



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN MATERIALES AVANZADOS, S. C.
POSGRADO**

**“Efectos de citotoxicidad en
microorganismos patógenos expuestos a
nanopartículas de plata y óxido de zinc”**

**Tesis que como Requisito para obtener el grado de Doctor en
Ciencia y Tecnología Ambiental presenta: “M.C. Carlos Arzate
Quintana”**

**Directores de tesis: Dr. Erasmo Orrantia Borunda (CIMAV)
 Dra. Blanca Estela Sánchez Ramírez (UACH)**

Chihuahua, Chih., a Septiembre del 2016

Agradecimientos:

A mis hijos, **Fernanda, Sebastián y Regina**, por ser mi inspiración diaria para trabajar, estudiar y seguirme superando en todos los sentidos de mi vida.

También doy gracias a a mi madre, **Anita Quintana Chavira** y mis hermanas **Diana Elizabeth** y **Ana Angélica**, ya que su convivencia y sus palabras de aliento siempre me impulsaron a seguir trabajando desde que me matriculé en el doctorado.

Gracias a **Carlos Arzate Navarro**, ya que siempre fue ejemplo de dedicación y de constante actualización en el estudio, ya que nunca ha dejado de seguir al día en una profesión tan exigente como lo es la medicina.

Por último quiero agradecer a mis asesores, el doctor **Erasmus Orrantia Borunda** y la doctora **Blanca Sánchez Ramírez**, por su guía y su paciencia durante estos años tan arduos y tan gratificantes que abarcaron el proceso de mi doctorado.

Índice

1. Resumen.....	1
2. Introducción	2
3. Hipótesis	4
4. Objetivos	5
4.1 Objetivo General.....	5
4.2 Objetivos Particulares.....	5
5. Antecedentes	6
5.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
5.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	7
5.3 <i>Candida albicans</i>	8
5.4 <i>Coniophora eremophila</i>	9
5.5 Diferencias estructurales de los modelos biológicos de bacterias y hongos. 10	
5.5.1 Estructura de la pared celular de las bacterias Gram-positivas.....	11
5.5.2 Estructura de la pared celular de las bacterias Gram-negativas.	11
5.5.3 Estructura de la pared celular de las células fúngicas.	12
5.6 Nanopartículas de plata.....	12
5.6.1 Estudios toxicológicos con nanopartículas de plata.....	13
5.7 Nanopartículas de zinc	15
5.7.1 Estudios toxicológicos con nanopartículas de zinc.....	15
6. Materiales y métodos.....	16
6.1 Obtención de nanopartículas.....	16
6.1.1 Caracterización de las nanopartículas	16
6.2 Cultivos bacterianos.....	17
6.2.1 Ensayos de viabilidad	17
6.2.1.1 Preparación de muestras para los ensayos de viabilidad.....	18
6.3 Ensayos de inhibición <i>in vitro</i>	19
6.3.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los tratamientos con ZnONP y AgNP contra <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i> y <i>C. albicans</i> en medio de cultivo líquido.	19
6.3.2 Determinación de la concentración mínima bactericida (MIB) y dosis letal 50 DL ₅₀ de los tratamientos de ZnONP y AgNP contra <i>S.aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>C. albicans</i> en medio líquido.....	19

6.3.3	Determinación de MIC de ZnONPy AgNP contra <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , y <i>C. albicans</i> en medio de cultivo sólido.	20
6.3.4	Determinación de la MIC de ZnONP y AgNP contra <i>C. eremophila</i> por medición de crecimiento radial.	21
6.4	Identificación del mecanismo inhibitorio	21
6.4.1	Determinación de daño al material genético	21
6.4.2	Determinación del daño estructural de la pared y la membrana celular	22
6.4.2.1	Preparación de muestras para microscopía electrónica de transferencia.....	22
6.4.2.2	Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido	23
6.4.2.3	Observación mediante microscopía electrónica de barrido de biopelículas generadas por microorganismos patógenos expuestos a AgNP.....	24
6.5	Medición de la actividad enzimática	24
6.5.1	Actividad de la lipasa expuesta a AgNP por medio de un método colorimétrico comercial	24
6.5.2	Actividad de la lipasa contenida en lisados bacterianos y expuesta a AgNP por medio de la medición del pH.....	25
7.	Resultados.....	26
7.1	Caracterización de las nanopartículas	26
7.2	Ensayos de viabilidad <i>in vitro</i>	27
7.3	Determinación de daño al material genético.....	28
7.4	Daño estructural de las paredes y membranas celulares.....	29
7.4.1	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	29
7.4.1.1	Micrografías de <i>P. aeruginosa</i> expuesta a tratamientos de AgNP.....	29
7.4.1.2	Micrografías de <i>S. aureus</i> expuesto a tratamientos de AgNP.....	30
7.4.1.3	Micrografías de <i>C. albicans</i> expuesta a los tratamientos con AgNP y ZnONP	30
7.4.2	Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	31
7.4.3	Análisis de biopelículas por medio de la microscopía electrónica de barrido	32
7.5	Medición de la actividad enzimática	33
7.4.2	Medición de la actividad enzimática de lipasa y DHL comerciales por medio de una técnica colorimétrica	33
8.	Discusiones:	36
8.1	Ensayos de viabilidad <i>in vitro</i>	36
8.1.1	Citotoxicidad de las nanopartículas de plata proporcionadas por Peñoles en medio líquido contra <i>S. aureus</i> ATCC 29213 y <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442..	36

8.1.2	Citotoxicidad de las nanopartículas de plata y óxido de zinc en medio sólido contra <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	37
8.1.3	Citotoxicidad de las nanopartículas de plata contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442 en medio M9 sólido	37
8.1.4	Citotoxicidad de las nanopartículas de plata contra <i>Coniophora eremophila</i> ATCC 64458 por medio de crecimiento radial en placas de agar Lee	38
8.2	Determinación de daño al material genético.....	38
8.3	Daño estructural de las paredes y membranas celulares.....	39
8.3.1	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	39
8.3.1.1	Ensayos con <i>P. aeruginosa</i> expuesta a AgNP y ZnONP.....	39
8.3.1.2	Ensayos con <i>S. aureus</i> expuesta a AgNP y ZnONP.	40
8.3.1.3	Ensayos con <i>C. albicans</i> expuesta a AgNP y ZnONP.	40
8.3.1.4	Ensayos con <i>C. eremophila</i> expuesta a AgNP y ZnONP.	41
9.	Conclusiones.....	41
10.	Bibliografía	43

1. Resumen

En el presente trabajo se analizaron las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de plata (AgNP) y óxido de zinc (ZnONP) en ensayos de citotoxicidad *in vitro* en contra de distintos microorganismos patógenos para el ser humano y de importancia industrial. Los valores de concentración observados para su inhibición fueron variados, siendo las AgNP de una actividad inhibitoria más efectiva que las ZnONP. Sin embargo el enfoque del presente trabajo de tesis estaba aplicado a los posibles mecanismos en que dichos metales inhiben el desarrollo y crecimiento de los microorganismos antes mencionados. Los daños más evidentes fueron observados en las micrografías obtenidas por medio de la microscopía electrónica de barrido (SEM), donde se muestra el daño a la pared celular de la levadura *Candida albicans* y de la bacteria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*. La actividad enzimática de la lipasa y de la deshidrogenasa láctica (HDL) al ser expuestas a compuestos de plata (AgNO_3 y AgNP) se vio disminuida de manera importante, por lo que se llegó a la conclusión de que las interacciones entre la plata y las enzimas son de gran relevancia para explicar el fenómeno de inhibición del crecimiento de los microorganismos estudiados y puede estar relacionado con el daño observado por medio de SEM. No fue posible demostrar el rompimiento de los puentes disulfuro de las proteínas, lo cual podría explicar la inhibición enzimática, por lo que se debe considerar la interacción de otros grupos funcionales con los iones de plata liberados por las AgNP en medios acuosos. El daño al material genético no fue evidente, ya que no se presentó un fraccionamiento observable del ADN de microorganismos expuestos a tratamientos de AgNP y ZnONP, sin embargo esto no descarta una posible interacción entre ambos, ya que el rompimiento de las cadenas de ADN no es el único medio por el cual puede haber un cambio en la composición de los nucleótidos o en la expresión de genes.

2. Introducción

Para mejorar la calidad de vida del ser humano y aumentar su longevidad, ha sido necesario controlar el efecto dañino causado por los microorganismos. Una variedad de agentes antimicrobianos y desinfectantes se han utilizado para inhibir el desarrollo de microorganismos causantes de diversas enfermedades, tanto para disminuir los riesgos de infección como para combatir procesos patológicos en pacientes que ya fueron infectados por microorganismos. También se ha buscado frenar o disminuir el deterioro de diversos materiales utilizados en la industria en sus diferentes campos, como el textil, de construcción, alimentaria, etc., con el fin de aumentar su tiempo de vida útil o su duración en el anaquel, y como consecuencia tener un efecto positivo en la economía y en la salud del ser humano.

Recientemente las investigaciones se han enfocado en los nanomateriales como una alternativa prometedora. No solamente son estos capaces de inhibir directamente el desarrollo de bacterias y hongos, evitando así la degradación de diversas materias primas (maderas, metales, concreto, etc.), sino que además han demostrado ser eficientes acarreadores de drogas, mejorando la capacidad antibiótica de la quimioterapia actual, o bien, pueden ser utilizados en biomateriales utilizados en injertos y prótesis, disminuyendo la probabilidad de una infección posoperatoria que complique la salud del paciente. De lograr una aplicación directa de los nanomateriales antimicrobianos en el equipo médico utilizado de manera rutinaria en los hospitales (catéteres, sondas, etc.) también se lograría un impacto muy importante en el sistema de salud, ya que un problema de gran relevancia es el tiempo de hospitalización prolongado a causa de infecciones intrahospitalarias.

En este trabajo de tesis se midió la capacidad antibiótica y antifúngica de las nanopartículas de óxido de zinc (ZnONP) y plata (AgNP) en *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* patógenos de importancia clínica y en *Coniophora eremophila*, patógeno de la madera. Además se proponen mecanismos por los cuales las nanopartículas de plata inhiben desarrollo de dichos microorganismos.

En la actualidad, en distintas regiones del planeta, se han empezado a identificar cepas bacterianas y fúngicas con alta resistencia a los tratamientos quimioterapéuticos, por lo que es necesario iniciar nuevos proyectos de investigación en busca de una alternativa a los antimicrobianos tradicionales (Pages *et al*, 2009). Los nanomateriales han demostrado ser una fuente prometedora de control de microorganismos, ya sea en la industria de la construcción como en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Se han estudiado directamente como agentes inhibidores, o bien como acarreadores que potencializan la acción de la terapia convencional basada en drogas (Araujo *et al*, 2010; Hans *et al*, 2002; Kumari *et al*, 2010; Martínez-Gutiérrez *et al*, 2010; Muthu *et al*, 2009; Pinto *et al*, 2006; Rahimi *et al*, 2010; Verran *et al*, 2007; Wang *et al*, 2010). Los nanomateriales pueden ser también un gran adelanto en la industria, ya que el uso de esta nueva tecnología se puede aplicar en la fabricación materiales, haciéndolos más resistentes a la descomposición por bacterias y hongos (Dastjerdi *et al*, 2010; Haile *et al*, 2010; Huang Z. *et al*, 2000; Sathishkumar *et al*, 2010).

Los nanomateriales incrementan el tiempo de vida de las diferentes materias primas utilizadas en la construcción y en la fabricación de productos que de otra manera están expuestos de manera cotidiana a dicho deterioro, como lo son por ejemplo productos de madera, concreto, pinturas, textiles y demás, que sufren de exposición permanente al medio ambiente (Dastjerdi *et al*, 2010, Haile *et al*, 2010; Huang *et al*, 1999; Kumari *et al*, 2010; Sathishkumar *et al*, 2010). Es posible también, aprovechar las características de esta tecnología en la fabricación de productos y materiales de uso quirúrgico y hospitalario, que son fuente de infección común debido a la capacidad de las diferentes cepas bacterianas de formar biopelículas en catéteres y sondas provocando infecciones de origen nosocomial (Baveja *et al*, 2004; Hilderbrand *et al*, 2006; Huang *et al*, 1999; Kumari *et al*, 2010; Reid *et al*, 1999). Basados en todas estas características, es fundamental seguir investigando y desarrollando nanomateriales para la mejora e innovación de la tecnología de control de microorganismos de importancia industrial y médica, ya que los medios convencionales han comenzado a verse rebasados por las cepas emergentes resistentes a agentes desinfectantes y de uso quimioterapéutico.

3. Hipótesis

Las nanopartículas de plata, el nitrato de plata y las nanopartículas de óxido de zinc poseen capacidad inhibitoria o antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, y *Coniophora eremophila* provocando uno o más de los siguientes tipos de daño celular:

- a) Fraccionamiento genómico,
- b) Daño a la estructura de la pared y/o membrana celular
- c) Alteración de la actividad enzimática.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Determinar la capacidad inhibitoria de nanopartículas de plata y óxido de zinc en contra de los patógenos humanos *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* y del hongo patógeno de la madera *C. eremophila*, y proponer un mecanismo por el cual se realiza la citotoxicidad de los microorganismos estudiados.

4.2 Objetivos Particulares

El trabajo se dividió de acuerdo a los siguientes puntos:

- Caracterizar la microestructura de NP por medio de microscopía electrónica y difracción de rayos X
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas contra los microorganismos en ensayos de viabilidad in vitro.
- Determinar el daño en material genético, membrana celular, pared celular y actividad enzimática en los microorganismos expuestos a AgNP, AgNO₃ y ZnONP.

5. Antecedentes

5.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Este patógeno está relacionado a infecciones de pacientes inmunosuprimidos o inmunocomprometidos y es la causa principal de muerte en pacientes con fibrosis quística. Además es la causa más común de neumonía en pacientes en terapia intensiva, adquirida a través de los respiradores, y es responsable del 10% de los casos de infecciones intrahospitalarias que ocurren cada año a nivel mundial, entre los que incluye: sepsia de heridas, otitis externa, folículitis y diarrea infantil (Abraham *et al*, 2009; Fuentefría *et al*, 2010; Lu, Q. *et al*, 2010; Nigaud *et al*, 2010; Reid *et al*, 1999). Esta bacteria es resistente a una gran variedad de antibióticos, sin embargo se sabe que generalmente es sensible a ciertos tratamientos, como lo son: algunos β -lactámicos (ceftazidima, Imipenem) y aminoglucósidos (Amikacina y Tobramicina). La capacidad de esta bacteria de generar biopelículas le confiere protección no solamente contra la quimioterapia antibiótica, además la protege de la acción fagocítica de las células del sistema inmune innato, la acción microbicida del suero, la opsonización por anticuerpos y de la eliminación de la bacteria mediante el movimiento de los cilios de la mucosa respiratoria (Lu, Q. *et al*, 2010; Sekiguchi *et al*, 2005).

La formación de biopelículas aumenta la capacidad de los microorganismo a resistir condiciones estresantes del medio ambiente, gracias lo cual *P. aeruginosa* puede permanecer por largos períodos de tiempo en ambientes húmedos y acuosos, diseminándose hasta entrar en contacto con cepas portadoras de plásmidos de resistencia antibiótica. Su importancia como patógeno nosocomial está relacionada con ésta capacidad de sobrevivir en suelo, agua, plantas, material quirúrgico, superficies, ropa, jabones, utensilios e incluso soluciones desinfectantes (Abraham *et al*, 2009; Fuentefría *et al*, 2010; Hocquet *et al*, 2003). La formación de biofilmes está relacionada con la capacidad de coordinación de los microorganismos que lo conforman, esta coordinación es conocida como Sensibilidad Quórum (QS por sus siglas en inglés).

Por medio de este mecanismo las bacterias regulan su densidad celular, resultando en la coordinación de diferentes funciones, incluida la conjugación de plásmidos y de los factores de virulencia (Lu, Q. *et al*, 2010; Nigaud *et al*, 2010).

La importancia de *P. aeruginosa* radica en su resistencia intrínseca a diferentes tipos de antibióticos y a la capacidad de adquirir resistencia a virtualmente cualquier otro tipo de antibiótico que siga siendo un tratamiento efectivo contra este patógeno. MexAB-OprM es el sistema de bombeo de flujo más importante en la multiresistencia de esta bacteria, ya que le confiere la capacidad de expulsar de su citoplasma no solamente los antibióticos de importancia médica, sino también detergentes, colorantes, solventes orgánicos y desinfectantes. *Pseudomonas* también posee la capacidad de degradar o alterar la estructura química de las sustancias antibióticas. Todas estas características son conferidas por los diversos genes de resistencia a antibióticos adquiridos por la bacteria (Hirakata *et al*, 2009; Hocquet *et al*, 2003; Pages *et al*, 2009).

5.2 *Staphylococcus aureus*

Es la causa principal de infecciones de piel y tejido blando a nivel mundial. La variedad de patologías de las cuales se considera a *S. aureus* como agente causal puede ir desde infecciones de poca importancia, como la foliculitis menor o la producción de forúnculos, hasta la invasión de tejidos más profundos, como en el caso del carbunco, neumonía y sepsis (Gould, 2009). Se relaciona también a infecciones intrahospitalarias y se ha identificado como agente causal en infecciones de heridas quirúrgicas e infecciones por uso de catéteres y sondas. La incisión y drenaje de los abscesos generalmente es tratamiento suficiente para las infecciones leves, pero también es necesaria una terapia antibiótica, sin embargo este microorganismo ha ido adquiriendo resistencia con el paso del tiempo (Gould, 2009).

Entre las cepas de mayor relevancia podemos destacar a *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (MRSA por sus siglas en inglés) y se le relaciona con la producción de la toxina Leucocidina Pantón Valentine (PVL), la cual es uno de sus factores de virulencia más importantes. La

resistencia a los antibióticos es un problema de salud de importancia mundial y su prevalencia se ha visto incrementada de manera importante. En diferentes partes del mundo, la resistencia a Metilina ha aumentado en altos porcentajes en períodos de tiempo relativamente cortos, como es el caso de Taiwan, que en el año de 1986 la prevalencia de dicha cepa era de 26.3%, y en el año 2006 se calculó en 74.6%. También han ido emergiendo nuevas cepas con resistencia media y completa a la vancomicina (VISA y VRSA por sus siglas en inglés) (Hsueh *et al*, 2009; Huang V. *et al*, 2010).

Desde la década de los 80 se han empezado a detectar cepas multiresistentes a drogas (MRSA) y se ha reportado resistencia una gran variedad de antibióticos como por ejemplo: macrólidos, lincosamidas, rifampicina, trimetropim/sulfametoxazol y tetraciclina. Dichas cepas se han vuelto endémicas de hospitales, principalmente en países en vías de desarrollo, como el caso de Brasil. Los factores de riesgo para su transmisión incluyen materiales punzocortantes, prolongada hospitalización y uso de antibióticos, transmisión a través del personal médico y propagación a través del medio ambiente hospitalario (Gould, 2009; Hsueh *et al*, 2009; Spirandelli *et al*, 2009).

La detección de infecciones causadas por MRSA se ha reportado también en comunidades extrahospitalarias, como el caso de indigentes, prisiones, cuarteles militares y guarderías (Spirandelli *et al*, 2009). Los pacientes a los cuales se les ha catalogado como portadores de cepas MRSA se consideran posibles fuentes de infección, por lo que se recomienda el monitoreo de pacientes con alto riesgo de portar esta cepa. Estos pacientes deberán ser confinados de preferencia con otros portadores de cepas resistentes, medida que no es realizada en hospitales con escasos recursos (Spirandelli *et al*, 2009).

5.3 *Candida albicans*

Es un organismo en forma de levadura que puede cambiar su morfología a pseudohifa, lo cual aumenta sus características patológicas. Se encuentra como flora normal transitoria en la piel humana, el tracto digestivo, cavidad oral, faringe, esófago, vagina y demás membranas mucosas, motivo por el cual el

espectro de infecciones que provoca es muy amplio. Tales enfermedades pueden ir desde una simple infección cutánea, o bien puede provocar casos muy complicados, como en el caso de pacientes con inmunodeficiencias, diabetes y linfomas (Angiolella et al, 2009; Villamizar *et al*, 2009).

La candidiasis es una de las infecciones endógenas causadas por hongos más frecuentes, y provocada por el desarrollo excesivo de flora normal fúngica. Es también la cuarta causa de infecciones intrahospitalarias a nivel mundial, debido a su capacidad de ser transmitido a través de prótesis, catéteres o al ser transmitido por el personal médico (Miceli *et al*, 2009; Villamizar *et al*, 2009).

La habilidad de *Candida albicans* de formar biofilmes en material médico es un factor de virulencia que la capacita para causar enfermedades en humanos en el ambiente hospitalario. La formación de biopelículas representa un gran reto para el tratamiento de infecciones causadas por esta levadura (Kurtulmus *et al*, 2010; Miceli *et al*, 2009). Sin embargo en muchos pacientes con biomateriales o catéteres relacionados con infecciones de *Candida*, el cambiar o remover el material infectado es un riesgo alto. Se han propuesto tratamientos preventivos de dichos materiales consistentes en soluciones de altas concentraciones de tetraciclinas y anfotericina B, que en estudios recientes muestran una reducción en el desarrollo del microorganismo. Sin embargo, el uso de nanomateriales puede ser también una medida eficaz y confiable, por lo que es necesario estudiar su efecto como material antifúngico, con posibles usos en el área médica (Kurtulmus *et al*, 2010).

5.4 *Coniophora eremophila*

La degradación de madera ha sido un problema que ha acompañado al hombre a través de la historia. Las finas obras de arte, los edificios, muebles y artefactos han sido blancos de los hongos que infestan y deterioran la madera.

A menudo los tratamientos químicos que se utilizan para prevenir este tipo de problema son causa también de daño, por lo que se han desarrollado medidas alternativas para evitar el desarrollo de hongos dichos materiales, esta tecnología sigue en proceso de desarrollo y es un oportunidad para desarrollar técnicas que involucren nanopartículas en el campo de la industria maderera (He *et al*, 2010; Tavzes *et al*, 2001).

Los hongos, en especial los basidiomicetos y ascomicetos son la causa más importante del deterioro y decoloración de la madera. Estos hongos despolimerizan y metabolizan los polisacárido de la madera, dejando residuos de color café, que son los que le confieren la apariencia típica a la madera en descomposición (Irbe *et al*, 2006; Ray *et al*, 2009). La presencia de humedad, como la aportada por tubería que gotea, es la razón más frecuente de la descompostura de madera en materiales de construcción, y uno de los hongos más frecuentemente relacionados a la infestación de la madera es *Coniophora puteana* conocida comúnmente como el hongo de las bodegas (Korpi *et al*, 1999; Voda *et al*, 2003). A este hongo se le identifica en daños y deterioro de edificios en Estados Unidos de Norteamérica y Europa. Este hongo prevalece principalmente en pisos de madera y en construcciones que están en contacto directo con el concreto y que carece de un aislamiento adecuado, lo que provoca que la madera se humedezca favoreciendo el desarrollo del hongo. Debido a la germinación de esporas y la activación de los micelios, este tipo de hongos requiere de una alta humedad relativa para poder utilizar los sustratos presentes en la madera (Korpi *et al*, 1999).

5.5 Diferencias estructurales de los modelos biológicos de bacterias y hongos.

El propósito de estudiar microorganismos pertenecientes a diferentes géneros y especies radica en probar el potencial inhibitorio de amplio espectro de las nanopartículas de plata y óxido de zinc. Si bien esta actividad ha sido probada reiteradamente, es necesario estudiar los mecanismos a través de los cuales ejercen su acción antibiótica y antifúngica. Por este motivo es que se eligieron representantes que pertenezcan a las bacterias Gram-positivas (*S. aureus*), Gram-negativas (*P. aeruginosa*), hongos levaduriformes (*C. albicans*) y hongos filamentosos (*C. eremophila*), ya que es posible que la configuración

de sus paredes celulares, o su condición de unicelulares o multicelulares puedan ejercer influencia en su respuesta a los diferentes tratamientos (Angionella *et al*, 2009; Braun V, 2015; Malanovic *et al* 2016).

5.5.1 Estructura de la pared celular de las bacterias Gram-positivas.

Las bacterias Gram-positivas se caracterizan por su gruesa capa de peptidoglucanos, la cual confiere a la célula protección en contra de factores hostiles del medio ambiente. La pared bacteriana también confiere estabilidad a la estructura celular de los microorganismos, por lo que es un elemento de alta importancia para su supervivencia. También es importante como factor de virulencia, ya que las moléculas de adhesión o estructuras accesorias como la cápsula, generalmente dependen de la integración al peptidoglucano (Malanovic *et al* 2016).

Al mismo tiempo, las enzimas encargadas de regular el metabolismo y la síntesis de la pared celular son blanco de algunos antibióticos, como los betalactámicos y la vancomicina. Tanto si la integridad de la pared bacteriana se ve afectada o no por los componentes de las nanopartículas podríamos inferir un posible mecanismo de acción antimicrobiana. (Malanovic *et al* 2016)

5.5.2 Estructura de la pared celular de las bacterias Gram-negativas.

Los microorganismos Gram-negativos tienen una pared celular más compleja que la que podemos observar en los Gram-positivos. Por ejemplo, entre la membrana celular y la capa de peptidoglucanos podemos observar un espacio periplasmático en el cual se almacenan enzimas relevantes para el metabolismo de la bacteria. También existe otro componente, la membrana externa, en el cual encontramos a la endotoxina LPS (lipopolisacárido) y proteínas como las porinas, las cuales juegan un papel muy importante en la patología y resistencia bacteriana de dichos microorganismos. El tipo de daño que observemos en la estructura celular de las bacterias Gram-negativas también pueden ser una pista para la proposición del mecanismo de acción antimicrobiano de las nanopartículas utilizadas en este trabajo. (Braun V, 2015).

5.5.3 Estructura de la pared celular de las células fúngicas.

A pesar de que las células de los hongos también poseen una pared celular, es muy diferente a la que encontramos en las bacterias. Entre sus componentes se encuentran la quitina y las manoproteínas que generan una gran resistencia mecánica que mantiene la integridad de la estructura celular. Los mecanismos antimicóticos pueden tener como blanco componentes de la membrana celular, como el ergosterol, o bien inhiben la síntesis de la pared celular. Al igual que el caso de las bacterias, observar el tipo de alteraciones celulares arrojará datos necesarios para dilucidar el mecanismo de acción de las nanopartículas como agentes antifúngico (Angionella *et al*, 2009).

5.6 Nanopartículas de plata

Históricamente, la plata ha sido siempre reconocida como un agente anti-microbiano y ha sido estudiada exhaustivamente, y ha sido usada como tratamiento de infecciones y para evitar la putrefacción. Recientemente la plata ha captado de nuevo la atención de los investigadores por sus propiedades antimicrobianas multifuncionales, principalmente en su forma de nanopartículas. Se han desarrollado varios métodos para la producción de nanopartículas de plata: reducción fotocatalítica, procesos de reducción química, reducción fotoquímica o radioquímica, por mencionar algunos, e incluso se ha llegado a utilizar la biosíntesis para la producción de nanopartículas de plata (Dastjerdi *et al*, 2010; Kumari *et al*, 2010; Martínez-Gutiérrez *et al*, 2010).

La plata es un agente relativamente seguro, si lo comparamos con algunos de los compuestos antimicrobianos orgánicos cuyo uso ha sido relegado debido a la alta toxicidad que producen al cuerpo humano, sin embargo se ha evitado su uso debido a los daños que provoca en el organismo. Se considera que la plata es un producto versátil, ya que puede ser utilizado como agente antibacteriano en diferentes productos y además su actividad antimicrobiana es de amplio espectro y su efecto puede apreciarse a bajas concentraciones.

También se ha demostrado que la plata tiene la capacidad de prevenir la formación de biopelículas, y esta característica también se ha sugerido en iones y nanopartículas de plata. Las nanopartículas de plata son un desinfectante no tóxico y cuya efectividad se potencializa gracias a su capacidad de distribución en las superficies (Dastjerdi *et al*, 2010; Sathishkumar *et al*, 2010).

Su mecanismo antimicrobiano se puede explicar brevemente de la siguiente manera: el ion destruye la membrana celular o pasa a través de esta, uniéndose al grupo –SH de las enzimas intracelulares, lo que provoca una inhibición del crecimiento de las bacteria y su posterior destrucción. Los iones metálicos también catalizan la producción de radicales libres de oxígeno que oxidan la estructura molecular de la célula. Los iones de plata pueden llevar a la desnaturalización de proteínas y la muerte celular debido a que reaccionan con residuos de aminoácidos en proteínas y se unen a los grupos sulfidrilo, amino, imidazol, fosfato y carboxilo de las proteínas membranales o enzimáticas, lo cual además también puede bloquear la respiración celular. La plata también inhibe procesos oxidativos, provoca flujo de metabolitos e interfiere con la replicación del ADN. Para que se pueda apreciar eficiencia de la plata como agente antimicrobiano se requiere de concentraciones nanomolares de nanopartículas de plata, mientras que los iones de plata requieren de concentraciones micromolares (Dastjerdi *et al*, 2010).

5.6.1 Estudios toxicológicos con nanopartículas de plata

La plata ha sido usada desde tiempos inmemorables en su forma metálica, o en combinación con nitratos y sulfadiazina en el tratamiento de quemaduras e infecciones bacterianas. Pero debido a la implementación de antibióticos, el uso de la plata había sido relegado completamente. Sin embargo, con el surgimiento de cepas resistentes a drogas y a los avances en nanotecnología la plata está siendo estudiada de nuevo como un posible agente antimicrobiano de amplio espectro (Rai *et al*, 2009).

Los usos potenciales de las nanopartículas de plata son muy variados, dependiendo del tratamiento utilizado en su preparación o bien su capacidad de incorporarse a materiales de uso médico industrial y sanitario. Por ejemplo,

se demostrado que el uso de nanopartículas de plata en soluciones para lentes de contacto disminuye significativamente el desarrollo de bacterias en dichas soluciones o en la superficie misma de los lentes, el efecto antimicrobiano ha sido medido en bacterias que más frecuentemente causan infecciones a tejidos oculares, como el caso del *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Willcox et al, 2010).

Se ha medido también la capacidad inhibitoria de las nanopartículas de plata contra *Pseudomonas aeruginosa* en superficies de titanio, ya que este material es muy comúnmente utilizado en la fabricación de prótesis dentales. Además de haber mostrado una buena actividad microbicida en contra de esta bacteria, posee la cualidad de ser fácilmente incorporado a las superficies de titanio, lo que hace de las nanopartículas de plata un excelente candidato para la mejora de las prótesis dentales (Flores, et al. 2010).

Se han incorporado nanopartículas de plata en forma de nanocristales con quitosano y se ha empleado en el vendaje de heridas en estudios con ratas de laboratorio, lo que permite una reparación más rápida de los tejidos. El estar combinado con el quitosano presenta una ventaja con respecto a las diferentes preparaciones de la plata, y es que sus niveles sanguíneos son significativamente menores de los que normalmente presenta (Lu et al, 2008).

Las nanopartículas de plata también se han utilizado en el saneamiento de agua en sistemas de purificación, logrando con éxito inhibir la formación de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* hasta en un 60% utilizando concentraciones de plata de 10µg/mL, de dicha masa solamente el 50% de las bacterias sobreviven el tratamiento (Dror-Ehre et al, 2010).

La actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata se puede incrementar al conjugarlas con otros compuestos, como es el caso del Dodecil sulfato de sodio (SDS), ya que la actividad de las nanopartículas de plata en ensayos con *Pseudomonas aeruginosa* se empieza a presentar a concentraciones de 5µg/mL en preparaciones bacterianas de 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC) (Jyothi et al, 2009).

Todos los estudios sugieren que las nanopartículas de plata presentan actividad antimicrobiana, lo que es posible que también presenten actividad antifúngica y contra la formación de biofilmes, También es necesario continuar la investigación del mecanismo citotóxico de estas nanopartículas para poder explicar este proceso.

5.7 Nanopartículas de zinc

Recientemente, el óxido de zinc ha demostrado ser altamente atractivo debido a su sobresaliente aplicación en celdas solares, sensores, emisores de rayos UV, y muchas otras aplicaciones más. Las nanopartículas de zinc ofrecen ciertas ventajas sobre la plata, ya que es de un costo menor y por ser capaces de bloquear emisiones UV. Se ha investigado la actividad antimicrobica de las nanopartículas de zinc en telas de algodón expuestas al sudor. Ha mostrado tener durabilidad, aún en presencia de un 100% de humedad en las telas en condiciones alcalinas y ácidas. La actividad microbica es mayor al ser expuesta a la iluminación (Dastjerdi *et al*, 2010).

Se ha podido producir diferentes tipos de arreglos de nano-partículas, como por ejemplo nanotubos o nanocables, siendo los nanobastones los que tienen mejor adherencia por las telas (Dastjerdi *et al*, 2010). Sin embargo, aún queda mucho trabajo de investigación por realizar referente a la actividad microbica de las nanopartículas de zinc y plata y sus posibles usos en la industria y en la medicina (Dastjerdi *et al*, 2010).

5.7.1 Estudios toxicológicos con nanopartículas de zinc

El óxido de zinc es un aditivo común en los materiales de construcción y tiene usos cerámicos y aplicaciones como semiconductor o como pigmento. Se ha usado como óxido de zinc (en concentraciones de 20mg/L) en estudios de citotoxicidad contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens* (Jiang *et al*, 2009).

Estudios recientes muestran que el óxido de zinc podría ser utilizado como un potente fungicida de uso agrícola. La actividad antifúngica del óxido de zinc fue probada contra hongos patógenos de postcosecha *Botrytis cinérea* y *Penicillium expansum*. El tamaño de las moléculas de zinc varió de 70 a 15 nm y su actividad fue más efectiva a concentraciones mayores de 3 mmol/L.

Estos resultados sugieren que el óxido de zinc puede tener aplicaciones como fungicida de uso comercial (He *et al*, 2010). Otro uso industrial probable para el óxido de zinc, es como componente en formulaciones de pinturas de interiores, ya que ha demostrado ser un agente fotocatalítico en presencia de luz ultravioleta (UV) ya que posee un amplio espectro antimicrobiano en contra de bacterias relacionadas con su deterioro, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, y mostró actividad antifúngica contra *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum* (Hochmmanova *et al*, 2010).

Sin embargo aún queda mucho trabajo de investigación relacionado con la capacidad microbicida y antifúngica del óxido de zinc, así como los mecanismos por los cuales provoca la lisis celular.

6. Materiales y métodos

6.1 Obtención de nanopartículas

Las nanopartículas de plata y óxido de zinc utilizadas en este trabajo de tesis fueron amablemente proporcionadas por la compañía minera Peñoles (Torreón, Coahuila). Las soluciones de trabajo de nanopartículas fueron preparadas adicionando una cantidad conocida de polvo de AgNP a 50 mL de agua desionizada, la mezcla fue sonicada a temperatura ambiente hasta lograr su completa homogenización (10-30 minutos). Para evitar su oxidación, las mezclas fueron almacenadas a -20°C hasta su uso posterior.

6.1.1 Caracterización de las nanopartículas

Las partículas ZnONP y AgNP fueron caracterizadas en el centro de investigación de materiales avanzados (CIMAV) mediante microscopía electrónica de barrido JSM7401f para determinar tamaño y forma de las nanopartículas, y para determinar su composición química se utilizó el modo STEM del mismo equipo. También se determinó su composición por medio de patrones de difracción de rayos X fueron registrados con un difractómetro GBC-diffttech MMA (Dandenong, Australia) (Martínez-Gutiérrez *et al*, 2010).

6.2 Cultivos bacterianos

Se realizaron cultivos de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* y *C. eremophila*. Las cepas fueron obtenidas mediante el centro global de materiales biológicos ATCC. Las cepas bacterianas se mantuvieron en agar Mueller Hinton, mientras que *C. albicans* y *C. eremophila* se mantuvieron en agar Sabouraud. Los cultivos bacterianos y de *C. albicans* se incubaron a 37° C y 5% de CO₂ y 100 RPM por 24 horas en caldo nutritivo antes de su uso en los ensayos de viabilidad. El cultivo de *C. eremophila* se realizó a temperatura ambiente (24° C) durante nueve días antes de realizar los experimentos.

6.2.1 Ensayos de viabilidad

Éstos se llevaron a cabo en los laboratorios de nanotoxicología del CIMAV. En éstos se determinó la capacidad antibiótica de los nanomateriales al exponer a las diferentes cepas bacterianas a la presencia de ZnONP y AgNP. Se determinaron las UFC por medio de ensayos en placas de 96 pozos y en cajas Petri con agar sólido, el porcentaje de inhibición se obtuvo por conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

Para los ensayos de viabilidad se utilizaron medios mínimos enriquecidos con extracto de levadura, vitaminas y minerales (elementos traza). Para las bacterias se utilizó medio de cultivo M9, mientras que para las levaduras se utilizó medio de cultivo Lee. Ambos medios se utilizaron en su versión líquida y sólida de acuerdo a las necesidades de los ensayos. La formulación es la siguiente:

Medio mínimo M9:

Para preparar una alícuota de sales M9 en 800 mL de agua se adicionó:

- 64g Na₂HPO₄·7H₂O
- 15g KH₂PO₄
- 2.5g NaCl
- 5.0g NH₄Cl

Se mezcló hasta disolver y se ajustó a 1000 mL con agua destilada, posteriormente se esterilizó en el autoclave (15 minutos a 15 libras de presión).

Para preparar la solución de trabajo se midieron 700 mL de agua destilada estéril y se adicionaron 200 mL de sales M9. Posteriormente se agregan soluciones estériles de 2 mL de MgSO₄ 1M, 20 mL de glucosa al 20% (o alguna otra fuente de carbón), 100 mL de CaCl₂ 1M y se ajustó a 1000 mL con agua destilada.

Medio mínimo Lee:

Para preparar un litro de solución de medio mínimo Lee se adicionaron los siguientes componentes a 1000 mL de agua destilada:

- KH₂PO₄ 0.25%
- MgSO₄ 0.20%
- (NH₄)₂SO₄ 0.5%
- NaCl 0.5%

La mezcla se esterilizó en el autoclave (15 minutos a 15 libras de presión) y posteriormente se adicionó dextrosa al 0.25% (estéril) como fuente de carbohidratos. Ambos medios mínimos fueron posteriormente adicionados con una solución de vitaminas (ATCC) y de elementos traza (ATCC) para complementar los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos.

6.2.1.1 Preparación de muestras para los ensayos de viabilidad.

Se prepararon soluciones de 1×10^8 bacterias/ml utilizando caldo nutritivo (Sigma). Para preparar soluciones de 1×10^8 levaduras/ml se utilizó caldo Sabouroud. El ajuste de las concentraciones bacterianas y de *C. albicans* se realizaron mediante medición de densidad óptica (D.O.) utilizando un espectrofotómetro, y utilizando una longitud de onda de 600nm para las bacterias y 560nm para las levaduras, ajustando la lectura a un valor de 0,1 D.O.

El desarrollo de micelios de *Coniophora sp.* se realizó en placas agar Sabouraud de donde se tomaron las muestras necesarias para los ensayos.

6.3 Ensayos de inhibición *in vitro*

6.3.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los tratamientos con ZnONP y AgNP contra *P. aeruginosa* y *S. aureus* y *C. albicans* en medio de cultivo líquido.

Para estos ensayos se utilizó un amplio rango de concentraciones de ambos tratamientos con nanopartículas y se realizaron en placas de 96 pozos estériles con fondo plano y tapa. Se colocaron 50 μL de medio de cultivo mínimo previamente enriquecido en concentración 4X en cada uno de los pozos de tratamientos y controles.

En base a esto se adicionó agua destilada estéril y solución de nanopartículas, los volúmenes se ajustaron de acuerdo a la concentración deseada de tratamientos. Finalmente se adicionaron 20 μL de la solución de microorganismos previamente ajustada a una concentración de 1×10^8 m.o/mL para lograr un volumen total de 200 μL en cada uno de los pozos. Como controles negativos se utilizaron 3 pozos en los cuales no se adicionaron tratamientos. Los controles positivos fueron adicionados con 5 $\mu\text{g/mL}$ de Gentamicina para *S. aureus* y *P. aeruginosa*, mientras que para *C. albicans* se utilizaron 0,2 mg/mL de Anfotericina B. Como control de esterilidad se utilizaron pozos con medio de cultivo sin inóculo. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se consideró que la CMI era la concentración a la cual no se observó crecimiento de los microorganismos.

6.3.2 Determinación de la concentración mínima bactericida (MIB) y dosis letal 50 DL₅₀ de los tratamientos de ZnONP y AgNP contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* en medio líquido.

A partir de las placas de 96 pozos utilizadas para la determinación de CMI se obtuvieron las muestras para determinar la CMB y DL₅₀. Para determinar la CMB se utilizó el contenido de los pozos con tratamientos de nanopartículas que no mostraron crecimiento de microorganismos y se colocaron sobre una placa de agar Muller Hilton.

Se utilizó un asa de dispersión bacteriológica para distribuir completamente el contenido del pozo y se dejó secar, después se incubaron los agares a 37°C durante 24 horas. Se consideró como CMB aquella concentración de nanopartículas en la cual no se observó crecimiento de colonias bacterianas.

Para la determinación de la DL50 se utilizaron pozos con concentraciones menores a la CMI y los controles negativos. A partir de éstas se realizaron diluciones seriadas 1:10 en tubos Eppendorff estériles de 1,5 mL. Todos los tubos se homogenizaron durante 20 segundos utilizando un vórtex y se colocaron en agar Muller Hinton tres muestras de 10 µL de cada uno de los tubos de acuerdo a la metodología de conteo de UFC por método en gota (Herigstad, *et al* 2001) y se incubaron a 37°C por 24 horas. Se realizó el conteo de colonias y se compararon con el control sin tratamientos. Se descartaron todas las diluciones en las cuales se contaron más de 30 colonias por gota. Se designó como DL50 a todas las concentraciones de nanopartículas en las cuales el crecimiento de microorganismos fue 50% menor en comparación al control.

6.3.3 Determinación de MIC de ZnONPy AgNP contra *P. aeruginosa*, *S. aureus*, y *C. albicans* en medio de cultivo sólido.

Para estos ensayos se utilizó medio de cultivo mínimo enriquecido solidificado con agarosa. Los tratamientos, previamente ajustados a las concentraciones deseadas, se adicionaron y homogenizaron a los medios antes de su solidificación. Los controles negativos se prepararon en ausencia de tratamientos. Todas las cajas Petri se dejaron incubar a 37°C por 24 horas para comprobar su esterilidad. Se colocaron 200 µL de solución bacteriana con una concentración de 1000 UFC/mL, lo que equivale a una cantidad de 200 UFC en cada placa de agar. Después de una incubación a 37°C por 24 horas se procedió a contar las UFC de todas las placas y se compararon con los controles.

6.3.4 Determinación de la MIC de ZnONP y AgNP contra *C. eremophila* por medición de crecimiento radial.

Los ensayos de viabilidad de *C. eremophila* se realizaron en cajas Petri con medio de cultivo mínimo enriquecido Lee, a los cuales se les adicionaron tratamientos de ZnONP y AgNP a diferentes concentraciones, un control negativo sin tratamientos y un control positivo de Anfotericina B a una concentración de 2 µg/mL. Las inoculaciones de *C. eremophila* se realizaron colocando en todos los agares un inóculo de 0.25cm² obtenido a partir de un cultivo fresco. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente por 9 días. El crecimiento radial fue medido cada tercer día durante todo el período de incubación. Cada experimento se realizó por triplicado (Ávila-Sosa *et al*, 2010; Portillo-Ruiz *et al*, 2005).

6.4 Identificación del mecanismo inhibitorio

Para determinar el mecanismo por el cual las nanopartículas de plata y óxido de zinc causan daño a la célula bacteriana se utilizaron diversos métodos. Para determinar si existe fraccionamiento del ADN se utilizó la electroforesis en geles de agarosa al 1%, para detectar daños en la estructura de las células se utilizó la microscopía electrónica de barrido y de transmisión, y para determinar inhibición del sistema enzimático de la célula se determinó la pérdida de capacidad funcional de las enzimas de origen comercial deshidrogenasa láctica y lipasa.

6.4.1 Determinación de daño al material genético

Para determinar el daño generado al ADN se realizaron ensayos en volúmenes de 50 mL de medio mínimo, con el objetivo de obtener suficiente biomasa. Se incubaron inóculos de 1x10⁷ m.o./mL en presencia de los tratamientos con nanopartículas durante 24 horas a 37°C y 200 RPM. Se trabajó con una concentración de 4 µg/mL de AgNP y 100 µg/mL de ZnONP para *P. aeruginosa* y *S. aureus*. En el caso de *C. albicans* se trabajó con 100 µg/mL de ambas nanopartículas.

Terminada la incubación, se recuperó 1,5 mL del medio y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se trabajó con el precipitado para la extracción del ADN (Wizard genomics)

(Matallana-Surget et al, 2010), y el fraccionamiento al ADN se observó por medio de geles de agarosa al 1% y bromuro de etidio (0,1 mg/mL), como buffer de corrida se utilizó el buffer TAE (40mM TRIS-Acetato y 1mM de EDTA), y se realizó la electroforesis durante 30 minutos. Se consideró la aparición de fracciones de ADN de menor peso molecular como indicador del daño al material genético y se comparó con microorganismos no expuestos a los tratamientos con nanopartículas (Enzmann et al, 1999).

6.4.2 Determinación del daño estructural de la pared y la membrana celular

6.4.2.1 Preparación de muestras para microscopía electrónica de transferencia

Para obtener la cantidad de muestra suficiente se realizaron ensayos en presencia y ausencia de los tratamientos en volúmenes de 50 mL en matraces Erlenmeyer de 250 mL. En el caso del hongo filamentoso, se tomaron muestras del ensayo en medio sólido con un sacabocados y se depositaron en un tubo Eppendorf. A todas las muestras se les adicionó un mililitro de glutaraldeido al 2,5%, se homogenizaron y se dejaron reposar por dos horas para los microorganismos y cuatro horas para el hongo filamentoso. Se centrifugaron los tubos y se eliminó el glutaraldeido con dos lavados de buffer de cacodilatos al 0,1M.

En este paso la muestra se puede almacenar a 40C para su posterior uso. Dentro de la campana de extracción se adicionaron 0,3 ml de tetraóxido de osmio al 1% a cada una de las muestras y se dejaron incubar por 1 hora para las muestras de microorganismos y 2 horas para la muestra de hongos filamentosos. Se centrifugaron las muestras y eliminó el sobrenadante, se realizó un lavado con buffer de cacodilatos.

A continuación se procedió a realizar la deshidratación de la muestra usando alcoholes a diferentes graduaciones y acetona pura. El proceso se realizó exponiendo la muestra durante 15 minutos en cada solución, cuyas concentraciones fueron las siguientes: 70%, 85%, 95% y alcohol absoluto, finalmente las muestras fueron expuestas durante 15 minutos a acetona sin diluir.

Una vez deshidratadas las muestras se pasaron a una cápsula de microscopía y se adicionó una mezcla que contenía 50% de resina y 50% de acetona, lo cual se dejó reposar por 24 horas a temperatura ambiente. Terminada la incubación, se centrifugaron las muestras y se eliminó el sobrenadante. Después se llenaron las cápsulas con resina y se dejaron curar a 60°C por 48 horas, lo cual provoca la solidificación de la resina. A partir de este punto la muestra fue llevada a procesar al micrótopo y posteriormente fue observada en un microscopio electrónico de transmisión Phillips CM200 (Amézaga-Madrid et al, 2002, 2003).

6.4.2.2 Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido

Al igual que las muestras de la metodología anterior, por medio de la centrifugación se obtuvieron botones de células expuestas a tratamientos. En el caso del hongo filamentoso, se tomaron muestras del ensayo en medio sólido con un sacabocados y se depositaron en un tubo Eppendorf. Se adicionó un mililitro de glutaraldeido al 2,5% en el cual se procedió a homogenizar la muestra y se dejó reposar por una hora. Se centrifugaron los tubos y se eliminó el glutaraldeido. Se realizaron dos lavados con buffer de cacodilatos al 0,1M a 4000 RPM durante 5 minutos y se procedió a deshidratar la muestra.

Dicha deshidratación es similar a la utilizada para muestras de microscopía de transmisión, sin embargo en este caso no se utiliza acetona. El proceso se realizó exponiendo la muestra durante 15 minutos en cada concentración gradual de alcohol, las concentraciones utilizadas fueron: 70%, 85%, 95% y alcohol absoluto.

La muestra se resuspendió en el alcohol absoluto y fue colocada en un papel filtro, el cual se dobló y se grapó para no permitir la pérdida de las células. Los papeles filtro fueron colocados entonces en la cámara del equipo de secado a punto crítico de CO₂, la cual se habían colocado previamente diez mililitros de alcohol absoluto.

Se procedió a cerrar la cámara e iniciar el secado, exponiendo las muestras a CO₂ líquido y permitiendo su salida purgando el alcohol y el agua contenida en las células. Una vez que la cámara se llenó, se procedió a subir la

temperatura a 31°C y la presión a 110 atm. Las muestras se colocan entonces en un portamuestras con adhesivo y reciben un baño de oro antes de proceder a observarlas en el microscopio electrónico.

6.4.2.3 Observación mediante microscopía electrónica de barrido de biopelículas generadas por microorganismos patógenos expuestos a AgNP

Se observó que en varios de los cultivos en matraces Herlenmeyer para microscopía electrónica los microorganismos formaron una biopelícula que captaba AgNP, aislándolas del medio y permitiendo el desarrollo de los microorganismos patógenos. Debido a que esto podría ser un mecanismo de defensa por parte de las bacterias, se decidió observar dichas biopelículas y comprobar la composición de los cúmulos contenidos en ellas. Por medio del modo STEM del microscopio electrónico de transmisión se analizaron dichas muestras para comprobar su composición química.

6.5 Medición de la actividad enzimática

Los ensayos de actividad enzimática solamente se llevaron a cabo con AgNP, ya que las ZnONP no mostraron una importante actividad inhibitoria en contra los microorganismos estudiados.

6.5.1 Actividad de la lipasa expuesta a AgNP por medio de un método colorimétrico comercial

Para medir la inhibición de la actividad enzimática de la lipasa en presencia de tratamientos de nanopartículas se utilizó el reactivo marca Randox, el cuales un método colorimétrico para la medición de triglicéridos mediante la medición de la absorbancia de los productos de las reacciones enzimáticas de la lipasa y la peroxidasa. Es in método indirecto que se basa en el cálculo de glicerol libre para la determinación de triglicéridos.

Principio:

Triglicéridos + H₂O (lipasa) → glicerol + ácidos grasos

Glicerol + ATP (GK) → glicerol-3-fosfato + ADP

Glicerol-3-fosfato + O₂ (GPO) → dihidroxiacetona fosfato + H₂O₂

2H₂O₂ + 4-aminoantipirina + 4 clorofenol (POD) → quinoneimina + HCL + 4H₂O

Componentes Concentraciones en la Prueba:

Reactivo 1 (Tampón): Tampón Pipes 40 mmol/l, pH 7,4, 4-clorofenol 5,4 mmol/l, Iones de magnesio 5,0 mmol/l, ATP 1,0 mmol/l, Peroxidasa ≥0,5 U/ml, [EC 1.11.1.7; Rábano, 25°C], Glicerolquinasa ≥0,4 U/ml, [EC 2.7.1.30; Microbial, 25°C], Glicerol-3-fosfato oxidasa ≥1,5 U/ml, [EC 1.1.3.21; Microbial, 25°C], Acida Sódica 0,05 %.

Reactivo 2 (Enzima): 4-aminoantipirina 0,4 mmol/l, Lipasas [EC 3.1.1.3; Microbial, 25°C] ≥150 U/ml, Azida Sódica 0,05 %.

Reactivo 3 (Patrón): 2,29 mmol/l (200 mg/dl).

6.5.2 Actividad de la lipasa contenida en lisados bacterianos y expuesta a AgNP por medio de la medición del pH

De manera complementaria se realizaron ensayos en los cuales se lisaron células de *P. aeruginosa*. Las muestras consistieron en soluciones bacterianas de 1 mL que fueron expuestas a 25 mL de cloroformo. La solución se agitó vigorosamente durante 15 minutos.

La solución de sustrato se preparó al colocar 5 mL de sustrato de lipasa (Sigma Chemical Co., USA) y 10 mL de solución Buffer Tris HCL (pH 7.2) en matraces Erlenmeyer de 50 mL. Las AgNP fueron adicionadas en los frascos control y de prueba (Concentración final de 5 µg/mL) por triplicado y se mantuvieron en agitación magnética hasta la realización del ensayo. Para medir la actividad catalítica de la lipasa se adicionaron alícuotas de 1 mL de lisado de *P. aeruginosa* a todos los matraces. Se utilizó una muestra de cada matraz para medir la actividad enzimática a diferentes tiempos (10, 20 y 30 min.). Para

detener la reacción enzimática se adicionaron 10 mL de acetona a la mezcla. Entonces se procedió a medir el pH utilizando un pHmetro automático (Thermo scientific Irion 2-star plus).

La actividad de la lipasa, al liberar ácidos grasos acidifica ligeramente el medio, por lo que una baja en el valor de pH se consideró como evidencia de que la enzima no está siendo inhibida, mientras que un valor constante de pH nos indica que la actividad enzimática no se está llevando a cabo. Este método es una variante de la técnica reportada por Tembucar (Tembucar *et al*, 2012).

7. Resultados

7.1 Caracterización de las nanopartículas

El tamaño y forma de las nanopartículas se determinó por medio de la microscopía electrónica de barrido y pudimos confirmar que las nanopartículas están compuestas por plata y óxido de zinc, además de que se pudieron observar las distintas formas geométricas que las componen, gracias a la microscopía electrónica de barrido (Figura 1). También se pudo analizar su composición química gracias al análisis en difracción de rayos X, confirmando la fase cristalina de las nanopartículas (cúbica para AgNP y hexagonal para el ZnONP) (Martínez-Gutiérrez *et al*, 2010).

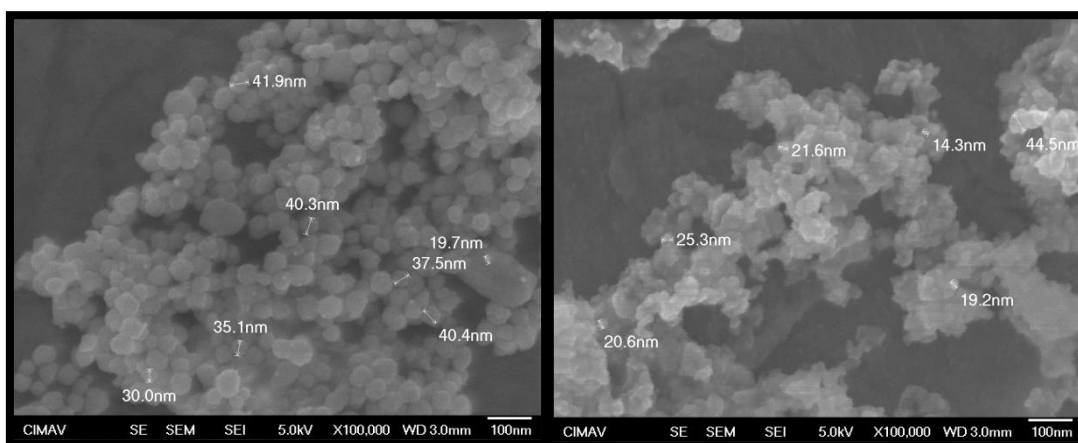


Figura 1.- Microscopía electrónica de barrido, en la cual se observa A) Nanopartículas de plata a una resolución de 100KX, con un rango de tamaño de 19.7 a 41.9 nm. B) Nanopartículas de Óxido de Zinc, con un rango de tamaño de 14.3 a 44.5 nm.

7.2 Ensayos de viabilidad in vitro

En la tabla 1 podemos apreciar los valores determinados en ensayos en placas de 96 pozos con medio mínimo M9:

Microorganismo	MIC de AgNP en medio acuoso	MIC de AgNP en medio sólido	MIC de ZnONP en medio acuoso	MIC de ZnONP en medio sólido
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MIC 7,0 µg/mL	MIC 1,0 µg/mL	No se observa inhibición	No se observa inhibición
<i>Staphylococcus aureus</i>	MIC 5,5 µg/mL	MIC 2,0 µg/mL	No se observa inhibición	No se observa inhibición

Tabla 1.- Comparación entre las MIC de las nanopartículas en ensayos realizados en medio líquido y medio sólido contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

En las Figuras 2 y 3 se muestran los valores de viabilidad determinados en ensayos en medio sólido en placas de 96 pozos con medio mínimo Lee para *C. albicans* y *C. eremophila* respectivamente, en presencia de los tratamientos de plata y óxido de zinc:

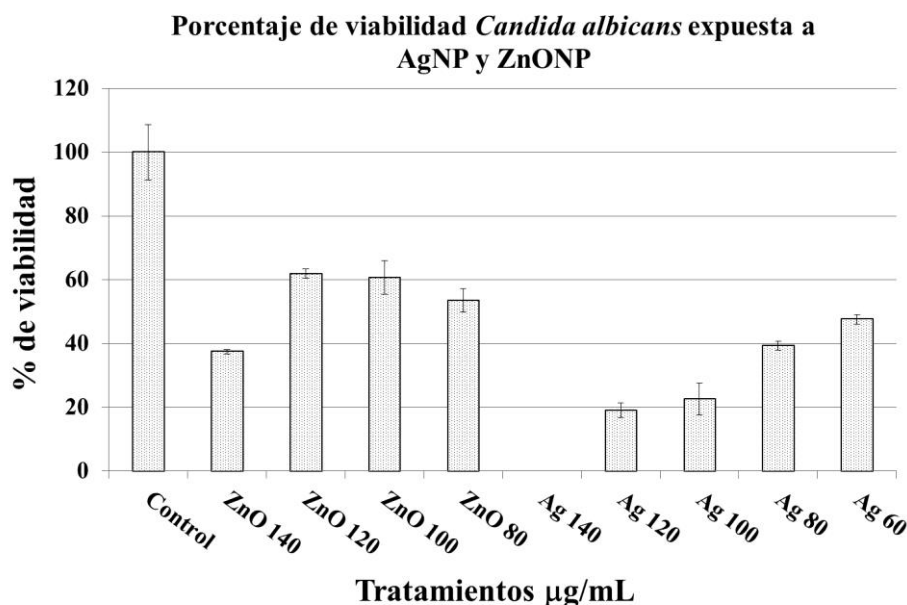


Figura 2.- Porcentaje de viabilidad y citotoxicidad de *Candida albicans* ATCC 102312 en presencia de nanopartículas de plata y óxido de zinc en medio sólido.

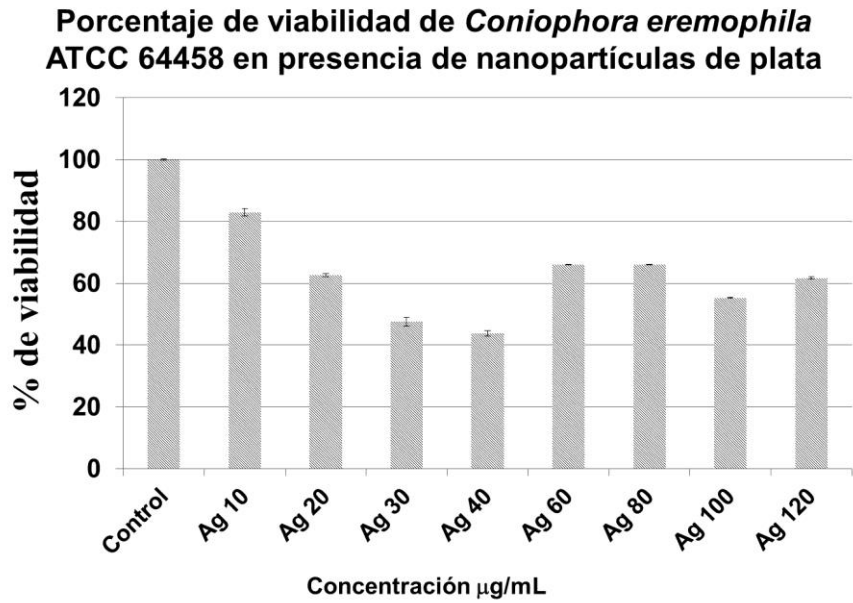


Figura 3.- Porcentaje de viabilidad y citotoxicidad de *Coniophora eremophila* ATCC 64458 en presencia de nanopartículas de plata proporcionadas por Peñoles

7.3 Determinación de daño al material genético

En la figura 4 se muestran los resultados de la electroforesis en geles de agarosa del material genético de los diferentes microorganismos (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* y *C. eremophila*) después de ser expuestos a los tratamientos con nanopartículas de plata y óxido de zinc.

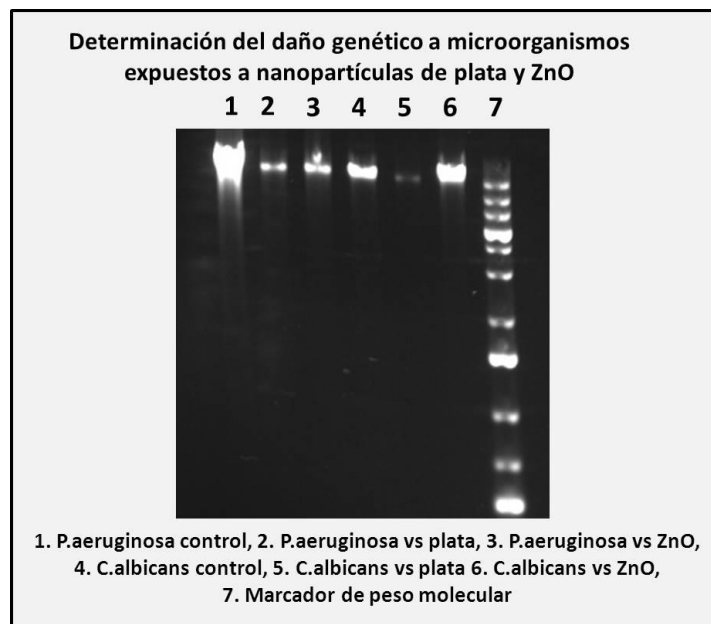


Figura 4.- Determinación del daño al material genético de los microorganismos expuestos a nanopartículas de plata y óxido de zinc por medio de la electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio.

7.4 Daño estructural de las paredes y membranas celulares

7.4.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Por medio de análisis SEM se analizaron muestras de los diferentes microorganismos de acuerdo a lo explicado en la metodología.

7.4.1.1 Micrografías de *P. aeruginosa* expuesta a tratamientos de AgNP

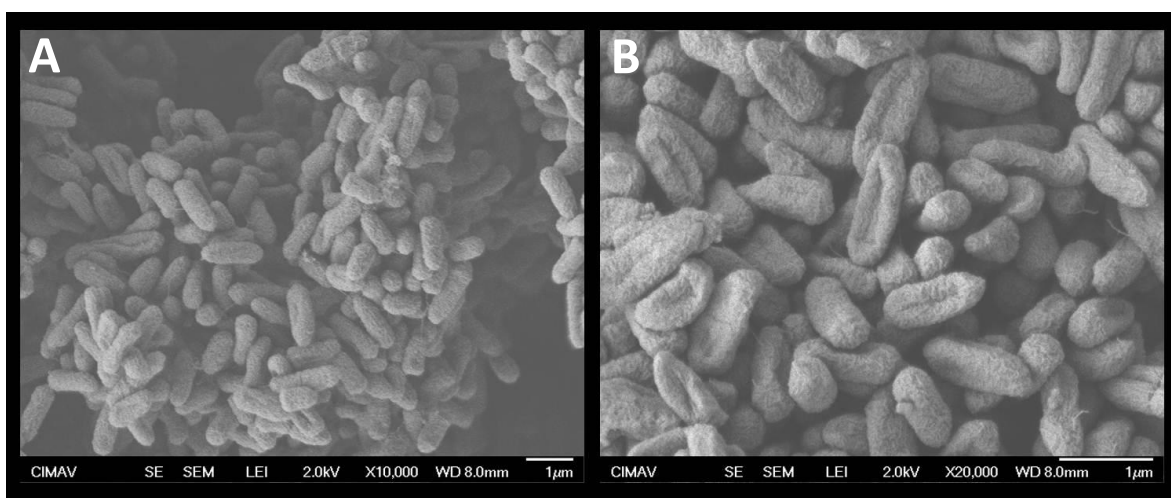


Figura 5.- Comparación entre una muestra de *P.aeruginosa* control (A) y una muestra expuesta a nanopartículas de plata (B). Las invaginaciones en la membrana son más obvias en las células expuestas a AgNP, sin embargo los tratamientos con ZnONP no mostraron diferencias con respecto al control sin tratamiento (resultados no mostrados).

7.4.1.2 Micrografías de *S.aureus* expuesto a tratamientos de AgNP

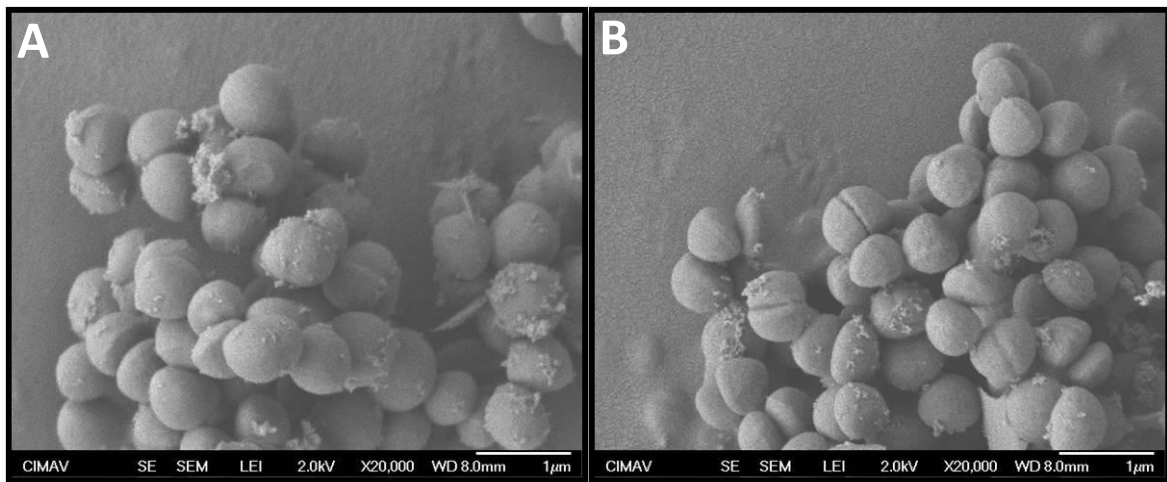


Figura 6.- Microscopía electrónica de transmisión de las muestras de *S. aureus* control (A), expuestas a AgNP (B) y a ZnONP (C). Como puede observarse en las imágenes, no hay diferencia en la estructura de los tres grupos de bacterias.

7.4.1.3 Micrografías de *C. albicans* expuesta a los tratamientos con AgNP y ZnONP

En la Figura 7 podemos comparar el resultado de la exposición de *C.albicans* (7A) a los tratamientos con AgNP (7B) y ZnONP (7C).

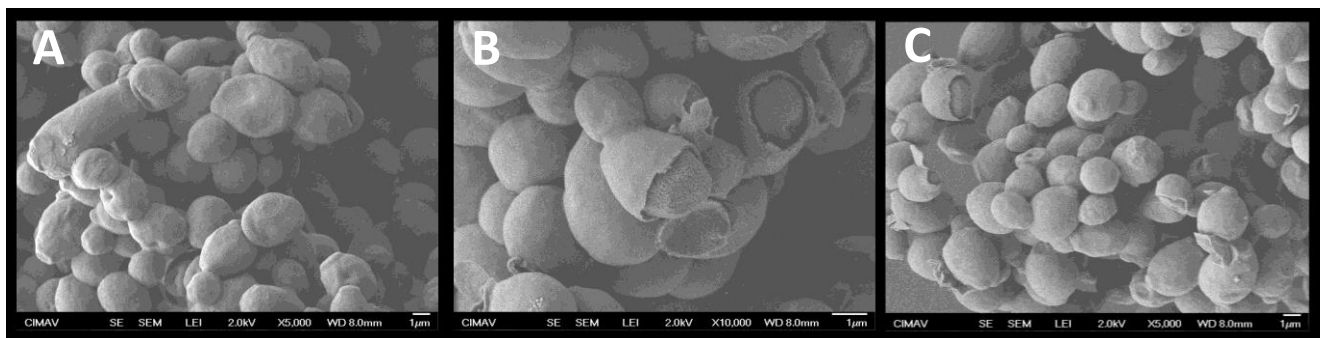


Figura 7.- Comparación entre una muestra de *C.albicans* control (A) y una muestra expuesta a nanopartículas de plata (B) y de ZnONP (C). Tanto en B, como en C se puede observar el daño extenso en la pared celular de las levaduras.

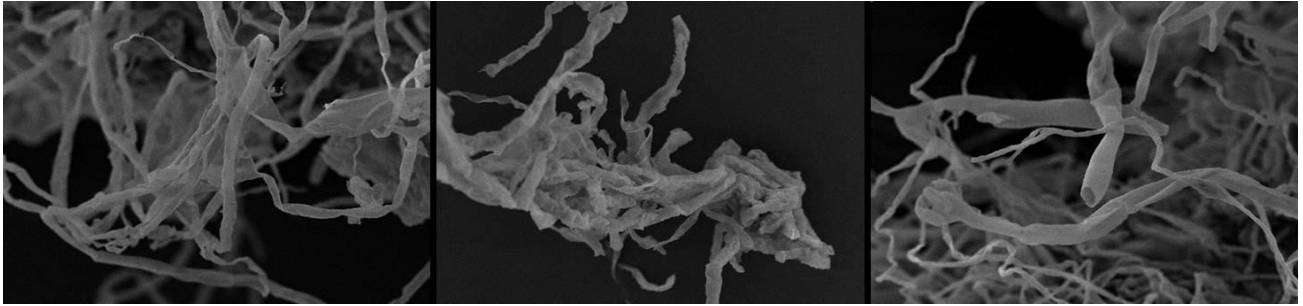


Figura 8.- Microscopía electrónica de transmisión de las muestras de *C. eremophila* control (A), expuestas a AgNP (B) y a ZnONP (C). En ninguno de los tratamientos se observan alteraciones a la estructura de las células fúngicas.

7.4.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La presencia de NPs en el citoplasma de las bacterias no fue evidente, sin embargo, como se mencionó antes, esto se debe a que el diámetro de las NP usada es más grande. Sin embargo el análisis elemental mostró pequeñas cantidades de plata dentro de las células (0.75% de peso). Esto puede ser explicado por la liberación de iones por parte de las NP, ya que se piensa que es el mecanismo por el cual son capaces de causar inhibición en los diferentes tipos de células.

En *C. albicans*, a pesar de haber mostrado resistencia a la inhibición por AgNPs podemos observar la presencia de dichas partículas en su citoplasma (Figura 9), lo cual puede explicarse también con el tamaño de las NP, ya que se ha reportado que las células eucariotas son más sensibles a las de diámetro mayor, mientras que las bacterias son más sensibles a las NP de diámetros del rango de los 10 nm.

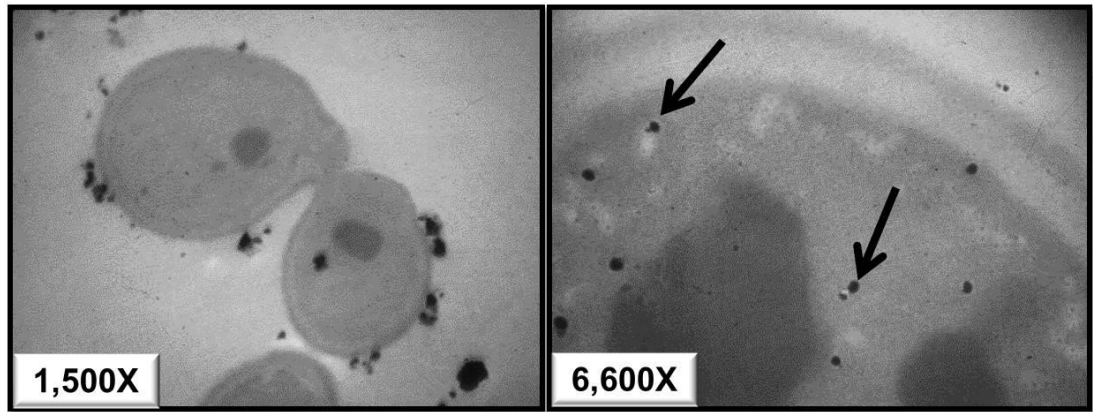


Figura 9.- Internalización de AgNP en el citoplasma de *C. albicans*. A) Las nanopartículas rodean las células en el exterior de su pared. B) Dentro del citoplasma se pueden observar las AgNP, a pesar de que no lograron inhibir completamente el crecimiento de las levaduras.

7.4.3 Análisis de biopelículas por medio de la microscopía electrónica de barrido

Durante los ensayos con mayor volumen de medio acuoso se observó que las bacterias producían una biopelícula que capturaba a las NPs, por lo que se decidió analizar dicho material para confirmar si este material biológico contenía restos de los metales. Para esto se llevaron a cabo análisis SEM acoplados con EDS para estudiar cúmulos de color oscuro que se sospechaba que eran las AgNPs atrapadas en un material secretado por los microorganismos (Figura 10). El análisis elemental (Figura 10B) confirmó la presencia de AgNP capturado en un compuesto a base de carbono, presumiblemente orgánico.

La presencia de la biopelícula reduce la exposición de los microorganismos a las NPs, lo que se correlaciona con una CMI más elevada en medios líquidos. La secreción de exopolisacáridos es un mecanismo bien conocido de defensa de los microorganismos en contra del medio ambiente y los agentes químicos, incluidos los antibióticos (Flores *et al*, 2016; Thomas *et al*, 2016).

7.5 Medición de la actividad enzimática

7.4.2 Medición de la actividad enzimática de lipasa y DHL comerciales por medio de una técnica colorimétrica

Debido a que la interacción de los iones metálicos con las enzimas es un posible mecanismo de inhibición por parte de AgNP se llevaron a cabo ensayos en los cuales se expusieron diferentes enzimas constitutivas tanto a las NPs como al AgNO_3 , como se explica en la metodología.

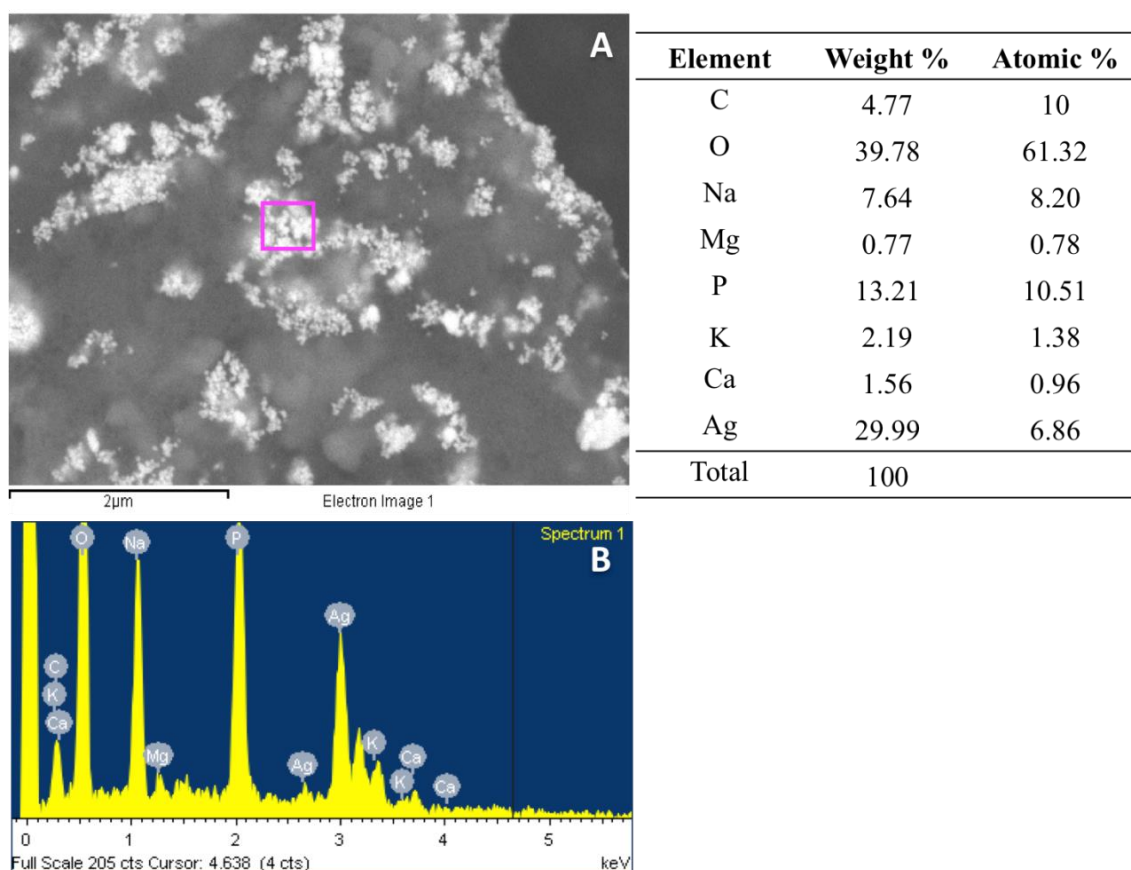


Figura 10. Análisis SEM de los exopolisacáridos obtenidos después de exponer a *S. aureus* a AgNP. A) muestra la micrografía de la biopelícula producida por las bacterias después de la exposición al tratamiento. B) muestra el análisis elemental que confirma la composición del material capturado en la biopelícula.

En la figura 11A se muestra la reducción de la actividad de la muestra de lipasa comercial, en la cual se confirma que los iones de plata tienen mayor poder inhibitorio que las AgNP en sí. Se sabe que las AgNP pierden aproximadamente del 10 al 30% de su volumen en forma de Ag^+ , y dichos iones son los que interactúan con las enzimas, interrumpiendo procesos como

la formación de paredes celulares o la actividad metabólica de las células (Cong *et al*, 2011). La inhibición de la Lipasa (Figura 11B) confirma la actividad no discriminativa de los iones de interactuar con cualquier enzima, ya que su composición química es similar.

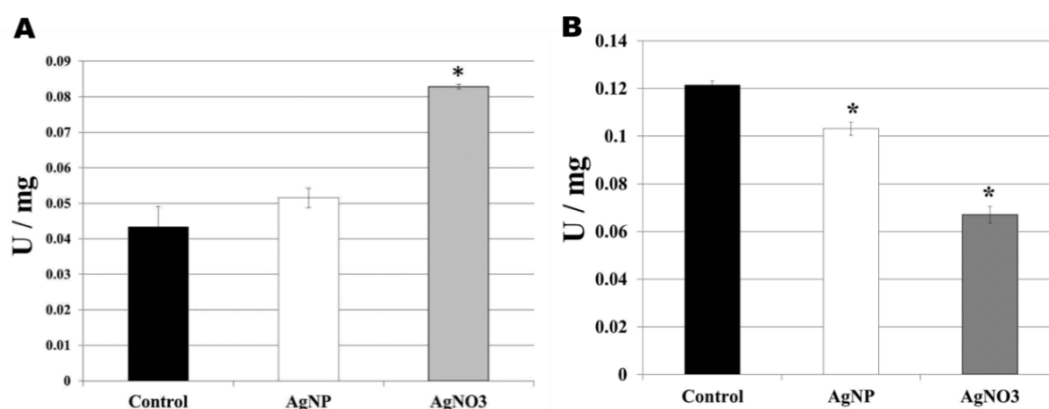


Figura 11. Actividad enzimática de la dehidrogenasa láctica y la lipasa expuestas a AgNP y AgNO₃. A) muestra la actividad de DHL y B) de la lipasa, las cuales fueron determinadas por métodos colorimétricos con medición de densidad óptica (D.O.). En ambos casos se puede observar que el control no tratado presenta una actividad mayor que sus contrapartes expuestas a la plata. Sin embargo, AgNO₃ presenta una mayor actividad inhibitoria en contra de las dos enzimas.* p < 0.05.

Para confirmar la actividad inhibitoria en enzimas bacterianas se decidió probar con lisados celulares de *P. aeruginosa*, sin embargo el método de medición fue por medio de la medición de pH. En este caso también se observó que AgNP es capaz de reducir la actividad enzimática de la lipasa, y la inhibición incrementa con el tiempo de exposición (Figura 12).

Debido a que se tienen referencias por predicciones en programas de simulación de reacciones químicas, es posible que la plata se una a los puentes disulfuro de las enzimas, provocando cambios en su conformación tridimensional, lo que explicaría su actividad inhibitoria y su poca selectividad a la hora de unirse a las enzimas.

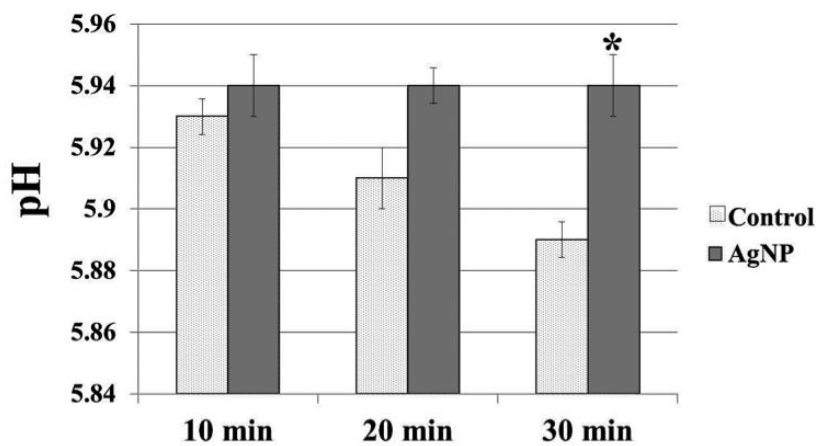


Figura 12. La medición de los valores de pH de los lisados de *P. aeruginosa* expuesta a AgNPs. Como se explica en materiales y métodos, las variaciones de pH indican que el lisado expuesto a las AgNPs durante 30 minutos presenta una disminución estadísticamente significativa de la actividad de la lipasa. * $p < 0.05$.

Para demostrar esto se realizaron ensayos en los cuales se colocaron proteínas (inmunoglobulinas) (Figura 13) y péptidos (insulina) (Figura 14) conformadas por dos o más cadenas unidas por puentes disulfuro, se expusieron a las nanopartículas de plata, y se realizarán electroforesis en geles de poliacrilamida con la técnica PAGE nativa para observar si hay separación de las subunidades de dichos compuestos.

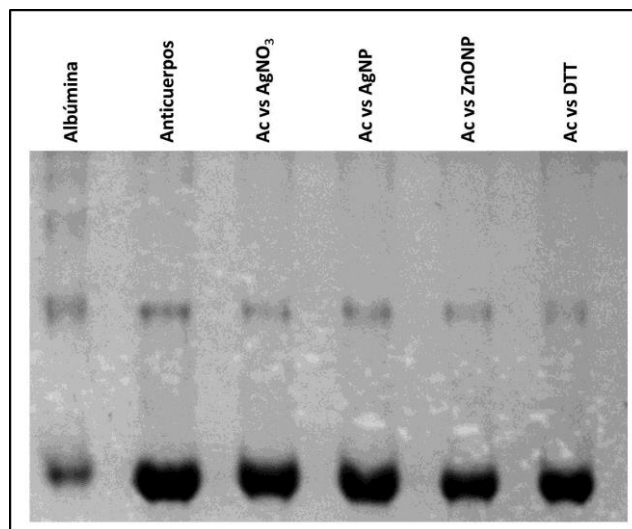


Figura 13.- Gel de poliacrilamida de una muestra de anticuerpos monoclonales de conejo anti IgA, en los cuales no se observa fraccionamiento de las proteínas.

Contrario a lo esperado, no hubo fraccionamiento de las cadenas de anticuerpos, ya que no hay diferencia entre el control sin tratamiento (carril 2) con el resto de las muestras tratadas. En el ensayo con Insulina comercial se obtuvo un resultado similar, en el cual no se logró observar ningún tipo de fraccionamiento de las cadenas de péptidos, expuestas a AgNP y AgNO₃ a 37°C.

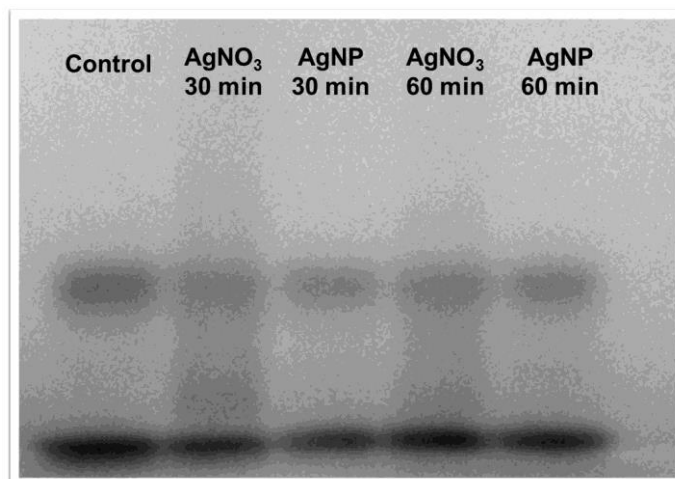


Figura 14.- Gel de poliacrilamida de una muestra de insulina humana comercial, en los cuales no se observa rompimiento de los puentes disulfuro.

Estos resultados nos indican que la interacción de los iones de plata no se llevan a cabo con los grupos tiol de las cisteínas que conforman los puentes disulfuro, o que al menos no son interacciones lo suficientemente fuertes para romper dicho tipo de enlace. Presumiblemente las interacciones se llevan a cabo con algún otro grupo funcional, se recomienda realizar estudios para determinar si en realidad son las atracciones electroestáticas que se ven afectadas por la presencia de la plata.

8. Discusiones:

8.1 Ensayos de viabilidad *in vitro*.

8.1.1 Citotoxicidad de las nanopartículas de plata proporcionadas por Peñoles en medio líquido contra *S. aureus* ATCC 29213 y *P. aeruginosa* ATCC 15442.

Las nanopartículas de plata fueron las únicas que presentaron actividad inhibitoria contra las bacterias, especialmente en medio sólido, ya que las MIC

fueron mucho menores que las observadas en medio líquido. Mientras que el óxido de zinc no mostró ningún tipo de inhibición en medios líquidos o sólidos.

8.1.2 Citotoxicidad de las nanopartículas de plata y óxido de zinc en medio sólido contra *Candida albicans* ATCC 10231

Las nanopartículas de plata inhibieron el crecimiento de la levadura en su totalidad a una concentración de 140µg/mL en medio sólido, lo cual confirma que la precipitación de nanopartículas disminuye en gran medida la actividad inhibitoria, ya que en medio líquido la misma concentración de nanopartículas se consideraba como DL50. En medio sólido también la DL50 requirió de menos cantidad de nanopartículas, siendo su valor final de 60µg/mL (Figura 1). En el caso de las nanopartículas de ZnO, se logró una inhibición del 62,5% utilizando una concentración de 140µg/mL, y una DL50 de 80µg/mL (Figura 2).

Todo esto concuerda con los estudios realizados por Zhaoxia en el 2010, quien propone que en medio líquido, las nanopartículas tienden a aglomerarse, lo que afecta negativamente su actividad inhibitoria. También es congruente con lo propuesto por Liu en el 2009, quien menciona que en medio sólido se puede evitar la disminución de dicha actividad, ya que las nanopartículas se mantienen dispersas.

8.1.3 Citotoxicidad de las nanopartículas de plata contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 en medio M9 sólido

En el caso de las nanopartículas de plata a bajas concentraciones observamos que la inhibición en medio sólido permanece en rangos de CMI similares, ya que los tratamientos presentaron inhibición a las mismas concentraciones (1-2µg/mL) (Tabla 1). Esto es debido a que bajas concentraciones de nanopartículas en medio líquido no provoca precipitaciones a corto plazo, por lo que el poder inhibitorio permanece intacto, esto es claro en medio de cultivo con baja concentración de sales y proteínas (Zhaoxia et al 2010).

8.1.4 Citotoxicidad de las nanopartículas de plata contra *Coniophora eremophila* ATCC 64458 por medio de crecimiento radial en placas de agar Lee

Al igual que en los ensayos realizados contra bacterias, las muestras de Peñoles mostraron un comportamiento diferente. A pesar de que las CMI y la DL50 aumentaron, la reproducibilidad del experimento otorga más confianza sobre estos nuevos resultados, ya que la variación de concentraciones de nanopartículas de plata es mucho menor. Se observó a una concentración de 30µg/mL obtenemos la DL50 (Figura 3).

Sin embargo al momento de escribir el presente reporte está en proceso el ensayo en que se utilizaron concentraciones mayores de nanopartículas (50, 60, 80 y 100 µg/mL), pero dadas las tendencias observadas, es probable que se determine la CMI a dichas concentraciones.

8.2 Determinación de daño al material genético

No se detectó fraccionamiento del material genético de los microorganismos (*P. aeruginosa*, *S. aureus* y *C. albicans*) por medio de la técnica de gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (Figura 4), sin embargo esto no es prueba definitiva de que los iones metálicos no interactúen con el material genético de las células expuestas a los tratamientos con AgNP y ZnONP, y debido a la naturaleza química del ADN, es muy probable que los iones positivos de la plata interactúen con los iones fosfato de los puentes fosfodiéster que unen a las ribosas de los diferentes ácidos nucleicos. También es posible una interacción con las bases nitrogenadas, especialmente con los átomos de oxígeno que forman parte de los puentes de hidrógeno que unen a ambas cadenas de ADN. También es necesario realizar más investigaciones que involucren la regulación de la expresión génica en células expuestas a dichos tratamientos.

8.3 Daño estructural de las paredes y membranas celulares

8.3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El daño a la pared y membrana celular es otro mecanismo de inhibición común de los antibióticos comerciales, por lo que era necesario estudiar un posible efecto similar por parte de las nanopartículas, cuya inhibición ya hemos demostrado en los ensayos de viabilidad/citotoxicidad. La microscopía SEM es ideal para este tipo de análisis en particular, ya que por su naturaleza permite obtener imágenes de alta definición de las superficies celulares, lo cual genera información específica sobre las alteraciones estructurales mencionadas. En base a esto se diseñaron los ensayos explicados a detalle en la metodología y cuyos resultados analizaremos a continuación.

8.3.1.1 Ensayos con *P. aeruginosa* expuesta a AgNP y ZnONP

Como se menciona en la introducción, los microorganismos gramnegativos poseen una estructura característica que los difiere de las bacterias Gram-positivas y las células fúngicas.

La pared celular de bacterias como *P. aeruginosa* es delgada y sus mecanismos de resistencia y adaptación al medio ambiente están más relacionadas con su metabolismo y con la integridad de su membrana celular, y en base a estudios similares (Grigor'eva *et al*, 2013; Li *et al*, 2008) podemos predecir que es la membrana celular la que debe de sufrir la mayor parte de los daños estructurales.

Debido a que la presencia de ZnONP no mostró inhibición del crecimiento de las bacterias, tanto Gram-positivas como Gram-neagtivas, los resultados de la microscopía electrónica no se consideraron relevantes, por lo que solamente se muestran los resultados con AgNP.

Los experimentos mostraron que la exposición de *P. aeruginosa* a AgNP resultó en la presencia de invaginaciones en la membrana celular (Figura 6B). A pesar de que las invaginaciones se observan también en células no expuestas, posiblemente debido al proceso de deshidratación durante la preparación de la muestra (Figura 6A), esta alteración estructural es más obvia y pronunciada en las células expuestas a los tratamientos. Además de los

resultados obtenidos en este estudio también se ha reportado daños muy similares en otras especies de bacterias gram-negativas, como *E. coli* y *S. typhimurium* en presencia de nanopartículas metálicas (Grigor'eva *et al*, 2013; Li *et al*, 2008). Basándose en dicha información, y en el hecho de que sabemos que los tratamientos de AgNP inhiben el desarrollo de dichos microorganismos podemos inferir que el daño observado es significativo en las membranas celulares bacterianas e interfiere con el crecimiento y reproducción de *P. aeruginosa*.

8.3.1.2 Ensayos con *S. aureus* expuesta a AgNP y ZnONP.

Los resultados del análisis SEM para las muestras de *S. aureus*, a pesar de que en los ensayos de viabilidad/citotoxicidad su crecimiento fue inhibido por los tratamientos, no muestran evidencia de que la integridad de su pared celular haya sido comprometida de alguna manera (Figura 7), sin embargo, Grigor'eva *et al* mostraron que las AgNP de un diámetro de 8 a 10 nm si pueden introducirse en las células gram-positivas, causando daños estructurales, por lo cual podemos proponer que la integridad de la célula depende en parte de la internalización de las nanopartículas al citoplasma, y que si bien la liberación de iones plata al medio de cultivo impide la reproducción de la bacteria, no afecta la estructura de la pared celular bacteriana.

Otra posibilidad es que la cantidad de iones por parte de las AgNP no es lo suficientemente alta para que se puedan observar cambios evidentes que puedan ser interpretados como daños estructurales.

8.3.1.3 Ensayos con *C. albicans* expuesta a AgNP y ZnONP.

En el caso de ambos microorganismos fúngicos se observó una inhibición del crecimiento en presencia de ambas nanopartículas, por lo que se decidió estudiar el efecto en la integridad de su estructura celular por medio de la microscopía electrónica de barrido. Se observó que la exposición de *C. albicans* a AgNP y ZnONP resultó en daño severo a la estructura de su pared celular (Figura 5). Las cicatrices de gemación siguen estando presentes en las células del control no expuesto (Figura 5A), en contraste las células expuestas muestran interrupción del proceso de gemación con daño estructural de la pared celular (Figura 5B y 5C). Las microscopías electrónicas de barrido nos

proporcionan la evidencia necesaria para proponer un mecanismo de acción de las AgNP en el cual la interacción resultante inhibe los procesos metabólicos responsables de mantener la integridad física de las paredes celulares de las células levaduriformes, más específicamente de *C. albicans*.

Estudios similares han evaluado la susceptibilidad de la integridad de la membrana celular de *Saccharomyces cerevisiae* expuesta a nanopartículas metálicas, por medio de la densitometría de flujo, sin embargo este trabajo muestra imágenes de microscopía electrónica de lo que solamente se había demostrado de forma indirecta, además de que en dichos estudios no se menciona el uso de AgNP (Otero-González *et al*, 2013).

8.3.1.4 Ensayos con *C. eremophila* expuesta a AgNP y ZnONP.

C. eremophila tampoco mostró daño estructural en sus paredes o membranas celulares al ser analizados por microscopía electrónica (Figura 8). Sin embargo, el interés de estudiar la inhibición de dicho organismo radica en las pocas referencias que lo mencionan a pesar de ser un importante patógeno de la madera. Debido a que no todos los microorganismos hayan mostrado daño estructural, a pesar de haber sido inhibidos por las NP, nos indica que la alteración de la pared y membrana celular no es su principal mecanismo de inhibición, y podría en cambio ser el resultado de un mecanismo más general que afecta a todo tipo de células (eucariotas y procariotas).

9. Conclusiones

Los resultados de este trabajo muestran que las AgNPs son tóxicas contra los microorganismos estudiados. La evidencia indica que los mecanismos para la inhibición del crecimiento fueron diferentes para los distintos microorganismos debido a que su estructura celular es diferente. El daño estructural fue confirmado solamente en *C. albicans* y *P. aeruginosa*, tratadas con AgNPs. En los demás microorganismos, es posible que el mecanismo de inhibición sea por vía enzimática.

A pesar de que ZnONP mostró daño a la pared celular de *C. albicans*, no mostró actividad inhibitoria importante en contra de ningún otro

microorganismo, por lo que se decidió continuar el análisis de los mecanismos de inhibición de la plata solamente.

Un mecanismo de defensa por parte de los microorganismos en contra de las AgNP es la formación de biopelículas, lo cual se confirmó debido a una menor actividad inhibitoria por parte de las AgNP en presencia de los exopolisacáridos.

La inhibición de la actividad catalítica de las enzimas fue más importante por parte del AgNO_3 , ya que el potencial de Ag^+ (que es liberado también por las AgNPs) para interactuar con proteínas y enzimas es mayor que el de las AgNPs. Por lo que se concluye que los daños observados y la inhibición enzimática es llevada a cabo principalmente por dicho ión.

A nuestro saber, este es el primer reporte de la actividad inhibitoria de AgNPs en contra del hongo patógeno de la madera *C. eremophila*, y los resultados sugieren que la plata puede ser utilizada para evitar el deterioro de los productos de madera.

10. Bibliografía

1. Abraham, M.; Venter, P.; Lues, J.F.R.; Ivanov, I; Smidt, O. Influence of selected antimicrobials on the viability, endotoxicity and lipopolysaccharide composition of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *International Journal of Antimicrobial Agents* 34 (2009) 419-423.
2. Amézaga-Madrid, P.; Nevárez-Moorillón, G.V.; Orrantia-Borunda, E.; Miki-Yoshida, M. Photoinduced bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa* by TiO₂ based thin films. *FEMS Microbiology Letters* Vol. 211 (2002) pg. 183-188.
3. Amézaga-Madrid, P.; Silveyra-Morales, R.; Córdoba-Fierro, L.; Nevárez-Moorillón, G.V.; Miki-Yoshida, M.; Orrantia-Borunda, E.; Solís, F.J. TEM evidence of structural alteration on *Pseudomonas aeruginosa* by photocatalytic TiO₂ thin films. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* Vol. 70 (2003) pg. 45-50.
4. Angionella, L.; Vitali, A.; Stringaro, A.; Mignogna, G.; Maras, B.; Bonito, M.; Colone, M.; Palamara, A.T.; Cassone, A. Localization of Bg12p upon antifungal drug treatment in *Candida albicans*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33 (2009) 143-148.
5. Araújo, J.; Gonzalez, E.; Egea, M.A.; Garcia, M.L.; Souto, E. Nanomedicines for ocular NSAIDs: safety on drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and medicine* 5 (2009) 394-4001.
6. Ávila-Sosa, R.; Hernández-Zamoran, E.H.; López-Mendoza, I.; Palou, E.; Jiménez-Munguía, M.T.; Nevárez-Moorillón, G.V.; López-Malo, A. Fungal Inactivation by Mexican Oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil added to Amaranth, Chitosan, or Starch edible films. *Journal of food science*. Vol 75. (2010)
7. Baveja, J.K.; Willcox, M.D.P.; Hume, E.B.H.; Kumar, N.; Odell, R. Poole-Warren, L.A. Furanones as potential anti-bacterial coatings on biomaterials. *Biomaterials* vol. 25 (2004) 5003-5012.
8. Bonecini-Almeida MG, Chitale S, Boutsikakis I, Geng J, Doo H, He S, Ho JL. Induction of In Vitro Human Macrophage Anti-Myco bacterium tuberculosis Activity: Requirement for IFN- γ and Primed Lymphocytes. *The Journal of Immunology*. Vol. 160 (1998) pg. 4490–4499.
9. Braun V. Bacterial cell wall research in Tübingen: A brief historical account *International Journal of Medical Microbiology* 305 (2015) pgs. 178–182.
10. Dastjerdi, R.; Montazer, M. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* (Article in press). (2010) ELSEIVER. Pgs 1-14.

11. Dror-Ehre, A.; Adin, A.; Markovich, G.; Mamane, H. Control of biofilm formation in water using molecularly capped silver nanoparticles. *Water research* Vol. 44 (2010) pg. 2601-2609.
12. Flores, C.Y.; Diaz, D.; Rubert, A.; Benitez, G.A.; Moreno, M.S., Fernández, M.A.; Lorenzo de Mele; Salvarezza, R.C.; Schilardi, P.L.; Vericat, C. Spontaneous adsorption of silver nanoparticles on Ti/TiO₂ surfaces. Antibacterial effect on *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of colloid and interface Science* vol. 350 (2010) pg. 402-408.
13. Flores VD, F. Dos Santos Siqueira, C.R. Mizdal, P.C. Bonez, V.A. Agertt, S.T. Stefanello, G.G. Rossi, M.M. Campos. *Microb Pathog.* 4010(16), 30174-7 (2016).
14. Fuentefria, D.B.; Ferreira, A.E.; Corção, G. Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater and superficial water: are they genetically related? *Journal of Environmental Management* vol. XXX (2010) pg. 1-6.
15. Gould, I.M. Antibiotics, skin and soft tissue infection and meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: cause and effect. *International Journey of antimicrobial agents* vol. 34, S1 (2009) pg. S8-S11.
16. Grigor'eva A SI, Tikunova N, Safonov A, Timoshenko N, Rebrov A, Ryabchikova E. 2013. Fine mechanisms of the interaction of silver nanoparticles with the cells of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* *Biometals* **26**:479–488.
17. Haile, T.; Nakhla, G.; Allouche, E.; Vaidya, S. Evaluation of the bactericidal characteristics of nano-copper oxide or functionalized zeolite coating for bio-corrosion control in concrete sewer pipes. *Corrosion Science* vol. 52 (2010) pg. 45-53.
18. Hans, M.L.; Lowman, A.M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* vol. 6 (2002) pg. 319-227.
19. He, L.; Liu, Y.; Mustapha, A.; Lin, M. Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Microbial Research* (2010) Artículo en revisión, disponible en línea.
20. Hildebrand, H.F.; Blanchemain, N.; Mayer, G.; Chai, F.; Lefebvre, M.; Boschini, F. Surface coatings for biological activation and fictionalization of medical devices. *Surface & Coatings Technology* vol. 200 (2006) pg. 6318-6324.
21. Hirakata, Y.; Kondo, A.; Hoshino, K.; Yano, H.; Arai, K.; Hirotsu, A.; Kunishima, H.; Yamamoto, N.; Hatta, M.; Kitagawa, M.; Kohno, S.; Kaku, M. Efflux pump inhibitors reduce the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 34 (2009) pg. 343-346.

22. Hochmannova, L.; Vytrasova, J. Photocatalytic and antimicrobial effects of interior paints. *Progress in Organic Coatings*. Vol. 67 (2010) pg. 1-5.
23. Hocquet, D.; Bertrand, X.; Köhler, T.; Talon, D.; Plésiat, P. Genetic and phenotypic variations of a resistant *Pseudomonas aeruginosa* epidemic clone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. (2003) pg. 1887-1894.
24. Huaiqiang, Z.; Lushan, W.; Peiji, G. Use of the contour approach for visualizing the dynamic behavior of intermediates during α -nitrophenyl- β -D-galactoside hydrolysis by β -galactosidase. *Process Biochemistry*. Vol. 44 (2009) pg. 1374-1380.
25. Huang, C.Y.; Hsieh, S.P.; Kuo, P.A.; Jane, W.N.; Tu, J.; Wang, Y.N.; Ko, C.H. Impact of disinfectant and nutrient concentration on growth and biofilm formation for a *Pseudomonas* strain and the mixed cultures from a fine papermachine system. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol. 63 (2009) pg. 998-1007.
26. Huang, V.; Cheung, C.M.; Kaatz, G.W.; Rybak, M.J. Evaluation of dalbavancin, tigecycline, minocycline, tetracycline, teicoplanin and vancomycin against community-associated and multidrug-resistant hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 35 (2010) pag. 25-29.
27. Huang, Z.; Maness, P.-Ch.; Blake, D.M.; Wolfrum, E.J.; Smolinski, S.L.; Jacoby, W.A. Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. Vol. 130(2000) pg. 163-170.
28. Hsueh, P.R.; Lee, S.Y.; Perng, C.L.; Chang, T.Y.; Lu, J.J. Clonal dissemination of methicillin-resistant and vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a Taiwanese hospital. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 36 (2010) pg. 307-312.
29. Irbe, I.; Andersons, B.; Chirkova, J.; Kallavus, U.; Andersone, I.; Faix, O. On the changes of pinewood (*Pinus sylvestris* L.) chemical composition and ultrastructure during the attack by brown-rot fungi *Postia placenta* and *Coniophora puteana*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol. 57 (2006) pg. 99-106.
30. Jiang, W.; Mashayekhi, H.; Xing, B. Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. *Environmental Pollution*. Vol. 157 (2009) pg. 1619-1625.
31. Jyothi, A.; Manjusha, R.; Arunachalam, J. Superior bactericidal of SDS capped silver nanoparticles: synthesis and characterization. *Materials Science and Engineering*. Vol C29 (2009) pg. 2104-2109.
32. Korpi, A.; Pasanen, A.L.; Viitanen, H. Volatile metabolites of *Serpula lacrymans*, *Coniophora puteana*, *Poria placenta*, *Stachybotrys chartarum* and *Chaetomium globosum*. *Building and Environment*. Vol. 34 (1999) pg. 205-211.

33. Kumari, A.; Yadav, S.K.; Yadav, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces Biointerfaces*. Vol. 75 (2010) pg. 1-18.
34. Kurtulmus, H.; Kumbuloglu, O.; Özcan, M.; Ozdemir, G.; Vural, C. *Candida albicans* adherence on silicone elastomers: Effects of polymerization duration and exposure to simulated saliva and nasal secretion. *Dental materials*. Vol. 26 (2010) pg. 76-82.
35. Lu, Q.; Yu, J.; Yang, X.; Wang, J.; Wang, L.; Lin, Y.; Lin, L. Ambroxol interferes with *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 36 (2010) pg. 211-215.
36. Lu, S.; Gao, W.; Gu, H.Y. Construction, application and biosafety of silver nanocrystalline chitosan wound dressing. *Burns* Vol. 34 (2008) pg. 623-628.
37. Malanovic N; Lohner K. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1858 (2016) pg. 936–946.
38. Martínez-Gutiérrez, F.; Olive, P.L.; Banuelos, A.; Orrantia, E.; Nino, N.; Morales, E.; Ruiz, F.; Bach, H.; Av-Gay, Y. Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. Vol. 6 (2010) pg. 681-688.
39. Miceli, M.H.; Bernardo, S.M.; Lee, S.A. In vitro analyses of the combination of high-dose doxycycline and antifungal agents against *Candida albicans* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 34 (2009) pg. 326-332.
40. Muthu, M.S.; Rawat, M.K.; Mishra, A.; Singh, S. PLGA nanoparticle of risperidone: preparation and neuropharmacological evaluation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. Vol. 5 (2009) pg. 323-333.
41. Nigaud, Y.; Cosette, P.; Collet, A.; Tchi-Song, P.C.; Vaudry, D.; Vaudry, H.; Junter, G.A.; Jouenne, T. Biofilm-induced modifications in the proteome of *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1804 (2010) pg. 957-966.
42. Nwani, C.D.; Lakra, W.S.; Nagpure, N.S.; Kumar, R.; Kushwaha, B.; Srivastava, S.K. Mutagenic and genotoxic effect of carbosulfan in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 48 (2010) pg. 202-208.
43. Pagès, J.M.; Amaral, L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: Challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol 1794 (2009) pg. 826-833.
44. Pinto-Reis, C.; Neufield, R.J.; Ribero, A.J.; Veiga, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. Vol. 2 (2006) pg. 8-21.

45. Portillo-Ruiz, M.C.; Viramontes-Ramos, S.; Muñoz-Castellanos, L.N.; Gastelum-Franco, M.G.; Nevárez-Moorillón, G.V. Antifungal activity of mexican oregano (*Lippia berlandieri* Shauer). *Journal of food Protection*. Vol. 68. (2005) pg. 2713-2717.
46. Rai, M; Yadav, A.; Gade, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances*. Vol 27 (2009) pg. 76-83.<
47. Rahimi, M.; Wadajkar, A.; Subramanian, K.; Yousef, M.; Cui, W.; Hsieh, J.T.; Nguyen, K. T. In vitro evaluation of novel polymer-coated magnetic nanoparticles for controlled drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* (2010) Article in press.
48. Ranjbar, Z.R.; Morsali, A. Sonochemical synthesis of a novel nano-rod two-dimensional zinc (II) oxide nanoparticles by direct thermolyses. *Ultrasonics Sonochemistry*. Vol. 18 (2011) pg. 644-651.
49. Ray, M.J.; Leak, D.J.; Spanu, P.D.; Murphy, R.J. Brown rot fungal early stage decay mechanism as a biological pretreatment for softwood biomass in biofuel production. *Biomass and bioenergy*. Vol. 34 (2010) pg. 1257-1262.
50. Reid, G. Biofilms in infectious disease and in medical devices. *Journal of antimicrobial agents*. Vol. 11 (1999) pg. 223-226.
51. Ribeiro, M.O.; Da Silva-Gomez, M.; Gonçalves-Senna,S.; Rosa-Rosseti, M.L.; De Souza-Fonzeca, L. Evaluation of rapid microplate assays using cellular-viability indicators to determine patterns of susceptibility to isoniazid and rifampin in *Mycobacterium tuberculosis* strains *Journal Brasileiro de Pneumologia*. Vol. 30(4) (2004) pg. 455-460.
52. Sathishkumar, M.; Sneha, K.; Yun, Y.S. Immobilization of silver nanoparticles synthesized using Curcuma longa tuber powder and extract on cotton cloth for bacterial activity. *Bioresource technology*. Vol. 101 (2010) pg. 7958-7965.
53. Sekiguchi, J.I.; Asagi, T.; Miyoshi-Akiyama, T.; Fujino, T.; Kobayashi, I.; Morita, K.; Kikushi, Y.; Kuratsuji, T.; Kirikae, T. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain that caused an outbreak in a neurosurgery ward and its aaz(6')-Iae gene cassette encoding a novel aminoglycoside acetyltransferase. *Antimicrobial agents and chemotherapy* (2005) pg. 3734-3742.
54. Spirandelli, K.; Masae, E.; Gontijo, P. Methicillin/Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a hospital public health threat in Brazil. *Infect. Dis*. Vol. 14 (2010) pg. 71-76. Elsevier Editora Ltda.
55. Tavzes, C.; Pohleven, F.; Koestler, R.J. Effect of anoxic conditions on wood-decay fungi treated with argon or nitrogen. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol. 47 (2001) pg. 225-231.

56. Thomas N., C. Thorn, K. Richter, B. Thierry, C. Prestidge. *J Pharm Sci.* 3549(16), 41520-0 (2016).
57. Verran, J.; Sandoval, G.; Allen, N.S.; Edge, M.; Stratton, J. Variables affecting the bactericidal properties of nano and pigmentary titania particles in suspension. *Dyes and Pigments.* Vol. 73 (2007) pg. 298-304.
58. Villamizar, R.A.; Maroto, A.; Rius, F.X. Improved detection of *Candida albicans* with carbon nanotube field-effect transistors. *Sensors and Actuators.* Vol. B 136 (2009) pg. 451-457.
59. Vivek Kumar, P.R.; Cheriyan, V.D.; Seshadri, M. Could a strong alkali deproteinization replace the standard lysis step in alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay (pH>13)? *Mutation Research.* Vol. 678 (2009) pg. 65-70.
60. Voda, K.; Boh, B.; Vrta-cnik M.; Pohleven, F. Effect of the antifungal activity of oxygenated aromatic essential oil compounds on the white-rot *Trametes versicolor* and the brown-rot *Coniophora puteana*. *International Biodeterioration & Biodegradation.* Vol. 51 (2003) pg. 51-59.
61. Wang, H.; Xu, K.; Liu, L.; Tan, J.P.K.; Chen, Y.; Li, Y.; Fan, W.; Wei, Z.; Sheng, J.; Yang, Y.Y.; Li, L. The efficacy of self-assembled cationic antimicrobial peptide nanoparticles against *Cryptococcus neoformans* for the treatment of meningitis. *Biomaterials.* Vol. 31 (2010) pg. 2874-2881.
62. Willcox, M.D.P.; Hume, E.B.H.; Vijay, A.K.; Petcavich, R. Ability of silver-impregnated contact lenses to control microbial growth and solonisation. *Journal of Optometry.* Vol. 3 (2010) Pg. 143-148.
63. Yin, X.H.; Li, S.N.; Liu, S.Y.; Zhu, G.N.; Zhuang, H.S. Genotoxicity evaluation of low doses of clodinafop-propargyl to the silkworm *Bombyx mori* using alkaline single-cell gel electrophoresis. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* Vol. 26 (2008) pg. 162-166.