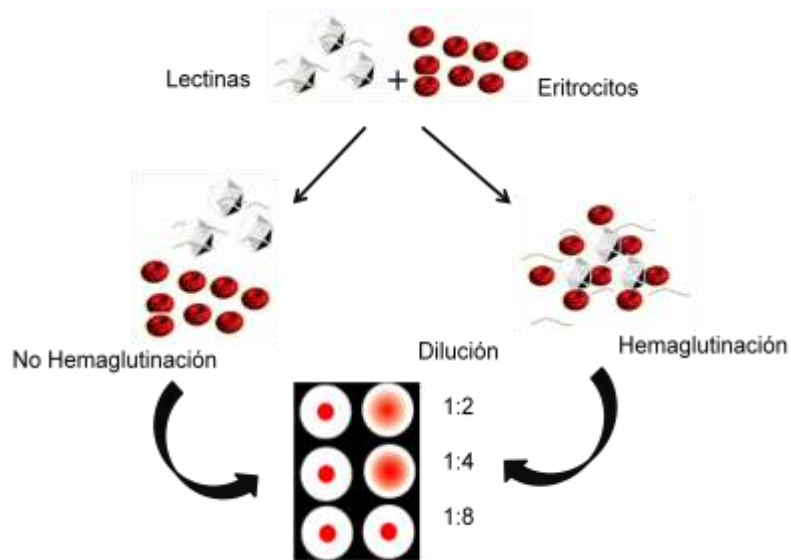


Figura 17: Esquema ilustrativo del ensayo de Hemaglutinación utilizando una suspensión de 2% de eritrocitos realizado para confirmar la presencia de la lectina.

Aprovechando la especificidad que presenta la lectina en estudio (LecBan) hacia el reconocimiento del carbohidrato manosa, se realizó una cromatografía de afinidad utilizando un soporte de Eupergit-C epóxido activado con este monosacárido (Ver **Figura 18**).

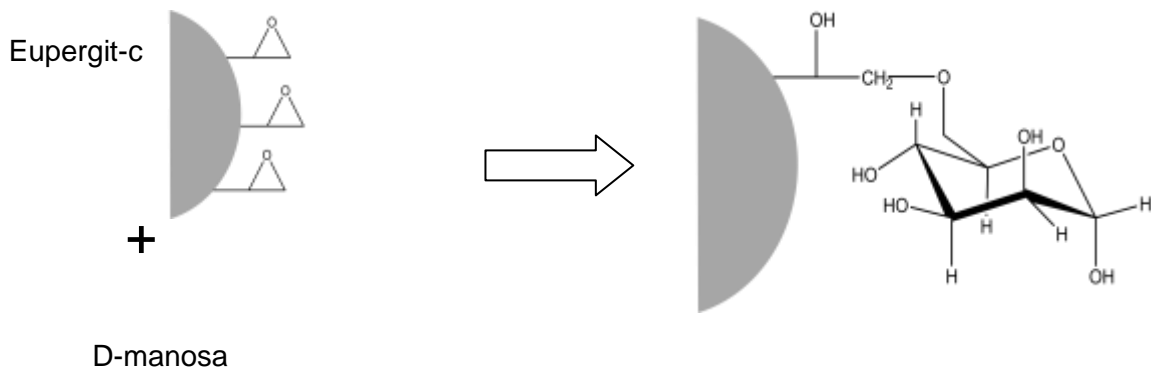


Figura 18: Procedimiento sistemático para la modificación del soporte Eupergit-c con manosa

Las proteínas que son retenidas en este tipo de columna son aquellas que se unen específicamente al ligando que, previamente, ha sido unido a la matriz de la columna. La fracción retenida en la columna de Eupergit-C-manosa fue posteriormente eluida con una solución de 0.5 M de manosa en buffer fosfato (50 mM pH 7). Esta fracción fue concentrada mediante la técnica de ultrafiltración utilizando filtros de amicon de 10 y 30 KDa (Ver **Figura 19**).

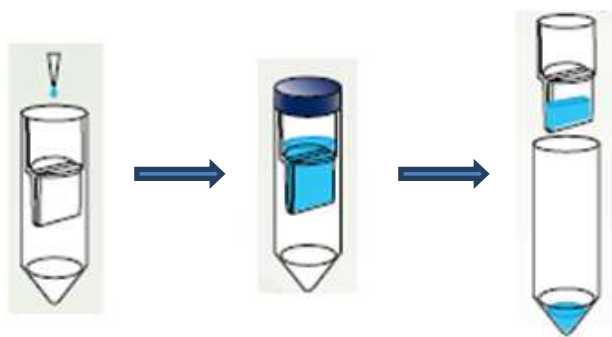


Figura 19: Ilustración de la técnica de ultrafiltración

Las membranas empleadas en esta técnica se caracterizan por su capacidad de retención de moléculas por encima de un peso molecular específico. Para este caso se realizaron dos ultrafiltraciones: Inicialmente, se utilizó un filtro de Amicon de 10 KDa, donde se retienen moléculas por encima de esta masa molecular. Posteriormente, se empleó un filtro de Amicon de 30 KDa, eliminando del extracto obtenido con el primer amicon, proteínas con pesos moleculares superiores a 30 KDa. Esta última fracción fue analizada mediante electroforesis SDS-PAGE (Ver **Figura 20a**, carril 2). En el carril 2 se observa la presencia de dos bandas en 15 y 30 KDa, aproximadamente. Estas bandas corresponden a la lectina de banano puesto que se ha descrito, en la literatura, que esta lectina existe como un dímero con 2 subunidades de 15 KDa [49, 50, 71]. El resultado obtenido es comparable con los publicados por otros autores que purifican la LecBan de otras especies de banano como *Musa basjoo* y *Musa acuminata* [49, 50, 71] obteniendo una banda de 15 KDa correspondiente al monómero de la lectina. La banda que se obtiene en 30 KDa corresponde, probablemente, a la presencia de la proteína en su forma dimérica. Para confirmar esta hipótesis se llevó a cabo una electroforesis nativa o no desnaturizante. La **Figura 20b** muestra una sola banda lo cual confirma que la LecBan

aislada de la pulpa de banano es una proteína dimérica con un peso molecular de 30 KDa.

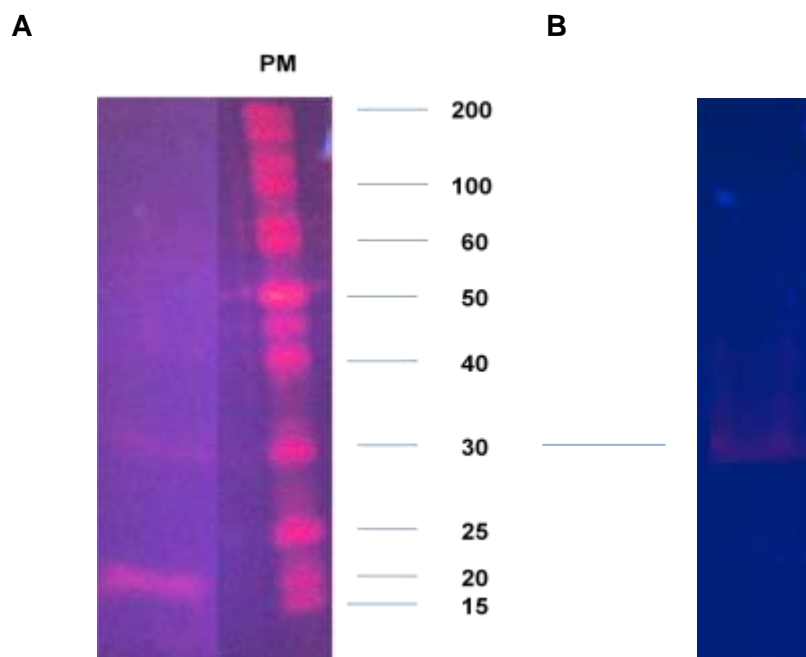


Figura 20: a) SDS-PAGE y b) Electroforesis nativa de las fracciones eluidas con buffer fosfato (50 mM, pH 7, 0.5 M de manosa) de la columna Eupergit-C-manosa. Tinción con Sypro.

3.4.2 Modificación de la superficie de las NPs bimetálicas

El recubrimiento de las NPs con grupos aminos, carboxilos e hidroxilos se utiliza frecuentemente para brindarles a la nanopartícula la capacidad de reconocer y enlazarse a biomoléculas como anticuerpos, péptidos, hormonas o lectinas, como en este caso [77].

La modificación de la superficie de las NPs sintetizadas se efectuó mediante una aminación con el 3-aminopropiltriétoxilano (APTS). Los grupos $-OH$, presentes en la superficie de la NP, pueden reaccionar con el APTS generando grupos aminos superficiales. El mecanismo general se puede observar en la **Figura 21**.



Figura 21: Modificación de la superficie de las NPs de magnetita con APTS.

La modificación de las NPs usando alcoxisilanos (Si-OR) como el APTS, implica dos reacciones que se llevan a cabo simultáneamente. En solución, ocurre la hidrólisis de los grupos alcoxisilanos formando grupos silanoles, especies altamente reactivas, mientras que, en fase sólida, se lleva a cabo la condensación de estos grupos alcoxisilanos con los -OH presentes en la superficie de la partícula, formando enlaces Si-O-Si. La cinética de estos procesos depende de los parámetros experimentales usados como tiempo de reacción, temperatura y solventes, entre otros. Por ejemplo, a mayor tiempo de reacción mayor será la densidad de grupos aminos en la superficie de las NPs [31].

Con el fin de verificar la modificación de las NPs con el APTS, se realizó un análisis de espectrometría infrarroja (IR). Los espectros de los NMs modificados y no modificados se muestran en la **Figura 22**. Se encontró para las NPs de magnetita, una banda característica alrededor de 425 cm^{-1} correspondiente al enlace Fe-O. Esta misma banda, en NPs recubiertas con APTS, apareció cerca de 518 cm^{-1} debido a la formación de enlaces Fe-Si-O en la superficie de la NP. En los espectros de las NPs modificadas se observaron pequeños picos en 2975 y 2892 cm^{-1} , los cuales corresponden a las vibraciones simétricas y asimétricas del $-\text{CH}_2$, una banda de absorción en 1089 cm^{-1} que se debe a la vibración del enlace C-N y bandas cerca a 1048 y 881 cm^{-1} atribuidas a las vibraciones del enlace Si-O y vibraciones del grupo $-\text{NH}_2$, respectivamente.

Adicionalmente, bandas encontradas alrededor de 1330 cm^{-1} se atribuyen a la formación de enlaces Si-O-Fe y Si-O-Si. La presencia de moléculas de agua remanente en las dispersiones de las NPs se ve reflejada en las bandas observadas alrededor de 3400 y 1650 cm^{-1} . Las bandas obtenidas en los espectros IR para las NPb modificadas y sin

modificar son similares a las encontradas y publicadas por otros autores lo cual confirma la presencia del APTS en la superficie de las partículas [21, 73, 95].

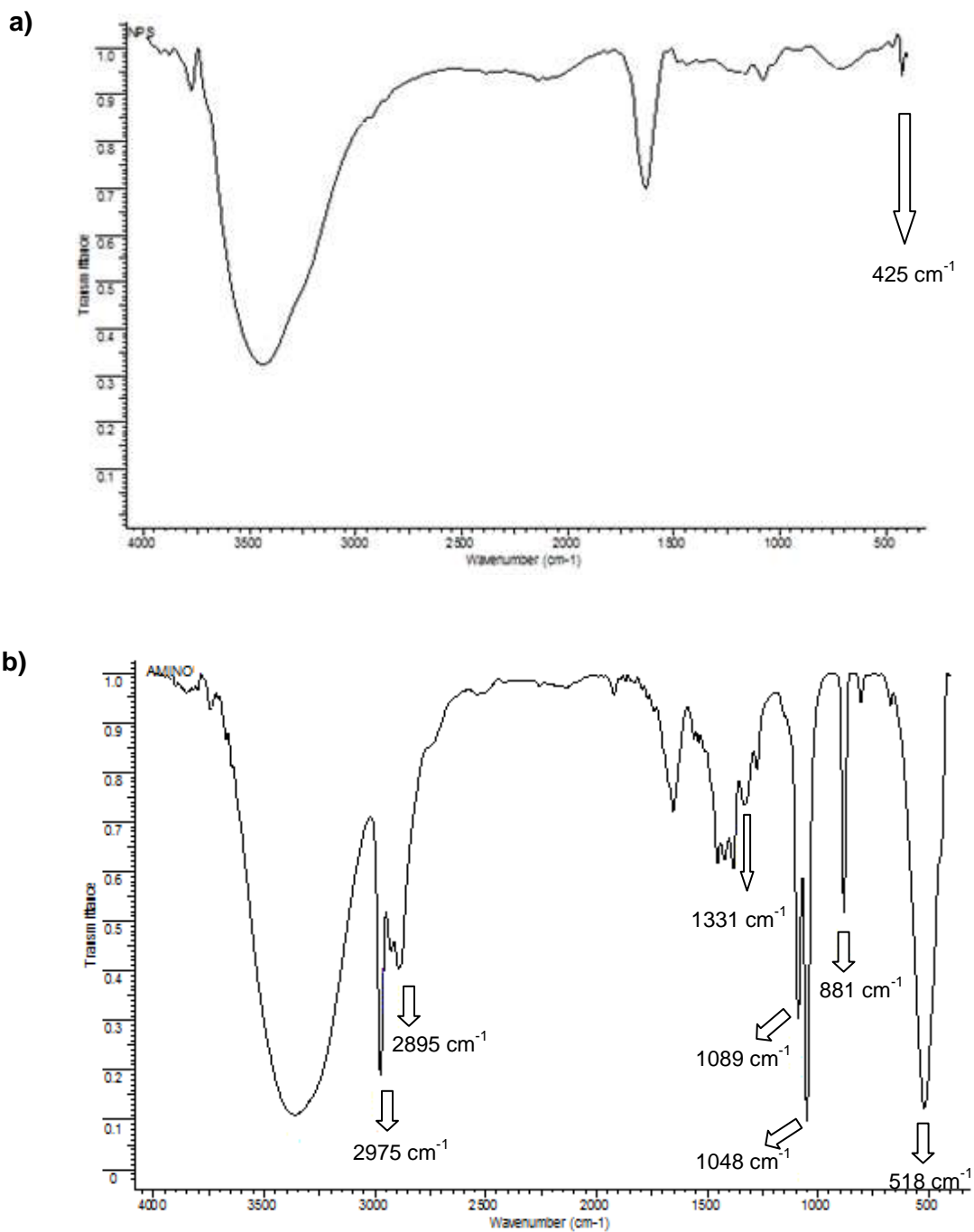


Figura 22: Espectros IR de las NPs a) sin modificar y b) modificadas con APTS

La conversión de los grupos -NH_2 a -COOH se llevó a cabo empleando dos metodologías: el glutaraldehído (GA) y el anhídrido succínico (AS). Estas técnicas son comúnmente empleadas para la modificación de NPs con el objeto de detectar o ligarlas a biomoléculas [13, 96]. Sin embargo, la metodología que mostró mejores resultados en cuanto a estabilidad y mejor dispersión fue usando el anhídrido succínico. Esto es debido a que el glutaraldehído puede llegar a presentar entrecruzamientos no deseados [74, 75], lo cual genera aglomeración de las partículas. El mecanismo general para la carboxilación de las NPs se muestra en la **Figura 23**.

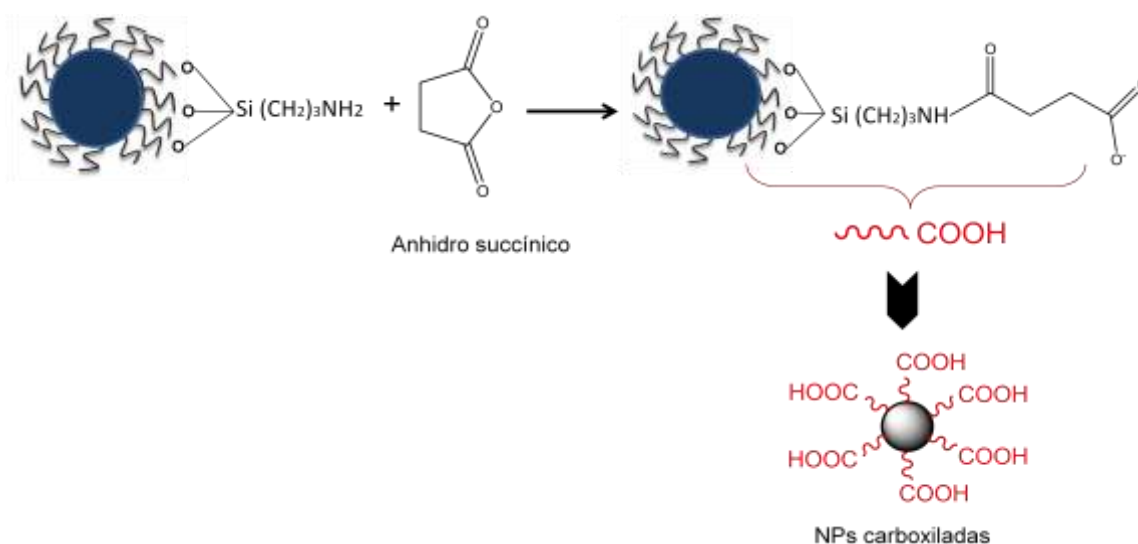


Figura 23: Esquema general de la modificación de los grupos aminos de la superficie de las NPs mediante el uso del anhídrido succínico 10% (p/v). Tiempo de reacción 12 horas a temperatura ambiente y 600 rpm.

La conversión de los grupos -NH_2 a -COOH se confirmó mediante análisis IR y los espectros se muestran en la **Figura 24**. Cuando los grupos -NH_2 son modificados por -COOH desaparece la banda cerca a 1331 cm^{-1} y aparece en 1705 cm^{-1} para -COOH y 1559 cm^{-1} para -NHCO- . Adicionalmente, en 2970 cm^{-1} aparece la vibración del C-H del grupo alquilo [97].

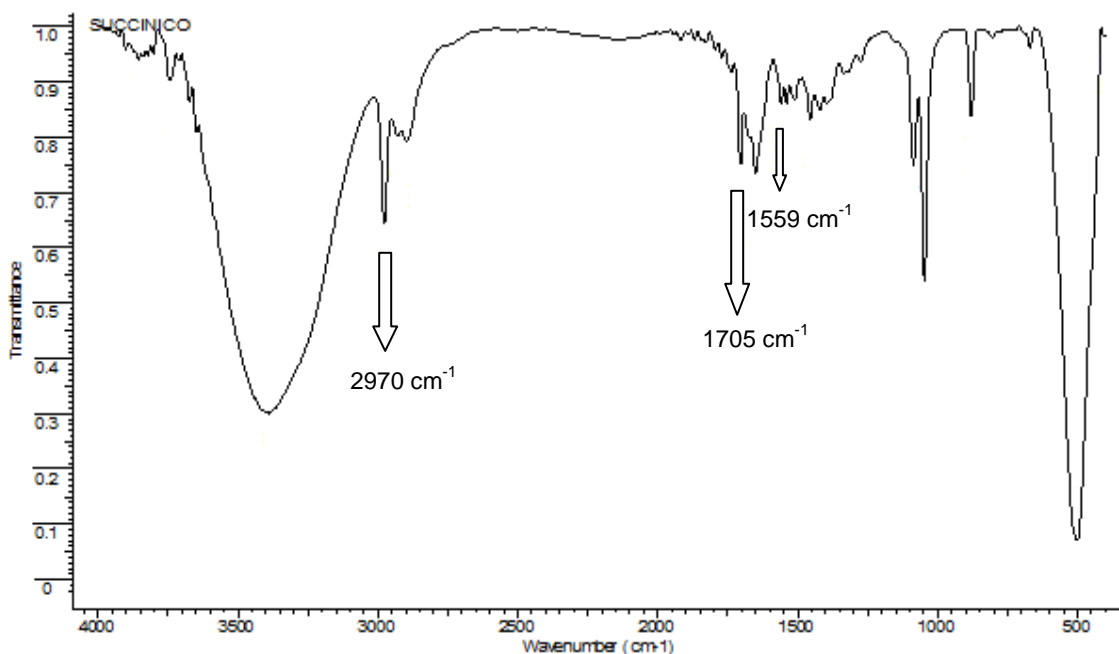


Figura 24: Espectros IR de las NPs modificadas con anhídrido succínico 10% (p/v). Tiempo de reacción 12 horas a temperatura ambiente y 600 rpm.

Para lograr la biofuncionalización de NPs con péptidos o proteínas se pueden llevar a cabo diferentes metodologías de acoplamiento y una de ellas es el método de la carbodiimida. Las carbodiimidas son agentes acoplantes heterobifuncionales [76] que activan los grupos carboxílicos para generar, posteriormente, enlaces amidas con los grupos aminos libres de la proteína. En este caso, los grupos -COOH que están presentes en la superficie de las NPs, interactuaban con los grupos -NH_2 libres de las lectinas en estudio. Para este acople, se empleó la carbodiimida EDC (clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) y la *N*-hidroxisuccinimida. Este compuesto se usó para incrementar la eficiencia de la reacción puesto que favorece la estabilidad del intermediario *o*-acilisourea por la formación de un éster succinimida [35, 38] (Ver **Figura 25**). La ventaja de la técnica de la carbodiimida se basa en el uso de condiciones suaves de reacción [98], por tal motivo es una estrategia ampliamente empleada para acoplar enzimas a NPs [35, 38, 76, 98]. Una vez realizada la modificación requerida de la superficie de las NPs se funcionalizaron con la Con A y la BanLec, ambas a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$.

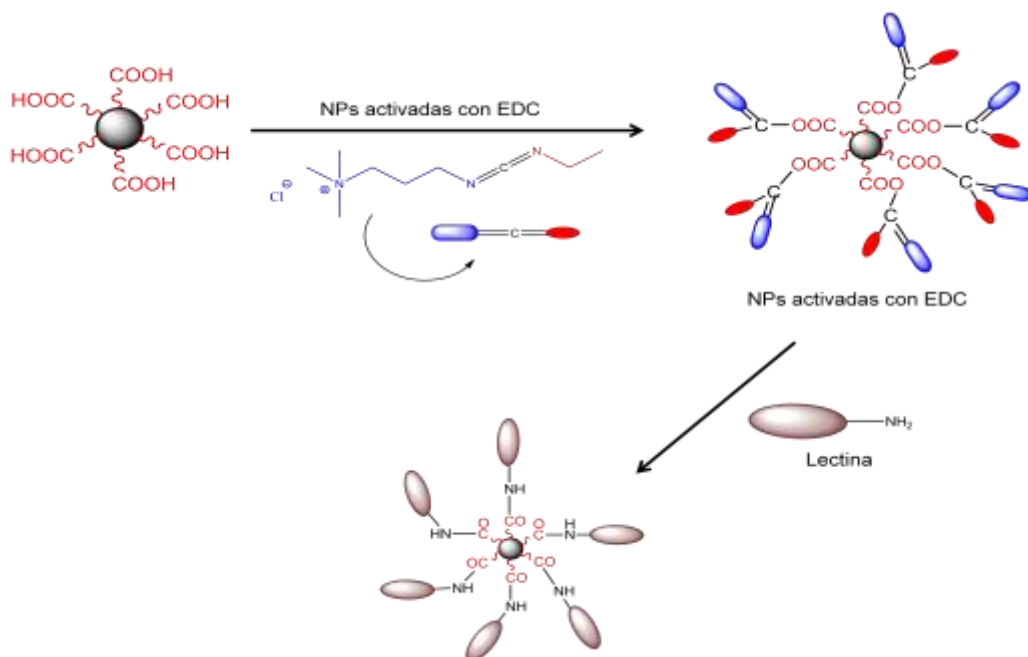


Figura 25: Esquema general para la inmovilización de lectinas sobre NPs de Fe/Ag

3.5 Efecto antibacteriano de las lectinas Concavalina A y Lectina de banano sobre *E. coli* O157:H7 y *S. aureus*

Lectinas como Concavalina A (ConA) y la lectina de banano (LecBan) exhiben interesantes propiedades antibacterianas sobre *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* SARM. Por lo tanto, los componentes glicosilados, presentes en la membrana bacteriana pueden servir como dianas para el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos.

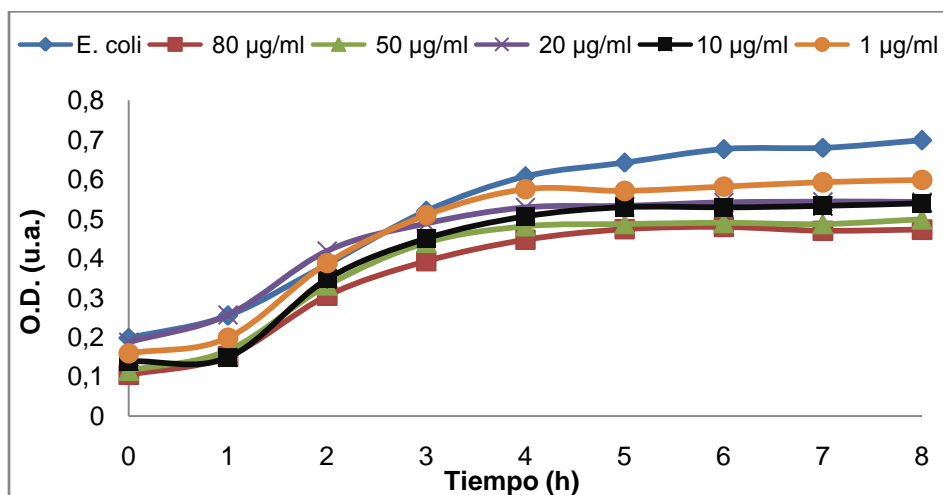
3.5.1 Efecto antibacteriano de la Concavalina A sobre *E. coli* O157:H7 y *S. aureus*

La concavalina A (Con A), lectina proveniente del frijol *canavalia ensiformis*, existe como tetrámero con una masa molecular de 104 KDa, a pH neutro. Esta proteína posee una excelente habilidad para interactuar con la mayoría de glicoproteínas que contienen

unidades de manosa o glucosa presentes en el suero, lo cual la hace ideal para la detección de glicoproteínas y muy útil en diversas aplicaciones médicas [47, 48].

En este estudio se demuestra la actividad antibacteriana de la Con A sobre *E. coli* O157:H7, bacteria Gram-negativa, y *S. aureus* SARM, bacteria Gram-positiva. El efecto bacteriostático se evaluó en un rango de concentraciones entre 1 y 80 $\mu\text{g/mL}$ (Ver **Figura 26**).

A



B

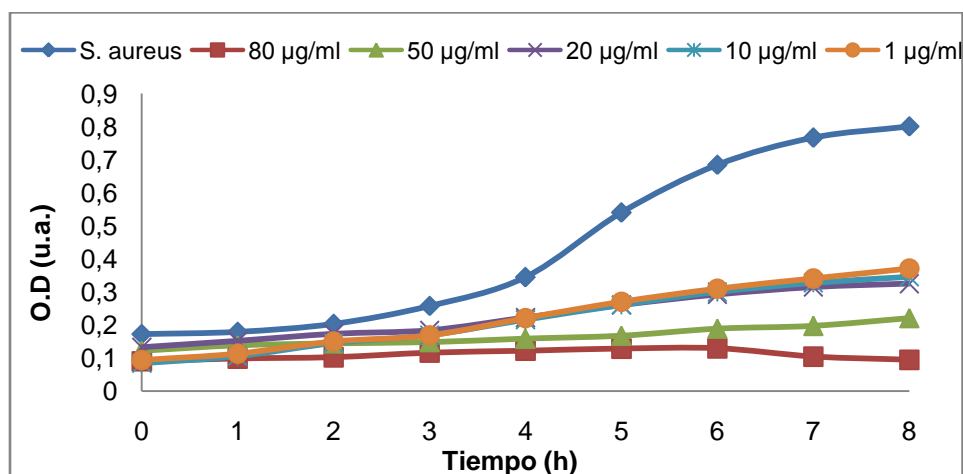


Figura 26: Cinética de crecimiento, en presencia de la Con A, de: A) *E. coli* O157:H7 y B) *S. aureus* SARM. Temperatura de 37°C, 200 rpm durante 8 horas, OD medida a 595 nm.

Los datos obtenidos muestran que *S. aureus* SARM presenta mayor sensibilidad ante la acción de la Con A ya que su inhibición es mayor que en el caso de *E. coli* O157:H7. Aunque se ha demostrado, en la presente investigación, que la Con A posee propiedades antibacterianas se desconoce el mecanismo de acción de este tipo de proteínas. La concavalina A puede reconocer residuos manosídicos, o incluso glucosídicos, ubicados en la superficie de la bacteria. Por esta razón, su modo de acción puede relacionarse con cambios estructurales en la membrana celular, ocasionados por la interacción lectina-manosa, alterando la permeabilidad e integridad de ésta y así provocando la degradación de la célula [99, 126]. Una mayor acción bacteriostática sobre la bacteria Gram-positiva podría sugerir que la capa de peptidoglicano, componente de la estructura bacteriana, es más rica en unidades de manosa, o glucosa, en *S. aureus* SARM que en *E. coli* O157:H7.

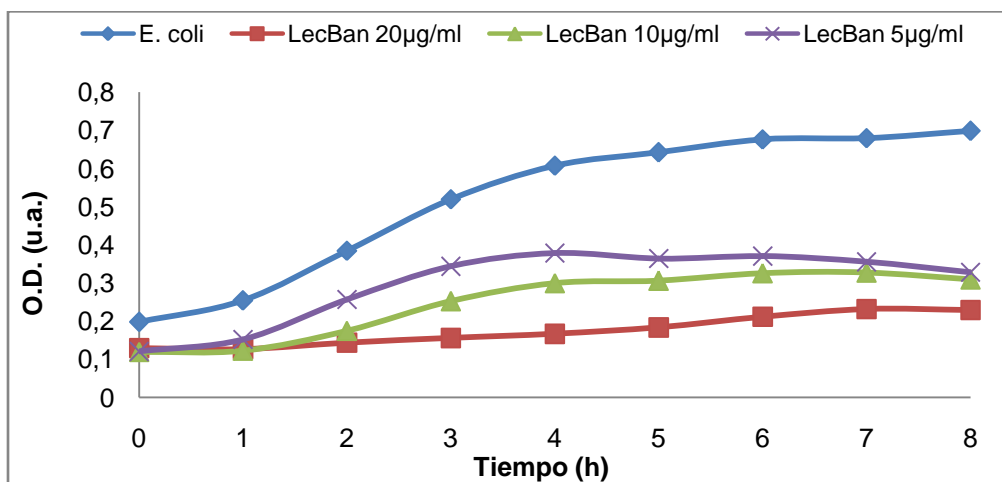
3.5.2 Efecto antibacteriano de la LecBan sobre *E. coli* O157:H7 y *S. aureus*

La lectina de banano fue inicialmente aislada de *Musa paradisiac* por Koshte y col. 2010 [49] Estos investigadores publican que esta proteína es homodimérica y con especificidad hacia la manosa o a oligosacáridos que contengan esta unidad monosacárida. Posteriormente, Peumans y col. 2000 secuenciaron esta lectina y la clasificaron como un miembro de la familia de proteínas aaxxrelacionadas a las jacalinas [99, 100]. La lectina de banano (LecBan) posee dos sitios de unión por monómero, en los cuales el carbohidrato se inserta por su parte reductora y hace numerosas interacciones con la proteína [99]. Estudios recientes han mostrado que la LecBan puede ser usada para estimular células T e inducir la producción de diferentes citoquinas [99, 100].

Adicionalmente, los resultados obtenidos en este estudio demuestran que esta lectina posee propiedades antibacterianas sobre *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* SARM (Ver **Figura 27**). Se evaluaron concentraciones de 5, 10 y 20 µg/mL debido a que la máxima concentración de LecBan obtenida al final del proceso de purificación fue de 20 µg/mL. A partir de los datos, esta lectina muestra un efecto bacteriostático sobre *E. coli* O157:H7 más fuerte en comparación con la Con A, ya que tan solo una concentración de 20 µg/mL de LecBan inhibe el crecimiento normal en un 78% del crecimiento bacteriano, mientras

que esta misma concentración de Con A solo inhibe el 30%. De igual manera, se observa que al disminuir la concentración decrece el efecto inhibitorio.

A



B

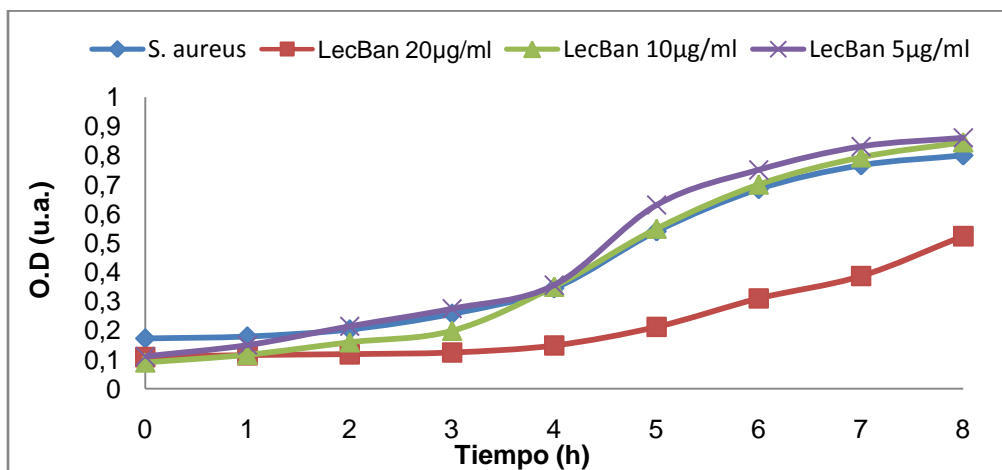


Figura 27: Cinética de crecimiento, en presencia de LecBan, de: A) *E. coli* O157:H7 y B) *S. aureus* SARM. Temperatura de 37°C, 200 rpm durante 8 horas, OD medida a 595 nm.

La LecBan presenta una fuerte actividad antibacteriana sobre *E. coli* O157:H7, sin embargo, no muestra el mismo efecto sobre *S. aureus* SARM. Según la cinética de crecimiento para esta última cepa (Ver **Figura 27b**), la LecBan a concentraciones de 5 y

10 µg/mL no posee propiedades bacteriostáticas y aunque una concentración de 20 µg/mL inicialmente presenta inhibición, ésta va disminuyendo a medida que las bacterias entran en su fase de crecimiento (Fase exponencial). Este comportamiento puede ser debido a que la concentración de lectina en el medio no es suficiente para unirse a los residuos manosídicos presentes en la pared celular de *S. aureus* SARM. Otra posible explicación, puede ser la orientación inadecuada de la lectina en el medio lo cual dificulta el reconocimiento de los sacáridos por parte de la proteína. Una tercera hipótesis podría basarse en un mecanismo de resistencia ante la deformidad y ruptura de la membrana celular generada por la unión de lectina-oligosacárido.

Otro estudio realizado sobre lectinas antimicrobianas ha demostrado que la Ansocalcina y Ovocleidina-17 (OC-17), dos lectinas extraídas de la cáscara de huevo, poseen excelentes propiedades antimicrobianas con CMI de 200 µg/mL contra bacterias Gram-positivas como *B. subtilis* y *S. aureus*. Adicionalmente, estos autores encontraron que estas proteínas se unen fuertemente a los polisacáridos bacterianos presentes en la capa de peptidoglicano. Un análisis morfológico de las bacterias, en presencia de estas lectinas, muestran que las bacterias sufren daños en la pared celular ocasionando la pérdida de su contenido intracelular [102].

3.6 Efecto antibacteriano de las nanopartículas bimetálicas de Fe/Ag funcionalizadas con lectinas sobre *E. coli* O157:H7 y *S. aureus*

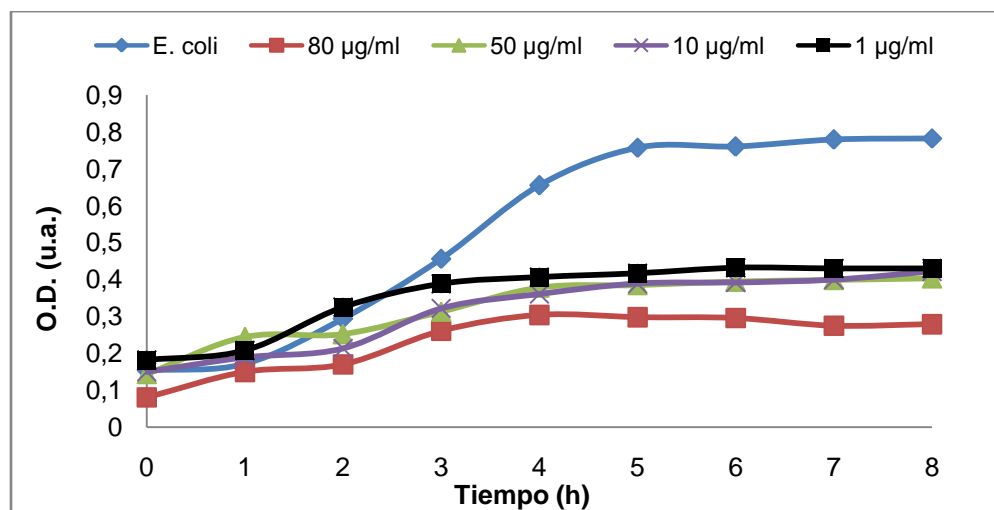
Según los resultados en este estudio, la presencia de lectinas, como la concavalina A y lectina de banano, sobre la superficie de las nanopartículas bimetálicas sintetizadas, genera un mejor efecto bacteriostático sobre las cepas bacterianas.

3.6.1 Efecto antibacteriano de las NPs bimetálicas funcionalizadas con la Concavalina A sobre *E. coli* O157:H7 y *S. aureus*

Se evaluaron concentraciones entre 1 y 80 µg/mL para determinar el efecto antibacteriano de las NPs bimetálicas funcionalizadas con la Concavalina A. La cinética de crecimiento

de *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) en presencia de las NPs Tipo I (obtenidas por el método de micela reversa) se muestra en la **Figura 28**. En ella se observa que una concentración de 1 µg/mL inhibe el 60% del crecimiento normal de *E. coli* O157:H7 mientras que esta misma concentración de NPs sin funcionalizar inhibe el 50% (Ver **Figura 14**).

A



B

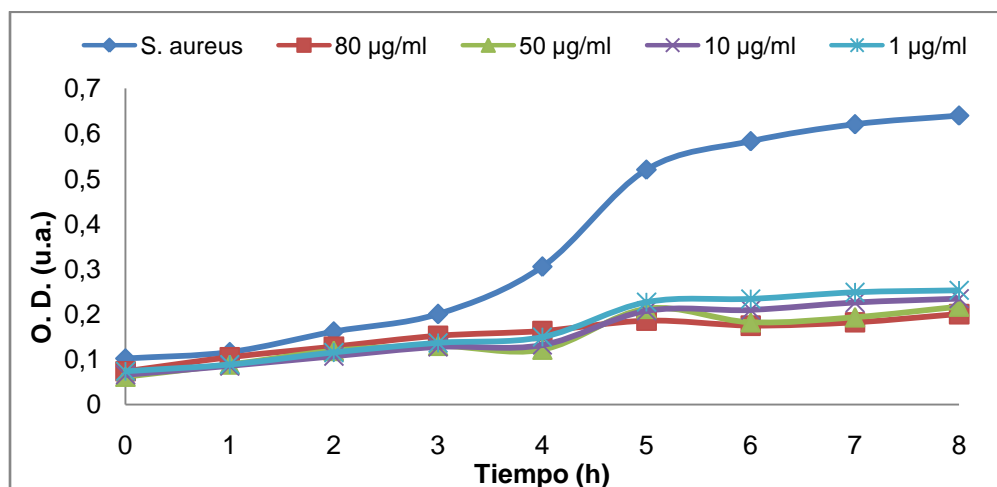


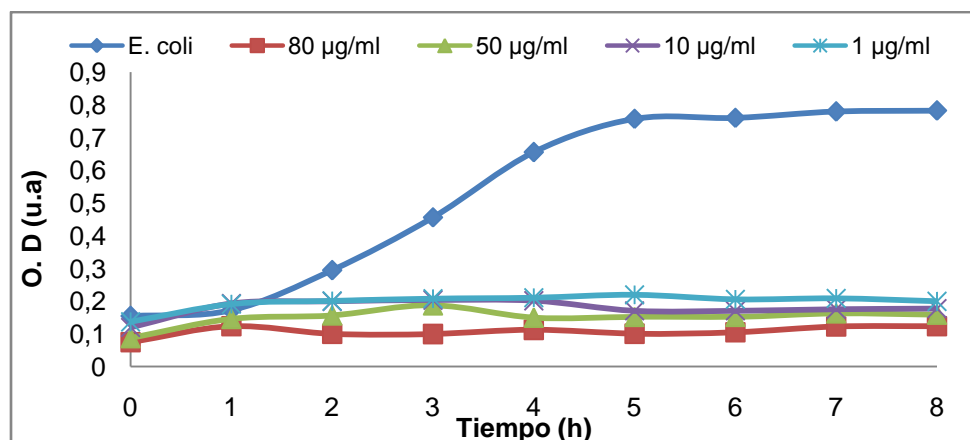
Figura 28: Cinética de crecimiento, en presencia de la $Fe_3O_4@Ag@ConA$, de: A) *E. coli* O157:H7 y B) *S. aureus* SARM. Temperatura de 37°C, 200 rpm durante 8 horas, OD medida a 595 nm.

De igual manera, al comparar los datos obtenidos para las lectinas sin funcionalizar y funcionalizadas, se observa que la bioconjugación mejora la actividad antibacteriana de las lectinas sin funcionalizar ya que una concentración de 10 µg/mL de Con A inhibe el 22% mientras que las NPb1 unidas con ConA inhibe el 58%. Para el caso de *S. aureus* SARM, una concentración de 80 µg/mL de NPb1 inhibe el 40% del crecimiento de la bacteria mientras que esta misma concentración de NPb1 funcionalizada con la Con A ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@ConA$) presenta un porcentaje de inhibición del 76%, observándose el mismo efecto sinérgico presentado en *E. coli*.

Por otra parte, la actividad antibacteriana de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@ConA$ disminuye un poco en comparación con la observada por la Con A sola. La concentración de 80 µg/mL de Con A sin funcionalizar ejerce un 99% de inhibición y funcionalizada inhibe el crecimiento celular en un 76%. No obstante, se observa un aumento en la actividad a concentraciones menores, ya que una concentración de 1 µg/mL de lectina inhibe un 54% mientras que la lectina funcionalizada aumenta su capacidad inhibitoria a 67%. Esto puede deberse a la dosis efectiva de NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@ConA$ que se necesita en el medio bacteriano para lograr la inhibición.

Las NPb2 funcionalizadas con la Con A ($\text{Fe}@Ag@ConA$) mostraron un mayor poder antibacteriano al ser evaluadas sobre las cepas en estudio, ya que la acción bacteriostática de las partículas a una concentración de 1 µg/mL aumenta desde un 55% (NCs sin funcionalizar) a un 90% de inhibición sobre *E. coli* O157:H7 (Ver **Figura 29**).

A



B

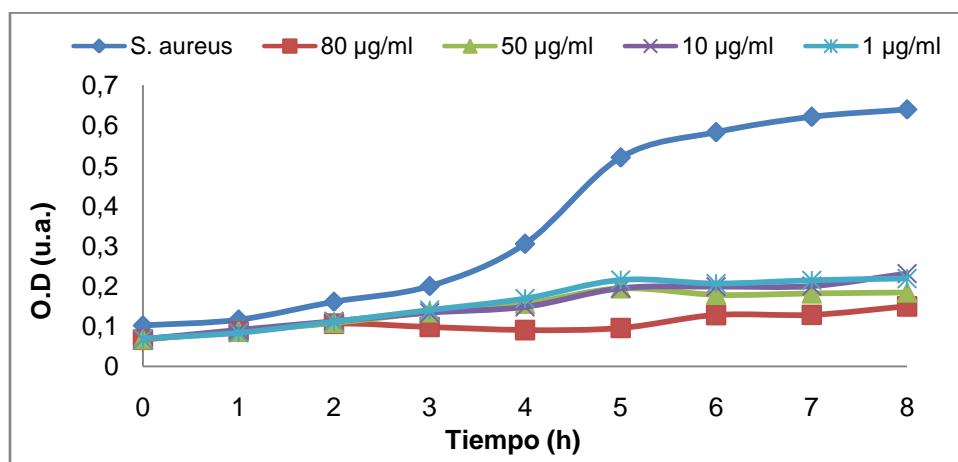


Figura 29: Cinética de crecimiento, en presencia de la Fe@Ag@ConA, de: A) *E. coli* O157:H7 y B) *S. aureus* SARM. Temperatura de 37°C, 200 rpm durante 8 horas, OD medida a 595 nm.

Para el caso de *S. aureus* SARM (Ver **Figura 29b**), se logra, con la funcionalización, que la actividad exhibida por una concentración de 1 µg/mL de NPb2 sea incrementada de 65% a un 72% de inhibición. Sin embargo, se observa la pérdida de actividad inhibitoria a concentraciones altas como 80 µg/mL ya que esta concentración solo inhibe el 83% en comparación con las NPs de Fe@Ag sin funcionalizar que logran un 99%.

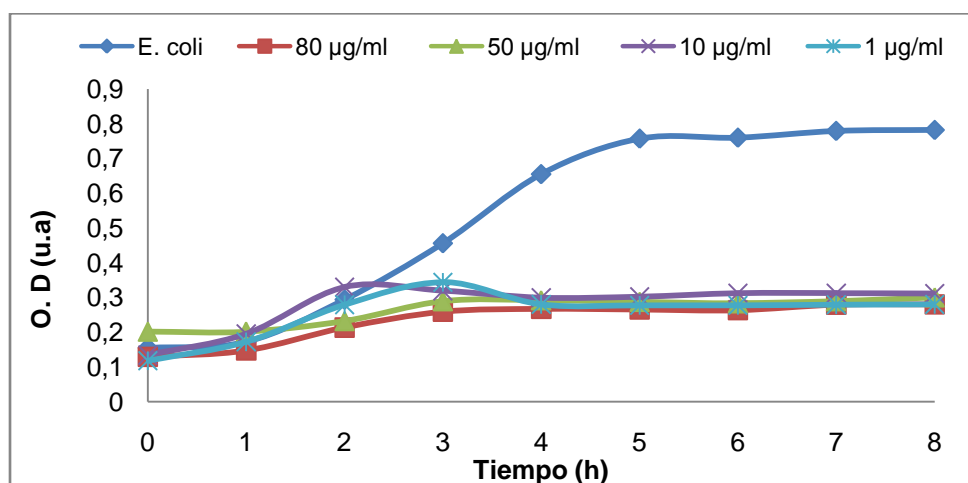
La disminución en la actividad antibacteriana sobre *S. aureus*, comportamiento igualmente observado con las NPb1, podría ser debido a la dificultad para formar el complejo lectina-manosa a concentraciones altas del nanocompuesto, lo cual desfavorece la alteración de la membrana bacteriana. Así, la orientación tanto de la lectina como de los oligosacáridos disminuye marcadamente el reconocimiento y su posterior enlace por parte de la lectina [102].

3.6.2 Efecto antibacteriano de las NPs bimetálicas funcionalizadas con la LecBan sobre *E. coli* O157:H7 y *S. aureus*

Las NPs bimetálicas de Fe₃O₄@Ag y Fe@Ag, sintetizadas en este trabajo, poseen propiedades antibacterianas. No obstante, esta actividad mejora o aumenta cuando moléculas de LecBan están presentes en la superficie de las partículas.

Por otro lado, una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NPb1 causa una inhibición del 50% y 40% sobre *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* SARM, respectivamente. Estas mismas partículas bioconjugadas con la LecBan, a esta misma concentración, inactivan el crecimiento bacteriano de *E. coli* O157:H7 en un 76% y *S. aureus* SARM en un 61% (Ver **Figura 30**).

A



B

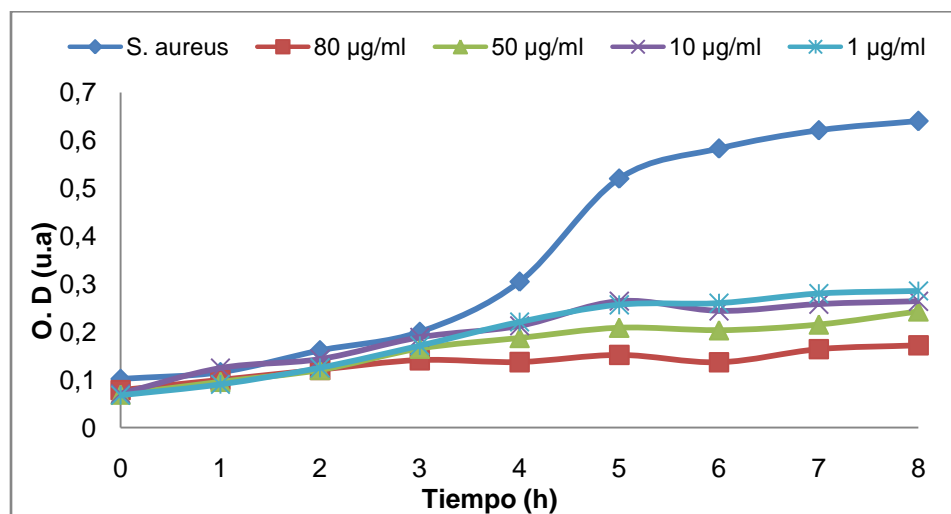


Figura 30: Cinética de crecimiento, en presencia de la $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@LecBan$, de: A) *E. coli* O157:H7 y B) *S. aureus* SARM. Temperatura de 37°C , 200 rpm durante 8 horas, OD medida a 595 nm.

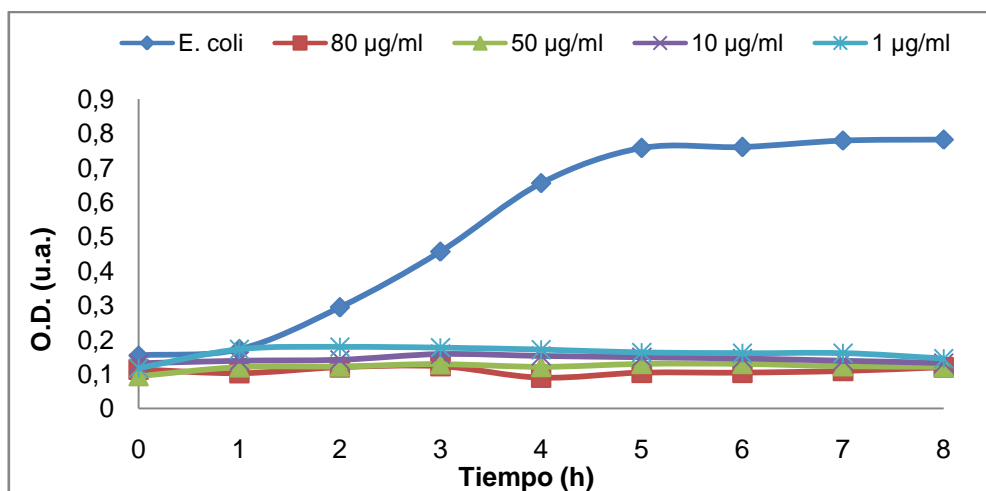
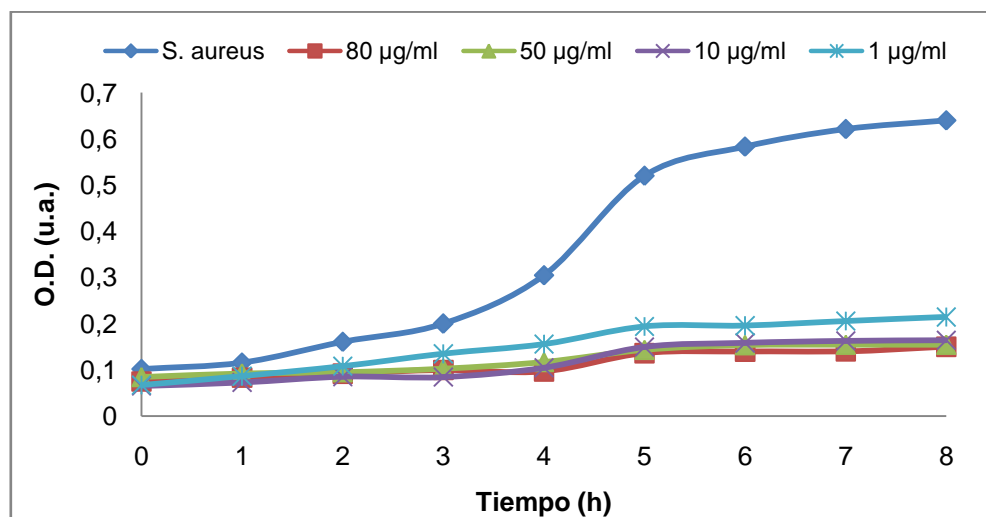
A**B**

Figura 31: Cinética de crecimiento, en presencia de la Fe@Ag@LecBan, de: A) *E. coli* O157:H7 y B) *S. aureus* SARM. Temperatura de 37°C, 200 rpm durante 8 horas, OD medida a 595 nm.

De igual manera, las NPb2 incrementan su actividad alcanzando una CMI del 99% de inhibición para *E. coli* O157:H7 y el 72% para *S. aureus* SARM con una concentración de 1 µg/mL (Ver **Figura 31**).

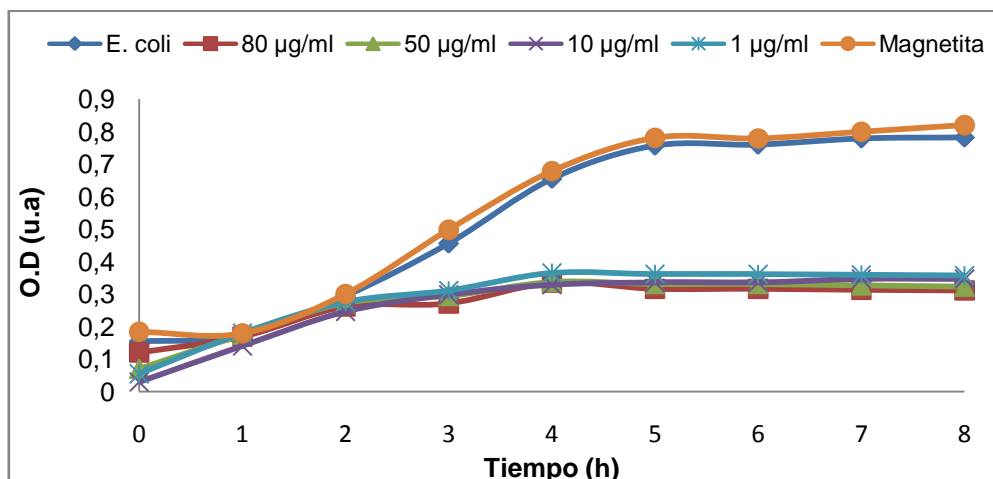
3.7 Efecto antibacteriano de las nanopartículas magnéticas (Fe₃O₄) funcionalizadas con lectinas sobre *E. coli* O157:H7 y *S. aureus*

Las nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ han sido ampliamente usadas por sus múltiples ventajas. Sin embargo, al evaluar sus propiedades antibacterianas no muestran ningún efecto significativo sobre el crecimiento normal de *E. coli* O157:H7 ni *S. aureus* SARM. No obstante, este tipo de NPs magnéticas funcionalizadas con la Con A o LecBan conllevan al desarrollo de nuevos modelos antibacterianos que podrían servir, en un futuro, en la lucha contra las infecciones bacterianas tales como la EDA o las infecciones nosocomiales.

3.7.1 Efecto antibacteriano de las NPs magnéticas funcionalizadas con la Con A sobre *E. coli* O157:H7 y *S. aureus*

Las NPs de Fe₃O₄@ConA ejercen un porcentaje de inhibición de 52% y 58% sobre *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* SARM, respectivamente. La **figura 32** muestra que la concentración mínima inhibitoria (CMI) para este tipo de NPs es de 1 µg/mL.

A



B

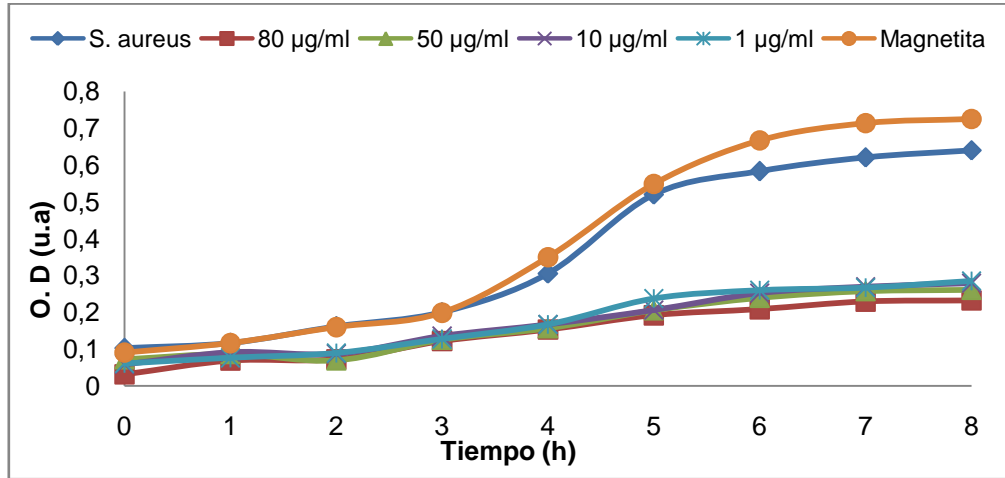
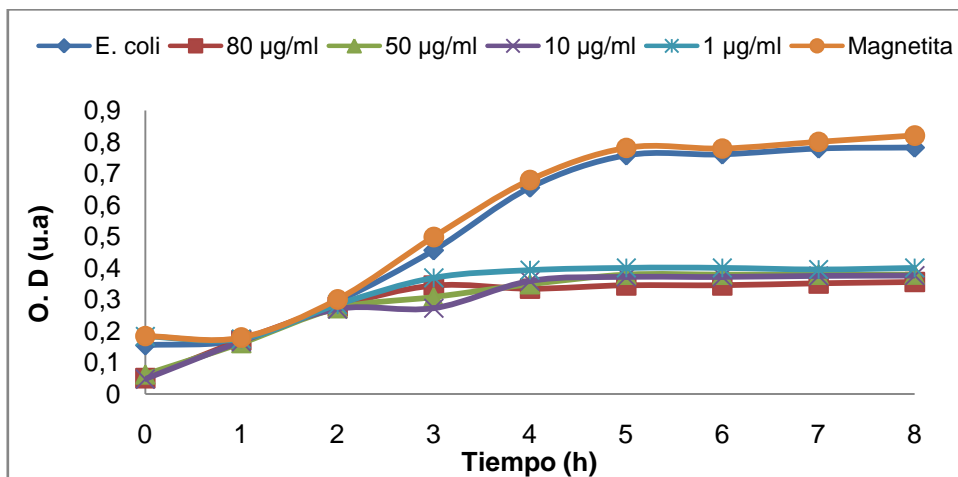


Figura 32: Cinética de crecimiento, en presencia de la $Fe_3O_4@ConA$, de: A) *E. coli* O157:H7 y B) *S. aureus* SARM. Temperatura de 37°C, 200 rpm durante 8 horas, OD medida a 595 nm.

3.7.2 Efecto antibacteriano de las NPs magnéticas funcionalizadas con la LecBan sobre *E. coli* O157:H7 y *S. aureus*

Las NPs magnéticas funcionalizadas con la lectina extraída del banano exhiben el mismo efecto inhibitorio observado por las NPs de $Fe_3O_4@ConA$. Los datos obtenidos para las cinéticas de crecimiento de las bacterias en estudio se muestran en la **gráfica 33**.

A



B

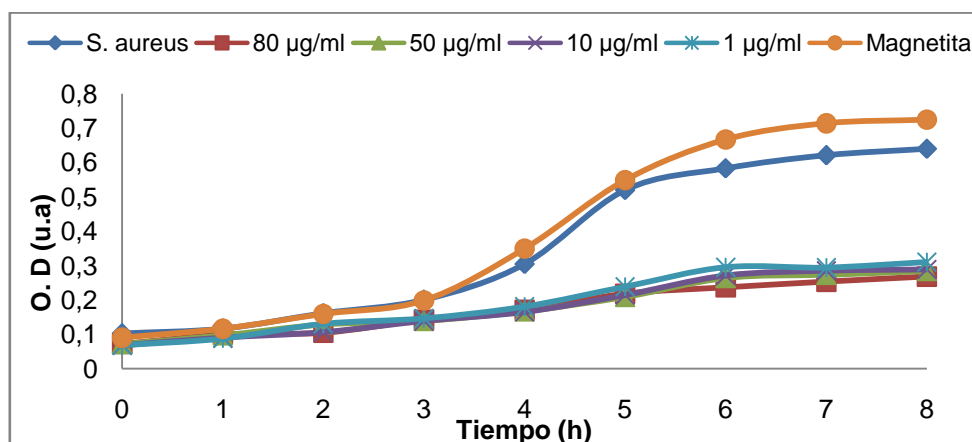


Figura 33: Cinética de crecimiento, en presencia de la $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{LecBan}$, de: A) *E. coli* O157:H7 y B) *S. aureus* SARM. Temperatura de 37°C, 200 rpm durante 8 horas, OD medida a 595 nm.

Se evaluaron concentraciones de NPs entre 1 y 80 µg/mL y todas causaron inhibición sobre el crecimiento de las bacterias. Las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{LecBan}$ presentan una CMI de 1 µg/mL con porcentajes de inhibición de 62% y 55% sobre *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* SARM, respectivamente.

La **Tabla 3** muestra las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) obtenidas para las lectinas (Con A y LecBan) y los diferentes nanocompuestos funcionalizados con estas proteínas.

Tabla 3: Concentraciones mínimas inhibitorias de NPb funcionalizadas con Con A y LecBan sobre *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* SARM.

MICROORGANISMO	Tipo de NPs	CMI ₅₀ µg/mL	CMI ₉₀ µg/mL	CMB µg/mL
<i>E. coli</i> O157:H7	$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{LecBan}$	1	≥ 80	≥ 80
	$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{LecBan}$	1	≥ 80	≥ 80

	Fe@Ag@LecBan	1	1	≥ 80
	Fe ₃ O ₄ @ConA	1	≥ 80	≥ 80
	Fe ₃ O ₄ @Ag@ConA	1	≥ 80	≥ 80
	Fe@Ag@ConA	1	1	≥ 80
<i>S. aureus</i> SARM	Fe ₃ O ₄ @LecBan	1	≥ 80	≥ 80
	Fe ₃ O ₄ @Ag@LecBan	1	≥ 80	≥ 80
	Fe@Ag@LecBan	1	≥ 80	≥ 80
	Fe ₃ O ₄ @ConA	1	≥ 80	≥ 80
	Fe ₃ O ₄ @Ag@ConA	1	≥ 80	≥ 80
	Fe@Ag@ConA	1	≥ 80	≥ 80

Las lectinas por su particularidad de reconocer diferentes estructuras oligosacáridas, ligadas covalentemente a la capa del peptidoglicano de las bacterias, son un punto clave en el desarrollo de nuevos modelos antibacterianos [103, 104]. Además, lectinas como la Con A y LecBan, exhiben excelentes propiedades bacteriostáticas alcanzando porcentajes de inhibición de 99% sobre el crecimiento normal de bacterias como *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* SARM.

En este sentido, el uso de nanocompuestos con propiedades biocidas funcionalizados con este tipo de lectinas genera nanomateriales con un mayor poder bacteriostático, alcanzando porcentajes de inhibición del 99% con tan solo concentraciones de 1 µg/mL. Por esta razón, las lectinas como la Con A y LecBan, afines a la manosa, pueden ser consideradas una excelente estrategia para proporcionar mayor especificidad y así mejorar las propiedades biocidas de nuevos nanocompuestos.

4. CONCLUSIONES

Se sintetizaron nuevos nanocompuestos bifuncionales de Fe/Ag con propiedades antibacterianas sobre *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* SARM. Los dos tipos de NPb sintetizadas poseen concentraciones inhibitorias de tan solo 1 µg/mL. Estos resultados son interesantes ya que son mejores a los publicados en la literatura para este tipo de nanocompuestos

Las nanopartículas bimetálicas de Fe@Ag (NPb2) mostraron mejor efecto bacteriostático, comparado con las NPs de Fe₃O₄@Ag (NPb1), logrando 95% de inhibición bacteriana al utilizar concentraciones de 80 µg/mL.

Las NPb2 ejercen mayor actividad bacteriostática frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en comparación con *E. coli* O157:H7 lo cual se debería a un mayor grado de afinidad por la membrana bacteriana basada en las propiedades físicas de este tipo de NPs.

Lectinas como concavalina A y LecBan exhiben interesantes propiedades antibacterianas sobre *E. coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) con valores de concentraciones mínimas inhibitorias de 1 µg/mL. Estos resultados son de gran importancia debido a la ausencia de estudios sobre la actividad bacteriostática en dichas lectinas

La Concavalina A posee mayor poder antibacteriano sobre *S. aureus* SARM, alcanzando, con una concentración de 80 µg/mL, un 99% de inhibición sobre el crecimiento normal de esta bacteria. Por el contrario, la LecBan presentó mayor inhibición sobre *E. coli* O157:H7 inhibiendo su crecimiento en un 78% con una concentración de tan solo 20 µg/mL. Esto puede deberse a la diferencia, en cuanto a residuos de manosa, que presentan en sus membranas estos dos tipos de bacterias.

Las NPs magnéticas (Fe₃O₄) no presentan actividad inhibitoria sobre las cepas en estudio. Sin embargo, la funcionalización de estas NPs con la Concavalina A y Lectina de banano

convierte estas NPs en interesantes agentes antibacterianos con porcentajes de inhibición del 50% con una concentración de tan solo 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La funcionalización de las NPb con las lectinas, Concavalina A y Lectina de Banano, incrementa el poder bacteriostático alcanzando porcentajes de inhibición del 99% con tan solo concentraciones de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados obtenidos en este trabajo son los primeros que demuestran importantes propiedades antibacterianas de este tipo de nanocompuestos.

RECOMENDACIONES

Al realizar la síntesis de las NPs bimetálicas se requiere hacer un seguimiento del cambio en el tamaño promedio de las mismas de acuerdo a concentración de precursores y en función del tiempo empleando como técnica experimental DLS (Dispersión de luz en modo dinámico).

Debido a la importancia de elucidar el mecanismo de acción antibacteriano de las NPs bimetálicas, se hace necesario realizar estudios posteriores más especializados que permitan establecer las interacciones directas entre la membrana exterior de la bacteria y las NPs, empleando diferentes técnicas de separación como electroforesis en dos dimensiones y posterior análisis por espectrometría de masas.

Teniendo en cuenta que las NPs bimetálicas sintetizadas funcionalizadas y sin funcionalizar exhibieron actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, se podrían evaluar sobre otras bacterias de gran relevancia e interés clínico como *Pseudomona aeruginosa* o *Streptococcus pneumoniae*, este último agente causante de neumonía.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Albarado, L.; Guzmán, Y.; Guzmán, M.; Betancourt, J. *Salmonella spp* y *Shigella spp* asociados con síndrome diarreico agudo en niños menores de seis años de edad. *Kasmera*. 2005. 33: 132-141.
- [2] Mattar, S. Prevalencia de *E. coli* 0157: H7, serotipo enterohemorrágico, en una población pediátrica de Bogotá, enfermedad diarreica aguda. Informe quincenal de casos y brotes de enfermedades. *INS*. 1996. 17: 182-183.
- [3] Máttar, S.; Visbal, J. S.; Arrieta, G. *E. coli* 0157: H7 enterohemorrágico: un agente etiológico de diarrea y zoonosis en Colombia subestimado. Parte I. *MVZ-Córdoba*. 2001. 6: 15-23.
- [4] Gil, M. *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. *Rev. Chil. Infect.* 2000. 17: 145-152.
- [5] Jim, J. S.; Kuk, M.; Yu, K. M; Kim, J. H. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2007. 3: 95–101.
- [6] Rai, M.; Yadav, A.; Gade, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*. 2009. 27: 76–83.
- [7] Yong, Y.; Bai, Y.; Li, Y.; Lin, L.; Cui, Y.; Xia, C. Preparation and application of polymer-grafted magnetic nanoparticles for lipase immobilization. *J. Magn. Magn. Mater.* 2008. 320: 2350– 2355.
- [8] Sondi, I.; Salopek-Sondi, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E.coli* as a model for gram-negative bacteria. *J Colloid Interface*. 2007. 275: 177–82.
- [9] **a)** Rungby, J. An experimental study on silver in the nervous system and on aspects of its general cellular toxicity. *Dan. Med. Bull.* 1990. 37: 442 449. **b)** Asharani, P. V.; Wu, Y.

L.; Gong, Z. Y.; Valiyaveetil, S. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology*. 2008. 19: 255102.

[10] Cohen, S. Y.; Quentel, G.; Egasse, D.; Cadot, M.; Ingster Moati, I.; Coscas, G. J. The dark choroid in systemic argyrosis. *Retina*. 1993. 13: 312-316.

[11] Neth, O.; Jack, D. L.; Dodds, A. W.; Holzel, H.; Klein, N. J. and Turner, M. Mannose-Binding Lectin Binds to a Range of Clinically Relevant Microorganisms and Promotes Complement Deposition. *Infection and immunity*. 2000. 68: 688–693.

[12] **a)** Sharma, A.; Sharma, S. and Khuller, G. K. Lectin-functionalized poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles as oral/aerosolized antitubercular drug carriers for treatment of tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004. 54: 761–766. **b) Abu-Dahab, R.; Schäfer, U. F. and Lehr, C.** Lectin-functionalized liposomes for pulmonary drug delivery: effect of nebulization on stability and bioadhesion. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2001. 14: 37-46. **c)** Gao, X.; Taa, W.; Lua, W.; Zhanga, Q.; Zhangb, Y.; Jianga, X.; Fub, S. Lectin-conjugated PEG–PLA nanoparticles: Preparation and brain delivery after intranasal administration. *Biomaterials*. 2006. 27: 3482–3490.

[13] Rossi. L. M.; Quach, A. D.; Rosenzweig, Z. Glucose oxidase–magnetite nanoparticle bioconjugate for glucose sensing. *Anal Bioanal Chem.* 2004. 380: 606–613.

[14] Gupta, A. K.; Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 2005. 26: 3995–4021.

[15] Gong, P.; Li, H.; He, X.; Wang, K.; Hu, J.; Tan, W.; Zhang, S. and Yang, X. Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄@Ag nanoparticles. *Nanotechnology*. 2007. 18: 1-7

[16] Goya, G. F.; Berquo, T. S.; Fonseca, F.C. Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles. *J Appl Phys.* 2003. 94: 3520–3528.

- [17] Zhang, G.; Liu, Y.; Zhang, C.; Hu, W.; Xu, W.; Li, Z.; Liang, S.; Cao, J.; Wang, Y. Aqueous immune magnetite nanoparticles for immunoassay. *J Nanopart Res.* 2009. 11: 441-448.
- [18] Tavakoli, A.; Sohrabi, M. and Kargari, A. A Review of Methods for Synthesis of Nanostructured Metals with Emphasis on Iron Compounds. *Chem. Pap.* 2007. 61: 151—170.
- [19] Tartaj, P.; Morales, M.; Veintemillas-Verdaguer, S.; González-Carreño, T. and Serna, C. J. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2003. 36: 182-197.
- [20] Seney, Caryn. Gutzman, Brittany. Goddard, Rusell. Correlation of Size and Surface-Enhanced Raman Scattering Activity of Optical and Spectroscopic Properties for Silver Nanoparticles. *J Phys Chem C.* 2009. 113: 74-80.
- [21] Osaka, T.; Matsunaga, T.; Nakanishi, T.; Arakaki, A.; Niwa, D.; Iida, H. Synthesis of magnetic nanoparticles and their application to bioassays. *Anal Bioanal Chem.* 2006. 384: 593–600.
- [22] Cheng-Tai Chen and Yu-Chie Chen. Fe₃O₄/TiO₂ Core/Shell Nanoparticles as Affinity Probes for the Analysis of Phosphopeptides Using TiO₂ Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2005. 77: 5912-5919.
- [23] Baoliang Lv, YaoXu n, HongTian, DongWu, Yuhan Sun. Synthesis of Fe₃O₄/SiO₂/Ag nanoparticles and its application in surface-enhanced Raman scattering. *Journal of Solid State Chemistry.* 2010. 183: 2968–2973
- [24] F. Li and C. Vipulanandan. Microemulsion Approach to Bimetallic Fe/Ni Production and Degradation of Trichloroethylene. Center for Innovative Grouting Material and Technology (CIGMAT). Texas Center for Superconductivity and Advanced Materials (TCSAM).

- [25] Chudasama, B.; Vala, A. K.; Andhariya, N.; Upadhyay, R. V. and Mehta, R. V. Enhanced Antibacterial Activity of Bifunctional Fe₃O₄-Ag Core-Shell Nanostructures. *Nano Res.* 2009. 2: 955-965.
- [26] Zhang, X.; Niu, H.; Yan, J.; Cai, Y. Immobilizing silver nanoparticles onto the surface of magnetic silica composite to prepare magnetic disinfectant with enhanced stability and antibacterial activity. *Colloids and surface A: Physicochem. Eng. Aspects.* 2011. 375: 186-192.
- [27] Tao, Andrea. Sinsersuksakul, Prasert. Yang, Peidong. Polyhedral silver nanocrystals with distinct scattering signatures. *Angew. Chem. Int.* 2006. 45: 4597-4601.
- [28] Lee, P. Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. *J Phys Chem.* 1982. 86(17): 3391-3395.
- [29] Sondi, I.; Goia, D. Preparation of highly concentrated stable dispersions of uniform silver nanoparticles. *J Colloid Interface Sci.* 2003. 260: 75-81.
- [30] García-Barrasa, J.; López-de-Luzuriaga, J.; Monge, M. Silver nanoparticles: synthesis through chemical methods in solution and biomedical applications. *Cent Eur J Chem.* 2011. 9: 7-19.
- [31] Krutyakov, Y.; Olenin, A.; Lisichkin, G. Aggregative stability and polydispersity of silver nanoparticles prepared using two-phase aqueous organic systems. *Nanotechnologies in Russia.* 2008. 3: 303-310.
- [32] Evanoff, David. Chumanov, George. Synthesis and Optical Properties of Silver Nanoparticles and Arrays. *Chem Phys Chem.* 2005. 6: 1221 - 31.
- [33] Kogan, M.; Olmedo, I.; Hosta, L.; Guerrero, A.; Cruz, L. and Albericio, F. Peptides and metallic nanoparticles for biomedical applications. *Nanomedicine.* 2007. 3: 287-306.

- [34] Saiyed, Z. M.; Sharma, S.; Godawat, R.; Telang, S. D.; Ramchand, C. N. Activity and stability of alkaline phosphatase (ALP) immobilized onto magnetic nanoparticles (Fe₃O₄). *J. Biotechnol.* 2007. 131: 240–244.
- [35] Wang, J.; Duan, T.; Sun, L.; Liu, D.; Wang, Z. Functional gold nanoparticles for studying the interaction of lectin with glycosyl complex on living cellular surfaces. *Anal. Biochem.* 2009. 392: 77–82.
- [36] Wang, L.; Zhao, W. and Tan, W. Bioconjugated Silica Nanoparticles: Development and Applications. *Nano Res.* 2008. 1: 99-115.
- [37] de la Fuente, J. M.; Penadéz, S. Glyconanoparticles: Types, synthesis and applications in glycoscience, biomedicine and material science. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2006. 1760: 636–651.
- [38] de la Fuente, J. M.; Barrientos, A. G.; Rojas, T. C.; Rojo, J.; Cañada, J.; Fernández, A.; Penadés, S. Gold glyconanoparticles as water-soluble polyvalent models to study carbohydrate interactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2001. 40: 2257–2261.
- [39] Ghazarian, H.; Idoni, B.; Steven B. Oppenheimer, S. O. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *acta histochemica.* 2010; 2: 1-12.
- [40] Rodríguez, J. S.; Santos-Magalhaesa, N. S.; Coelhoa, L. C. B. B; Couvreurb, P.; Ponchelb, G.; Gref, R. Novel core(polyester)-shell(polysaccharide) nanoparticles: protein loading and surface modification with lectins. *J. Controlled Release.* 2003. 92: 103–112.
- [41] Lee, X.; Thompson, A.; Zhang, Z.; Ton-that, H.; Biesterfeldt, J.; Ogata, C.; Xu, L.; Johnston R. A. Z.; Young, N. M. Structure of the complex of *Maclura pomifera* agglutinin and the T-antigen disaccharide, Gal β 1,3GalNAc. *J. Biol. Chem.* 1998. 273: 6312–6318.
- [42] Chumkhunthod, P.; Rodtong, S.; Lambert, S. J.; Fordham-Skelton, A. P.; Rizkallah, P. J.; Wilkinson, M. C.; Reynolds, C. D. Purification and characterization of an N-acetyl-D-

galactosamine-specific lectin from the edible mushroom *Schizophyllum commune*. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. 1760: 326–332.

[43] Cammarata, M.; Benenati, G.; Odom, E. W.; Salerno, G.; Vizzini, A.; Vasta, G. R.; Parrinello, N. Isolation and characterization of a fish F-type lectin from gilt head bream (*Sparus aurata*) serum. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. 1770: 150–155.

[44] Sharon, L. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. *TIBS.* 1993. 18: 221-226.

[45] a) Niemeyer, C. M. Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: biotechnology meets materials science. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001. 40: p. 4128–4158. **b)** Katz, E.; Willner, I. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004. 33: 6042–6108.

[46] Otsuka, H.; Akiyama, Y.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K. Quantitative and reversible lectin-induced association of gold nanoparticles modified with α -Lactosyl- ω -mercapto-poly(ethylene glycol). *J. Am. Chem. Soc.* 2001. 123: 8226–8230.

[47] Ding, C.; Qian, S.; Wang, Z. Electrochemical cytosensor based on gold nanoparticles for the determination of carbohydrate on cell surface. *Analytical Biochemistry.* 2011. 414: 84–87.

[48] Oliveira, M. D.; Correia, M.; Diniz, F. Concanavalin A and polyvinyl butyral use as a potential dengue electrochemical biosensor. *Biosensors and Bioelectronics.* 2009. 25: 728–732.

[49] a) Koshte, V.L., et al., Isolation and characterization of BanLec-I, a mannoside-binding lectin from *Musa paradisiac* (banana). *Biochem J*, 1990. 272: 721-6. **b)** Swanson, M. D. Molecular Engineering of a Banana Lectin that Inhibits HIV-1 Replication. Universidad de Michigan. 2010.

[50] Swanson, M. D.; Winter, H. C.; Goldstein, I. J. and Markovitz, D. M. A Lectin Isolated from Bananas Is a Potent Inhibitor of HIV Replication. *J. Biol. Chem.* 2010. 285: 8646–8655.

[51] Vargas, J.; Clavo, N.; Salim, M. Detección de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* spp., en cerdos del departamento de Córdoba. *MVZ-Córdoba.* 2004. 9: 386-392.

[52] Blanco, J. Blanco, M. Blanco, J. Alonso, M. Escribano A. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico de las infecciones producidas por *Escherichia coli* enterohemorrágicas productoras de verotoxinas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1993. 11: 325-334.

[53] Daoud, W. A.; Xin, J. H. and Zhang, Y. H. Surface functionalization of cellulose fibers with titanium dioxide nanoparticles and their combined bactericidal activities. *Surf. Sci.* 2005 599: 69–75.

[54] Ghule, K.; Ghule, A. V.; Chen, B. and Ling, Y. Preparation and characterization of ZnO nanoparticles coated paper and its antibacterial activity study. *Green Chem.* 2006 8: 1034-1041

[55] Makhluaf, S.; Dror, R.; Nitzan, Y.; Abramovich, Y.; Jelinek, R.; Gedanken, A. Microwave-assisted synthesis of nanocrystalline MgO and its use as a bactericide. *Adv Funct Mater.* 2005 15: 1708–1715.

[56] Zhua, A.; Lanhua Yuan, L.; Liao, T. Suspension of Fe₃O₄ nanoparticles stabilized by chitosan and *o*-carboxymethylchitosan. *International Journal of Pharmaceutics.* 2008. 350: 361–368.

[57] Qi, L.; Xu, Z.; Jiang, X.; Hu, C. and Zou, X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydr. Res.* 2004 339: 2693–700.

- [58] Yamanaka, M.; Hara, K. and Kudo, J. 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: 7589–7593.
- [59] Novak, J. P.; Feldheim, D. L. Assembly of phenylacetylenebridged silver and gold nanoparticle arrays. *J. Am. Chem. Soc.* 2000. 122: 3979 3980.
- [60] Zhua, A.; Lanhua Yuan, L.; Liao, T. Suspension of Fe₃O₄ nanoparticles stabilized by chitosan and o-carboxymethylchitosan. *International Journal of Pharmaceutics.* 2008. 350: 361–368.
- [61] Kohanski, M. A.; Dwyer, D. J.; Hayete, B.; Lawrence, C. A.; Collins, J. J. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell.* 2007 130: 797–810.
- [62] Touati, D. Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys.* 2000 373: 1–6.
- [63] a) 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. b) Morones, Jose. Elechiguerra, Jose. Camacho, Alejandra. Holt, Katherine. Kouri, Juan. Ramirez, Jose. Yacaman, Miguel. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 2005. 16: p. 2346-53. c) Baker, C. Pradhan, A. Pakstis, L. Pochan, D. Shah S. Synthesis and Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol.* 2005; 5: 244–9.
- [64] Feng, Q. L.; Wu, J.; Chen, G. Q.; Cui, F. Z.; Kim, T. N.; Kim, J. O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002. 52: 662 668.
- [65] Wellman-Labadie, O.; Lakshminarayanan, R.; Hincke, M. T. Antimicrobial properties of avian eggshell-specific C-type lectin-like proteins. *FEBS Letters.* 2008. 582: 699–704.

- [66]** Redondo, M. J.; Alvarez-Pellitero, P. The effect of lectins on the attachment and invasion of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) in turbot (*Psetta maxima* L.) intestinal epithelium in vitro. *Exp. Parasitology*. 2010. 126: 577-581.
- [70]** Carroll, K. J.; Hudgins, D. M.; Spurgeon, S.; Kemner, K. M. et al. One-Pot Aqueous Synthesis of Fe and Ag Core/Shell Nanoparticles. *Chem. Mater.* 2010. 22: 6291–6296.
- [71] a)** Wong, J. H.; Ng, T. B. Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with stimulatory effect on nitric oxide production by macrophages from the emperor banana. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2006. 38: 234–243. **b)** Cheung, A. H.; Wong, J. H.; Ng, T. B. *Musa acuminata* (Del Montebanana) lectin is a fructose-binding lectin with cytokine-inducing activity. *Phytomedicine*. 2009. 16: 594–600.
- [72]** Ersson, B. A phytohemagglutinin from sunn hemp seeds (*crotalaria juncea*). II. purification by a high capacity biospecific affinity adsorbent and its physicochemical properties. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1977. 494: 51-60.
- [73]** Ma, M.; Zhang, Y.; Yu, W.; Shen, H.; Zhang, H.; Gu, N. Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane. *Colloids Surf., A: Physicochem. Eng. Aspects*. 2003. 212: 219- 226.
- [74]** Hermanson, G. *Bioconjugate Techniques*. Second edition. 2008: 216-219.
- [75]** Hermanson, G. *Bioconjugate Techniques*. Second edition. 2008: 203-205.
- [76]** Hermanson, G. *Bioconjugate Techniques*. Second edition. 2008: 134-136.
- [77]** Kekkonen, V.; Lafreniere, N.; Ebara, M. Synthesis and characterization of biocompatible magnetic glyconanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* 2009. 321: 1393–1396.
- [78]** Gupta, A.K.; Wells, S. Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization and cytotoxicity studies. *IEEE Trans Nanobiosci.* 2004. 3: 66–73.

[79] Campo, A.; Sen, T.; Lellouche, J.; Bruce, I. Multifunctional magnetite and silica-magnetite nanoparticles: Synthesis, surface activation and applications in life sciences. *J. Magn Magn. Mater.* 2005. 293: 33–40.

[80] Xia, H.; Cui, B.; Zhou, J.; Zhang, L.; Zhang, J. Synthesis and characterization of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Ag}$ nanocomposites and their antibacterial performance. *Appl. Surf Sci.* 2011. 257: 9397– 9402.

[81] Gómez, A. Preparación de nanopartículas magnéticas uniformes y de alta cristalinidad para biomedicina. 2009. Tesis.

[82] Dadosh, Tali. Synthesis of uniform silver nanoparticles with a controllable size. *Mater lett.* 2009. 63: p. 2236-38.

[83] 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: p. 33-37.

[84] 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: p. 31-37.

[85] Schwegmann, H. Influence of the zeta potential on the sorption and toxicity of iron oxide nanoparticles on *S. cerevisiae* and *E. coli*. *Journal of Colloid and Interface Science* 347 (2010) 43–48.

[86] 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: 637-643.

[87] Epand, R. S.; Schmitt, M. Role of membrane lipids in the mechanism of bacterial species selective toxicity by two α/β -antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006. 1758: 1343–1350.

[88] Feng, Q. L.; Wu, J.; Chen, G. Q. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. John Wiley & Sons. 2000. 662-668.

[89] 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.

[90] Lee, C.; Kim, J. Y.; Lee, W. Il.; Nelson, K. L.; Yoon, J. and Sedlak, D. Bactericidal effect of zero-valent iron nanoparticles on *Escherichia coli*. *environ. sci. technol.* 2008. 42: 4927–4933.

[91] Sonohora, R. Difference in surface properties between *Escherichia coli* Z and *Staphylococcus aureus* as revealed by electrophoretic mobility measurements. *Biophysical Chemistry* S5. 1995: 273-277.

[92] Gordon, T. Synthesis and characterization of zinc/iron oxide composite nanoparticles and their antibacterial properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 2011. 374: 1–8.

[93] Paredes, D. Estudio del efecto antibacteriano de nanopartículas de plata sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Tesis. 2011.

[94] Pérez, G.; Navarro de, Y. Detección y caracterización preliminar de lectinas presentes en semillas de leguminosas. *Revista Colombiana de Química*. 1978. 8: 25-43.

- [95] Yan, F.; Li, J.; Zhang, J.; Liu, F.; Yang, W. Preparation of Fe₃O₄/polystyrene composite particles from monolayer oleic acid modified Fe₃O₄ nanoparticles via miniemulsion polymerization. *J Nanopart Res.* 2009. 11(2): p. 289-296
- [96] Sahoo, B. A novel method for the immobilization of urease on phosphonate grafted iron oxide nanoparticle. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 2011. 69: 95–102.
- [97] Jang, J. H.; Lim, H. B. Characterization and analytical application of surfacemodified magnetic nanoparticles. *Microchemical Journal* 94 (2010) 148–158.
- [98] Chirra, H. D.; Sexton, T. Catalase-coupled gold nanoparticles: Comparison between the carbodiimide and biotin–streptavidin methods. *Acta Biomaterialia.* 2011. 7: 2865–2872.
- [99] Swason, M. D. Molecular Engineering of a Banana Lectin that Inhibits HIV-1 Replication. 2010. Tesis PhD. Universidad de Michigan.
- [100] Peumans, W.J., et al., *Fruit-specific lectins from banana and plantain.* *Planta*, 2000. 211(4): p. 546-54.
- [101] Wellman-Labadie, O. Antimicrobial properties of avian eggshell-specific C-type lectin-like proteins. *FEBS Letters* 582 (2008) 699–704.
- [102] Neumann, D. Computational modeling of the sugar–lectin interaction. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56 (2004) 437– 457.
- [103] Navarre, W. W.; Schneewind, O. Surface Proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999, 63(1):174.
- [104] Sleytr, U. B.; Messner, P. Crystalline surface layers on bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 1983. 37:311-39.