

**PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA**  
**INVESTIGACIÓN**

**ESTUDIO DE LA EFECTIVIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y  
COBRE COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS**

**Del Bene, Camila – LU: 1026906**

*Licenciatura en Biotecnología*

**Gallardo, Marina Florencia – LU: 1038779**

*Licenciatura en Biotecnología*

Tutor:

**Dra. Angelomé, Paula Cecilia, Centro Atómico Constituyentes, Comisión  
Nacional de Energía Atómica, UADE**

Co-tutor:

**Dra. Raffellini, Silvia Mónica, UADE**

**Noviembre, 2016**



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

## **AGRADECIMIENTOS**

Queremos agradecer este trabajo a las excelentes personas que nos guiaron durante el transcurso de estos años y quienes sin su participación no hubiera sido posible realizar nuestro proyecto final de la carrera:

Dra. Angelomé, Paula Cecilia: Nuestra tutora, la persona quien confió en nosotras y ayudó a iniciarnos en el campo de la nanobiotecnología. Gracias por transmitirnos tu conocimiento, por estar atenta y presente en todo momento, por abrirnos las puertas de tu laboratorio y por sobretodo, investigar con nosotras a lo largo de todo el proyecto. Sin todos tus aportes y tu experiencia, hubiera sido imposible lograr este trabajo.

Dra. Raffellini, Silvia Mónica: Nuestra co-tutora, gracias por transmitirnos toda tu experiencia en el área de la microbiología y ayudarnos a desarrollarnos mejor en el ámbito del laboratorio. Ningún experimento hubiera sido exitoso sin tu colaboración, apoyo y paciencia. Queremos agradecerte por no haber dudado en confiar en nosotras desde el primer momento.

Por último, agradecemos también al Centro Atómico Constituyentes, el cual nos permitió realizar las síntesis químicas de nuestro trabajo, facilitándonos todos los materiales y reactivos que necesitábamos para la elaboración y desarrollo de gran parte de nuestro proyecto.

## Resumen

Dada la emergencia de microorganismos resistentes a múltiples agentes bactericidas, existe en el mercado actual una creciente demanda por mejorar los métodos antimicrobianos. Es sabido que una infección causada por un microorganismo resistente a drogas resulta en un incremento significativo de la mortalidad, la morbilidad y los costos relacionados a tratamientos prolongados. Debido a ello, se han propuesto nuevas opciones para el tratamiento y prevención de los microorganismos con el uso de la nanotecnología. Las nanopartículas metálicas se han propuesto como agentes más eficaces que los antibióticos actuales, ya que se sintetizan de manera sencilla y presentan una baja citotoxicidad. Los iones de  $\text{Ag}^+$  y  $\text{Cu}^{+2}$  son históricamente conocidos como agentes antimicrobianos, por lo cual el objetivo principal de esta tesis ha sido la producción de nanopartículas de Ag y Cu y la posterior evaluación de su efecto como agentes bactericidas. El siguiente objetivo fue cuantificar y comparar el efecto bactericida o bacteriostático surgido por los diferentes tipos de nanopartículas metálicas obtenidas, determinando la concentración inhibitoria mínima (CIM).

Para la obtención de las nanopartículas se llevaron a cabo síntesis químicas de reducción en medio acuoso, con el uso de diferentes agentes estabilizantes. Se lograron preparar mediante dichas reducciones nanoesferas de Ag (obtenidas utilizando citrato de sodio y borohidruro de sodio como reductores y estabilizantes) y nanoprismas de Ag (utilizando borohidruro de sodio como agente reductor y citrato de sodio como agente estabilizante). Por otro lado, se ensayaron diversas síntesis de nanopartículas de cobre, utilizando diversos agentes reductores: ácido ascórbico, citrato y borohidruro de sodio. Sin embargo, no fue posible obtener nanopartículas de Cu estables en solución acuosa.

Posteriormente se evaluó el efecto antimicrobiano de las nanopartículas de Ag sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* como especies representativas de bacterias (Gram +) y Gram -, respectivamente. Para esto se hicieron ensayos de difusión en agar y determinación de la CIM en medio líquido. Comparando luego las CIM obtenidas mediante la prueba estadística de Kruskal-Wallis se arribó a la conclusión de que, con la misma concentración de Ag, las nanopartículas esféricas reducidas con borohidruro presentan un mayor poder inhibitorio para *E. coli*, mientras que los nanoprismas demostraron un potencial efecto bactericida en *S. aureus*. No obstante, los iones de plata demostraron ser más efectivos que las nanoesferas de plata, indicando que los sistemas basados en nanopartículas metálicas deben ser mejorados para obtener mayor efectividad.

## Abstract

Due to the emergency in the increment of resistant microorganisms to a wide range of antimicrobial agents, there is a rising demand to improve antimicrobial methods. It is known that an infection caused by a drug resistant microorganism results in a significant increase in mortality, morbidity and longlife treatments costs. Because of this, new options for the treatment and prevention of these microorganisms have been proposed: the use of nanotechnology. Metallic nanoparticles have been proposed as more efficient agents than current antibiotics because they are easily synthesized and they present a low cytotoxicity.  $\text{Ag}^+$  and  $\text{Cu}^{2+}$  ions are historically known as antimicrobial agents; therefore the main objective of this thesis has been the production of copper and silver nanoparticles, and the further evaluation of their bactericidal effects. Another objective was to quantify and compare the bactericidal or bacteriostatic effect arisen by the different types of metal nanoparticles obtained, determining the minimal inhibitory concentration (MIC).

For the nanoparticles preparation, syntheses by chemical reduction in aqueous solution were performed, using different stabilizing agents. It was possible to obtain Ag nanospheres by using sodium citrate and sodium borohydride as reductors and stabilizers, and Ag nanoprisms, using sodium borohydride as reduction agent and sodium citrate as stabilizing agent. On the other side, different copper nanoparticles synthesis were examined, using different reduction agents, like ascorbic acid, sodium citrate and sodium borohydride. However, it was not possible to obtain stable copper nanoparticles in aqueous solution.

Later, antimicrobial effect of the silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* as representative of (Gram +) and (Gram -) bacteria, respectively was evaluated. To achieve this objective agar diffusion assays were performed and MIC was determined in liquid media. Comparing then the obtained MIC for both strains by the Kruskal-Wallis statistical test ( $P < 0.05$ ), it was possible to conclude that with the same concentration, spherical nanoparticles prepared with borohydride are better at growth inhibition of the *E. coli* strain, while nanoprisms showed a potential bactericide effect on *S. aureus*. However, silver ions demonstrated being more effective than silver nanospheres, indicating that nanoparticles-based systems must be improved to achieve a greater effectivity.

# INDICE

<b>1. Introducción</b> .....	8
<b>2. Antecedentes</b> .....	9
<u>2.1.Nanotecnología</u> .....	9
<u>2.2.Nanopartículas metálicas</u> .....	10
<u>2.3. Síntesis de nanopartículas metálicas</u> .....	11
<u>2.4. Agentes antimicrobianos</u> .....	12
<u>2.5. Plata y cobre como agentes antimicrobianos</u> .....	14
<u>2.6.Nanopartículas de plata y cobre como agentes antimicrobianos</u> .....	17
<b>3. Hipótesis</b> .....	17
<b>4. Metodología y desarrollo</b> .....	18
<u>4.1. Síntesis de nanopartículas de plata esféricas</u> .....	18
4.1.1. Obtención de nanopartículas de Ag estabilizadas con citrato .....	18
4.1.2. Obtención de nanopartículas de Ag estabilizadas con borohidruro .....	19
4.1.3. Dilución de las nanopartículas reducidas con citrato .....	19
4.1.4. Concentración de las nanoesferas de Ag recubiertas con borohidruro .....	19
4.1.5. Síntesis de nanopartículas recubiertas con borohidruro concentradas .....	20
4.1.6. Centrifugación de nanopartículas recubiertas con borohidruro .....	20
4.1.7. Soluciones blanco de nanoesferas de Ag diluidas.....	20
4.1.8. Soluciones blanco de nanoesferas de Ag concentradas.....	21
<u>4.2. Síntesis de nanoprismas de plata</u> .....	22
4.2.1. Concentración de la solución de nanoprismas de plata .....	22
4.2.2. Solución blanco de nanoprismas de Ag .....	22
<u>4.3. Caracterización de las nanopartículas de plata</u> .....	23
4.3.1. Espectrofotometría UV-visible.....	23
4.3.2. Medición del pH.....	23
4.3.3. Caracterización de nanoprismas por SEM .....	23
<u>4.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana de nanopartículas de Ag</u> .....	24
4.4.1. Cepas empleadas y condiciones de conservación .....	24
4.4.2. Preparación de inóculos a utilizar en los ensayos antimicrobianos.....	25
4.4.3. Determinación de la CIM mediante la técnica de dilución en caldo.....	25
4.4.4. Evaluación de la actividad inhibitoria por ensayo de difusión en agar .....	27
<u>4.5 Ensayos preliminares para la puesta a punto de la determinación de la CIM por la técnica de dilución en caldo</u> .....	29

4.5.1. Ensayo 1: Detección preliminar del efecto antimicrobiano de nanoesferas de plata .....	29
4.5.2. Ensayo 2: Detección de presencia de peróxido residual en nanoprismas de plata .....	30
4.5.3. Ensayo 3: Puesta a punto en la determinación de la CIM con nanoesferas de Ag de diferente concentración.....	30
<u>4.6. Determinación de CIM con nanoesferas de Ag.....</u>	31
4.6.1. Determinación de la CIM en nanoesferas de Ag recién sintetizadas .....	31
4.6.2. Determinación de la CIM en nanoesferas de Ag envejecidas .....	32
<u>4.7. Ensayos microbiológicos con nanoprismas de Ag .....</u>	32
<u>4.8. Análisis estadístico .....</u>	33
<u>4.9. Síntesis de nanopartículas de cobre.....</u>	34
4.9.1. Determinación de las condiciones de síntesis de nanopartículas de cobre... 34	
4.9.2. Síntesis de nanopartículas de cobre estabilizadas con ácido ascórbico..... 35	
4.9.3. Síntesis de nanopartículas de Cu estabilizadas con ácido ascórbico, a mayor concentración..... 35	
4.9.4. Síntesis de nanopartículas de Cu estabilizadas con NaBH <sub>4</sub> .....	35
4.9.5. Síntesis de nanopartículas de Cu estabilizadas con citrato..... 36	
<b>5. Resultados y discusión.....</b>	37
<u>5.1. Síntesis de nanopartículas de Ag esféricas.....</u>	37
5.1.1. Concentración de las nanopartículas sintetizadas con borohidruro..... 38	
<u>5.2. Síntesis de Nanoprismas de Ag .....</u>	39
<u>5.3. Caracterización de las nanopartículas de Ag.....</u>	39
5.3.1. Espectrofotometría UV-visible..... 39	
5.3.2. Caracterización de nanoprismas por SEM .....	41
5.3.3. Estabilidad de las NP esféricas..... 42	
5.3.4. Medición del pH..... 43	
<u>5.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de Ag .....</u>	43
5.4.1. Determinación de la pureza de cepas ensayadas E. coli y S.aureus .....	43
5.4.2. Inóculos a utilizar en los ensayos antimicrobianos .....	44
5.4.3. Ensayos preliminares para la puesta a punto de la determinación de la CIM .....	44

5.4.3.1. Ensayo 1: Detección preliminar del efecto antimicrobiano de nanoesferas de plata.....	44
5.4.3.2. Ensayo 2: Detección de presencia de peróxido residual en nanoprismas de Ag.....	45
5.4.3.3. Ensayo 3: Puesta a punto en la determinación de la CIM con nanoesferas de Ag de diferente concentración .....	46
5.4.4 Ensayos microbiológicos con nanoesferas de Ag .....	48
5.4.4.1 Determinación de la CIM en nanoesferas de Ag recién sintetizadas	48
5.4.4.2. Determinación de la CIM en nanoesferas envejecidas.....	50
5.4.4.3. Ensayo de difusión en agar en nanoesferas de Ag .....	52
5.4.5. Ensayo microbiológico con nanoprismas de Ag .....	54
5.4.5.1. Determinacion de la CIM en nanoprismas de Ag .....	54
5.4.5.2. Ensayo de difusión en agar con nanoprismas de Ag .....	56
5.4.6. Pruebas estadísticas con nanopartículas de Ag .....	57
<b>5.5. Síntesis de nanopartículas de cobre.....</b>	<b>68</b>
5.5.1. Nanopartículas de Cu estabilizadas con ácido ascórbico .....	68
5.5.2. Concentración de nanopartículas de Cu estabilizadas con ácido ascórbico .	69
5.5.2.1. Resultados por espectrofotometría .....	69
5.5.3. Síntesis de nanopartículas de Cu estabilizadas con NaBH <sub>4</sub> .....	70
5.5.4. Síntesis de nanopartículas de Cobre estabilizadas con citrato .....	71
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>73</b>
<b>7. Apéndices .....</b>	<b>75</b>
<b>8. Referencias bibliográficas.....</b>	<b>82</b>
<b>9. Anexo .....</b>	<b>92</b>
<u>9.1. Composición de los medios de cultivo y reactivos empleados .....</u>	<u>92</u>
<u>9.2. Pruebas para determinación de la pureza e identificación de las cepas bacterianas</u>	<u>96</u>

## 1. Introducción

Las nanopartículas metálicas, entre las que se destacan las de plata y cobre, han demostrado ser de gran utilidad en varias aplicaciones en el campo de la biotecnología, debido a sus propiedades ópticas y catalíticas. Estas propiedades resultan diferentes a las de los materiales tradicionales debido a la mayor relación superficie-volumen que presentan las nanopartículas. Es por ello que las mismas actualmente poseen una gran demanda en el mercado (Tan y Cheon, 2013).

Estas propiedades exhibidas por los nanomateriales son inmensamente diferentes a las que exhiben estos mismos materiales en la macroescala. Debido a que las nanopartículas poseen una mayor relación de superficie-volumen, tienen una mayor superficie de contacto con el entorno. Esto hace que los nanomateriales sean muy atractivos para su explotación en múltiples sectores y que su aplicación crezca a un ritmo elevado en los últimos años. En la actualidad el inventario de productos para el consumo indica que hay 1317 productos que contienen nanomateriales. Las principales aplicaciones son para electrónica, informática, industria textil, industria alimentaria, en medicina y odontología (Ávalos *et al*, 2013). Además de las propiedades ya mencionadas, algunos investigadores han hecho hincapié en la acción bactericida de las nanopartículas metálicas, principalmente de plata y cobre, y han observado cambios morfológicos y estructurales en bacterias luego de haber sido tratadas con nanopartículas. Asimismo, se pueden ver imágenes de microscopía electrónica de transmisión en las cuales se muestran daños a la membrana celular y algunos elementos del citoplasma, ocasionados por las nanoesferas metálicas (Morones *et al*, 2005). Aunque aún no se han establecido los blancos de acción de la plata y el cobre en tamaño nanométrico, se cree que reaccionarían con los grupos azufrados contenidos en las enzimas localizadas en las membranas celulares. Dado que la membrana es la responsable de la respiración y del control de intercambio de materiales con el medio ambiente, la interacción con los metales nanométricos llevaría a que la membrana pierda permeabilidad, y la bacteria no sea capaz de efectuar procesos de respiración y, eventualmente, muera (Raffi *et al*, 2008).

A pesar de la limitada información acerca del mecanismo de acción bactericida de los compuestos de plata y cobre (Lemire *et al*, 2013), existen varias publicaciones científicas que han comprobado su actividad inhibitoria ante cepas resistentes a antibióticos. Adicionalmente, el único mecanismo de resistencia a la plata que se ha observado, es en

bacterias que habitan minas donde se encuentra este metal (Gupta *et al*, 1999; Silver, 2003). Es por esto que, ante la creciente ineficiencia de los antibióticos actuales ante enfermedades infecciosas, resulta propicio el enfoque hacia el desarrollo de productos que utilizan plata como agente antimicrobiano. Por lo tanto, resulta imprescindible el estudio de dichas nanopartículas en profundidad y, por consiguiente, en el presente trabajo se apeló a determinar la actividad antimicrobiana de la plata y el cobre nanométrico. Además, en este proyecto se propone generar un protocolo para la síntesis de nanopartículas de Cu, con la mayor eficiencia y los mayores grados de pureza y monodispersidad posibles.

Si bien existen numerosas investigaciones que avalan las propiedades antibacterianas de los nanomateriales basados en plata, se debate aún como influyen el tamaño y la forma de las entidades de tamaño nanométrico en el comportamiento antimicrobiano. Algunos investigadores informaron que las formas anisotrópicas de partículas de plata, como nanoplacas o nanoprismas triangulares, juegan un papel clave para lograr una alta actividad biocida. Por lo tanto, las investigaciones para comprender la influencia de las nanopartículas con diferentes tamaños, geometría, funcionalidad química, y carga superficial sobre los sistemas biológicos resultan de gran importancia (Raza *et al*, 2016). El objetivo del presente proyecto de investigación fue la obtención de partículas de tamaño nanométrico de Ag y Cu, con el fin de explorar el efecto inhibitorio que surgen de las diferentes formas y tamaños de las nanopartículas metálicas contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas seleccionadas. Dado que en investigaciones previas se ha encontrado que la actividad antimicrobiana de nanopartículas de Ag variaba según tamaño y forma (Seil y Webster, 2012), se decidió evaluar la actividad con dos formatos de nanopartículas: esferas y prismas.

Debido a que en el presente trabajo únicamente se logró la síntesis efectiva de nanopartículas de plata, los ensayos de determinación del efecto antimicrobiano sobre bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* se realizaron con estas nanopartículas. Para la evaluación del efecto antimicrobiano se utilizaron los métodos de difusión radial en agar y de determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de las nanopartículas, en medio de cultivo líquido. Los resultados obtenidos fueron analizados y discutidos a la luz de la literatura disponible. La actividad antimicrobiana de las nanopartículas de Ag se contrastó con un control de AgNO<sub>3</sub> y se observó la existencia de diferencias en la inhibición producida por el nanomaterial y los iones de plata.

La presente tesis se inicia con una breve sección de antecedentes, incluyendo información sobre nanotecnología, nanomateriales, agentes antimicrobianos y uso de nanomateriales como bactericidas. A continuación, se describe la hipótesis planteada en el presente trabajo de investigación. Las secciones del trabajo se organizan siguiendo el orden con la cual se llevaron a cabo las síntesis químicas realizadas en este proyecto, con el objetivo de lograr las nanopartículas propuestas. Por consiguiente, en primer lugar se presentan los resultados relacionados con la síntesis de nanopartículas de plata, su caracterización y los posteriores ensayos microbiológicos. Seguidamente, se especifican los experimentos realizados con el fin de obtener nanopartículas de cobre. El desarrollo correspondiente a las síntesis químicas, caracterización de las nanopartículas y estudios microbiológicos se especifica en la sección de resultados y discusión, donde se informan y se comentan los resultados obtenidos en cada uno de los experimentos realizados. Finalmente, se presentan las conclusiones generales del trabajo, haciendo hincapié en los posibles efectos de las nanopartículas de plata en *E. coli* y en *S. aureus*.

## 2. Antecedentes

### 2.1. Nanotecnología

La nanotecnología es la rama de la ciencia e ingeniería dedicada al estudio y las aplicaciones de materiales que presentan un tamaño de entre 1 y 100 nm en una de sus dimensiones. Actualmente, el campo de la nanotecnología es una de las áreas de mayor estudio en las ciencias médicas y de los materiales, debido a que los nanomateriales presentan nuevas propiedades fisicoquímicas relacionadas al tamaño, que difieren significativamente de los materiales de mayor escala. Los nanomateriales han sido adoptados por varios sectores industriales debido a sus aplicaciones en el campo de los sistemas de almacenamiento electrónico, la biotecnología, la separación y preconcentración de analitos de interés, la administración dirigida de fármacos, y como vehículo para liberación controlada de genes y fármacos. En consecuencia, esta rama de la ciencia tiene el potencial de generar un impacto significativo en la sociedad. (Mody *et al*, 2010; Anbarasu *et al*, 2016).

Los materiales nanoestructurados pueden tener una dimensión en la nanoescala, como es el caso de los films delgados; dos dimensiones, por ejemplo fibras o hebras; o las tres dimensiones, lo que corresponde a nanopartículas (Nps) (Alagarasi, 2009).

Las propiedades de los nanomateriales difieren de las que poseen los materiales macroscópicos tradicionales. Esto es debido, principalmente, a dos razones: la mayor relación superficie/volumen y la influencia de efectos cuánticos. Dichos efectos cuánticos generan variaciones significativas en las propiedades ópticas, eléctricas y magnéticas de los nanomateriales respecto del mismo material a escala tradicional (Rossi, 2013).

## **2.2. Nanopartículas metálicas**

Las nanopartículas metálicas en particular han existido en el planeta por siglos, pero desde hace unos pocos años se conocen en detalle sus propiedades y, por ende, han comenzado a ser utilizadas en diversas aplicaciones tecnológicas. Esas propiedades difieren de las presentadas por los materiales macroscópicos. Por un lado se consideran de gran interés los efectos de superficie, ya que en las nanopartículas se observa un incremento en áreas superficiales por unidad de volumen y en energías libres superficiales con respecto a los sólidos macroscópicos. Esto genera que los materiales nanométricos tengan una mayor reactividad frente a otras moléculas (Gutiérrez Wing, 2012; Bosco Balaguru y Jeyaprakash, 2010).

Por otro lado, los electrones en la banda de conducción de los metales en la escala nanométrica son libres de oscilar colectivamente, ante la excitación con una radiación incidente, lo cual se denomina resonancia plasmónica de superficie. Este fenómeno genera un campo electromagnético aumentado adyacente a la superficie de las nanopartículas metálicas. Debido a que la distancia de oscilación está restringida por el tamaño de las nanopartículas metálicas, las mismas tienen algunas propiedades ópticas diferentes a las de los materiales tradicionales. Estas características incluyen absorción plasmónica fuerte, dispersión de Rayleigh incrementada, y un campo electromagnético localizado en la superficie de la nanopartícula (Gao y Xu, 2007; Mohammad *et al*, 2013). El resultado más notorio de todos estos fenómenos es la coloración marcada que presentan las suspensiones de nanopartículas de metales nobles y alcalinos, producto de la absorción plasmónica.

## **2.3. Síntesis de nanopartículas metálicas**

Los métodos de síntesis de nanopartículas suelen agruparse en dos categorías: las aproximaciones "*top down*" y las "*bottom up*". La primera consiste en la división de

sólidos másicos en porciones más pequeñas. Este enfoque puede involucrar la molienda o el desgaste, diversos métodos físicos, y la volatilización de un sólido seguido por la condensación de los componentes volatilizados. La segunda aproximación, *bottom up*, consiste en la fabricación del material desde “abajo”, a partir de átomos o moléculas, para la generación de compuestos más grandes. Esto se puede lograr a través de, por ejemplo, la condensación de átomos o entidades moleculares en una fase gaseosa o en solución. Ambos enfoques tienen roles importantes en la industria moderna y en la nanotecnología (Cao y Wang, 2004; Zanella, 2012)

Las nanopartículas se preparan por varios métodos físicos, químicos, y biológicos (Iravani *et al*, 2014). Los métodos físicos más importantes son de arco de descarga, la condensación física en fase vapor, y la ablación con láser. Los métodos químicos frecuentemente utilizados para la síntesis de nanopartículas metálicas incluyen la reducción química en fase homogénea, reducción en microemulsiones, reducción fotoinducida, reducción electroquímica y síntesis asistida por microondas. Los métodos de base biológica consisten en métodos de síntesis verde, donde se utilizan extractos de diferentes plantas, células bacterianas u hongos como agentes reductores (Mohanpuria *et al*, 2008).

El tamaño pequeño no es el único requerimiento en la síntesis de nanomateriales. Para cualquier aplicación práctica se necesita tener un control del proceso de forma tal que las nanopartículas tengan las siguientes propiedades: tamaño idéntico de todas las partículas, igual morfología, la misma composición química, y ausencia de aglomeración (Cao y Wang, 2004).

De las técnicas mencionadas anteriormente, los métodos físicos normalmente exigen equipos sofisticados lo que podrían no ser rentables para síntesis a gran escala. Para los métodos biológicos, a pesar de sus ventajas favorables al medio ambiente, muchos aspectos críticos deben ser considerados, como por ejemplo, la naturaleza de los organismos, sus características hereditarias y genéticas, condiciones adecuadas para el crecimiento celular y la actividad enzimática, y la elección del biocatalizador para obtener las nanopartículas estables deseadas. Entre los métodos químicos se destacan principalmente las técnicas de reducción química húmeda, consideradas como el mejor enfoque debido a la rentabilidad, el manejo sencillo, los bajos factores de impureza, la estabilidad térmica y la amplia disponibilidad de reactivos para las síntesis (Zanella, 2012).

Las nanopartículas de Ag y Cu en bajas concentraciones son seguras y no tóxicas para las células humanas y animales, por lo tanto, el grado de toxicidad de nanopartículas metálicas para el medio ambiente se considera extremadamente bajo en comparación con otros materiales (Duran *et al*, 2007; Pal *et al*, 2007). Tal vez sea por eso que las nanopartículas de Ag alcanzan el más alto nivel de comercialización y representan el 55,4% de los productos de consumo basados en nanomateriales totales disponibles actualmente en el mercado (313 de 565 productos que informaban su composición, en el año 2012) (Asghari *et al*, 2012).

Por otro lado, las nanopartículas de cobre resultan de elevado interés ya que presentarían propiedades antibacterianas, actividad catalítica, propiedades ópticas y magnéticas, a un coste mucho menor que las nanopartículas de plata. Además, cuentan también con una elevada relación volumen: superficie, lo que les confiere una aplicación potencial en sistemas para liberación controlada de drogas en terapias contra el cáncer, modulación del comportamiento celular, inmunosensores, detección de glucosa y ADN, entre otras aplicaciones terapia y diagnóstico médico (Goel *et al*, 2014).

#### **2.4. Agentes antimicrobianos**

Los agentes antimicrobianos son sustancias obtenidas por síntesis o naturalmente (por ejemplo, a partir de los cultivos de microorganismos), que mediante algún mecanismo de acción tienen la capacidad de matar o inhibir el crecimiento de microorganismos. Es posible la producción de agentes sintéticos o semisintéticos mediante la modificación de la estructura química de un algún agente antimicrobiano cuya generación fue natural.

Los primeros agentes sintéticos usados fueron los del grupo de los colorantes (Errecalde, 2004). El primer agente antimicrobiano fue el Salvarsán, en 1910. En 1935 se comenzaron a desarrollar las sulfonamidas, compuestos sintéticos, que presentaban limitaciones en términos de eficacia y seguridad (Saga y Yamaguchi, 2009).

El primer antibiótico natural fue la penicilina, producida por el hongo *Penicillium notatum*, y descubierta en 1928 por Alexander Fleming. A partir de allí comenzó la era de los antibióticos, con su introducción como agentes terapéuticos contra infecciones microbianas. Desde ese momento, los antibióticos han sido los antimicrobianos más efectivos

en quimioterapia y una gran variedad de antibióticos fueron descubiertos e introducidos en aplicaciones clínicas (Davies y Davies, 2010).

Los blancos de los antibióticos se encuentran en diversas regiones de la célula atacada. Los mismos pueden ser clasificados según su mecanismo de acción, de la siguiente manera:

- Agentes que inhiben la síntesis de la pared bacteriana (penicilinas, cefalosporinas).
- Agentes que inhiben la síntesis proteica afectando la función de las subunidades ribosomales 30S o 50S (tetraciclinas, macrólidos y clindamicina).
- Agentes que bloquean pasos metabólicos importantes de los microorganismos (sulfonamidas y trimetoprima).
- Agentes que interfieren con la síntesis de nucleótidos (metronidazol y quinolonas) (Silva Soares *et al*, 2012).

Sin embargo, en los años recientes, la producción de nuevos antibióticos ha disminuido de forma considerable y ha surgido como un problema médico grave en todo el mundo: la resistencia a los mismos por parte de los distintos microorganismos (Riverón *et al*, 2003). Los microorganismos adquieren resistencia a antibióticos por diferentes mecanismos como por ejemplo mutaciones cromosómicas o intercambio genético mediado por plásmidos y transposones. Por el proceso natural de selección, ante la presencia de antibióticos en el medio ambiente, sólo se multiplicaran los microorganismos que los resistan y, por consiguiente, se transmitirá esa característica a la población microbiana que se origine a partir de los mismos (Okonko *et al*, 2008). Esto ha originado que, ante el uso extensivo de antibióticos en la comunidad y en los hospitales, se incremente cada más la aparición de microorganismos resistentes (Neu, 1992). Es por esto, que existe actualmente una amplia demanda en mejorar y generar nuevos materiales o moléculas que actúen como antimicrobianos.

## **2.5. Plata y cobre como agentes antimicrobianos**

Tanto el cobre como la plata han sido ampliamente utilizados, durante siglos, como agentes antimicrobianos en una gran cantidad de aplicaciones. Los iones  $\text{Ag}^+$  y  $\text{Cu}^{2+}$  resultan ser extremadamente tóxicos para las bacterias incluso en concentraciones

excepcionalmente bajas. Aunque el comportamiento antibacteriano de estos elementos no se comprende completamente, se han propuesto dos potenciales mecanismos de acción (Palza, 2015). Uno de los mecanismos está basado en la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales pueden inducir un estrés oxidativo en las bacterias, resultando en que las células fallen en el mantenimiento de sus funciones fisiológicas normales (Fu *et al*, 2014). El otro mecanismo está dado por la capacidad de estos iones de interactuar con enzimas y proteínas celulares, uniéndose a grupos funcionales con carga negativa que estén presentes en ellas, principalmente con grupos tioles. Esto último resulta en cambios estructurales a nivel de la membrana plasmática de la bacteria, lo cual aumenta su permeabilidad causando disipación de protones y finalmente muerte celular (Gophinat *et al*, 2012).

Las propiedades antimicrobianas del cobre y la plata han dado lugar a su aprovechamiento en infraestructura, mobiliario y grifería para ser utilizados en recintos deportivos, hospitales o entidades de atención al público. En la actualidad, es posible encontrar superficies recubiertas de cobre en centros hospitalarios de los Estados Unidos, como el centro de traumatología del Pullman Regional Hospital, en Washington, que tiene 29 mil metros cuadrados recubiertos con cobre, para reducir infecciones (Pullman Regional Hospital, 2014).

Diversos investigadores han propuesto también el uso de iones de plata, así como los de cobre como desinfectantes de clase superior para desagües hospitalarios con altos riesgos de infección (Lin *et al*, 1996; Lin *et al*, 1998).

## **2.6. Nanopartículas de plata y cobre como agentes antimicrobianos**

En numerosas investigaciones se ha observado que cuando a la plata y al cobre se los prepara en forma de nanopartículas se observan características antimicrobianas superiores a las que posee el material tradicional, posiblemente debido a su mayor relación superficie:volumen. Esto permite, además, que interactúen de manera distinta con las membranas bacterianas (Kolár *et al*, 2001; Morones *et al*, 2005).

Las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de plata han sido establecidas y se han propuesto diversos mecanismos de acción (Sondi y Salopek-Sondi, 2004; Cho *et al* 2005) pero hay muy pocos estudios reportados sobre los efectos bactericidas del cobre nanoparticulado.

En diversos trabajos se presentan a las nanopartículas como alternativas a los agentes antibacterianos tradicionales por presentar una menor toxicidad en células eucariotas al liberar menor cantidad de iones metálicos (Katsumiti *et al*, 2015). Además, pueden ser inmovilizadas y adheridas a diferentes superficies, lo cual tiene aplicación en numerosos campos. Asimismo, las nanopartículas de plata pueden ser combinadas con polímeros para generar materiales compuestos con mayor actividad antimicrobiana (Long *et al*, 2006).

Se han realizado ensayos, además, con nanopartículas de diversas formas, en donde se logró potenciar la acción bactericida con partículas triangulares en comparación con esferas y varillas (Pal *et al*, 2007).

Morones y colaboradores realizaron un estudio sobre el efecto del tamaño de nanopartículas de plata esféricas de entre 1 y 10 nm. En primer lugar, observaron que las NP interactúan con la membrana de células *E. coli*, e ingresan en el interior de estas bacterias. Mediante imágenes obtenidas por microscopía de campo oscuro (HAADF) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) se propuso que el efecto bactericida podría depender del tamaño, ya que las nanopartículas que ingresaban a la célula tenían tamaños similares a las que se encontraban delimitando la membrana, lo cual indicaría que solo las partículas que interactúan con la membrana son capaces de ingresar al citoplasma (Morones *et al*, 2005).

Por otro lado, Salopek y colaboradores sugirieron que cuando un cultivo de *E. coli* es tratado con nanopartículas de plata, estas se acumulan en la pared celular bacteriana y desactivan enzimas celulares, provocándole perforaciones e incrementando significativamente su permeabilidad, lo cual afecta negativamente el transporte activo a través de la membrana plasmática y genera la muerte celular (Sondi y Salopek-Sondi, 2004).

Otros aportes indican que las nanopartículas de Ag esféricas probablemente interactúan con el azufre y los complejos que contienen fósforo como el ADN y las cadenas lipídicas de la membrana externa de las (Gram -), interrumpiendo de esta forma la morfología de la membrana plasmática celular y ocasionando daños irreversibles en el material genético, impidiendo la multiplicación celular (Alcamo, 1997; Rabeah y Yousef, 2009).

Por otro lado, se estableció que las nanopartículas de cobre pueden unirse al ADN y distorsionar su estructura helicoidal por medio de entrecruzamientos entre las hebras, interfiriendo de esta forma con los procesos bioquímicos tras su ingreso en el interior celular (Stohs y Bagchi, 1995; Kim *et al*, 2000).

La razón por la cual las bacterias (Gram +) pueden resultar menos resistentes a las nanopartículas de plata y cobre, podría residir en la gran abundancia de grupos aminos y carboxilos presentes en la superficie celular de estas bacterias y la gran afinidad de las nanopartículas metálicas por estos grupos (Beveridge y Murray, 1980). No obstante, muchas investigaciones recientes difieren en cuanto al mecanismo de acción antibacteriano de las nanopartículas de Ag y Cu descritos anteriormente y proponen que las propiedades antibacterianas de las nanopartículas se deben a la liberación de iones en las cercanías de las bacterias por oxidación, y no a la acción de las nanopartículas en sí mismas (Álvarez y Brown, 2012). Por ejemplo, la posibilidad de contribución de los iones de plata pertenecientes a las nanopartículas que pueden presentar efectos inhibitorios se verificó mediante voltametría (Cho *et al*, 2005). En este estudio, se observó la liberación efectiva de iones al medio, a través del comportamiento electroquímico de las nanopartículas.

Por otro lado, investigadores de la Universidad de Rice, determinaron que la efectividad de nanopartículas de plata se debe principalmente a su propiedad de ionización en ambientes aerobios, mientras que sin oxígeno las nanopartículas demostraron no tener efecto antimicrobiano (Zong-ming *et al*, 2012). El mecanismo de acción propuesto se encuentra representado en la Fig.1.

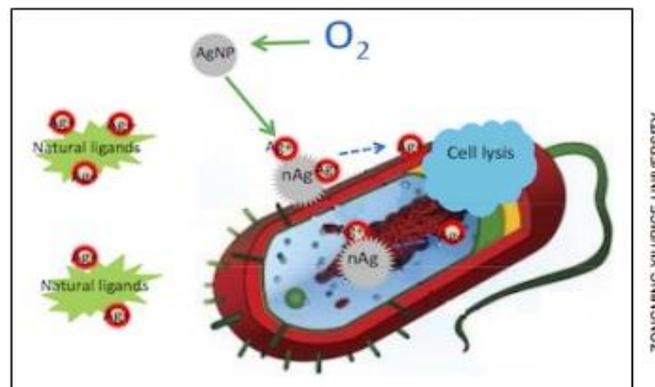


Figura 1: Representación del mecanismo de acción de las nanopartículas de Ag esféricas sobre la superficie bacteriana. Extraído de (Zong-Ming *et al*, 2012).

Se ha observado que ante la presencia de los iones de  $Ag^+$  las bacterias generaban una condensación del ADN, lo cual podría significar un posible mecanismo de defensa de las mismas frente a estos compuestos tóxicos. Además los iones metálicos podrían generar la separación del citoplasma y la pared celular, lo cual sería la causa de la inhibición

de la multiplicación de las células bacterianas, tanto en bacterias (Gram +) como en (Gram -) (Feng *et al*, 2000).

Debido a las controversias existentes, en este proyecto se consideró interesante realizar una comparación de la actividad antibacteriana de diferentes tipos de nanopartículas metálicas y su mecanismo de acción.

### 3. Hipótesis

Muchos investigadores sugirieron que las nanopartículas de Ag y Cu podrían actuar como agentes antimicrobianos. Es por ello que en este trabajo se propuso lograr la síntesis de nanopartículas de plata y cobre para luego comprobar los efectos bactericidas sobre *E. coli* y *S. aureus*.

Dado que las características fundamentales de las nanopartículas metálicas dependen fuertemente de su forma, tamaño, composición y la cristalinidad (Santos *et al*, 2013), la hipótesis inicialmente planteada en este proyecto fue que modificando la composición, forma y tamaño de las nanopartículas, las mismas deberían mostrar diferencias en sus propiedades antimicrobianas.

Además, al existir escasa cantidad de reportes disponibles contrastando los efectos de las nanopartículas de Ag y Cu sobre cepas bacterianas (Gram +) y (Gram -), se esperaba verificar que ambos metales en tamaño nanométrico actúen de manera similar en su mecanismo de acción antimicrobiano.

Para corroborar estas hipótesis, el proyecto se llevó a cabo en dos partes: en primer lugar se realizaron síntesis de tres tipos de nanopartículas de plata: dos tipos de nanoesferas de plata, mediante el empleo de citrato de sodio y borohidruro de sodio como reductores y estabilizantes; y nanoprismas de plata, utilizando borohidruro de sodio y peróxido de hidrógeno. En segundo lugar, se buscó lograr la síntesis de nanopartículas de cobre mediante reducción química en medio acuoso. Las nanopartículas fueron ensayadas luego, mediante experimentos microbiológicos sobre *E. coli* y *S. aureus*, con el fin de detectar su actividad antimicrobiana, contrastándola con soluciones blanco de iones de plata.

## 4. Metodología

La síntesis de nanopartículas en el presente proyecto se realizó con técnicas de tipo *bottom-up*, utilizando síntesis químicas, en medio acuoso. Estas síntesis están basadas en la reducción química de sales metálicas en presencia de agentes estabilizantes, que controlan la forma y el tamaño de las nanopartículas obtenidas.

Dentro de los beneficios de trabajar con síntesis químicas se encuentran: la reproducibilidad, la disponibilidad de reactivos y los bajos costos de producción. A su vez, el trabajo con síntesis químicas permite introducir una mayor precisión al sistema, logrando controlar adecuadamente la forma y tamaño de las partículas.

### 4.1. Síntesis de nanopartículas de plata esféricas

#### 4.1.1. Obtención de nanopartículas de Ag estabilizadas con citrato

De acuerdo con lo reportado por Lee y Meisel (1982), se disolvieron 45 mg de  $\text{AgNO}_3$  (Aldrich, Misuri, Estados Unidos) en 250 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  y se llevó a ebullición. Se agregó luego 5 ml de una solución al 1% de citrato de sodio (Aldrich, Misuri, Estados Unidos) y se mantuvo la solución en hervor por 1 hora. El medio que se utiliza para llevar a cabo la reacción es agua MilliQ (Millipore, resistencia  $18 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$ ).

En esta síntesis, el citrato de sodio actúa como reductor y estabilizante de las nanopartículas obtenidas, por lo que se coloca en gran exceso respecto de la reacción de reducción estequiométrica.

Mediante esta síntesis se obtuvo, una suspensión de nanopartículas de plata de una concentración de 114,22 ppm (mg de Ag/l), basado en la estimación de que toda la  $\text{Ag}^+$  presente en la solución inicial se redujo a Ag metálica.

Los cálculos de las concentraciones de las suspensiones de nanopartículas esféricas de plata reducidas con citrato, se encuentran en el Apéndice 1.

#### 4.1.2. Obtención de nanopartículas de Ag estabilizadas con borohidruro

Empleando la síntesis planteada por Mavani y Shah (2013), se colocaron 187,5 ml de solución 0,002 M de  $\text{NaBH}_4$  (Aldrich, Misuri, Estados Unidos) recién preparada en un erlenmeyer de 250 ml, luego se colocó éste dentro de un baño de agua y hielo; y se dejó enfriar por aproximadamente 20 minutos. Luego de transcurrido este tiempo, el

erlenmeyer se dispuso sobre una placa agitadora magnética y se comenzó a agitar rápidamente. Seguidamente, se agregaron, gota a gota 62,5 ml de solución 0,001 M de  $\text{AgNO}_3$ . Se detuvo la agitación inmediatamente después de terminar de agregar la solución de  $\text{Ag}^+$ . Finalmente, se incorporó todo al mismo volumen (250 ml) de solución de citrato de sodio  $1,5 \times 10^{-3}$  M y se mezcló cuidadosamente.

En este caso, el borohidruro de sodio actúa como reductor y estabilizante, y el citrato se agrega como estabilizante adicional, ya que es más efectivo a largo plazo que el primero. A partir de esta reacción, se obtuvo una suspensión de nanopartículas de una concentración de 13,48 ppm (mg de Ag/l).

Los cálculos de las concentraciones de las suspensiones de nanopartículas esféricas de plata reducidas con borohidruro se presentan en el Apéndice 2.

#### **4.1.3. Dilución de las nanopartículas reducidas con citrato**

Para que ambas soluciones de nanopartículas presentaran la misma concentración se procedió a realizar una dilución de las nanopartículas obtenidas por el método de citrato llevándolas a un volumen de 500 ml. Para ello, se tomaron 59 ml de la solución de nanopartículas y se añadió agua MilliQ hasta obtener un volumen final de 500 ml. De esta forma, las nanopartículas reducidas con citrato contenían una concentración final de Ag equivalente a 13,48 ppm (mg de Ag/l).

Los cálculos realizados para efectuar la dilución de las nanopartículas esféricas preparadas con citrato se presentan en el Apéndice 2.1.

#### **4.1.4. Concentración de las nanoesferas de Ag recubiertas con borohidruro**

Por requerimiento de los ensayos microbiológicos (ver sección 5.4.3.3), fue necesario concentrar las nanopartículas obtenidas mediante la reducción con borohidruro de sodio y, para ello, se plantearon dos procedimientos:

- 1- Realizar la síntesis aumentando la concentración de los reactivos: nitrato de plata, borohidruro de sodio, y citrato de sodio.
- 2- Utilizar la misma síntesis y concentrar las nanopartículas obtenidas mediante centrifugación.

#### **4.1.5. Síntesis de nanopartículas recubiertas con borohidruro concentradas**

Utilizando una concentración de 114,22 ppm de Ag, para la síntesis planteada en el ítem 1, se procedió a colocar 187,5 ml de solución 0,0169 M de  $\text{NaBH}_4$  (recién preparada) en un erlenmeyer de 250 ml, dentro de un baño de agua y hielo. Se dejó enfriar por aproximadamente 20 minutos, y luego se dispuso el erlenmeyer sobre una placa agitadora magnética. Se agregaron, gota a gota 62,5 ml de solución 0,008 M de  $\text{AgNO}_3$ . Se detuvo la agitación inmediatamente después de terminar de agregar la solución de  $\text{Ag}^+$ . En última instancia, se incorporó todo al mismo volumen (250 ml) de solución de citrato de sodio 0,0127 M.

#### **4.1.6. Centrifugación de nanopartículas recubiertas con borohidruro**

Para llevar a cabo la concentración de las partículas estipuladas en el ítem 2, se utilizó una centrífuga de 9000 rpm, durante una hora. De esta manera, se logró concentrar a aproximadamente el doble la concentración de las nanopartículas recubiertas con borohidruro de sodio y citrato de sodio, siendo la misma de 26,96 ppm (mg Ag/l). Mediante esta metodología, se obtuvieron 50 ml finales de solución.

#### **4.1.7. Soluciones blanco de nanoesferas de Ag diluidas**

Se prepararon soluciones blanco empleando las mismas condiciones de síntesis que se utilizaron previamente, reemplazando por agua MilliQ cada uno de los compuestos.

##### Blanco de nitrato de plata<sup>1</sup>

Se tomaron 0,0106 g de  $\text{AgNO}_3$  y se añadieron 500 ml de agua bidestilada, para obtener una solución final de nitrato de plata 13,48 ppm (mg Ag/l).

##### Blanco de borohidruro y citrato

Se preparó una solución de 187,5 ml de  $\text{NaBH}_4$  0,002 M y se la colocó en un baño de agua y hielo, y se procedió a agitar. Posteriormente se añadieron, gota a gota, 62,5

---

<sup>1</sup> Para los blancos denominados como “blanco de nitrato de plata”, la concentración de la solución se encuentra expresada en ppm en base a los iones de  $\text{Ag}^+$ .

ml de agua bidestilada. Finalmente se añadieron 250 ml de una solución de citrato de sodio  $1,5 \times 10^{-3}$  M.

#### Blanco de citrato

Se tomaron 0,05 g de citrato de sodio, y se añadieron 250 ml de agua bidestilada. Luego se diluye la solución, llevándola a 500 ml.

#### **4.1.8. Soluciones blanco de nanoesferas de Ag concentradas**

Los blancos utilizados fueron preparados en base a las nanopartículas sintetizadas con la mayor concentración de plata de 114,22 ppm (mg Ag/l), la concentración que tenían las nanopartículas sintetizadas con el método del citrato antes de realizar la dilución de las mismas.

#### Blanco de nitrato de plata

Se disolvieron 0,044 g de  $\text{AgNO}_3$  en 250 ml de agua bidestilada

#### Blanco de borohidruro y citrato

Se obtiene una solución de 250 ml, para ello se disuelven 0,014 g de  $\text{NaBH}_4$  (93,75 ml); 0,096 g de citrato de sodio (125 ml), y se completa el volumen con 31,25 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada.

#### Blanco de citrato

Se disuelven 0,05 g de citrato de sodio en 250 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada.

#### **4.2. Síntesis de nanoprismas de plata**

El procedimiento experimental por el cual se llevó a cabo la síntesis de los nanoprismas de plata se basó en lo establecido Frank y colaboradores (Frank et al, 2010), quienes describieron un procedimiento adecuado con el fin de controlar la forma y el tamaño en 2 dimensiones de nanopartículas de Ag, permitiendo obtener nanoprismas de diferentes tamaños. En el presente trabajo se eligió una de las condiciones reportadas, la que da lugar a los prismas de mayor tamaño (ver detalles de caracterización en la sección 5.3.1. y 5.3.2.).

En un Erlenmeyer de 250 ml se agregaron, en el orden listado, 34,48 ml de citrato de sodio  $1,25 \times 10^{-2}$  M, 86,20 ml de nitrato de plata  $3,75 \times 10^{-4}$  M, y 86,20 ml de peróxido de hidrógeno (Biopack, Buenos Aires, Argentina)  $5,0 \times 10^{-2}$  M. Finalmente, para el paso de la reducción de plata, se agregan 43,10 ml de solución  $5 \times 10^{-3}$  M de borohidruro de sodio. Una vez combinados los reactivos, se procede a mezclar cuidadosamente hasta que la reacción se evidencie mediante cambios en el color, que se relacionan con el crecimiento de los nanoprismas de plata.

En este caso, el borohidruro actúa como reductor, el citrato como estabilizante y el agua oxigenada ayuda a dar la forma final a las partículas obtenidas, ya que redissuelve esferas pequeñas que se van formando durante la síntesis. La concentración de Ag final para este experimento fue de 13,94 ppm (mg de Ag/l).

Los cálculos realizados para la obtención de los nanoprismas de plata se presentan en el Apéndice 3.

#### **4.2.1. Concentración de la solución de nanoprismas de plata**

La solución obtenida tras la síntesis se centrifugó durante 90 minutos a 8000 rpm en una centrífuga de rotor fijo, separada en porciones de 30 ml. En cada uno de los tubos se descartaron aproximadamente 27ml del sobrenadante, de manera de obtener una solución 10 veces más concentrada que la original.

#### **4.2.2. Solución blanco de nanoprismas de Ag**

En un Erlenmeyer de 50 ml, se agregaron de forma tal que la solución sea 10 veces más concentrada que en el protocolo de síntesis original: 0,11 g de citrato de sodio, 1,4 ml de  $H_2O_2$  y 0,0081 g de  $NaBH_4$ , y se completó el volumen final con agua MilliQ hasta llegar a 25 ml.

### **4.3. Caracterización de las nanopartículas de plata**

Se procedió a la caracterización de las nanopartículas obtenidas para determinar diversas propiedades de las mismas. Esto se llevó a cabo mediante la utilización de diferentes técnicas: Espectrofotometría UV-visible, medición del pH y caracterización de nanoprismas por SEM.

#### **4.3.1. Espectrofotometría UV-visible**

Se realizaron mediciones del espectro de absorción UV-visible de las distintas soluciones preparadas, para comprobar que la forma y tamaño de las nanopartículas de Ag sintetizadas. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro con arreglo de diodos HP8453, en el rango 200-1000 nm.

Se sabe que las nanopartículas de Ag presentan una banda de resonancia característica del plasmón de superficie localizado (LSPR) definida en el intervalo de, 300-500 nm para las nanoesferas y de 400-800 nm para los nanoprismas (Liz-Marzán, 2004).

Luego de transcurrido un año, se procedió a medir nuevamente el espectro de absorción de las nanopartículas sintetizadas durante el comienzo del trabajo (nanoesferas reducidas con citrato de sodio y con borohidruro de sodio). De esta manera, se corroboró el efecto del tiempo sobre el agregado o de desestabilización de las partículas.

#### **4.3.2 Medición del pH**

Debido a que el pHmetro no se puede sumergir en las suspensiones de nanopartículas, las mediciones se realizaron mediante cintas colorimétricas. Se midió el pH de cada una de las soluciones preparadas: nanopartículas de Ag concentradas (aproximadamente 114 ppm), blancos de nanopartículas y los dos blancos de AgNO<sub>3</sub>. Es relevante que no se presente una concentración elevada de H<sup>+</sup>, es decir, una acidez elevada, ya que podría interferir en el desarrollo de las cepas bacterianas.

#### **4.3.3. Caracterización de nanoprismas por SEM**

Las suspensiones de nanoprismas se observaron mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido, (SEM, por su nombre en inglés: Scanning Electron Microscope). Se dispuso para ello, una gota de la muestra de nanoprismas sobre placas de silicio y se la dejó secar. Finalmente, la placa de Si se fijó a un taco de aluminio para microscopía. Las medidas se realizaron en un microscopio SEM de efecto de campo ZEISS LEO GEMINI (Centro de Microscopías Avanzadas, FCEyN, UBA)

### **4.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana de nanopartículas de Ag**

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas obtenidas, se utilizaron como microorganismos indicadores las cepas *Staphylococcus aureus*

ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922, cedidas por la Universidad Nacional de Luján. Los métodos empleados fueron la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante la técnica de dilución en caldo, y la técnica de difusión radial en agar.

Todos los experimentos microbiológicos se realizaron por duplicado, en condiciones de esterilidad, bajo campana de flujo laminar (Microfilter SA, Buenos Aires, Argentina) o bajo mechero, según corresponda, utilizando las técnicas asépticas microbiológicas habituales para aislamientos y recuentos en medios sólidos, siembras en medios líquidos y manipulación de instrumental (micropipetas, ansas).

#### 4.4.1. Cepas empleadas y condiciones de conservación

En este estudio se utilizaron las cepas de colección *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922, usualmente empleadas en determinaciones de actividad antimicrobiana.

Los cultivos se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  en Caldo Cerebro Corazón (Brain Heart Infusion, o BHI por su sigla en inglés) suplementado con glicerol 10% v/v. Para el almacenamiento por períodos breves, las cepas se repicaron semanalmente en tubos con picos de flauta de Agar Tripto-caseína de Soja (Trypto-casein Soy Agar, o TSA por su sigla en inglés), incubadas 24 h a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  en estufa de cultivo (FAC, Buenos Aires, Argentina) y posteriormente almacenadas a  $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Para corroborar pureza e identificación, las cepas fueron sometidas periódicamente a tinción de Gram y pruebas bioquímicas seleccionadas: crecimiento en Agar ENDO y pruebas de indol, de rojo de metilo, de Voges Proskauer y de utilización de citrato para *E. coli*; crecimiento en Agar Baird Parker y prueba de la coagulasa para *S. aureus*.

La composición de los medios de cultivos y reactivos empleados y la descripción de las pruebas para determinación de la pureza e identificación de las cepas se reportan en los Anexos 9.1 y 9.2, respectivamente.

#### 4.4.2. Preparación de inóculos a utilizar en los ensayos antimicrobianos

Para la preparación de los inóculos a emplear en los estudios, una ansada del cultivo stock congelado o refrigerado de cada cepa se transfirió a BHI y se incubó estáticamente durante 18 h a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Luego de una segunda transferencia bajo condiciones similares,

los cultivos obtenidos se utilizaron como inóculo para los ensayos realizados y paralelamente se determinó la carga celular mediante recuento en placa. Para ello, se realizaron diluciones seriadas decimales de los cultivos hasta la dilución  $10^{-7}$ , empleando tubos con 9 ml de agua peptonada (0,1 % de peptona de carne en agua destilada) y micropipetas y tips de 1000  $\mu$ l para hacer las transferencias correspondientes. A partir de cada dilución se sembraron 100  $\mu$ l en placas con medio TSA, y el volumen sembrado se distribuyó por la superficie con espátula de Drigalsky, en condiciones asépticas y bajo campana de flujo laminar horizontal. Las placas se incubaron invertidas durante 24 – 48 horas a 37°C, al cabo de las cuales se procedió al conteo del número de colonias desarrolladas.

Para el cálculo del número de unidades formadoras de colonias/ml se usó la fórmula:

$$\text{ufc/ml: } N^{\circ} \text{ de colonias} \times \text{factor dilución} \times \text{factor volumen} \quad (1)$$

Donde, el N° de colonias corresponde a la cantidad de colonias total contadas sobre la placa de TSA, el factor dilución se corresponde a la inversa de la dilución bacteriana que se utilizó para sembrar la placa que se está contando (1/dilución bacteriana), y el factor volumen equivale a la inversa del volumen sembrado en la placa (1/vol sembrado).

#### **4.4.3. Determinación de la CIM mediante la técnica de dilución en caldo**

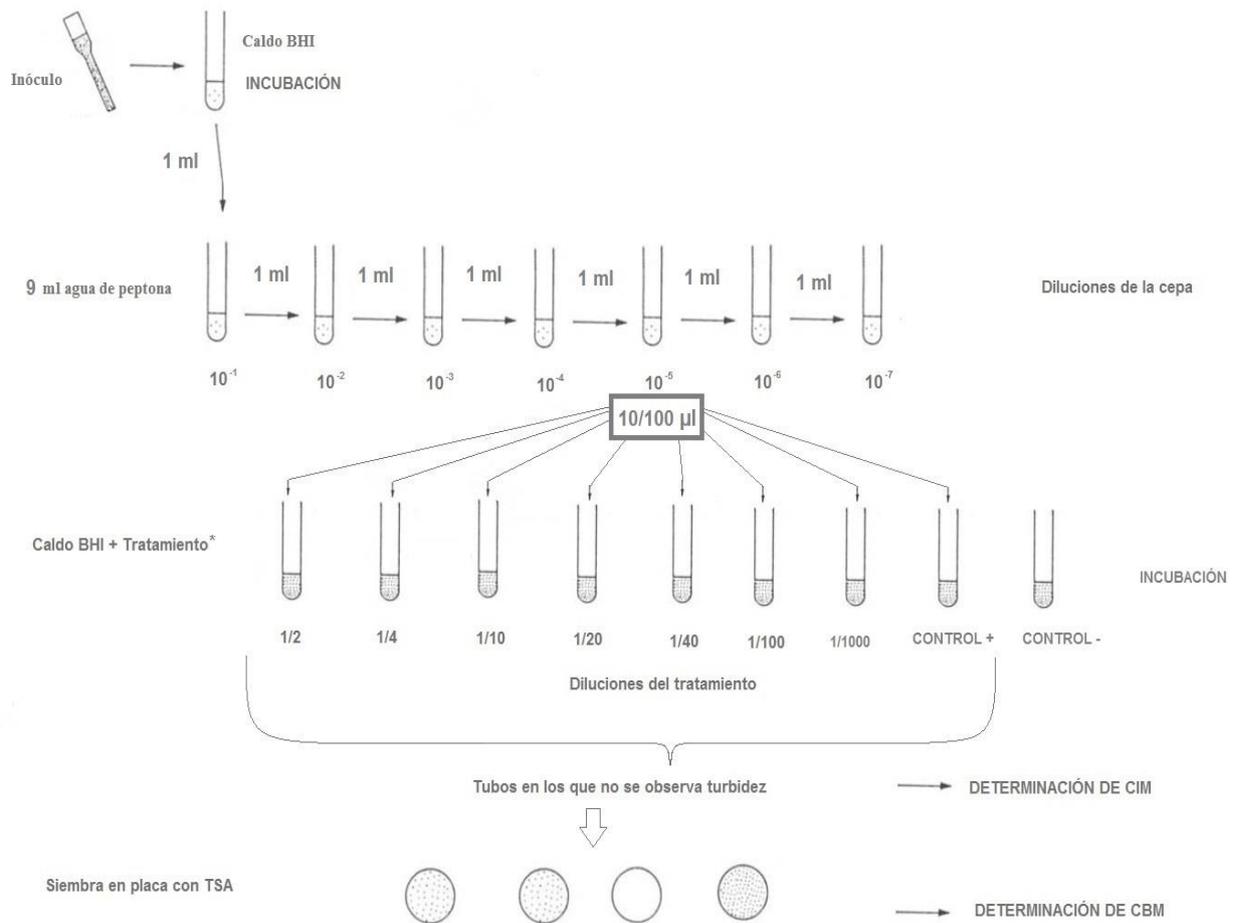
La CIM es la menor concentración de determinado agente antimicrobiano que inhibe el desarrollo *in vitro* de los microorganismos. Para su determinación, mediante la técnica de dilución en caldo, se colocan concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano en una serie de tubos con medio de cultivo líquido (caldo) que se inoculan con las bacterias empleadas como indicadores y se incuban en las condiciones de tiempo y temperatura óptimas para las mismas. Como controles se incuban también un tubo sin inocular (control de esterilidad) y un tubo inoculado pero sin agente antimicrobiano (control de crecimiento). Al cabo de la incubación se observa en los caldos la presencia de turbidez, que indica que el microorganismo ha desarrollado. El microorganismo crecerá en el control positivo y en los tubos que no contengan la suficiente cantidad de agente antimicrobiano para inhibirlo. La CIM será la menor concentración en la que no se observa desarrollo (Vullo *et al*, 2000). A partir de los tubos donde no se observó crecimiento se puede determinar la concentración bactericida mínima (CBM) que es la menor concentración del agente

antimicrobiano que no sólo inhibe a las bacterias sino que también las destruye. Para esto, se efectúa el subcultivo del contenido de los tubos que no presentaron desarrollo en placas con medio agarizado, se incubaba a las condiciones óptimas para el microorganismo indicador, y se observa posteriormente el desarrollo o no de colonias visibles. El tubo con la menor concentración de antimicrobiano que al ser subcultivado no da lugar al desarrollo de colonias, determina la CBM del agente en estudio (López Tevez y Torres, 2006).

Para determinar la CIM y poder obtener resultados comparables entre los tratamientos se deben estandarizar numerosas variables como por ejemplo, tamaño de inóculo, medio utilizado, volúmenes de medio de cultivo a emplear, entre otros factores (Vullo *et al* 2000), lo cual obliga a realizar ensayos preliminares para la puesta a punto del protocolo a emplear en la determinación.

En este trabajo, la determinación de la CIM de los diferentes tipos de nanopartículas sintetizadas sobre las cepas empleadas como indicadores (*E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923) se realizó en BHI; en algunos ensayos se ha determinado además la CBM en TSA. La incubación en todos los ensayos ha sido en condiciones estáticas, a 37° C durante 24 horas, al cabo de las cuales se observó la presencia o no de desarrollo de los microorganismos.

En la Fig. 2 se esquematiza el diseño del experimento empleado para la determinación de la CIM y de la CBM de las nanopartículas sintetizadas. Los mismos se llevaron a cabo luego de la realización de los ensayos preliminares y de la puesta a punto de la metodología, y se efectuaron tanto para *E. coli*, como para *S. aureus*. Como control positivo se incubaba un tubo de BHI inoculado con la cepa que corresponde pero sin agente antimicrobiano, y como control de esterilidad se incubaba un tubo con BHI sin inocular (control -).



\*: Tratamientos: NP citrato, NP borohidruro, Nanoprismas, nitrato de plata, blanco de citrato, blanco de borohidruro, blanco de nanoprismas

Figura 2: Representación gráfica de los ensayos realizados para la determinación de la CIM y la CBM de cada uno de los tratamientos, para cada una de las cepas bacterianas y sus controles.

#### 4.4.4. Evaluación de la actividad inhibitoria por ensayo de difusión en agar

Un método alternativo para la evaluación de la actividad inhibitoria de agentes antimicrobianos en la técnica de difusión en agar. Este sistema permite probar la eficacia de varios antimicrobianos al mismo tiempo. Sobre la superficie de una placa de agar se realiza la siembra de una suspensión bacteriana calibrada y a continuación se realizan en el agar pocillos u orificios equidistantes donde se colocan las sustancias antimicrobianas a testear. Las sustancias difundirán al medio circundante creando así concentraciones progresivamente decrecientes. Las placas se incuban entonces a la temperatura y tiempo óptimos para el

desarrollo de la bacteria que se utiliza como indicadora. Al término de la incubación, en la zona donde el antimicrobiano impide el crecimiento aparece un halo de inhibición alrededor del pocillo. Las zonas de inhibición dependen de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas que influyen *in vitro* sobre la velocidad de difusión en el agar.

Los diámetros generados en zonas de inhibición (DIZ) reflejan la magnitud de susceptibilidad del microorganismo en estudio. De esta forma, la cepa con mayor susceptibilidad a las nanopartículas debería exhibir un mayor DIZ, mientras que las cepas con mayor resistencia deberían exhibir un menor DIZ (Ruparelia, 2008).

En este trabajo, para la utilización de esta técnica se utilizaron placas de Petri conteniendo medio TSA, sobre el cual se sembraron 100 microlitros de un cultivo overnight de las cepas indicadoras en BHI y se distribuyeron con espátula de Drigalsky. Posteriormente, se realizaron en las placas ya sembradas 5 orificios circulares con la parte trasera de un tip estéril, dispuestos en forma de cruz. En cada orificio se sembraron 20  $\mu$ l de los tratamientos o controles correspondientes. Los tratamientos evaluados fueron: nanoesferas de Ag recubiertas con borohidruro y citrato, los nanoprismas de Ag con sus respectivos blancos y  $\text{AgNO}_3$ . Además, se incorporaron otros controles, uno negativo (posición central en la placa) utilizando para ello agua destilada (que no provoca inhibición bacteriana) y un control positivo correspondiente a peróxido de hidrógeno al 3%, que provoca inhibición del crecimiento de las dos cepas empleadas en los ensayos. Para cada cepa se sembraron las placas con la disposición indicada en la Fig. 3. Las placas se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas, al cabo de las cuales se observó la presencia o no de halos de inhibición.

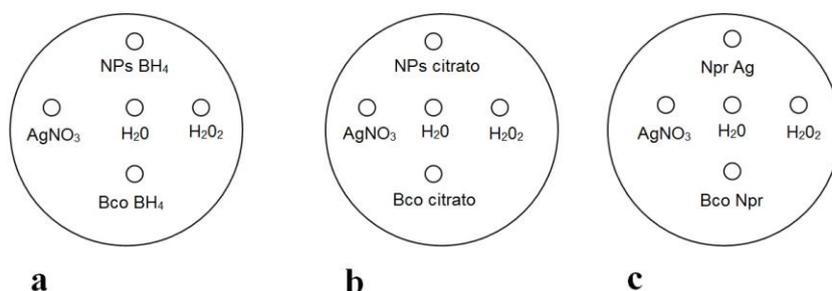


Figura 3: Esquema del ensayo de difusión en agar. Placas con los tratamiento de: nanoesferas reducidas con borohidruro (a); nanoesferas reducidas con citrato (b) y nanoprismas de plata (c) con sus respectivos blancos en la parte inferior, el blanco de nitrato de plata a la izquierda, un control negativo en el centro y un control positivo a la derecha.

#### **4.5 Ensayos preliminares para la puesta a punto de la determinación de la CIM por la técnica de dilución en caldo**

Se realizaron ensayos preliminares para determinar si las nanopartículas de plata esféricas presentaban efecto antimicrobiano, y posteriormente, para estandarizar el inóculo (concentración celular y volumen), volumen de medio a emplear, y el rango de concentraciones de nanopartículas a abordar en la determinación de la CIM.

El primer ensayo consistió en utilizar a las nanoesferas como medio líquido para incubar las cepas bacterianas y en un segundo ensayo se corroboró la presencia residual de peróxido de hidrógeno en la suspensión de nanoprismas aplicadas de forma directa sobre las colonias bacterianas de *E. coli* y *S. aureus*.

Posteriormente, para proceder con la puesta a punto en la determinación de la CIM se realizó un último ensayo utilizando inicialmente las nanopartículas de Ag esféricas con menor concentración de Ag correspondiente a 13,48 ppm (mg Ag/l) y luego, se trabajó con concentraciones de Ag superiores: 114,22 ppm (mg Ag/l) para las nanoesferas reducidas con citrato y 26,96 ppm (mg Ag/l) para las nanoesferas reducidas con borohidruro concentradas.

Como inóculo en estos ensayos se emplearon 100 µl de las diluciones  $10^{-1}$  (carga celular  $\approx 10^7$  ufc/ml) y  $10^{-6}$  (carga celular  $\approx 10^2$  ufc/ml) de los cultivos de 24 h de *E. coli* y *S. aureus*.

Los tratamientos empleados en la puesta a punto corresponden a: las nanoesferas de plata reducidas con citrato, las nanoesferas de plata reducidas con borohidruro, el blanco de nitrato de plata, el blanco de citrato de sodio y el blanco de borohidruro+citrato de sodio.

##### **4.5.1. Ensayo 1: Detección preliminar del efecto antimicrobiano de nanoesferas de plata**

En este ensayo se intentó comprobar la efectividad antimicrobiana de las nanopartículas. Se colocaron en tubos de ensayo estériles un volumen de 5 ml de cada uno de los tratamientos para cada cepa bacteriana y se sembraron luego con  $10^2$  células de *E. coli* y *S. aureus*. Luego de transcurrir una hora, se tomaron con una micropipeta 100 µl de cada uno de los tubos sembrados y se los colocó en 4,5 ml de medio de cultivo BHI y se lo incubó por 24 h a 37°C.

Los tratamientos utilizados en este ensayo preliminar fueron: las nanoesferas de citrato, las nanoesferas de borohidruro y el blanco de nitrato de plata con concentraciones de Ag iguales a 13,48 ppm (mg Ag/l).

#### **4.5.2. Ensayo 2: Detección de presencia de peróxido residual en nanoprismas de plata**

Como ya se mencionó, para la síntesis de nanoprismas de Ag se utilizó peróxido de hidrógeno. A pesar de que el mismo debería haberse descompuesto por el paso del tiempo, según lo establecido por Nitinaivinij *et al* (2014), se evaluó su posible presencia residual en la suspensión de nanoprismas mediante el método biológico de la prueba de la catalasa.

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> actúa como un agente oxidante mediante la producción de radicales libres hidroxilo (-OH), que atacan los componentes esenciales de la célula, incluyendo los lípidos, las proteínas, el ADN y los grupos *target* más comunes como los sulfhidrilo y los dobles enlaces (Raza *et al*, 2016). Frente a este agente inhibidor, las bacterias presentan un mecanismo de defensa mediante el cual la acción de la enzima catalasa convierte a este compuesto tóxico en especies menos reactivas como el agua y el oxígeno (Zhao *et al*, 2016). De esta forma, la cantidad de formación de burbujas por desprendimiento del oxígeno liberado en la placa indicará de manera proporcional la cantidad de peróxido en los tratamientos ensayados.

Para llevar a cabo el ensayo se colocaron, utilizando una micropipeta, 100 µl de tratamiento directamente sobre las cepas de *S. aureus* y *E. coli* crecidas sobre una placa de agar TSA. Los tratamientos ensayados fueron: los nanoprismas de Ag (140 ppm), el blanco de nanoprismas (0,16 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y un control positivo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con concentración del 3%.

#### **4.5.3. Ensayo 3: Puesta a punto en la determinación de la CIM con nanoesferas de Ag de diferente concentración**

El objetivo de este ensayo fue determinar si era posible determinar la CIM empleando medio de cultivo BHI y diluciones decimales de las suspensiones de nanopartículas esféricas de Ag inoculándolos con las cargas 10<sup>6</sup> y 10<sup>2</sup> de *S. aureus* y *E. coli*. Las diluciones de nanopartículas ensayadas fueron 1/10, 1/100 y 1/1000. Para ello se colocaron 0,5 ml de cada tratamiento en 4,5 ml de un tubo con medio de cultivo BHI y con

una micropipeta p1000 se procedió a efectuar las diluciones decimales correspondientes. Luego se inocularon las cargas bacterianas de cada cepa a los tubos de BHI+tratamiento. Transcurrido el tiempo de incubación a 37°C durante 24 h, se observó si hubo crecimiento de las cepas.

En este ensayo se utilizaron cinco tratamientos correspondientes a las dos síntesis de nanopartículas esféricas de Ag (reducidas con borohidruro y reducidas con citrato), al blanco de AgNO<sub>3</sub> y a los blancos de citrato y borohidruro. Con lo cual, al efectuar las 3 diluciones decimales de cada uno de los tratamienos se utilizaron en total 15 tubos de ensayo con 4,5 ml de medio BHI por cada cepa, con sus respectivos duplicados.

Sobre la base del diseño experimental descripto se ensayaron nanopartículas de Ag con concentración de 1,35 ppm, 0,13 ppm y 0,013 ppm, inoculadas con cargas bacterianas iguales a 10<sup>6</sup> y 10<sup>2</sup> cel/ml. Luego, se ensayaron nanopartículas de Ag estabilizadas con citrato con concentraciones de 11,42 ppm, 1,14 ppm y 0,114 ppm, y nanopartículas de Ag estabilizadas con NaBH<sub>4</sub> de 2,7 ppm, 0,27 ppm y 0,027 ppm, con cargas bacterianas de 10<sup>6</sup> cel/ml.

#### **4.6. Determinación de CIM con nanoesferas de Ag**

Los siguientes ensayos tuvieron como objetivo determinar la CIM en mg/l o ppm de las suspensiones de nanoesferas de Ag reducidas con citrato y de nanoesferas de Ag reducidas con borohidruro. De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos previos, se realizaron las determinaciones de CIM con las nanoesferas reducidas con citrato de 114,22 ppm y 26,96 ppm para las nanoesferas reducidas con borohidruro de sodio.

En estos experimentos se trabajó únicamente con el blanco de citrato de sodio y el de nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>), dado que los efectos de los blancos con borohidruro de sodio y citrato de sodio fueron verificados en los experimentos anteriores.

Los tubos de los tratamientos se inocularon con una carga celular  $\approx 10^1$ -  $10^2$  ufc/ml. Todos los experimentos con nanoesferas de Ag, fueron realizados por duplicado.

##### **4.6.1. Determinación de la CIM en nanoesferas de Ag recién sintetizadas**

En este ensayo, se midió el efecto inhibitorio de las nanopartículas empleando cargas bacterianas, correspondientes a 10<sup>1</sup> - 10<sup>2</sup> cel/ml de *S. aureus* y *E. coli*, según corresponda, a partir de las diluciones del cultivo de 24 h de cada cepa. A partir de la

suspensión de Np de 114,22 ppm para las nanoesferas reducidas con citrato y 26,96 ppm para las nanoesferas reducidas con NaBH<sub>4</sub>, se ensayaron en tubos con BHI diluciones crecientes de nanopartículas del orden: 1/2, 1/4, 1/10, 1/20, 1/40 y 1/100, correspondientes a las concentraciones 57,11; 28,55; 11,42; 5,71; 2,85; 1,14 y 13,5; 6,75; 2,7; 1,35; 0,67; 0,37 ppm, respectivamente. Los tratamientos se incubaron a 37°C a 24 h al cabo de las cuales se observó presencia o no de turbidez en cada tubo. Se hicieron 3 replicas de cada ensayo, con su respectivo duplicado.

#### **4.6.2. Determinación de la CIM en nanoesferas de Ag envejecidas**

En el ensayo de determinación de la CIM para nanoesferas de Ag envejecidas, se utilizó una carga bacteriana de 10<sup>2</sup> células para *S. aureus* y para *E. coli*. En tubos con caldo BHI se ensayaron las diluciones 1/4 y 1/10 de las suspensiones de nanopartículas con concentraciones iguales a 28,55 y 11,42 ppm para las nanoesferas reducidas con citrato y 6,75 y 2,7 ppm para las nanoesferas reducidas con borohidruro, que ya contaban con un envejecimiento de un año. Los tratamientos se incubaron 24 h a 37°C, al cabo de los cuales se observó presencia o no de turbidez en los tubos. A efectos de determinar la concentración bactericida mínima (CBM), de acuerdo a lo sugerido por Avadi y colaboradores (Avadi *et al*, 2004), a partir de los tubos de BHI que no presentaron turbidez, se transfirieron 100 µl a placas con agar TSA, se distribuyeron con espátula de Drigalsky y se incubaron 24 h a 37°C, al cabo de los cuales se determinó la presencia o no de desarrollo sobre las placas.

### **4.7. Ensayos microbiológicos con nanoprismas de Ag**

#### **4.7.1. Determinación de la CIM en nanoprismas de Ag**

En este ensayo se utilizaron nanoprismas de Ag para comparar su efectividad en *S. aureus* y *E. coli* y contrastarlas con los efectos producidos por nanopartículas esféricas.

En el presente experimento de determinación de la CIM con nanoprismas de Ag de concentración 140 ppm (mg Ag/l), se aplicó las mismas condiciones que en los ensayos microbiológicos realizados con nanoesferas de Ag. Las cargas bacterianas ensayadas fueron de 10<sup>1</sup>– 10<sup>2</sup> células para *S. aureus* y para *E. coli*.

Sobre la base del diseño experimental ya descrito, en tubos con caldo BHI se ensayaron las diluciones 1/2, 1/4, 1/10 y 1/20 de las nanoprismas de Ag con concentraciones iguales a 70, 35, 14 y 7 ppm y se contrastaron con su blanco correspondiente y con el blanco

de  $\text{AgNO}_3$ . Una vez inoculados los tratamientos, los tubos se incubaron 24 h a  $37^\circ\text{C}$  al cabo de lo cual se observó presencia o no de turbidez. En los tubos en los que no se observó turbidez se procedió a sembrar con 100  $\mu\text{l}$  una placa con agar TSA. De esta forma, se determinó finalmente si la concentración inhibitoria mínima ocasionaba un efecto bactericida, observado por la ausencia de desarrollo en la placa, obteniendo así la CBM (concentración bactericida mínima) de los nanoprismas de Ag.

#### **4.8. Análisis estadístico**

Los resultados de los ensayos microbiológicos con nanopartículas de Ag se sometieron a los test estadísticos utilizando el programa estadístico *Infostat* FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Las variables medidas fueron las CIM en ppm (mg Ag/l) correspondientes a cada uno de los tratamientos con nanoesferas y nanoprismas evaluados en este trabajo, en contraste con los iones metálicos (blanco del  $\text{AgNO}_3$ ). Para cada tratamiento fue seleccionado un  $n$  poblacional igual a 5 correspondiente a los ensayos con nanopartículas de Ag con las dos cepas ensayadas (*E. coli* y *S. aureus*) los cuales fueron realizados por duplicado y de los que al menos se hicieron 3 réplicas técnicas.

Para cada tratamiento se realizó la estadística descriptiva, determinando la media, mediana, la varianza y el desvío estándar. La tendencia central se analizó luego mediante los gráficos de Box-Plot y Q-Q plot.

Para la comparación de las CIM entre las nanopartículas de Ag y el  $\text{AgNO}_3$  en cada cepa se realizaron los siguientes tests: prueba estadística de Shapiro-Wilks modificado para analizar el supuesto de normalidad, prueba de Levene para analizar el supuesto de homocedasticidad y finalmente la prueba estadística para el análisis de la varianza no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Las diferencias significativas para las CIM de cada tratamiento efectuado en *E. coli* y *S. aureus* se analizaron mediante las pruebas estadísticas para muestras independientes. Se utilizó la prueba t bilateral para los tratamientos efectuados con nanoesferas reducidas con borohidruro y con  $\text{AgNO}_3$ , y la prueba de Mann-Whitney (Wilcoxon) bilateral para las nanoesferas reducidas con citrato y para los nanoprismas. Por otra parte, para las diferencias entre los tratamientos que presentaron una CIM con efecto bactericida como los nanoprismas y el blanco de  $\text{AgNO}_3$  en *S. aureus* se estudiaron mediante la prueba de Mann-Whitney (Wilcoxon).

En los análisis estadísticos efectuados en este trabajo, para todos las pruebas se estableció un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ , indicando que un p-valor menor a ese valor supondría rechazar  $H_0$ .

## **4.9. Síntesis de nanopartículas de cobre**

### **4.9.1. Determinación de las condiciones de síntesis de nanopartículas de cobre**

Dado que la síntesis de nanopartículas de Cu en medio acuoso no está tan difundida como la síntesis de Nps de Ag. La dificultad principal de la preparación de las nanopartículas de cobre reside en su estabilidad, ya que se oxidan muy fácilmente por la exposición al aire (Dang, 2011). Existen varios trabajos en los que se supera este problema utilizando diferentes medios inertes, tales como: conservación en ambiente de argón o nitrógeno, uso de solventes orgánicos para la síntesis y/o uso de agentes protectores orgánicos específicos (Mittu, 2016). Sin embargo, la mayoría de estas condiciones de reacción no utilizan reactivos usuales y/o no son compatibles con los ensayos microbiológicos que se pretende realizar a continuación con las nanopartículas. Por lo tanto, fue necesario buscar en diversos artículos científicos métodos adecuados para la realización de la síntesis en condiciones acuosas y con los reactivos disponibles en los laboratorios de CNEA. Algunas metodologías empleadas debieron llevarse a cabo sin contar con todos los datos necesarios para su realización, efectuando por lo tanto ensayos exploratorios para lograr poner a punto la preparación de las nanopartículas. Los experimentos preliminares fueron realizados con el objetivo de preparar una solución de nanopartículas monodispersa, estable y pura; y además conseguir una correcta estandarización del método de síntesis. En primer lugar, se ensayó la reducción química de  $\text{Cu}^{2+}$  con ácido ascórbico, ya que fue reportado en diversos estudios. Las síntesis posteriores se realizaron con borohidruro de sodio y citrato de sodio como agentes reductores, en diferentes ensayos. Se utilizó borohidruro de sodio ya que tiene un poder reductor fuerte, y es un compuesto estable en diversas condiciones (Zhang *et al*, 2009). En el caso del citrato se utilizó como agente reductor ya que es sabido que funciona tanto para la reducción así como también para la estabilización de las partículas de plata (Pacioni *et al*, 2015). Por lo tanto se generó un protocolo para analizar su efectividad en la reducción del cobre.

#### **4.9.2. Síntesis de nanopartículas de cobre estabilizadas con ácido ascórbico**

Esta síntesis inicial, planteada por Asim Umer y colaboradores (Umer *et al* 2014) se realizó utilizando ácido ascórbico como agente reductor y cloruro de cobre como fuente de iones  $\text{Cu}^{2+}$ . Se realizaron los cálculos necesarios para utilizar una concentración de agente reductor diez veces mayor a la concentración de la sal de cobre.

La concentración de cobre utilizada fue de 67,28 ppm (mg Cu/L), lo cual fue calculado teniendo en cuenta la concentración final con la que se trabajaron las nanopartículas de plata estabilizadas con citrato. Se disolvieron 0,018 g de cloruro de cobre (II) dihidratado (Merck, Buenos Aires, Argentina) en 90 ml de agua. Paralelamente se disolvieron 0,186 g de ácido ascórbico (Aldrich, Misuri, Estados Unidos) en 10 ml de agua. Se llevó la solución de cloruro de cobre a 90°C durante treinta minutos y luego se añadió la solución de ácido ascórbico gota a gota. Se observaron los cambios producidos.

Los cálculos realizados para llevar a cabo la síntesis de nanopartículas de cobre estabilizadas con ácido ascórbico se muestran en el Apéndice 4.

#### **4.9.3. Síntesis de nanopartículas de Cu estabilizadas con ácido ascórbico, a mayor concentración**

Se llevó a cabo la síntesis anterior variando las concentraciones de los reactivos, de forma tal que las concentraciones tanto para Cu como para el ácido ascórbico fueran diez veces mayores que en el caso de la síntesis de nanoesferas de Ag estabilizadas con citrato.

Se disolvieron 0,18 g de cloruro de cobre (II) dihidratado en 80 ml de agua. Paralelamente se disolvieron 1,86 g de ácido ascórbico en 20 ml de agua. Se llevó la solución de cloruro de cobre a 90°C durante treinta minutos y luego se añadió la solución de ácido ascórbico gota a gota. Se observaron los cambios producidos.

#### **4.9.4. Síntesis de nanopartículas de Cu estabilizadas con $\text{NaBH}_4$**

Mediante la síntesis planteada por Agarwal y colaboradores (Agarwal *et al*, 2016), se procedió a la utilización de cloruro de Cobre (II) nuevamente como fuente de iones  $\text{Cu}^{2+}$ , y se empleó borohidruro de sodio como agente reductor. Ya que en el artículo no se encontraban detalladas las relaciones estequiométricas entre los reactivos, inicialmente se decidió utilizar una proporción de seis moles de borohidruro por mol de cloruro de cobre.

Se pesaron 0,018 gramos de cloruro de cobre y se disolvieron en 90 ml de agua. Paralelamente se preparó una solución de borohidruro de sodio pesando 0,024 g del mismo y disolviéndolo en 10 ml de agua. Se añadió la solución de borohidruro de sodio, gota a gota, en la solución de cloruro de cobre. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente. Se observaron luego los cambios de colores.

Se realizó también otra síntesis de forma tal que la relación de las concentraciones fuera de 2 moles de borohidruro por mol de cobre. Se esperaba que dichas concentraciones se ajusten mejor al proceso de reducción del cobre metálico.

Los cálculos realizados para la síntesis de nanopartículas de cobre reducidas con borohidruro se presentan en los Apéndice 5 y 5.1.

#### **4.9.5. Síntesis de nanopartículas de Cu estabilizadas con citrato**

Se intentó poner a punto la síntesis de las nanopartículas de cobre suponiendo que el citrato de sodio funcionaría como agente reductor de iones  $\text{Cu}^{2+}$  con la misma efectividad con la que lo hace con los iones  $\text{Ag}^+$ .

Para ello, se disolvieron 0,018 g de cloruro de cobre dihidratado, en 90 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ y se llevó a ebullición. Se agregó una solución de 1% de citrato de sodio (10 ml) 0,04 g. La solución se mantuvo en hervor por 1 hora.

Los cálculos realizados para la síntesis de nanopartículas de cobre estabilizadas con citrato se presentan en el Apéndice 6.

## 5. Resultados y discusión

### 5.1. Síntesis de nanopartículas de Ag esféricas



Figura 4: Nanopartículas de Ag estabilizadas con citrato.

En lo que se refiere a la primera síntesis utilizando citrato como agente reductor (Fig. 4), inicialmente se obtuvo una solución color amarillo, que con el paso del tiempo adquirió un tono más grisáceo. Debido a que las nanopartículas absorben radiación a la longitud de onda correspondiente a la resonancia del plasmón de superficie, las nanopartículas esféricas de plata obtenidas, absorben radiación en la longitud de onda del azul en el espectro visible (460-482 nm), por lo que el color que se debe observar es el amarillo. La síntesis preparada únicamente con citrato genera nanopartículas de diversos tamaños, que van desde los 10 nm, hasta más de 100 nm. Es por esto que se observa el tono grisáceo, ya que absorben en un rango más amplio de longitudes de onda.



Figura 5: Nanopartículas de Ag estabilizadas con  $\text{NaBH}_4$ .

En cambio, las nanopartículas reducidas con borohidruro y estabilizadas con citrato (Fig. 5), tienen un tamaño aproximado de 10-15 nm, con una distribución de tamaños

más estrecha. Al analizar ópticamente la solución, se observa un color amarillo claro, lo cual se corresponde con nanopartículas esféricas de plata de ese tamaño.

Es por esto que se puede inferir que las síntesis fueron correctas y se obtuvieron las nanopartículas esperadas. Esto se corrobora posteriormente realizando una medición del espectro de absorción de ambas suspensiones de partículas.

### 5.1.1. Concentración de las nanopartículas sintetizadas con borohidruro

La síntesis con los ajustes necesarios para concentrar la cantidad de  $\text{AgNO}_3$  no fue exitosa, se observó una solución de color grisáceo, perdiendo el color amarillo característico de las nanopartículas de plata esféricas. Por lo tanto, se optó por la segunda opción, que consistió en la centrifugación de las nanopartículas. Así, centrifugando a 9000 rpm durante 1 hora, se logró concentrar a aproximadamente el doble la concentración de las nanopartículas recubiertas con borohidruro y citrato, sin perder las propiedades originales de las partículas.

Luego de la centrifugación, se logró obtener una solución concentrada al doble de las nanopartículas reducidas con borohidruro, de color amarillo oscuro, con una mayor turbidez. La concentración final de Ag de dicha suspensión fue de 26,96 ppm, en 50 ml finales.

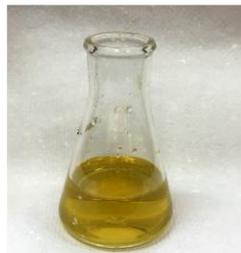


Figura 6: Nanopartículas de Ag concentradas, estabilizadas con  $\text{BH}_4^-$  y concentradas mediante centrifugación a 9000 rpm durante 1 hora.

Por consiguiente, las concentraciones que se trabajaron de nanopartículas, corresponden a: 114,22 ppm para las sintetizadas con citrato y 26,96 ppm para las sintetizadas con  $\text{NaBH}_4$  y citrato.

## 5.2. Síntesis de Nanoprismas de Ag



Figura 7: Evolución de la coloración en función del tiempo, durante la síntesis de Nanoprismas de Ag.

Luego de mezclar los reactivos en el orden detallado se observó, a partir de los 3 minutos de reacción, un cambio de color en la solución. Este viraje de colores (mostrado en la Fig. 7) se debe a la evolución en el tamaño y la forma de las nanopartículas que se estaban sintetizando, y a las diferentes resonancias plasmónicas superficiales asociadas a estas formas y tamaños (Dong *et al*, 2012). Se observó la evolución iniciando con un color amarillo, pasando por naranja-rojo oscuro, rojo oscuro-violeta, y finalmente estabilizándose en un color azul oscuro. Para la preparación de los nanoprismas concentrados, luego de ser centrifugadas por 90 minutos a 8000 rpm la suspensión final con la que se trabajó presentó un color azul aún más intenso.

## 5.3. Caracterización de las nanopartículas de Ag

### 5.3.1. Espectrofotometría UV-visible

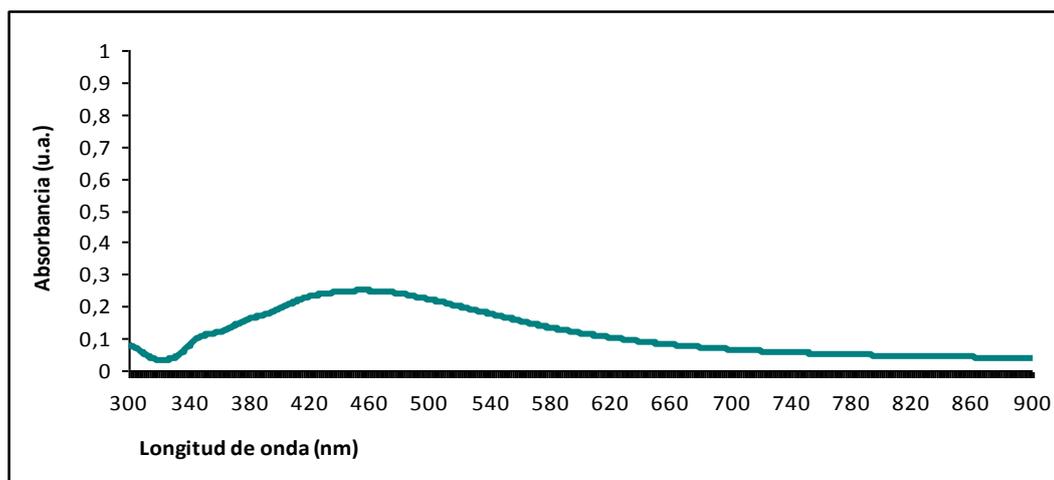


Figura 8: Espectro de absorción UV-visible para las nanopartículas esféricas de Ag estabilizadas con citrato diluidas.

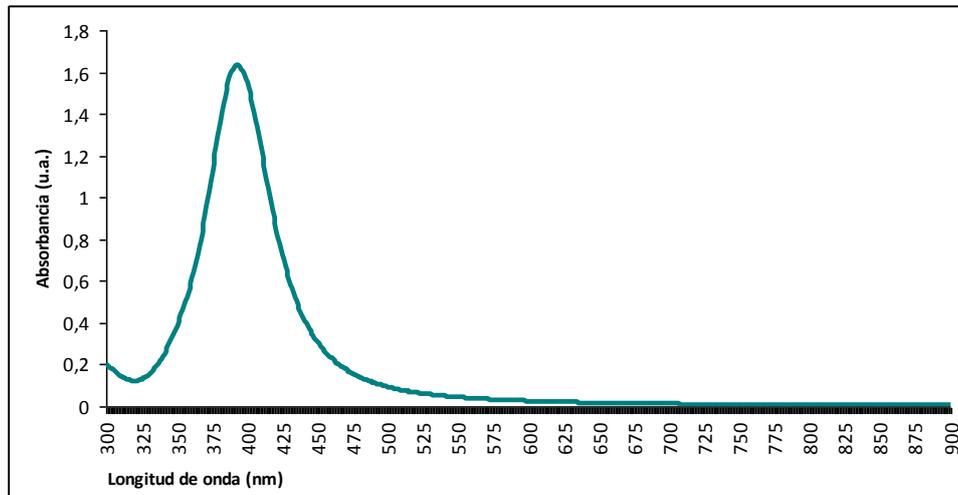


Figura 9: Espectro de absorción UV-visible para las nanopartículas esféricas de Ag estabilizadas con  $\text{NaBH}_4$ .

El espectro de absorción de las nanopartículas reducidas con citrato (Fig.8) presenta una banda de absorción de gran amplitud, cuyo máximo está aproximadamente a 450 nm. Este comportamiento es típico de suspensiones de nanopartículas cuyo tamaño no es uniforme, por lo que se deduce que se obtuvieron nanopartículas de diversos tamaños mediante esta síntesis. En cambio, en la síntesis de nanopartículas de plata preparadas con borohidruro y citrato, se obtuvo una banda plasmónica mucho más definida y fina, cuyo máximo se encuentra en 400 nm (Fig. 9), indicando mayor grado de monodispersidad.

Las medidas espectrofotométricas son coincidentes con lo observado visualmente: la suspensión de nanopartículas de plata preparadas con citrato tenía un color amarillo-grisáceo no definido, mientras que la suspensión de nanoesferas reducidas con borohidruro presentaba un color amarillo intenso.

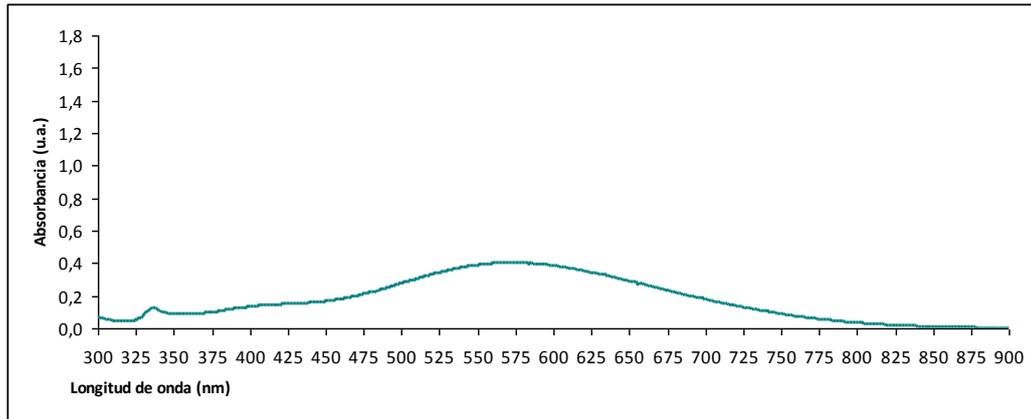


Figura 10: Espectro de absorción UV-visible para los nanoprismas de Ag, medido en el rango de longitudes de onda desde 300-900 nm.

Mediante el espectro de absorción de la suspensión de nanoprismas de plata (Fig.10), se pudo observar un pico de absorción en la longitud de onda correspondiente a 575 nm, que coincide con la posición esperada para nanopartículas de Ag planas. En comparación con lo reportado en bibliografía (Cathcart *et al*, 2009), la banda obtenida es más ancha, lo que permite suponer que la muestra obtenida está constituida por una mezcla de prismas de diversos tamaños y, eventualmente, esferas.

### 5.3.2. Caracterización de nanoprismas por SEM

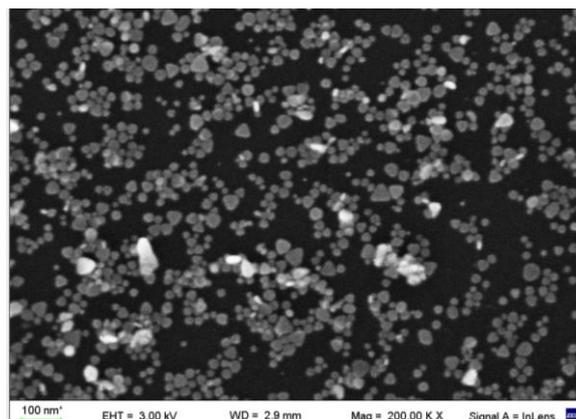


Figura 11: Imagen de SEM de los nanoprismas triangulares de plata.

Mediante la imagen obtenida por SEM de los nanoprismas de plata, se pudieron observar dos formas (esferas y prismas triangulares) y diversos tamaños de

nanopartículas, que coexisten de manera estable en la síntesis lograda en este trabajo. Los prismas obtenidos presentan un tamaño de lado de  $40 \pm 5$  nm.

### 5.3.3. Estabilidad de las NP esféricas

Se realizaron medidas de espectrofotometría UV-visible de las muestras de NP esféricas de Ag un año después de sintetizadas. Los espectros obtenidos se muestran en las figuras Fig.12 y Fig.13.

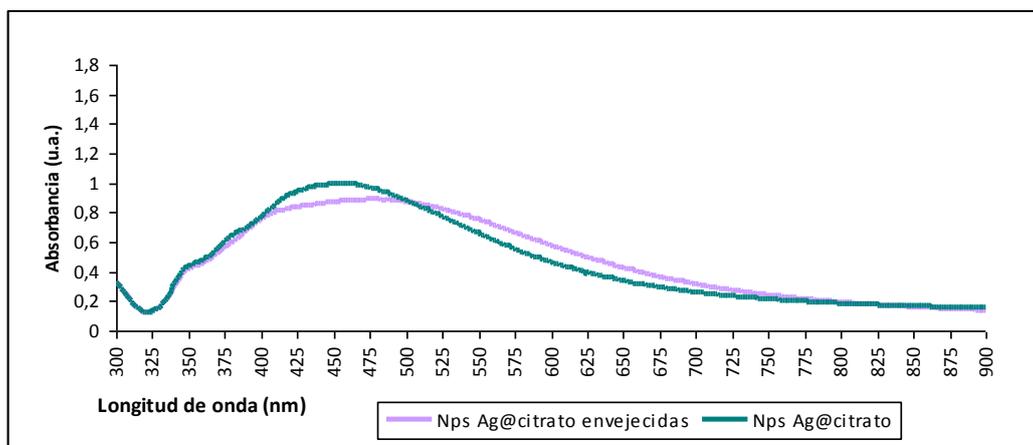


Figura 12: Espectro de absorción UV-visible para las muestras de nanopartículas de Ag estabilizadas con citrato, recién sintetizadas (verde), y transcurrido 1 año (violeta).

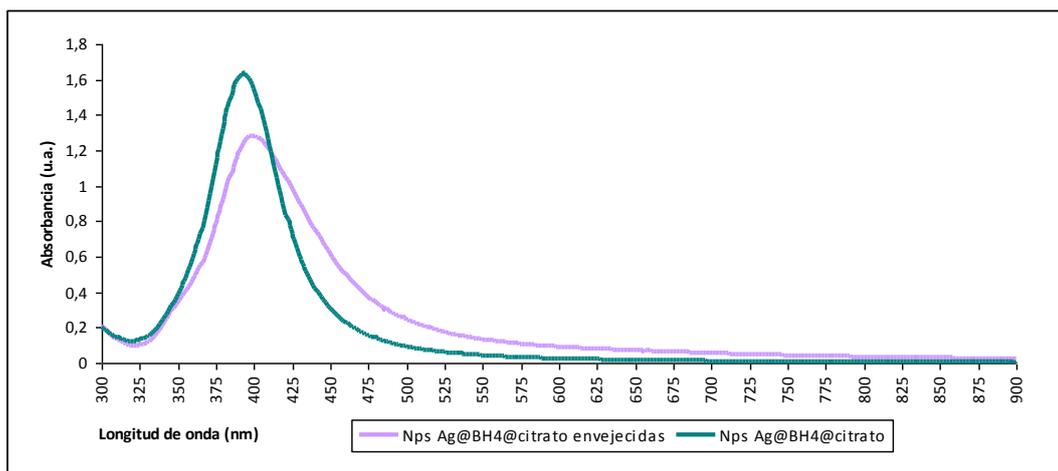


Figura 13: Espectro de absorción UV-visible para las muestras de nanopartículas de Ag estabilizadas con borohidruro, recién sintetizadas (verde), y transcurrido 1 año (violeta).

Si bien el espectro de absorción de las nanopartículas envejecidas se encuentra desplazada hacia la derecha, en ambos casos, ya sean sintetizadas con citrato o con borohidruro, no resulta un corrimiento significativo que indique que las nanopartículas se han agregado significativamente. Por lo tanto, se puede concluir que el transcurso del tiempo no afecta apreciablemente la estabilidad de las nanopartículas esféricas sintetizadas en este trabajo.

#### 5.3.4. Medición del pH

A continuación se detallan los valores de pH obtenido para las distintas soluciones preparadas a lo largo de este trabajo:

- pH Suspensión de Nanopartículas esféricas preparadas con citrato= 6
- pH Suspensión de Nanopartículas preparadas con borohidruro = 7
- pH Blanco de  $\text{NaBH}_4$  = 7
- pH Blanco de Citrato= 6
- pH Suspensión de Nanoprismas concentrados = 7
- pH Blanco de Nanoprismas = 7,5
- pH Blanco de  $\text{AgNO}_3$ = 6
- pH Blanco de  $\text{AgNO}_3$  concentrado= 5,5

Es importante destacar que el pH para las nanoesferas resultó indistinto para su forma concentrada y diluida, por lo cual se dejó establecido un único valor.

Estos resultados determinan que la concentración de protones en la solución no se encuentra aumentada o disminuida y por lo tanto debido a la ausencia de acidez o basicidad, las soluciones obtenidas resultan aptas para utilizar en ensayos microbiológicos.

### 5.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de Ag

#### 5.4.1. Determinación de la pureza de cepas ensayadas *E. coli* y *S. aureus*

Se observó que luego de haber incubado durante 24 h la cepa de *S. aureus* en agar Baird Parker, se formaron colonias negras con halos a su alrededor, lo cual verifica pureza. Además, al realizar la prueba de la coagulasa, luego de 2 horas de incubación se observó la formación de coágulos, por lo cual se corroboró su identidad. Por otro lado, se

incubó a *E. coli* en un agar Endo, y transcurridas 24 horas se observó la formación de colonias rojizas con brillo metálico, indicando la pureza de la cepa y siendo confirmada también a través de un ensayo de IMViC que resultó negativo para el indol, positivo para el rojo metilo, negativo para Voges Proskauer y negativo para citrato.

Al verificar la pureza y realizar los recuentos bacterianos, se pudo afirmar que tanto *E. coli* como *S. aureus* fueron correctamente cultivadas en un ambiente de esterilidad. En todos los tubos control + hubo crecimiento microbiano, lo cual indica que la cepa se encontraba activa, sin ningún contaminante, ni agente inhibitorio en el medio. Además, en todos los tubos control – en los que no se sembraron bacterias, no hubo crecimiento, por lo cual se puede afirmar que el proceso de autoclavado fue correcto y que todo el trabajo fue realizado en condiciones de esterilidad.

#### **5.4.2. Inóculos a utilizar en los ensayos antimicrobianos**

Las cargas iniciales con las que se trabajaron en todos los experimentos microbiológicos fueron de  $\approx 10^9$  ufc/ml para cada cepa bacteriana (*S. aureus* y *E. coli*) luego de 24 h de incubación en medio BHI a 37°C. A partir de esos cultivos se hicieron las diluciones necesarias para obtener inóculos de  $\approx 10^7$  y  $10^2$  ufc/ml para utilizar en los ensayos de la puesta a punto en la determinación de la CIM, y de aproximadamente  $\leq 10^2$  ufc/ml para la obtención de concentraciones inhibitorias mínimas en los ensayos microbiológicos con nanoesferas de Ag (recién sintetizadas y envejecidas) y nanoprismas de Ag.

Los cálculos efectuados en la obtención de las cargas bacterianas para cada ensayo se encuentran detallados en el apéndice 7.

#### **5.4.3. Ensayos preliminares para la puesta a punto de la determinación de la CIM**

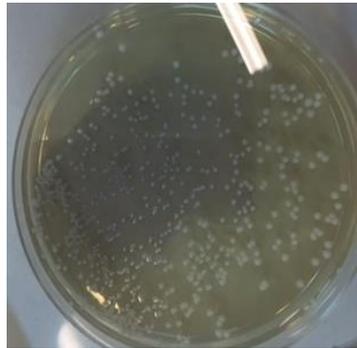
##### **5.4.3.1. Ensayo 1: Detección preliminar del efecto antimicrobiano de nanoesferas de plata**

En este experimento se dejaron incubando ambas cepas bacterianas (*E. coli* y *S. aureus*) durante una hora dentro de cada uno de los tratamientos ensayados sin medio de cultivo, para después transferirlos al medio BHI e incubar durante 24 h. Luego de dicho período, todos los tubos de BHI que se sembraron presentaron un color

traslúcido indicando que tanto las nanopartículas esféricas de Ag reducidas con citrato y reducidas con borohidruro como el blanco del  $\text{AgNO}_3$ , presentaron un efecto inhibitorio.

Mediante este experimento se pudo comprobar en consecuencia la correcta esterilidad de las soluciones utilizadas como tratamientos, y a su vez pudo establecerse que, al no observarse desarrollo bacteriano luego de incubar los tubos de BHI, dicho ambiente no resulta propicio para permitir el desarrollo de bacterias Gram – (*E. coli*) y (Gram +) (*S. aureus*).

#### 5.4.3.2. Ensayo 2: Detección de presencia de peróxido residual en nanoprismas de Ag



A: Ensayo sobre cepas bacterianas con nanoprismas



B: Ensayo sobre cepas bacterianas con blanco de nanoprismas al 0,16%



C: Ensayo sobre cepas bacterianas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> control al 3%

Figura 14: Proceso de reducción del peróxido de hidrógeno sobre células procariotas y liberación de oxígeno en presencia de la enzima catalasa para *E. coli* y *S. aureus*. (Para ambas cepas se obtuvieron resultados similares)

Al no observarse desprendimiento de burbujas en la placa de TSA luego de aplicar el tratamiento de nanoprismas sobre las colonias bacterianas de *E. coli* y *S. aureus* (Fig. 14 A) pudo concluirse que no existía peróxido residual en la suspensión. Con lo cual se demostró que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> empleada para controlar la forma de las nanopartículas reaccionó de manera considerable con el resto de los reactivos involucrados en la síntesis, no quedando residuos de la misma en la suspensión de Nps final. De esta forma no resultó un componente que pueda causar la inhibición bacteriana.

Teniendo en cuenta la formación de burbujas sobre las placas de agar TSA pudo establecerse que en el blanco de los nanoprismas se encontraba presente el peróxido de hidrógeno (Fig.14 B) al igual que en el control positivo, aunque este último haya presentado una mayor formación de burbujas sobre las colonias bacterianas ensayadas dada su elevada concentración de agua oxigenada (Fig.14 C).

#### 5.4.3.3. Ensayo 3: Puesta a punto en la determinación de la CIM con nanoesferas de Ag de diferente concentración

En este ensayo no fue posible verificar la inhibición de crecimiento bacteriano con nanoesferas de Ag de 13,48 ppm (mg Ag/l) tanto para *E. coli* como para *S. aureus*, ya que se observó turbidez en todos los tubos ensayados con mayores ( $\approx 10^7$  células) y menores cargas microbianas ( $\approx 10^2$  células). Se observó crecimiento en todos los tubos, incluidos los blancos. Se concluyó en primera instancia que la concentración de las suspensiones de

nanopartículas de Ag esféricas trabajadas iguales a 1,34 ppm 0,134 ppm y 0,0134 ppm no resultaron ser efectivas para observar inhibición del crecimiento bacteriano.

En las tablas I y II se muestran las comparaciones efectuadas con los tratamientos de nanopartículas esféricas de plata de concentración 114,22 ppm y 26,29 ppm para las reducidas con citrato y borohidruro respectivamente, con sus respectivos blancos, en diluciones del orden 1/10, 1/100 y 1/1000, con las cargas  $10^6$  de *S. aureus* y *E. coli*.

TABLA I: Comparación entre el tratamiento efectuado con nanoesferas de Ag estabilizadas con citrato y borohidruro en BHI para *S. aureus* y *E. coli*, en diluciones decimales.

Tratamientos	NPs citrato			NPs borohidruro			
	Diluciones ppm (mgAg/l)	1/10	1/100	1/1000	1/10	1/100	1/1000
		11,42	1,14	0,114	2,7	0,27	0,027
<i>S. aureus</i>	+/-	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	-	+	+	-	+	+	+

Referencias: + presencia de turbidez, +/- turbidez intermedia, - ausencia de turbidez.

TABLA II: Blancos correspondientes al citrato de sodio, borohidruro de sodio y nitrato de plata, en diluciones decimales, incubados con *E. coli* y *S. aureus*.

Tratamientos	Blanco citrato y Blanco de borohidruro <sup>2</sup>			Control AgNO <sub>3</sub>		
	Diluciones ppm (mgAg/l)	1/10	1/100	1/1000	1/10 11,42	1/1000, 1,14
<i>S. aureus</i>	+	+	+	-	+	+
<i>E. coli</i>	+	+	+	-	+	+

Referencias: + presencia de turbidez, +/- turbidez intermedia, - ausencia de turbidez.

Luego de evaluar el efecto inhibitorio de las nanoesferas con las diluciones efectuadas en torno a las nanopartículas con mayor concentración de Ag e incubadas con

<sup>2</sup> Los blancos de citrato y borohidruro se muestran en una misma celda, por haber presentado resultados equivalentes.

cargas bacterianas de  $\approx 10^6$  células, se logró que únicamente la cepa bacteriana de *E. coli* fuera inhibida con las nanoesferas reducidas con citrato con 11,42 ppm y con las nanoesferas reducidas con borohidruro con 2,7 ppm.

Se demostró también que *S. aureus* presentó una resistencia superior a *E. coli* frente a las diluciones efectuadas con las nanoesferas de citrato de 114,22 ppm y las nanoesferas de borohidruro de 26,96 ppm, ya que en todos los tubos se observó crecimiento bacteriano. Cabe destacar que los iones de Ag correspondientes al blanco de  $\text{AgNO}_3$  en la primera dilución de 11,42 ppm (mg Ag/l), cumplen también con alguna posible inhibición del crecimiento bacteriano en *E. coli* y a *S. aureus*.

#### Conclusión de la puesta a punto

Luego del último experimento de la puesta a punto, se pudo arribar a la conclusión de que las concentraciones de Ag con las que se debe trabajar en la síntesis de nanopartículas y su estudio como agentes inhibidores debían superar a los 13,48 ppm de Ag, para poder detectar la concentración inhibitoria mínima. Por otro lado, la determinación de CIM de las suspensiones de nanopartículas más concentradas que lograron sintetizarse, debía hacerse a lo sumo con diluciones de hasta 1/100, y en lo posible con diluciones menores a 1/10, y empleando cargas bacterianas inferiores a  $10^5$  células/ml.

### **5.4.4. Ensayos microbiológicos con nanoesferas de Ag**

#### **5.4.4.1 Determinación de la CIM en nanoesferas de Ag recién sintetizadas**

En las tablas III y IV se encuentran expresados los resultados correspondientes a la CIM de las diluciones 1/2, 1/4, 1/10, 1/20, 1/40, 1/100 de las nanoesferas reducidas con citrato de 114,22 ppm y de las nanoesferas reducidas con borohidruro de 26,29 ppm recién sintetizadas, en contraste con el blanco de citrato y  $\text{AgNO}_3$ , inoculados con cargas bacterianas correspondientes a  $10^1$  -  $10^2$  cel/ml de *S. aureus* y *E. coli*.

TABLA III: Efecto inhibitorio de las nanoesferas de Ag estabilizadas con citrato y BH<sub>4</sub> en diluciones 1/2, 1/4, 1/10, 1/20, 1/40, 1/100, en contraste con el blanco de nitrato de plata, blanco de citrato y blanco de BH<sub>4</sub> sobre las cepas bacterianas

*S. aureus* y *E. coli*.

Tratamientos	Nps citrato						Nps BH <sub>4</sub>					
	Diluciones ppm (mgAg/l)	1/2 57,11	1/4 28,55	1/10 11,42	1/20 5,71	1/40 2,85	1/100 1,14	1/2 13,5	1/4 6,75	1/10 2,7	1/20 1,35	1/40 0,67
<i>S. aureus</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	-	-	-	+/-	+	+	-	-	-	+	+	+

Referencias: + presencia de turbidez, +/- turbidez intermedia, - ausencia de turbidez.

TABLA IV: Ensayos efectuados con los blancos de citrato y blanco de nitrato de plata en diluciones 1/2, 1/4, 1/10, 1/20, 1/40, 1/100 sobre las cepas bacterianas

*S. aureus* y *E. coli*.

Tratamientos	Bco citrato						Bco AgNO <sub>3</sub>					
	Diluciones ppm (mgAg/l)	1/2	1/4	1/10	1/20	1/40	1/100	1/2 57,11	1/4 28,55	1/10 11,42	1/20 5,71	1/40 2,85
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+/-	+

Referencias: + presencia de turbidez, +/- turbidez intermedia, - ausencia de turbidez.

Con estos ensayos se determinó que la CIM de las nanoesferas estabilizadas con citrato recién sintetizadas, con las cargas bacterianas de  $\approx 10^2$  células en *S. aureus* fue de 28,55 ppm (mg Ag/l) mientras que en *E. coli* la CIM resultó de 11,42 ppm (mg Ag/l). Se observó también que las nanoesferas sintetizadas con borohidruro inhibieron con las mismas cargas bacterianas a *S. aureus* con una concentración mínima de 6,75 ppm (mg Ag/l) e inhibieron a *E. coli* con una concentración mínima de 2,7 ppm (mg Ag/l) (Tabla III).

Se pudo establecer por consiguiente que las nanopartículas reducidas con borohidruro presentaron una acción inhibitoria a menores concentraciones que las nanoesferas de citrato en ambas cepas y con aún menor CIM en las bacterias (Gram -) *E. coli*.

Estos resultados se asemejan a los reportados por Kim y colaboradores (Kim *et al.* 2007) quienes indicaron que las bacterias (Gram +) como *S. aureus* resultan ser más

resistentes a las nanopartículas de plata en comparación con bacterias Gram – como *E. coli*, las cuales presentaban mayor susceptibilidad.

Finalmente, en este estudio se observó que el blanco con AgNO<sub>3</sub> actuó con una concentración menor de 5,7 ppm (mg de Ag/l) en la dilución 1/20 (Tabla IV) en ambas cepas bacterianas, lo cual podría indicar que el nitrato de plata presenta una inhibición mayor en *E. coli* y *S. aureus* que las nanopartículas reducidas con citrato.

#### 5.4.4.2. Determinación de la CIM en nanoesferas envejecidas

En las tablas V y VI se muestran los resultados correspondientes a las CIM de las diluciones 1/4 y 1/10 de las nanoesferas reducidas con citrato de 114,22 ppm y de las nanoesferas reducidas con borohidruro de 26,29 ppm luego de transcurrido un año, en contraste con el blanco de citrato y AgNO<sub>3</sub>, inoculados con cargas bacterianas correspondientes a 10<sup>1</sup> - 10<sup>2</sup> cel/ml de *S. aureus* y *E. coli*. En la tabla VII se expresa finalmente el recuento a partir del subcultivo de los tubos tratados, sobre placas con agar TSA.

TABLA V: Efecto inhibitorio de las nanoesferas de Ag recubiertas con citrato y borohidruro luego de transcurrido 1 año, en la dilución 1/4 y 1/10, sobre las cepas bacterianas *E. coli* y *S. aureus*.

Tratamientos	Nps citrato		Nps borohidruro	
	1/4	1/10	1/4	1/10
Diluciones ppm (mgAg/l)	28,55	11,42	6,75	2,7
<i>S. aureus</i>	+	+	-	+
<i>E. coli</i>	-	+	-	+

Referencias: + presencia de turbidez, - ausencia de turbidez.

TABLA VI: Efecto comparativo entre el blanco de citrato de sodio y  $\text{AgNO}_3$ , con diluciones 1/10 y 1/4 sobre *E. coli* y *S. aureus*.

Tratamientos	Bco.citrato		Bco $\text{AgNO}_3$	
	1/4	1/10	1/4	1/10
Diluciones ppm (mgAg/l)			28,55	11,42
<i>S. aureus</i>	+	+	-	-
<i>E. coli</i>	+	+	-	-

Referencias: + presencia de turbidez, - ausencia de turbidez.

TABLA VII: Recuento en placa de agar TSA de los tubos con efecto inhibitorio (Tabla VI), para los tratamientos efectuados con las nanopartículas esféricas de Ag, y para el blanco de  $\text{AgNO}_3$ .

	<i>S. aureus</i> (ufc)	<i>E. coli</i> (ufc)
$\text{AgNO}_3$ (1/4)	<i>Sin desarrollo</i>	54
$\text{AgNO}_3$ (1/10)	<i>Sin desarrollo</i>	203
Nps $\text{BH}_4$ (1/4)	>1000	80
Nps $\text{BH}_4$ (1/10)	Incontable	Incontable
Nps citrato (1/4)	>1000	>1000

Se observó luego de transcurrido un año que las nanopartículas estabilizadas con citrato inhibieron a *E. coli* con 28.55 ppm (mg de Ag/l), pero dejaron de inhibir el crecimiento de *S. aureus*, y que las nanopartículas esféricas de Ag reducidas con borohidruro inhibieron el desarrollo de *E. coli* y *S. aureus* con una concentración mínima de 6,75 ppm (mg de Ag/l). A pesar de haberse observado en el espectro de absorción que las nanopartículas no sufrieron cambios muy significativos (Fig. 12 y Fig. 13), puede estimarse mediante estos ensayos que el envejecimiento ejerció cierto tipo de influencia en los efectos de las partículas, haciéndolas perder su efecto inhibitorio. Probablemente esto se deba a la oxidación superficial de las Nps de Ag, que no modifica significativamente el espectro pero sí la reactividad.

Las CIM a las que se arribaron con las nanoesferas recubiertas con borohidruro y con las nanoesferas recubiertas con citrato, determinaron solo una CIM con efecto bacteriotático en *E. coli* y *S. aureus*, ya que se observó que luego de sembrar esos tubos sobre las placas con agar TSA hubo crecimiento en todas las placas.

Para el tratamiento con  $\text{AgNO}_3$ , luego de sembrar los tubos con inhibición (Tabla VII) en placas de agar TSA, se pudo concluir que la CIM correspondiente a 11,42 ppm cumplía además con un efecto bactericida en *S. aureus* ya que en dicha concentración no se observó desarrollo bacteriano. No obstante, la CIM del  $\text{AgNO}_3$  de 11,42 ppm en *E. coli* solo logró un efecto bacteriostático. Se puede concluir que los iones de  $\text{Ag}^+$  disueltos correspondientes a la solución del blanco de  $\text{AgNO}_3$  podrían afectar en mayor medida a las bacterias (Gram +), impidiendo su desarrollo y ocasionando su muerte celular. Esto concuerda con lo reportado por Feng (2000), quien sugirió una CIM con efecto bactericida para el  $\text{AgNO}_3$  en 10 ppm sobre las cepas bacterianas de *S. aureus*.

#### 5.4.4.3. Ensayo de difusión en agar en nanoesferas de Ag

En la Figura 15 se muestran las fotografías correspondientes a los ensayos de difusión realizados en placas de Agar TSA, con un césped bacteriano sembrado en la superficie del medio, y los tratamientos evaluados sobre el mismo.



A: Placas sembradas con *S. aureus*



B: Placas sembradas con *E. coli*



C: Placas sembradas con *S. aureus*

D: Placas sembradas con *E. coli*

Figura 15: Placas de agar TSA sembradas con 100 µl del inóculo de cepa bacteriana. A y B se corresponden a las placas sembradas con las nanoesferas reducidas con borohidruro; C y D corresponden a las placas sembradas con nanoesferas reducidas con citrato. En el extremo opuesto, se ubican sus respectivos blancos. En el centro de la placa se colocó un control – (H<sub>2</sub>O destilada) y a la izquierda, un control + (peróxido de hidrógeno).

En todas las placas sembradas, el control negativo de agua destilada no generó ningún halo, mientras que el control positivo de peróxido de hidrógeno al 3% determinó un halo alrededor de cada orificio, logrando inhibir tanto a *S. aureus* como a *E. coli* con efecto bactericida. Con lo cual, al observar el correcto funcionamiento de los controles y la buena disposición de césped bacteriano, se pudo concluir en primera instancia que los procedimientos fueron realizados adecuadamente y bajo condiciones de esterilidad.

Al no observarse halos alrededor de los tratamientos en ninguna placa, se pudo concluir que las concentraciones de Ag empleadas correspondientes a 114,22 ppm para las nanoesferas recubiertas con citrato y 26,96 ppm para las nanoesferas recubiertas con borohidruro, y de 114,22 ppm para el blanco de nitrato de plata resultaron ser demasiado bajas para lograr ocasionar algún efecto inhibitorio sobre el césped bacteriano de elevada carga ( $\approx 10^9$  células).

### 5.4.5. Ensayos microbiológicos con nanoprismas de Ag

#### 5.4.5.1. Determinación de la CIM en nanoprismas de Ag

En la tabla VIII se muestran los resultados obtenidos luego de evaluar la CIM de los nanoprismas de concentración igual a 140 ppm, y sus respectivos blancos, con diluciones 1/2, 1/4, 1/10 y 1/20 inoculados con cargas bacterianas de  $10^1 - 10^2$  células de *S. aureus* y *E. coli*. En la tabla IX se expresan los recuentos a partir del subcultivo de los tubos con tratamientos que resultaron traslúcidos en la tabla anterior.

TABLA VIII: Efecto inhibitorio comparativo entre nanoprismas de Ag y su respectivo blanco, con las diluciones crecientes en 1/2, 1/4, 1/10 y 1/20 para cada una de las cepas bacterianas, *E. coli* y *S. aureus*.

	Nanoprismas				Bco. Nanoprismas				Bco. AgNO <sub>3</sub>			
Diluciones ppm (mgAg/l)	1/2	1/4	1/10	1/20	1/2	1/4	1/10	1/20	1/2	1/4	1/10	1/20
	70	35	14	7					70	35	14	7
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+

Referencias: + presencia de turbidez, - ausencia de turbidez.

TABLA IX: Recuento en placa de agar TSA de los tubos con efecto inhibitorio (Tabla VIII), para los tratamientos efectuados con las nanoprismas de Ag con diluciones 1/20, 1/10 y 1/4, y para AgNO<sub>3</sub> y blanco de las Nanoprismas con diluciones 1/10 y 1/4.

	<i>S. aureus</i> (ufc)	<i>E. coli</i> (ufc)
Nanoprismas (1/20)	8	Incontable
Nanoprismas (1/10)	<i>Sin desarrollo</i>	>100
Nanoprismas (1/4)	<i>Sin desarrollo</i>	3
Blanco AgNO <sub>3</sub> (1/10)	>100	>100
Blanco AgNO <sub>3</sub> (1/4)	<i>Sin desarrollo</i>	7
Blanco Nanoprismas (1/20)	<i>Sin desarrollo</i>	<i>Sin desarrollo</i>
Blanco Nanoprismas (1/10)	<i>Sin desarrollo</i>	<i>Sin desarrollo</i>

Para los nanoprismas de Ag se obtuvo una CIM de 7 ppm (mg Ag/l) para *S. aureus*, mientras que para *E. coli* la CIM resultó ser de 14 ppm (mg Ag/l). No obstante, según estos resultados el efecto inhibitorio de los nanoprismas es mayor sobre las bacterias (Gram +).

Luego de sembrar las placas con agar TSA a partir de los tubos en los que se observó una concentración inhibitoria mínima con los nanoprismas, se pudo concluir que la CIM correspondiente a 14 ppm para *E. coli* cumplen con un efecto bacteriostático ya que en esa concentración se observó crecimiento en la placa y por otro lado, la concentración inhibitoria mínima de los nanoprismas para *S. aureus* con 14 ppm cumplió con un efecto bactericida (CBM), ya que no se observó crecimiento en la placa luego de sembrar el tubo con esa concentración de nanoprimas.

Se pudo observar también que el blanco de AgNO<sub>3</sub> presentó una CIM menor sobre bacterias del género *Staphylococcus* siendo la misma de 7 ppm (mg Ag/l), mientras que para *E. coli* la CIM del AgNO<sub>3</sub> resultó ser de 14 ppm (mg Ag/l). Al sembrar las placas a partir de los tubos visualmente claros para el blanco del AgNO<sub>3</sub>, la concentración inhibitoria mínima de 7 ppm resultó tener un efecto bacteriostático en *S. aureus* ya que se observó desarrollo bacteriano, y por consiguiente se logró la concentración mínima inhibitoria bactericida (CBM) en esta cepa mediante el subcultivo del tubo con la CIM correspondiente a la dilución 1/4 del tratamiento de AgNO<sub>3</sub>, con una cantidad de Ag igual a 35 ppm.

En este ensayo, no se logró una concentración inhibitoria bactericida para la cepa de *E. coli* con el blanco de Ag NO<sub>3</sub>, ni con los nanoprismas de Ag.

Con estos resultados se pudo observar que las nanopartículas de plata en forma triangular de aproximadamente 40 nm de lado (Fig. 11) demostraron una mayor actividad antibacteriana que las nanopartículas esféricas ya que se logró una concentración mínima inhibitoria con efecto bactericida (CBM) sobre *S. aureus* mientras que las nanoesferas no demostraron CBM en ninguna cepa.

Se comprobó también que la cantidad de peróxido ensayada de 0,16% dentro del blanco de los nanoprismas inhibió el crecimiento de ambas cepas, en todas sus diluciones.

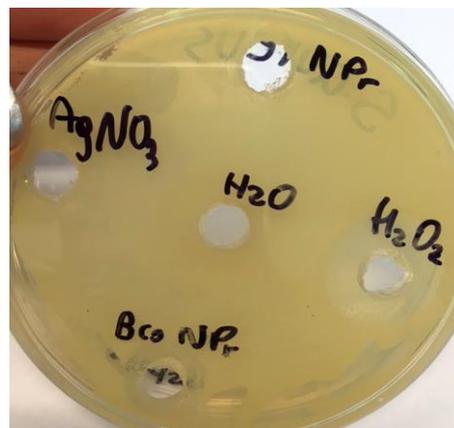
Los resultados obtenidos en cuanto a los nanoprismas resultaron similares a los reportados por Pal *et al* y Dong *et al* (2007; 2012), quienes describieron una mayor actividad antibacteriana de las nanopartículas triangulares de plata en comparación con las esféricas. Estos autores argumentaron que la alta reactividad de las nanopartículas de Ag triangulares

era debido a su estructura geométrica y a los planos cristalinos expuestos. Estas facetas atómicas de alta densidad determinan un máximo poder antibacteriano (Dong *et al*, 2012) y una creciente concentración de los iones de  $\text{Ag}^+$  en torno a los prismas, según lo reportado por Frank *et al* (2010). Por otro lado, las aristas definidas y afiladas de los nanoprismas podrían ser más tóxicas para la célula bacteriana, ya que sus bordes y vértices permitirían que penetren fácilmente en la célula (Dong *et al*, 2012).

#### 5.4.5.2. Ensayo de difusión en agar con nanoprismas de Ag



A: Placa sembrada con *E. coli*



B: Placa sembrada con *S. aureus*

Figura 16: Ensayo de difusión en agar, comparación de halos de inhibición para *E. coli* y *S. aureus*, entre las nanoprismas de Ag, y blancos de  $\text{AgNO}_3$  y blanco de nanoprismas, contrastados con un control – ( $\text{H}_2\text{O}$ ) y un control positivo de peróxido de hidrógeno.

Se observó en el ensayo de difusión radial en agar de TSA que los nanoprismas de Ag de 140 ppm (mg Ag/l) ensayados sobre *E. coli* y *S. aureus* no generaron halos de inhibición, con lo cual las nanoprismas en esas concentraciones no lograron inhibir las cepas bacterianas con elevada carga ( $\approx 10^9$ ).

Se logró visualizar únicamente un halo de inhibición del crecimiento bacteriano en torno al blanco de los nanoprismas y al control positivo con peróxido de hidrógeno.

Pudo concluirse también que la formación de un halo menor en torno al blanco de los nanoprismas se debió a la efectiva presencia de peróxido en esta última solución. La catalasa u otras peroxidasas presentes en *E. coli* y *S. aureus* posiblemente aumentaron la tolerancia de las cepas en dicho medio, en comparación con el halo producido por acción del efecto inhibitorio del  $H_2O_2$  al 3% (Zhao *et al*, 2016). En general, una mayor actividad de agua oxigenada se ve reflejada en bacterias Gram-positivas que en las bacterias Gram-negativas (McDonnell y Russell, 1999), aunque en este experimento ambas cepas demostraron un mismo diámetro de inhibición (DIZ) frente al peróxido de hidrógeno.

#### 5.4.6. Pruebas estadísticas con nanopartículas de Ag

Para proceder con los análisis estadísticos, se plantearon inicialmente las siguientes hipótesis:

$H_0$ : Las concentraciones inhibitorias mínimas de nanopartículas de Ag y de los iones metálicos sobre cada cepa ensayada son las mismas.

$H_1$ : Alguna concentración inhibitoria mínima de los tratamientos evaluados es diferente.

Mediante el análisis de las medidas resumen para las CIM (ppm) de los tratamientos de nanopartículas de Ag esféricas y nanoprismas de Ag en contraste con el  $AgNO_3$ , se observó que en muchos de los experimentos tanto para *S. aureus* como *E. coli*, los coeficientes de variación fueron mayores al 20% (Tablas X y XI). Esto indicó que los datos no se comportaron de manera homogénea en ninguna de las cepas y por lo tanto, existe una elevada variabilidad dentro de los tratamientos, con desvíos estándar  $> 10$ .

Tabla X: Estadística descriptiva del número poblacional, de la media, el desvío estándar, el mínimo, el máximo, la mediana y el percentil 50. Medidas resumen correspondientes a *S. aureus*.

**Medidas resumen**

Tratamientos	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx	Mediana	P(50)
AgNO <sub>3</sub>	CIM (ppm)	5	4,06	2,02	1,00	5,71	5,20	5,20
Nanoprismas	CIM (ppm)	5	7,00	0,00	7,00	7,00	7,00	7,00
Np BH <sub>4</sub>	CIM (ppm)	5	7,45	1,02	6,70	9,00	6,80	6,80
Np cit	CIM (ppm)	5	26,37	3,08	22,00	28,55	28,55	28,55

Tabla XI: Estadística descriptiva del número poblacional, de la media, el desvío estándar, el mínimo, el máximo, la mediana y el percentil 50. Medidas resumen correspondientes a *E. coli*.

**Medidas resumen**

Tratamientos	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx	Mediana	P(50)
AgNO <sub>3</sub>	CIM (ppm)	5	9,82	3,18	5,70	14,00	10,00	10,00
Nanoprismas	CIM (ppm)	5	14,32	0,40	14,00	15,00	14,20	14,20
Np BH <sub>4</sub>	CIM (ppm)	5	2,26	1,79	1,00	5,20	1,40	1,40
Np cit	CIM (ppm)	5	17,85	9,07	11,00	28,55	11,42	11,42

Para la tendencia central mediante el gráfico de box-plot (Fig. 17 y 18), se pudo concluir que las concentraciones inhibitorias para los tratamientos sobre *E. coli* y *S. aureus* no presentan una distribución simétrica. Las CIM correspondientes a las nanoesferas presentaron medianas menores a la medias con una tendencia unilateral derecha. Mientras que las CIM correspondientes a los nanoprismas presentaron una distribución con tendencia a la normal en ambas cepas, aunque en *E. coli* pudo observarse también un outlier o dato atípico. Para el estudio con AgNO<sub>3</sub> se observó una distribución simétrica en *E. coli* ya que la media y la mediana presentaban el mismo valor, mientras que para *S. aureus* presentaron una distribución unilateral izquierda, siendo la mediana más alta que la media. Asimismo, mediante los gráficos de Q-Q Plot (Fig. 19 y 20) se observó un patrón donde los puntos no mostraron buen ajuste a la distribución normal.

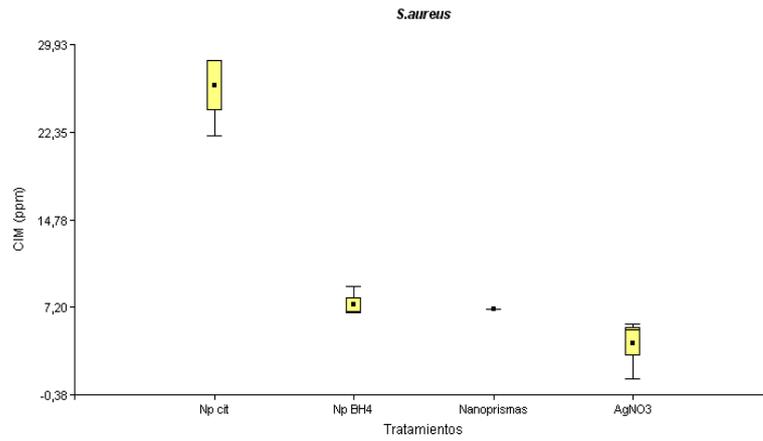


Figura 17: Gráfico de Box-plot para *S. aureus*.

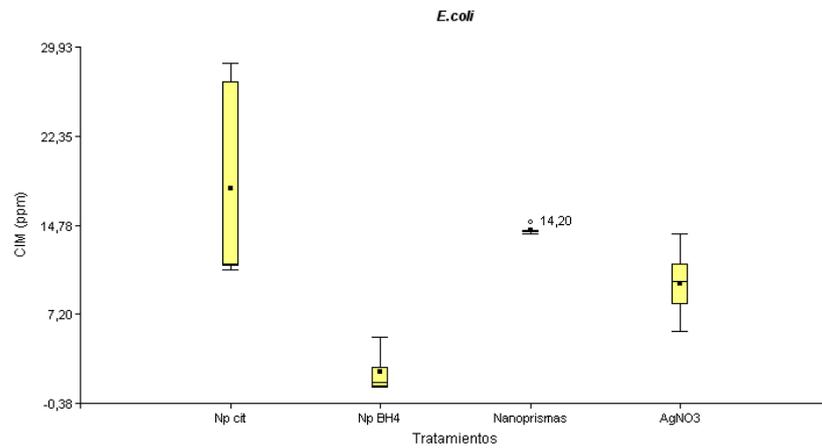


Figura 18: Gráfico de Box-plot para *E. coli*.

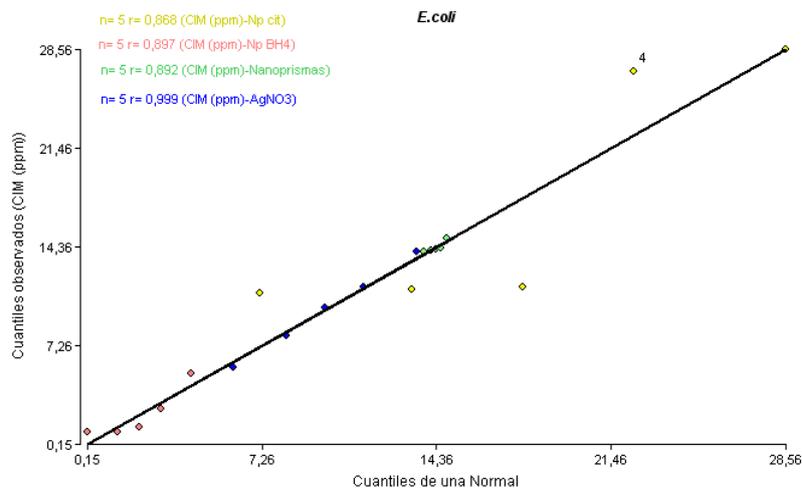


Figura 19: Gráfico de Q-Q Plot para *E. coli*.

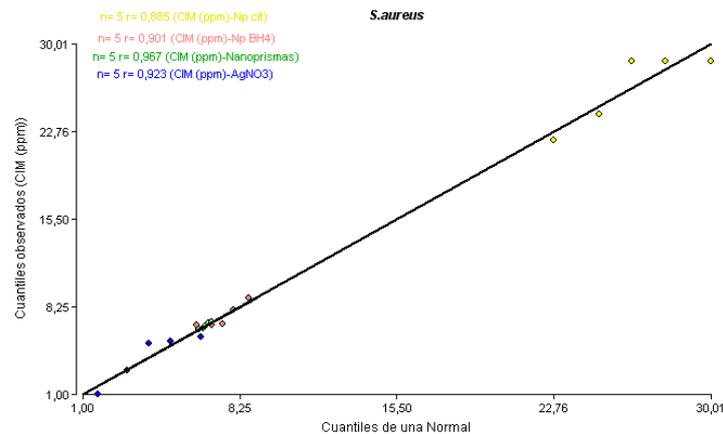


Figura 20: Gráfico de Q-Q Plot para *S. aureus*.

Una vez terminada la estadística descriptiva, se procedió a efectuar el análisis de la varianza de los tratamientos dentro de cada cepa poblacional. Para la elección de la prueba se seleccionó entre paramétricas (ANOVA) o no paramétricas (Kruskal-Wallis) de acuerdo a si los experimentos cumplían con los siguientes supuestos:

1. Las variables deben ser medidas al menos en escalas de intervalo.
2. Las muestras deben ser aleatorias y las observaciones independientes entre sí.
3. Los tratamientos deben tener la misma variabilidad  $\sigma$  (homocedasticidad).
4. Las observaciones en cada tratamiento deben proceder de poblaciones normales.

Para realizar el análisis cuantitativo de la normalidad de Shapiro Wilks se plantearon las siguientes hipótesis para ambas cepas poblacionales (*E. coli* y *S. aureus*):

$H_0$ : Las variables se comportan normalmente.

$H_1$ : Las variables no se comportan normalmente.

Por otro lado, para analizar el supuesto de la homocedasticidad se efectuaron dos hipótesis correspondientes a la prueba de Levene:

$H_0$ : Las varianzas de los tratamientos en *E. coli* y *S. aureus* son iguales.

$$\sigma^2_{(Np\ cit)} = \sigma^2_{(Np\ BH4)} = \sigma^2_{(Nanoprismas)} = \sigma^2_{AgNO3}$$

$H_1$ : Alguna varianza de los tratamientos en *E. coli* y *S. aureus* difiere del resto.

Alguna  $\sigma^2_i \neq \sigma^2$

Los resultados para el análisis de la varianza poblacional se evaluaron en torno a los gráficos de dispersión, donde se analizaron las variaciones de los diferentes tratamientos en ambas cepas, comparando los valores predichos con respecto a los residuos absolutos.

En la prueba de Shapiro Wilks, tanto en *E. coli* (Tabla XIII) como en *S. aureus* (Tabla XII), se obtuvieron valores menores al nivel de significación  $\alpha$  (0,05) para algunos de los tratamientos y se comprobó también mediante los gráficos de dispersión para la prueba de Levene que existe varibilidad entre los mismos (Fig. 21 y 22). Con lo cual, mediante estos resultados se rechazó el supuesto de normalidad y el de homocedasticidad.

Tabla XII: Prueba de Shapiro-Wilks modificado para *S. aureus*.

**Shapiro-Wilks (modificado)**

Tratamientos	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
AgNO3	CIM (ppm)	5	4,06	2,02	0,83	0,1726
Nanoprismas	CIM (ppm)	5	6,68	0,26	0,90	0,4388
Np BH4	CIM (ppm)	5	7,45	1,02	0,79	0,0740
Np cit	CIM (ppm)	5	26,37	3,08	0,75	0,0313

Tabla XIII: Prueba de Shapiro-Wilks modificado para *E. coli*.

**Shapiro-Wilks (modificado)**

Tratamientos	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
AgNO3	CIM (ppm)	5	9,82	3,18	0,99	0,9831
Nanoprismas	CIM (ppm)	5	14,32	0,40	0,82	0,1316
Np BH4	CIM (ppm)	5	2,26	1,79	0,80	0,0922
Np cit	CIM (ppm)	5	17,85	9,07	0,70	0,0099

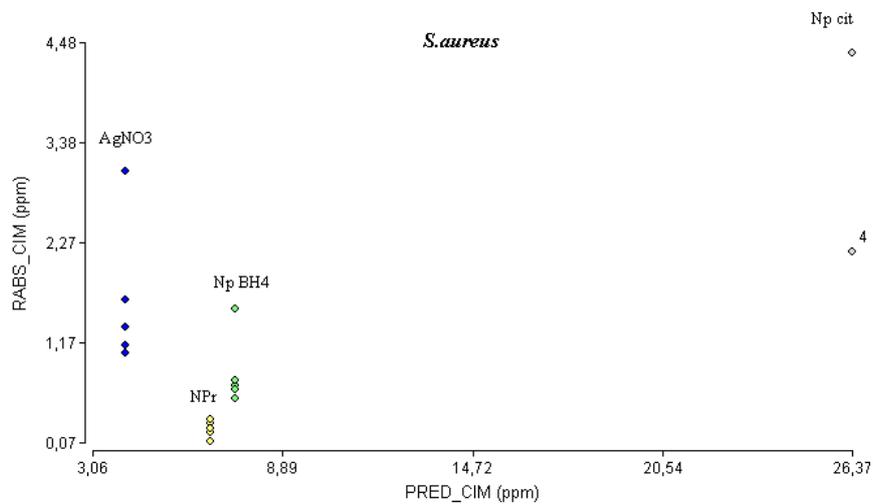


Figura 21: Gráfico de dispersión de los tratamientos efectuados en *S. aureus*

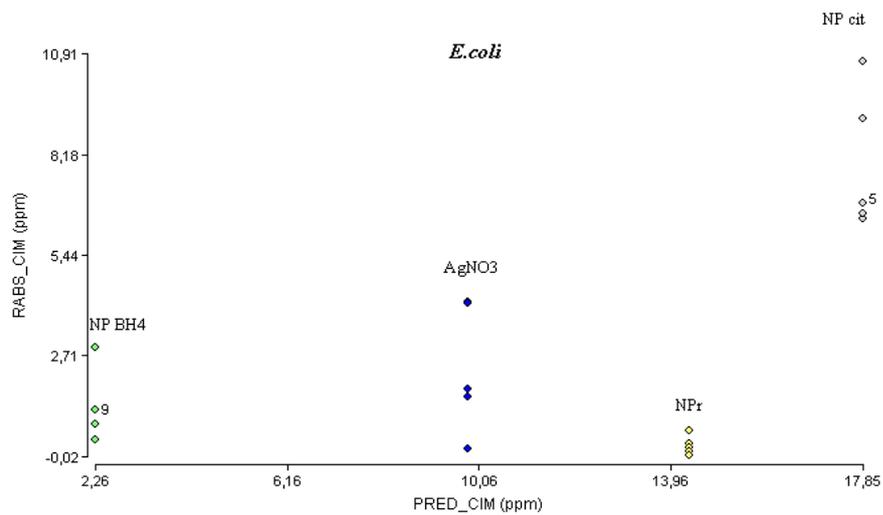


Figura 22: Gráfico de dispersión de los tratamientos efectuados en *E. coli*

Luego de evaluar los supuestos de normalidad y homocedasticidad se decidió que las pruebas estadísticas que se debían efectuar en ambas cepas eran no paramétricas. Mediante la prueba de Kruskal-Wallis elegida, las hipótesis planteadas tanto para *E. coli* como *S. aureus* fueron las siguientes:

$H_0$ : Las poblaciones no difieren en su tendencia central. ( $Me_{(np\ cit)} = Me_{(np\ BH4)} = Me_{(npr)} = Me_{(AgNO3)}$ )

$H_1$ : Al menos una de las poblaciones difiere del resto en su tendencia central. (Alguna  $Me_i$  es  $\neq$ )

Los resultados obtenidos para esta prueba se muestran en las Tablas XIV y XV.

Tabla XIV: Prueba de Kruskal-Wallis para *S. aureus*

**Prueba de Kruskal Wallis**

Variable	Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
CIM (ppm)	AgNO <sub>3</sub>	5	4,06	2,02	5,20	16,55	0,0009
CIM (ppm)	Nanoprismas	5	6,68	0,26	6,60		
CIM (ppm)	Np BH <sub>4</sub>	5	7,45	1,02	6,80		
CIM (ppm)	Np cit	5	26,37	3,08	28,55		

Trat.	Ranks
AgNO <sub>3</sub>	3,00 A
Nanoprismas	9,20 A B
Np BH <sub>4</sub>	11,80 B C
Np cit	18,00 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Tabla XV: Prueba de Kruskal-Wallis para *E. coli*

**Prueba de Kruskal Wallis**

Variable	Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
CIM (ppm)	AgNO <sub>3</sub>	5	9,82	3,18	10,00	14,09	0,0027
CIM (ppm)	Nanoprismas	5	14,32	0,40	14,20		
CIM (ppm)	Np BH <sub>4</sub>	5	2,26	1,79	1,40		
CIM (ppm)	Np cit	5	17,85	9,07	11,42		

Trat.	Ranks
Np BH <sub>4</sub>	3,00 A
AgNO <sub>3</sub>	9,20 A B
Np cit	13,90 B
Nanoprismas	15,90 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Los p-valor obtenidos para ambas cepas fueron menores al nivel de significación  $\alpha$  con un  $p_v < a$  0,0009 en *S. aureus* y un  $p_v < a$  0,0027 en *E. coli*, y en consecuencia se rechazó  $H_0$  planteada al inicio del análisis estadístico. Por ende, existe evidencia significativa de que existen diferencias significativas entre los tratamientos. En el ranking obtenido de la prueba, distintas letras simbolizaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0,05$ ).

Al observar las comparaciones entre ambas cepas, los resultados referentes a *S. aureus* demostraron que existen diferencias significativas entre las CIM de los nanoprismas y las nanoesferas reducidas con citrato, pero no existe una diferencia significativa entre la CIM de los nanoprismas con el AgNO<sub>3</sub> y con las nanoesferas recubiertas con NaBH<sub>4</sub>. Para *E. coli*, se demostró que existe diferencia significativa entre la CIM de las nanopartículas esféricas

reducidas con borohidruro en comparación con los nanoprismas y las nanoesferas reducidas con citrato. No obstante, no existe diferencia significativa entre las nanoesferas recubiertas con  $\text{NaBH}_4$  y el  $\text{AgNO}_3$ . Los resultados se sumarizan en las Figuras 23 y 24 y las Tablas XVI y XVII.

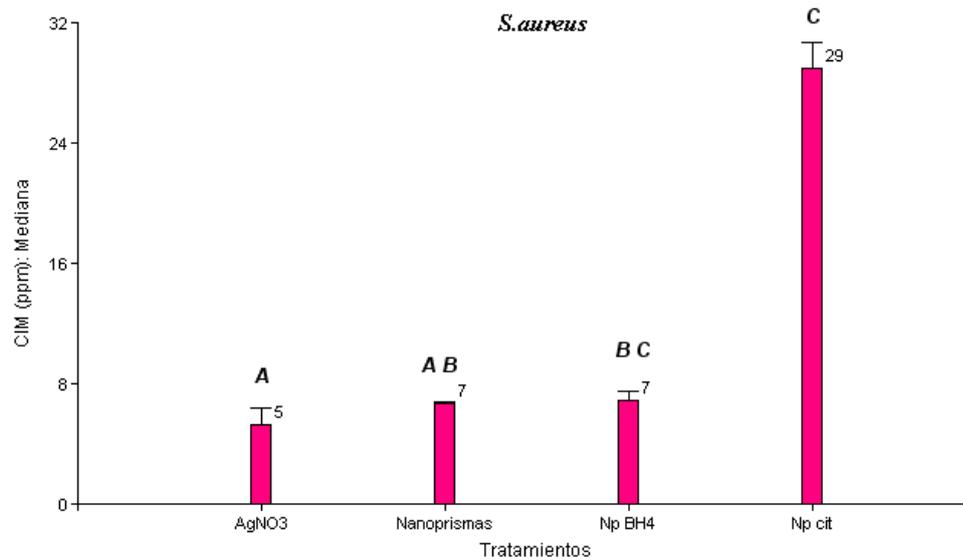


Figura 23: Gráfico de barras correspondiente a los 4 tratamientos en *S. aureus*. En el mismo se ilustran las diferencias significativas entre las nanopartículas y el  $\text{AgNO}_3$ , obtenido con la prueba Kruskal-Wallis.

Tabla XVI: Efecto de los tratamientos según la concentración mínima inhibitoria en ppm (mg Ag/l) sobre el desarrollo de *S. aureus*.

Tratamiento	CIM (ppm)
AgNO <sub>3</sub>	4,06 ± 2,02 (A)
Nanoprismas	6,68 ± 0,26 (A B)
Np BH <sub>4</sub>	7,45 ± 1,02 (B C)
Np citrato	26,37 ± 3,08 (C)

Letras distintas significan cifras significativas ( $p < 0,05$ )

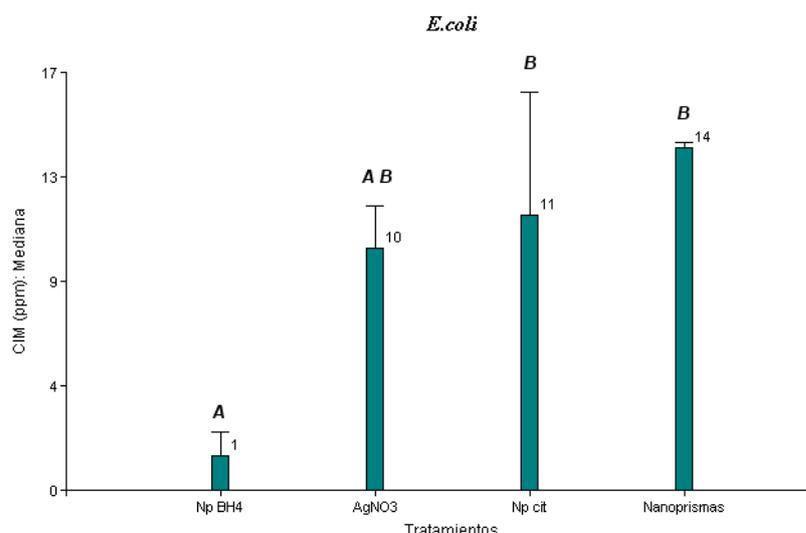


Figura 24: Gráfico de barras correspondiente a los 4 tratamientos en *E. coli*. En el mismo se ilustran las diferencias significativas entre las nanopartículas y el AgNO<sub>3</sub>, obtenido con la prueba Kruskal-Wallis.

Tabla XVII : Efecto de los tratamientos según la concentración mínima inhibitoria en ppm (mg Ag/l) sobre el desarrollo de *E. coli*.

Tratamiento	CIM (ppm)
Np BH <sub>4</sub>	2,26 ± 1,79 (A)
AgNO <sub>3</sub>	9,82 ± 3,18 (A B)
Np citrato	17,85 ± 9,07 (B)
Nanoprismas	14,32 ± 0,40 (B)

Letras distintas significan cifras significativas (p<0,05)

Las diferencias significativas para cada tratamiento dentro de cada una de las cepas se evaluó mediante una prueba t para muestras independientes en las nanopartículas sintetizadas con borohidruro y el AgNO<sub>3</sub> ya que en el análisis de la normalidad para estos tratamientos la prueba de Shapiro Wilks resultó ser mayor al nivel de significación  $\alpha$ . Por otro lado, para el estudio con nanoesferas reducidas con citrato y nanoprismas, se utilizó la prueba de Mann Whitney (Wilcoxon) ya que no se cumplió con el supuesto de normalidad.

Las hipótesis planteadas para estas pruebas fueron:

Prueba t para muestras independientes

H<sub>0</sub>: Las CIM de los tratamientos no presentan diferencias en cada cepa

$$\mu(\text{Np BH}_4)_A = \mu(\text{NP BH}_4)_B$$

$$\mu(\text{AgNO}_3)_A = \mu(\text{AgNO}_3)_B$$

H<sub>1</sub>: Las CIM de los tratamientos presentan diferencias en cada una de las cepas

$$\mu(\text{Np BH}_4)_A \geq 0 \leq \mu(\text{NP BH}_4)_B$$

$$\mu(\text{AgNO}_3)_A \geq 0 \leq \mu(\text{AgNO}_3)_B$$

Donde A= *S. aureus* y B= *E. coli*

Prueba de Mann Whitney (Wilcoxon)

H<sub>0</sub>: Las dos poblaciones no difieren en su tendencia central

$$\text{Me}(\text{Np cit})_A = \text{Me}(\text{Np cit})_B$$

$$\text{Me}(\text{Npr})_A = \text{Me}(\text{Npr})_B$$

H<sub>1</sub>: Las dos poblaciones si difieren en su tendencia central

$$\text{Me}(\text{Np cit})_A \neq \text{Me}(\text{Np cit})_B$$

$$\text{Me}(\text{Npr})_A \neq \text{Me}(\text{Npr})_B$$

Donde A= *S. aureus* y B= *E. coli*

Tabla XVIII: Prueba de Shapiro-Wilks modificado para *E. coli* y *S. aureus*.

**Shapiro-Wilks (modificado)**

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
CIM Np citrato	10	22,11	7,81	0,71	0,0010
CIM np BH4	10	4,86	3,06	0,84	0,0729
CIM npr	10	10,50	4,04	0,68	0,0003
CIM AgNO3	10	6,94	3,94	0,95	0,7794

Finalmente mediante estas pruebas, se concluye que existen diferencias significativas entre las CIM (ppm) de los tratamientos efectuados con nanoesferas reducidas con borohidruro, siendo *E. coli* la cepa más sensible a ellas (Tabla XVII) y para los

nanoprismas y el  $\text{AgNO}_3$  con mayor efectividad sobre las cepas de *S. aureus* (Tabla XVI). Con las nanoesferas reducidas con citrato, si bien *E. coli* es más sensible, la diferencia de las CIM para ambas cepas no es estadísticamente significativa.

En las tablas XIX y XX se muestran los p-valores obtenidos para las pruebas estadísticas (Prueba t y Wilcoxon) empleadas para comprobar si las CIM derivadas de cada tratamiento presentaban diferencias estadísticamente significativas entre ambas cepas empleadas (Grupo 1 *E. coli* y Grupo 2 *S. aureus*).

Tabla XIX: Prueba t para muestras independientes bilateral para las nanopartículas reducidas con  $\text{NaBH}_4$  y para el blanco  $\text{AgNO}_3$  sobre *E. coli* (Grupo 1) y *S. aureus* (Grupo 2).

#### Prueba T para muestras Independientes

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	Media(1)-Media(2)	LI(95)	LS(95)	pHomVar	T	p-valor	prueba
Cepas poblacionales CIM np	BH4	{e.coli}	{s.aureus}	5	4	2,26	7,64	-5,38	-7,79	-2,96	0,4321	-5,26	0,0012	Bilateral
Cepas poblacionales CIM	AgNO3	{e.coli}	{s.aureus}	5	4	9,82	3,78	6,05	1,60	10,49	0,5788	3,21	0,0148	Bilateral

Tabla XX: Prueba de Mann Whitney (Wilcoxon) bilateral para los nanoprismas y las nanopartículas reducidas con citrato, sobre *E. coli* (Grupo 1) y *S. aureus* (Grupo 2).

#### Prueba de Wilcoxon para muestras independientes

Cálculo exacto de probabilidades

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	DE(1)	DE(2)	W	p(2 colas)
Cepas poblacionales CIM npr		e.coli	s.aureus	5	4	14,32	6,60	0,40	0,22	10,00	0,0095
Cepas poblacionales CIM Np	citrato	e.coli	s.aureus	5	4	17,85	27,46	9,07	2,18	30,50	0,0857

Por último, para las CIM que resultaron ser bactericidas en *S. aureus* con el tratamiento de los nanoprismas en contraste con el tratamiento de nitrato de plata, no demostraron diferencias significativas (p-valor = 0,65). Por lo tanto, se podría inferir que estos dos tratamientos tienen la misma capacidad inhibitoria (con efecto bactericida) en bacterias (Gram +) (Tabla XXI).

Las hipótesis fueron:

$H_0$ : Las dos CIM con efecto bactericida (CBM) no difieren en su tendencia central en *S. aureus*.

$$Me (Npr)_A = Me (AgNO_3)_A$$

H<sub>1</sub>: Las dos CIM con efecto bactericida (CBM) si difieren en su tendencia central en *S. aureus*.

$$Me (Npr)_A \neq Me (AgNO_3)_A$$

Tabla XXI: Prueba de Mann Whitney (Wilcoxon) bilateral para los nanoprismas y el nitrato de plata sobre *S. aureus*.

**Prueba de Wilcoxon para muestras independientes**

Cálculo exacto de probabilidades

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	DE(1)	DE(2)	W	p(2 colas)
Tratamientos	CBM S.aureus	AgNO3	npr	5	5	21,08	13,92	13,17	0,40	25,00	0,6508

## 5.5. Síntesis de nanopartículas de cobre

### 5.5.1. Nanopartículas de Cu estabilizadas con ácido ascórbico

Inicialmente, con el agregado de la solución de ácido ascórbico, no se observó ningún cambio de color. Pero con el transcurso del tiempo, se pudo observar un leve tono rosado en la solución (Fig. 25). No se obtuvieron nanopartículas, ya que las partículas preparadas mediante este método se adhirieron a las paredes de vidrio y al buzo, indicando que presentaban un tamaño micrométrico o superior.

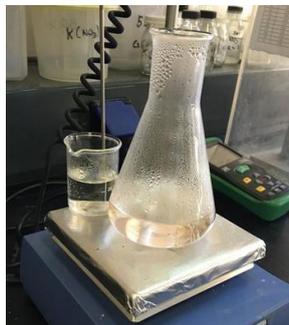


Figura 25: Síntesis de nanopartículas de Cobre, reducidas con ácido ascórbico

Se decidió intentar este método nuevamente, pero incrementando la concentración tanto de cobre como de ácido ascórbico en un orden de diez.

### 5.5.2. Concentración de nanopartículas de Cu estabilizadas con ácido ascórbico

Inicialmente se obtuvo una solución blanca, lo cual se correspondía con la descripción detallada en el artículo científico utilizado como referencia (Umer *et al*, 2014). Luego, como se puede observar en la primera imagen de la Figura 26, la solución viró a un color amarillo claro, que con el transcurso de más de una hora fue variando a un color anaranjado



Figura 26: Variación del color de la solución de nanopartículas de Cobre reducidas con ácido ascórbico, en el lapso de 2 horas.

Se midió a continuación, el espectro de absorción de la solución amarilla para determinar si había material metálico nanométrico. Se lo dejó incubando por un tiempo mayor, observando en 4 horas un color beige oscuro, con un precipitado de color blanco en el fondo.

#### 5.5.2.1. Resultados por espectrofotometría

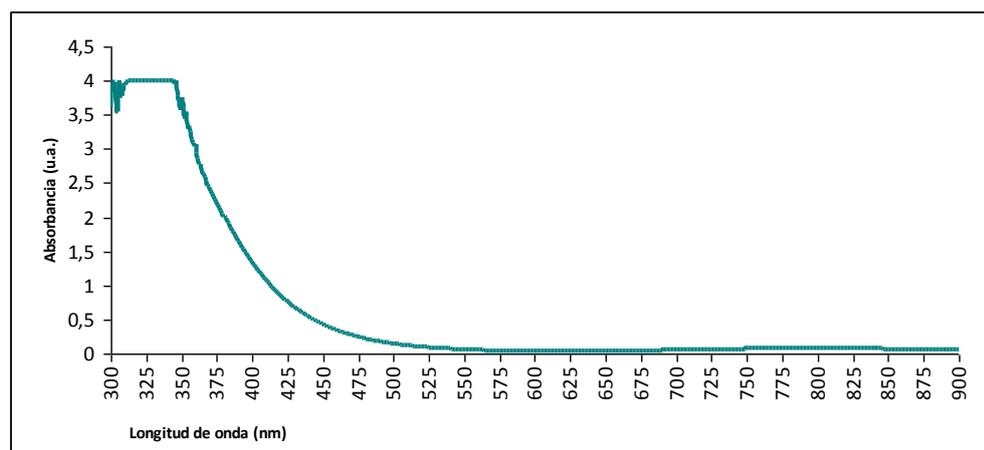


Figura 27: Espectro de absorción UV-visible para las nanopartículas de Cu estabilizadas con ácido ascórbico.

Al realizar la síntesis de nanopartículas de Cu reducidas con ácido ascórbico, se esperaba un pico correspondiente al nanomaterial metálico con máximo entre 400 y 600

nm, relacionado con el color naranja claro de la solución. Como se puede observar en el gráfico (Fig. 27), no se obtuvo una banda plasmónica definida en ningún rango de longitudes de onda. Esto indica que, con las cantidades de reactivos empleadas, no se logró obtener partículas de Cu metálico de tamaño nanométrico.

### 5.5.3. Síntesis de nanopartículas de Cu estabilizadas con $\text{NaBH}_4$

Con el agregado de cada gota de la solución de borohidruro, se observó un claro cambio de color de la solución de cloruro de cobre, que inicialmente era celeste translúcida. La solución fue virando a un tono amarillento y luego a un color más anaranjado. Luego de añadir las últimas gotas de borohidruro, la solución adquirió un color negro y se observó la precipitación de partículas macroscópicas (ver evolución en la Fig. 28).



Figura 28: Evolución de la síntesis de nanopartículas de Cobre reducidas con borohidruro.

Probablemente ocurrió una agregación de las partículas por el exceso de borohidruro, el cual constituía seis veces la concentración final de cobre. Por lo tanto, se procedió a realizar la misma síntesis pero con diferentes proporciones de los agentes precursores.

Se analizó primeramente la solución con menor concentración de borohidruro siendo la misma de 801,23 ppm ( $\text{mg NaBH}_4/\text{l}$ ). Se obtuvo un color gris oscuro verdoso, con partículas de gran tamaño (visibles a simple vista), similares a las de la reducción con 2403,7 ppm de  $\text{NaBH}_4$ .

#### 5.5.4. Síntesis de nanopartículas de Cobre estabilizadas con citrato

Se observó una solución de color celeste, con lo cual indicaría que existe asociación del cobre con los grupos carboxílicos del citrato (Fig. 29). Es decir, el cobre metálico no logró ser reducido mediante esta síntesis, por lo tanto puede decirse que no se generó la formación de nanopartículas.

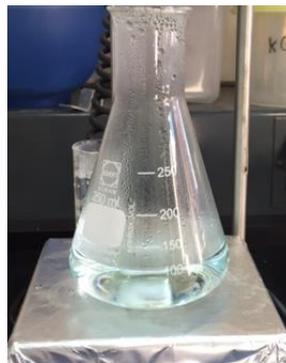


Figura 29: síntesis de nanopartículas de Cu, estabilizadas con citrato.

Para la síntesis de nanopartículas de cobre, se concluyó que mediante la reducción de 67,28 ppm (mg de Cu/L) en agua, utilizando agentes precursores como el ácido ascórbico, el borohidruro y el citrato de sodio en diversas concentraciones, no es posible crear las condiciones químicas necesarias para la formación de nanopartículas de cobre monodispersas. La síntesis en la cual se empleó ácido ascórbico como agente reductor fue la que mejor se aproximó al color esperado, siendo este mismo de color bronce. No obstante, se demostró posteriormente mediante espectrofotometría que no existe longitud de onda en la cual la absorción se presente en un único rango, en consecuencia se concluye que no hay partículas metálicas de tamaño nanométrico (Fig.27).

Por otro lado, las síntesis acuosas en las cuales se utilizaron borohidruro y citrato como agentes reductores resultaron ser rápidas, con NaBH<sub>4</sub> por un lado, se logró un viraje por diversas coloraciones de los tonos esperados (desde beige a marrón oscuro) durante las síntesis, pero todas resultaron finalmente de color gris oscuro, indicando que no pudo obtenerse el producto deseado. Del mismo modo, el color celeste obtenido con citrato no indica formación de nanopartículas sino la obtención del complejo [Cu (Cit)]<sup>+2</sup> (Muhammad Sani Usman *et al*, 2012). Es complicado obtener nanopartículas metálicas de cobre debido a

su alta tendencia a la oxidación. Este elemento es extremadamente sensible al aire, y las fases de óxido son más estables termodinámicamente. La oxidación de las nanopartículas de cobre puede ser eliminada si la síntesis es realizada en presencia de CO o H<sub>2</sub>. Por el otro lado, el manejo de esos gases es complicado, y es preferible evitarlo de ser posible (Khan *et al*, 2016). También se pueden usar otros agentes estabilizante, como el PEG (polietilenglicol), el EtOH (etanol), y el AF (ácido fórmico), inhibidores del crecimiento y de agregación. Otros ejemplos, de catalizadores metálicos, para prevenir la aglomeración de partículas nanométricas son el EDTA, el ácido tartárico, el ácido cítrico (Sieben *et al*, 2010). Sin embargo, en este trabajo se descartaron aquellas síntesis que no fueran compatibles con el crecimiento de las bacterias *S. aureus* y *E. coli*, y muchas de ellas, como las que utilizan el PEG como medio estabilizante, se efectúan en medio orgánico (dimetilformamida, formamida, tolueno) (Wang *et al*, 2010). Tampoco es posible utilizar NP estabilizadas con otros agentes que se emplean comúnmente como agentes protectores como bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), etilendiamina (EDTA) y como aislantes polímeros como PVP, poliestireno, polimetilmetacrilato (Benavente *et al*, 2013; Valencia *et al*, 2015), ya que tampoco son compatibles con los cultivos bacterianos estudiados.

## 6. Conclusiones

A continuación se enumeran las conclusiones que se derivan del presente trabajo:

✓ Se lograron sintetizar nanopartículas esféricas y nanoprismas de Ag, utilizando condiciones de bibliografía. Las nanopartículas sintetizadas pudieron ser concentradas mediante centrifugación.

✓ Se logró establecer la puesta a punto para los ensayos microbiológicos con nanopartículas de Ag sobre las bacterias de *S. aureus* y *E. coli*, como especies representativas de microorganismos (Gram +) y (Gram -), respectivamente.

✓ Se determinó que las nanopartículas de Ag esféricas inhiben el crecimiento de las cepas bacterianas de *S. aureus* y *E. coli*, impidiendo su multiplicación, pero no cumplen con la función de ser agentes bactericidas.

✓ Se logró la menor CIM con efecto bacteriostático en *E. coli* utilizando nanoesferas de Ag reducidas con NaBH<sub>4</sub>.

✓ Se comprobó que las nanopartículas de plata con diferentes morfologías, como los nanoprismas, presentaron una menor CIM con efecto bactericida sobre la cepa (Gram +), *Staphylococcus aureus* en comparación con las nanoesferas de Ag.

✓ Se demostró que los iones liberados por el AgNO<sub>3</sub> presentan un efecto bacteriostático mayor que las nanoesferas sobre las cepas de *S. aureus* siendo además, bactericida.

✓ A pesar de haber intentado diversos métodos de síntesis de nanopartículas de cobre en medio acuoso, se pudo concluir que el agua destilada utilizada

para realizar las síntesis químicas no resulta ser el medio más adecuado para la protección de la oxidación y conservación de las nanopartículas de cobre.

El efecto bactericida observado con el tratamiento de nanoprismas de Ag sobre la cepa de *S. aureus*, confirma la hipótesis planteada al inicio del trabajo, por lo que se estableció que la forma de dichas nanopartículas podría estar generando una disrupción significativa sobre la pared bacteriana, a diferencia de las nanoesferas.

Finalmente, la causa por la que no se obtuvieron los resultados esperados con la síntesis para la reducción de cobre metálico fue debido a que los reactivos necesarios para obtener dichas nanopartículas no resultaban compatibles con los ensayos microbiológicos posteriores.

Teniendo en cuenta estos resultados, se sugiere realizar más experimentos para explorar a fondo la relación forma y tamaño dependientes de la actividad biocida de nanopartículas de Ag, debido a que el papel de las áreas superficiales efectivas de diferentes geometrías todavía no se entiende completamente.

Por último, se espera que este estudio sobre la eficacia bactericida variando el tamaño y forma de nanopartículas facilite un nuevo paradigma para considerar el verdadero papel de las nanopartículas de Ag y Cu como agentes antimicrobianos en diversas aplicaciones dentro de la industria nanobiotecnológica.

A continuación listamos algunas posibles estrategias para futuros experimentos que permitirán mejorar o complementar los resultados obtenidos:

- Estudiar más detalladamente las formas y tamaños de las nanopartículas, mediante medidas de microscopía electrónica de transmisión (TEM).

- Generar un medio alternativo que sea compatible con las cepas bacterianas y en el que pueda adicionarse PEG u otros compuestos para lograr llevar a cabo la síntesis de nanopartículas de Cu estables.

- Comparar la liberación tanto de iones de  $\text{Ag}^+$  y  $\text{Cu}^{2+}$  de las nanopartículas en agua y medio de cultivo, de manera de determinar si esta liberación puede ser la causa de la toxicidad de las Nps.

- Obtener un perfil de crecimiento del cultivo batch en presencia de las distintas concentraciones de las nanopartículas de plata/cobre para *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923.

## 7. Apéndices

### [1] Obtención de nanopartículas de Ag estabilizadas con citrato

PM AgNO<sub>3</sub>: 169,86 g/mol

$2,649 \times 10^{-4}$  moles en 0,045 g.

#### Concentración molar de Ag

$$\frac{2,649 \times 10^{-4} \text{ moles} \times 1000 \text{ ml}}{250 \text{ ml}} = 1,059 \times 10^{-3} \text{ M}$$

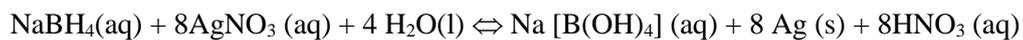
### [2] Obtención de nanopartículas de Ag estabilizadas con borohidruro

NaBH<sub>4</sub>

PM NaBH<sub>4</sub>: 37,83 g

$$\frac{0,002 \text{ moles (0,7566 g)} \times 187,5 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 3,75 \times 10^{-4} \text{ moles} = 0,01418 \text{ g}$$

Para el matraz de 250 ml se pesan 0,019 g de NaBH<sub>4</sub>



AgNO<sub>3</sub>

PM AgNO<sub>3</sub>: 169,87 g 1 mol

$$\frac{0,001 \text{ g} \times 62,5 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 0,0106 \text{ g} = 6,25 \times 10^{-5} \text{ moles}$$

Para el matraz de 100 ml se pesan 0,017 g de  $\text{AgNO}_3$

**Concentración molar de Ag**

$$\frac{6,25 \times 10^{-5} \times 1000 \text{ ml}}{500 \text{ ml}} = 1,25 \times 10^{-4} \text{ M}$$

**Solución citrato de sodio**

$$\frac{1,5 \times 10^{-3} \times 250 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 3,75 \times 10^{-4} \text{ moles}$$

PM  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ : 258,06 g

$$\frac{0,0967725 \text{ g}}{258,06 \text{ g}} = 3,75 \times 10^{-4} \text{ moles}$$

**[2.1] Dilución de las nanopartículas reducidas con citrato**

$$V_i \times 1,059 \times 10^{-3} \text{ M} = 500 \text{ ml} \times 1,25 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$V_i = 59,01 \text{ ml}$$

**[3] Síntesis de nanoprismas de Plata**

$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$

Mar: 258,06 g/mol

$$\frac{1,25 \times 10^{-2} \text{ M} \times 258,06 \text{ g/mol} \times 34,48 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 0,11 \text{ g de } \text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$$

$\text{AgNO}_3$

Mar: 169,87 g/mol

$$\frac{3,75 \times 10^{-4} \text{ M} \times 169,87 \text{ g/mol} \times 86,20 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 0,00549 \text{ g de AgNO}_3$$

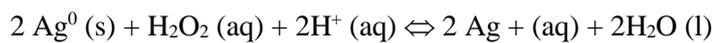
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Mar: 34,0147 g/mol

$$\frac{5,0 \times 10^{-2} \text{ M} \times 34,0147 \text{ g/mol} \times 86,2 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 0,146 \text{ g de H}_2\text{O}_2$$

%p/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>= 30

=0,56 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 100 ml de sn



NaBH<sub>4</sub>

Mar: g/mol

$$\frac{5 \times 10^{-3} \text{ M} \times 37,83 \text{ g/mol} \times 43,10 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 0,008153 \text{ g de NaBH}_4$$

**Concentración molar de Ag**

$$\frac{1,875 \times 10^{-6} \text{ moles} \times 1000 \text{ ml}}{14,5 \text{ ml}} = 1,29 \times 10^{-4} \text{ M}$$

**[4] Síntesis de nanopartículas de Cobre reducidas con ácido ascórbico**

PM Cloruro de cobre (II) dihidratado: 170,48 g/mol.

[Cu]= Cf.Vf = Co. Vo

$$\frac{1,059 \times 10^{-3} \times 100 \text{ ml}}{90 \text{ ml}} = 1,17 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$[\text{AA}] = \frac{0,01059 \times 100 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 0,1059 \text{ M}$$

10 ml

Para Cu<sup>+2</sup>: en 90 ml,  $1,053 \times 10^{-4}$  moles = 0,01795 g

Para AA: en 10 ml,  $1,059 \times 10^{-3}$  moles = 0,186512 g

**[5] Síntesis de nanopartículas de Cobre reducidas con borohidruro**

$$[Cu] = C_f \cdot V_f = C_o \cdot V_o$$

$$\frac{1,059 \times 10^{-3} \times 100 \text{ ml}}{90 \text{ ml}} = 1,17 \times 10^{-3} \text{ M}$$

PM borohidruro de Sodio: 37,83 g/mol

6 BH<sub>4</sub> : 1 Cu

$$[BH_4] = \frac{0,006354 \times 100 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} = 0,06354 \text{ M}$$

En 10 ml,  $6,354 \times 10^{-4}$  moles = 0,02403 gramos

**[5.1] relación 2:1 nanopartículas de Cobre reducidas con borohidruro**

2 BH<sub>4</sub> : 1Cu

$$[BH_4] = \frac{0,002118 \times 100 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} = 0,02118 \text{ M}$$

En 10 ml,  $2,11 \times 10^{-4}$  moles = 0,0080 g

**[6] Síntesis de nanopartículas de Cobre estabilizadas con citrato**

2 citrato : 1 Cu

$$[Cu] = \frac{1,059 \times 10^{-3} \times 100 \text{ ml}}{90 \text{ ml}} = 0,00117 \text{ M}$$

$$[Na_3C_6H_5O_7] = \frac{0,05 \text{ g} \times 100 \text{ ml}}{250 \text{ ml}} = 2 \times 10^{-2} \text{ g}$$

$$2X [\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7] = 4 \times 10^{-2} \text{ g}$$

## [7] Recuento y cálculo de las cargas microbianas

### 7.1. Ensayos preliminares para la puesta a punto en la determinación de la CIM

#### 7.1.1. Ensayo 1

##### *S. aureus*

Dilución  $10^{-6}$ : 42 ufc.

Dilución  $10^{-7}$ : 9 ufc.

El número de unidades formadoras de colonias en el caldo original, corresponde a:

$$\text{ufc/ml: } 9 \times 10^7 \times 1/0,1 \text{ ml} = 9 \times 10^8 \text{ ufc/ml}$$

$$\text{Carga ensayada: } 9 \times 10^8 \text{ ufc/ml} \times 10^{-1} \times 0,1 \text{ ml} = 9 \times 10^6 \text{ células}$$

$$9 \times 10^8 \text{ ufc/ml} \times 10^{-6} \times 0,1 \text{ ml} = 90 \text{ células}$$

##### *E. coli*

Dilución  $10^{-6}$ : 120 ufc.

Dilución  $10^{-7}$ : 12 ufc.

El número de unidades formadoras de colonias en el caldo original, corresponde a:

$$\text{ufc/ml: } 12 \times 10^7 \times 1/0,1 \text{ ml} = 1,2 \times 10^9 \text{ ufc/ml}$$

$$\text{Carga ensayada: } 1,2 \times 10^9 \text{ ufc/ml} \times 10^{-1} \times 0,1 \text{ ml} = 1,2 \times 10^7 \text{ células}$$

$$1,2 \times 10^9 \text{ ufc/ml} \times 10^{-6} \times 0,1 \text{ ml} = 1,2 \times 10^2 \text{ células}$$

#### 7.1.2. Ensayo 2

##### *S. aureus*

Dilución  $10^{-6}$  = 126 ufc.

Dilución  $10^{-7}$  = 98 ufc.

$$\text{ufc/ml: } 98 \times 10^7 \times 1/0,1 \text{ ml} = 9,8 \times 10^9 \text{ ufc/ml}$$

Carga ensayada:  $9,8 \times 10^9$  ufc/ml  $\times 10^{-1} \times 0,1$  ml =  $9,8 \times 10^7$  células

***E. coli***

Dilución  $10^{-5}$  : 32 ufc.

ufc/ml:  $32 \times 10^5 \times 1/0,1$  ml =  $3,2 \times 10^7$  ufc/ml

Carga ensayada:  $3,2 \times 10^7$  ufc/ml  $\times 10^{-1} \times 0,1$  ml =  $3,2 \times 10^5$  células

7.1.3. Ensayo con nanoesferas recién sintetizadas

***S. aureus***

Dilución  $10^{-6}$ : 77 ufc.

Dilución  $10^{-7}$ : 8 ufc.

El número de unidades formadoras de colonias, corresponde a:

ufc/ml:  $77 \times 10^6 \times 10 = 7,7 \times 10^8$  ufc/ml

Carga ensayada:  $7,7 \times 10^8$  ufc/ml  $\times 10^{-5} \times 0,01$  ml = 77 células

***E. coli***

Dilución  $10^{-6}$ : 56 ufc.

Dilución  $10^{-7}$ : 8 ufc.

ufc/ml:  $56 \times 10^6 \times 10 = 5,6 \times 10^8$  ufc/ml

Carga ensayada:  $5,6 \times 10^8$  ufc/ml  $\times 10^{-5} \times 0,01$  ml = 56 células

7.1.4. Ensayo con nanoesferas envejecidas

***S. aureus***

Dilución  $10^{-7}$  : 11 ufc.

Dilución  $10^{-6}$  : 102 ufc.

ufc/ml:  $11 \times 10^7 \times 1/0,1$  ml =  $1,1 \times 10^9$  ufc/ml

Carga ensayada:  $1,1 \times 10^9$  ufc/ml  $\times 10^{-5} \times 0,01$  ml =  **$1,1 \times 10^2$  células**

***E. coli***

Dilución  $10^{-7}$  : 19 ufc.

Dilución  $10^{-6}$  : 68 ufc.

El número de unidades formadoras de colonias en el caldo original, correspondía a:

$$\text{ufc/ml: } 19 \times 10^7 \times 1/0,1 \text{ ml} = 1,9 \times 10^9 \text{ ufc/ml}$$

$$\text{Carga ensayada: } 1,9 \times 10^9 \text{ ufc/ml} \times 10^{-5} \times 0,01 \text{ ml} = \mathbf{1,9 \times 10^2 \text{ células}}$$

#### 7.1.5. Ensayo con nanoprismas

##### *S. aureus*

Dilución  $10^{-6}$ : 56 ufc

El número de unidades formadoras de colonias en el caldo original, corresponde a:

$$\text{ufc/ml: } 56 \times 10^6 \times 1/0,1 \text{ ml} = 5,6 \times 10^8 \text{ ufc/ml}$$

$$\text{Carga ensayada: } 5,6 \times 10^8 \text{ ufc/ml} \times 10^{-5} \times 0,01 \text{ ml} = 56 \text{ células}$$

##### *E. coli*

Dilución  $10^{-6}$ : 66 ufc

El número de unidades formadoras de colonias en el caldo original, corresponde a:

$$\text{ufc/ml: } 66 \times 10^6 \times 1/0,1 \text{ ml} = 6,6 \times 10^8 \text{ ufc/ml}$$

$$\text{Carga ensayada: } 6,6 \times 10^8 \text{ ufc/ml} \times 10^{-5} \times 0,01 \text{ ml} = 66 \text{ células}$$

## 8. Referencias bibliográficas

Acharya T. “*Coagulase Test: principle, procedure and interpretation*” [en línea]. Updated 18 Apr. 2012. [consulta 08 nov. 2016]. <<https://microbeonline.com/diagnostic-tests-biochemical-tests-coagulase-test/>>.

Agarwal M, Jyoti A, Singh Tomar R. "Growth inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* by citrate capped copper nanoparticles". International Journal of Pharma & Bio Sciences Spl Ed 2016; pp 131-139.

Agnihotri S, Mukherji S, Mukherji S. “Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy”. RSC Advances 2014; vol. 4:3974–3983.

Ahrland S, Chatt J, Davies N R. “The relative affinities of ligand atoms for acceptor molecules and ions”. Quarterly Reviews, Chemical Society 1958; vol.12:265–276.

Alagarasi A. “Introduction to nanomaterials”. Viswanathan B (ed.), Nanomaterials, Narosa Publishing House, 2009.

Alcorno IE. "Fundamentals of Microbiology" 5th edn 1997 (Reading, MA: Addison Wesley Longman Inc.).

Álvarez P, Brown GR. "Pruebas indican que los iones de plata, no las nanopartículas en sí, ayudan a eliminar bacterias". The Silver Institute 2012.- [Consulta 01 nov. 2016]. <<https://www.silverinstitute.org/site/wp-content/uploads/2012/10/SNSPAug2012.pdf>>.

Anbarasu R, Selvan G, Baskar S, Raja V. “Nalidic acid mediated silver nanoparticles synthesis, characterization and its pharmacological applications”. International Journal of Scientific Research and Modern Education (IJSRME) 2016; vol. 1:75-83.

Asghari S, Johari SA, Lee JH, Kim YS, Jeon YB, Choi HJ, Moon MC, Yu IJ. “Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*”. Journal of Nanobiotechnology 2012; vol. 10:1–14.

Avadi MR, Sadeghi AMM, Tahzibi A, Bayati Kh, Pouladzadeh M, Zohuriaan-Mehr MJ, Rafiee-Tehrani M. “*Diethylmethyl chitosan as an antimicro-bial agent: synthesis, characterization and antibacterial effects*”. *European Polymer Journal* 2004; vol. 40:1355-1361.

Ávalos, A, Haza, AI, Mateo, D y Morales, P. “*Silver nanoparticles: applications and toxic risks to human health and environment*”. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 2013; vol. 7:1-23.

Benavente E, Lozano H, González G. “*Fabrication of copper nanoparticles: advances in synthesis, morphology control, and chemical stability*”. *Recent Patents on Nanotechnology* 2013; vol. 7, 108-132.

Beveridge TJ, Murray RGE. “*Sites of metal deposition in the cell wall of Bacillus subtilis*”. *Journal of Bacteriology* 1980; vol. 141:876–887.

Bosco Balaguru RJ y Jeyaprakash BG. “*Melting points, mechanical properties of Nanoparticles and hall petch relationship for nanostrucutred materials*”. NPTEL 2010. pp. 1-18.

Cao G, Wang Y. “*Nanostructures and nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications*”. 2<sup>nd</sup> edition. Imperial College Press 2004.

Cathcart N, Frank AJ, Kitaev V. “*Silver nanoparticles with planar twinned defects: effect of halides for precise tuning of plasmon resonance maxima from 400 to >900 nm*”. *Chemical Communications* 2009; vol. 46:7170-2.

Cho K, Park J, Osaka T, Park S. “*The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient*”. *Electrochim Acta* 2005; vol. 51:956–960.

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung. “*Han descubierto que las nanopartículas de plata pueden ser tóxicas porque liberan iones de plata, conocidos por sus propiedades antibacterianas*”. Agencia Iberoamericana para la difusión de la Ciencia y la Tecnología [en línea]. Updated 1 March. 2010 [consulta 18 oct 2016]. < <http://www.dicyt.com/viewNews.php?newsId=16817>>.

Dang TMD, Le TTT, Fribourg-Blanc E, Dang MC. “*The influence of solvents and surfactants on the preparation of copper nanoparticles by a chemical reduction method*”. Vietnam Academy of Science & Technology 2011; vol.2: 1-3.

Davies J, Davies D. “*Origins and Evolution of Antibiotic Resistance*”. Microbiology and Molecular Biology Reviews 2010; vol.74: 417-433.

Dong PV, Ha CH, Binh LT, Kasbohm J. “*Chemical synthesis and antibacterial activity of novel-shaped silver nanoparticles*”. International Nano Letters 2012; vol. 2:1–9.

Duran N, Marcato PD, De Souza GIH, Alves, OL, Esposito E. “*Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment*”. Journal of Biomedical Nanotechnology 2007; vol. 3: 203-208.

El-Kheshen AA, El-Rab SFG. “*Effect of reducing and protecting agents on size of silver nanoparticles and their anti-bacterial activity*”. Der Pharma Chemica 2012; vol. 4:53–65.

Errecalde JO. “*uso de antimicrobianos en animales de consumo*”. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, 2004.

Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. “*A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus*”. Journal of Biomedical Materials Research 2000; vol. 52,662–668.

Finegold SM, Sweeney EE. “*New selective and differential medium for coagulase-positive Staphylococci allowing rapid growth and strain differentiation*”. Journal of Bacteriology 1961; vol. 81: 636-641.

Frank AJ, Cathcart N, Maly KE, Kitaev V. “*Synthesis of Silver Nanoprisms with variable size and investigation of their optical properties: a first-year undergraduate experiment exploring plasmonic Nanoparticles*”. Journal of Chemical Education 2010; vol. 87:1098-1101.

Fu PP, Xia Q, Hwang HM, Ray PC, Yu H. “*Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species*”. Journal of Food and Drug Analysis 2014; vol. 22:64-75

Gan X, Liu T, Zhong J, Liu X, Li G. “*Effect of Silver nanoparticles on the electron transfer reactivity and the catalytic activity of myoglobin*”. Chembiochem 2004; vol. 5:1686–1691.

Gao J, Xu M. “*Metal nanoparticles of various shapes*”. 2007. ECE-580 Mid-term Paper.

Gogoi SK, Gopinath P, Paul A, Ramesh A, Ghosh SS, Chattopadhyay A. “*Green fluorescent protein expressing Escherichia coli as a model system for investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles*”. Langmuir 2006; vol. 22:9322-9328.

Goel S, Chen F, Cai W. “*Synthesis and Biomedical Applications of Copper Sulfide Nanoparticles: From Sensors to Theranostics*”. Small 2014; vol. 10:631-645.

Gophinat V, MubarakAli D, Priyadarshini S, MeeraPriyadharsshini N, Thajuddin N, Palaniyandi V. “*Biosynthesis of silver nanoparticles from Tribulus terrestris and its Antimicrobial activity: A novel biological approach*”. Coloids and surfaces B: Biointerfaces 2012; vol. 96:69-74.

Gupta A, Matsui K, Lo JF, Silver S. “*Molecular basis for resistance to silver cations in Salmonella*”. Nature Medicine 1999; vol. 5:183-188.

Gutiérrez Wing CE. “*Las nanopartículas: pequeñas estructuras con gran potencial. ¿Por qué el interés en estos materiales? ¿Qué potencial tienen?*”. Contacto Nuclear 2012. pp. 24-29.

Hatchett DW, White HS. “*Electrochemistry of Sulfur Adlayers on the Low-Index Faces of Silver*” The Journal of Physical Chemistry 1996; vol. 100:9854–9859.

Iravani S, Korbekandi H, Mirmohammadi SV, Zolfaghari B. “*Synthesis of silver nanoparticles: Chemical, physical and biological methods*”. Research in Pharmaceutical Sciences 2014; vol. 9:385–406.

Katsumiti A, Gilliland D, Arostegui I, Cajaraville MP. “*Mechanisms of Toxicity of Ag Nanoparticles in Comparison to Bulk and Ionic Ag on Mussel Hemocytes and Gill Cell*”. PLoS One 2015.

Khan A, Rashid A, Younas R, Chong R. “*A chemical reduction approach to the synthesis of copper nanoparticles*”. International Nano Letters 2016; vol. 6:21-26.

Kim JH, Cho H, Ryu SE, Choi MU. “*Effects of metal ions on the activity of protein tyrosine phosphatase VHR: highly potent and reversible oxidative inactivation by Cu<sup>2+</sup> ion*”. Archives of Biochemistry and Biophysics 2000; vol. 382:72–80.

Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, Kim SH, Park YK, Park YH, Hwan CY, Kim YK, Lee YS, Jeong DH, Cho MH. “*Antimicrobial effects of silver nanoparticles*”. *Nanomedicine* 2007; vol. 3:95-101.

Kolár M, Urbánek K, Látal T. “*Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance*”. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2001; vol. 17:357–363.

Lee PC, Meisel D. “*Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols*”. *The Journal of Physics and Chemistry* 1982; vol. 86:3391-3395.

Lemire JA, Harrison JJ, Turner JR. “*Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications*”. *Nature Reviews Microbiology* 2013; vol. 11: 371–384.

Lin YE, Vidic RD, Stout JE, Yu VL. “*Individual and combined effects of copper and silver ions on inactivation of Legionella pneumophila*”. *Water Research* 1996; vol. 30:1905–1913.

Lin YE, Vidic RD, Stout JE, McCartney CA, Yu VL. “*Inactivation of Mycobacterium avium by copper and silver ions*”. *Water Research* 1998; vol. 32:1997–2000.

Liz Marzán LM “*Nanometals: formation and color*”. *Materials Today* 2004; vol.7, no.2:26-31.

Lok CN, Ho CM, Chen R, He Qy, Yu WY, Sun H, Tam PK, Chiu JF, Che CM. “*Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles*”. *Journal of Proteome Research* 2006; vol. 5:916–924.

Long TC, Saleh N, Tilton RD, Lowry GV, Veronesi B. “*Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity*”. *Environmental Science and Technology* 2006; vol. 40:4346–4352.

López Tevez L, Torres C. “*Determinación de la actividad antimicrobiana*”. Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Agroindustrias 2006.

MacFaddin J. “*Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*”. Ed. Médica Panamericana 2004, 3º Edición, Buenos Aires, Argentina.

Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. “*Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity*”. BioMed Research International 2013, vol.2013:1-15.

Martínez-Castanon GA, Nino-Martínez N, Martínez-Gutierrez F, Martínez-Mendoza JR, Ruiz F. “*Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes*”. Journal of Nanoparticle Research 2008; vol. 10:1343–1348.

Mavani K, Shah M. “*Synthesis of silver nanoparticles by using sodium borohydride as a reducing agent*”. International Journal of Engineering Research & Technology 2013; vol. 2:2278-0181.

Maynard A, Michelson E. “*An inventory of nanotechnology based consumer products currently on the market*”. Project on Emerging Nanotechnologies 2011.

McDonell G, Russell D. “*Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance*”. Clinical Microbiology Reviews 1999; vol. 12:147-179

Mittu R. “*Synthesis, characterization of copper nanoparticles - a review*”. International Advanced Research Journal in Science, Engineering and Technology 2016; Vol. 3: 37-40.

Mody VV, Siwale R, Singh A, Mody HR. “*Introduction to metallic nanoparticles*”. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences 2010; vol. 2:282-289

Mohammad J, Abderrahim B, Boiteux G, Massardier V, Bertrand G, Anatoli S. “*Electrical and thermal properties of polyethylene/silver nanoparticle composites*”. Polymer Composites 2013; vol. 34:778-786.

Mohanpuria P, Rana NK, Yadav SK. “*Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications*”. Journal of Nanoparticle Research 2008; vol. 10:507–517.

Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT. “*The bactericidal effect of silver nanoparticles*”. Nanotechnology 2005; vol. 16:2346–2353.

Neu HC. “*The crisis in antibiotic resistance*”. Science 1992; vol. 257:1064-1073.

Nitinaivinij K, Parnklang T, Thammacharoen C, Ekgasita S, Wongravee K. “*Colorimetric determination of hydrogen peroxide by morphological decomposition of silver nanoprisms coupled with chromatography analysis*”. Analytical Methods 2014; vol.6: 9816-9824.

Okonko IO, Fajobi EA, Ogunnusi TA, Ogunjobi AA, Obiogbolu CH. “*Antimicrobial chemotherapy and sustainable development: the past, the current trend, and the future*”. African Journal of Biomedical Research 2008; vol. 11:235-250.

Pacioni NL, Borsarelli CD, Rey V, Veglia AV. "Synthetic routes for the Preparation of Silver Nanoparticles". Springer International Publishing Switzerland 2015; pp 13-46.

Pal S, Tak YK, Song JM. “*Does the antimicrobial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle. A study of the gram-negative bacterium Escherichia coli*”. Applied and Environmental Microbiology 2007; vol. 73:1712–1720.

Palza H. “*Antimicrobial polymers with metal nanoparticles*”. International Journal of Molecular Sciences 2015; vol. 16:2099-2116.

Pullman Regional Hospital. “*Pullman Regional Hospital invests in bacteria-killing copper to reduce potentially deadly infections*”. Antimicrobial Copper. Updated 18 Nov. 2014. [Consulta 15 sept. 2016]. <<http://www.multivu.com/players/English/7378651-copper-development-association-cda-pullman-regional-hospital-keep-patients-safe-antimicrobial-copper/>>.

Qi L, Xu Z, Jiang X, Hu C, Zou X. “*Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles*”. Carbohydrate Research 2004; vol. 339:2693-2700.

Rabeah R, Yousef H. “*Antibacterial mechanisms of metallic nanoparticles*”. Dinamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology 2009; p. 13-15.

Raffi M, Hussain F, Bhatti TM, Akhter JI, Hameed A, Hasan MM. “*Antibacterial characterization of silver nanoparticles against E. coli ATCC-15224*”. Journal of Materials Science & Technology 2008; vol.24:192-196.

Raimondi F, Scherer GG, Kotz R, Wokaun A. “*Nanoparticles in energy technology: examples from electrochemistry and catalysis*” Angewandte Chemie International Edition in English 2005; vol. 44:2190–209.

Raza MA, Kanwal Z, Rauf A, Sabri AN, Riaz S, Naseem S. “*Size and shape-dependent antibacterial studies of silver nanoparticles synthesized by wet chemical routes*”. *Nanomaterials* 2016; p.6:74.

Riverón FF, Hernández JL, Ponce Martínez LM, Machado Betarte C. “*Resistencia bacteriana*”. *Revista Cubana de Medicina Militar* 2003; vol. 32:44-48.

Rossi MB. “*Nanociencia y nanotecnología en el Siglo XXI*”. *Revista Digital de Ciencias - Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y de Salud* 2013.

Ruparelia JP, Duttgupta SP, Chatterjee AK., Mukherji SM. “*Avances in environmental management and technology*”, A nanonickel. Technical poster, Proceedings of the 9th Annual Conference of the Indian Environmental Association 2006.

Ruparelia JP, Chatterjee AK, Duttgupta SP, Mukherj S. “*Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles*”. *Acta Biomaterialata* 2008; vol. 4:707-716.

Saga T, Yamaguchi K. “*History of antimicrobial agents and resistant bacteria*”. *Research and reviews* 2009; vol 52:103-108

Santos C L, Albuquerque A.JR, Sampaio FC, Keyson D. “*Nanomaterials with antimicrobial properties: applications in health sciences*”. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* 2013; p.143-146.

Sarkar S, Jana AD, Samanta SK, Mostafa G. “*Facile synthesis of silver nanoparticles with highly efficient anti-microbial property*”. *Polyhedron* 2007; vol. 26:4419–4426.

Seil JT, Webster TJ. “*Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature*”. *Int J Nanomedicine* 2012; vol.7: 2767–2781.

Sieben, JM, Duarte MME, Mayer CE. “*Effect of organic additives on the disposition of Pt-Ru catalysts*”. *Matéria Rio de Janeiro*, 2010, vol.15:076-085.

Siegrist J. “*Selective growth media for differentiation and detection of Escherichia coli and other coliforms*”. *AnalytiX* 2011; vol.8: 1-5.

Silva Soares GM, Figueiredo LC, Faveri M, Cavalca Cortelli S, Mendes Duarte P, Feres M. “*Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms*

*of bacterial resistance to these drugs*". Journal of Applied Oral Science 2012; vol. 20:295-304.

Silver S. "*Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds*". FEMS Microbiology Reviews 2003; vol. 27:341-353.

Sondi I, Salopek-Sondi B. "*Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria*". Journal of Colloid and Interface Science 2004; vol. 275:177–182.

Stohs SJ, Bagchi D. "*Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions*". Free Radical Biology and Medicine 1995; vol. 18:321–336.

Tan SK, Cheon KY. "*Advances of Ag, Cu, and Ag–Cu alloy nanoparticles synthesized via chemical reduction route*". Journal of Nanoparticle Research 2013; 15:1537.

Torres LA, Gmez-Quintero TJR, Padron GH, Santana FB, Hernandez JF, Castano VM. "*Silver nanoprisms and nanospheres for prosthetic biomaterials*". Conference paper, IADR/AADR/CADR General Session and Exhibition 2013.

Umer A, Naveed S, Naveed R, Rafique MS, Imran M. "*A green method for the synthesis of Copper Nanoparticles using L-ascorbic acid*". Materia 2014; vol. 19.

Usman MS, Ibrahim NA, Shameli K, Zainuddin N, Yunus WM. "*Copper nanoparticles mediated by chitosan: synthesis and characterization via chemical methods*". Molecules 2012; vol. 17:14928-14936.

Valencia E., L. Díaz, S. Devis-Ruiz, Benavente, G. González. "*Síntesis de nanopartículas de cobre estabilizadas y aisladas en un polímero*". Centro para el Desarrollo de Nanociencia y Nanotecnología CEDENNA, Santiago Chile, 2015.

Vullo DL, Wachsman MB, Alche LB. "Microbiología en práctica". Editorial Atlante SRL 2000. 266p. ISBN : 9509539392.

Wang Y, Biradar AV, Wang G, Sharma KK, Duncan CT, Rangan S, Asefa T. "*Controlled synthesis of water-dispersible faceted crystalline copper nanoparticles and their catalytic properties*". Chemistry 2010; vol. 16:10735-10743.

Williams DN, Ehrman SH, Holoman TRP. “*Evaluation of the microbial growth response to inorganic nanoparticles*”. Journal of Nanobiotechnology 2006; 4:3.

Yu W, Xie H, Chen L, Li Y, Zhang C. “*Synthesis and characterization of monodispersed copper colloids in polar solvents*”. Nanoscale Research Letters 2009; vol. 4:465-470

Zanella R. “*Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño*”. Mundo Nano 2012; vol. 5

Zhang QL, Yang ZM, Ding BJ, Lan XZ, Guo YJ. “*Preparation of copper nanoparticles by chemical reduction method using potassium borohydride*”. Transactions of Nonferrous Metals Society of China 2009; vol. 20:240-244.

Zhao L, Wiebe J, Zahoor R, Slavkovic S, Malile B, Johnson PE, Chen JIL. “*Colorimetric detection of catalase and catalase-positive bacteria (E. coli) using silver nanoprisms*”. Analytical Methods 2016; vol. 8:6625-6630.

Zong-ming X, Qing-bo Z, Hema L, Colvin V, Alvarez JP. “*Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles*”. Nano Letters 2012, vol.12: 4271–4275.

## 9. Anexo

### 9.1. Composición de los medios de cultivo y reactivos empleados

#### 9.1.1. Caldo de infusión Brain Heart Infusion (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia

Infusión de cerebro-corazón de cerdo	17,5 g
Digerido pancreático de gelatina	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Fosfato disódico	2,5 g
Glucosa	2,0 g
Agua destilada	1000 ml

pH final (25°C):  $7,4 \pm 0,2$ . Se esteriliza en autoclave a 121°C 15 min.

Brain Heart Infusion (BHI) es un medio de cultivo líquido que contiene los nutrientes de la infusión de cerebro y corazón, la peptona y la glucosa. Las peptonas y la infusión son fuentes de nitrógeno orgánico, carbono, azufre, vitaminas y sustancias de traza. La glucosa es la fuente de carbohidratos que los microorganismos utilizan mediante fermentación. Se utiliza fosfato disódico como tampón en el medio.

#### 9.1.2. Agar Tripto-caseína de soja (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia

Triptona	15,0 g
Digerido papaico de harina de soja	5,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1000 ml

pH final (25°C):  $7,3 \pm 0,2$ . Se esteriliza en autoclave a 121°C 15 min.

En este medio de cultivo la combinación de caseína y peptonas de soja aportan fuentes nutritivas, al suministrar nitrógeno orgánico, en especial aminoácidos y péptidos de cadena más larga. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Este medio se utilizó para llevar a cabo los recuentos de las cepas bacterianas mediante siembra en superficie en placa de Petri y para conservar las cepas en forma de picos de flauta.

### 9.1.3. Agar Endo (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia)

Digerido pancreático de carne	10,0 g
Lactosa	10,0 g
Fosfato dipotásico de hidrógeno	3,5 g
Sulfito sódico	2,5 g
Fucsina básica	0,5 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1000 ml
pH (25°C): $7,5 \pm 0,2$ . Se esteriliza en autoclave a 121°C 15 min.	

El agar Endo es un medio ligeramente selectivo para el aislamiento y la diferenciación de microorganismos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (como por ejemplo *E. coli*) y diversos otros bacilos Gram negativos. La selectividad del agar Endo se debe a la combinación del sulfito de sodio con fucsina básica, lo cual ocasiona la supresión parcial de los microorganismos Gram positivos. Los microorganismos que fermentan la lactosa del medio, producen colonias color rosa oscuro a rojizo con un brillo metálico verdoso iridiscente. Por otro lado, las colonias de microorganismos que no fermentan la lactosa son incoloras o de color rosa pálido en contraste con el fondo rosa claro del medio (Siegrist, 2011).

### 9.1.4. Agar Baird Parker (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia)

Tryptona	10,0 g
Extracto de carne	5,0 g
Extracto de levadura	1,0 g
Piruvato de sodio	10 g
Glicina	12,0g
Cloruro de litio	5,0 g
Agar	20 g
Telurito potásico	0,1 g
Emulsión de yema de huevo	50,0 ml
Agua destilada	1000 ml

pH final (25°C):  $6,8 \pm 0,3$ . Se esteriliza en autoclave a 121°C 15 min.

Baird-Parker Agar es un medio selectivo diferencial para el aislamiento o diferenciación de *Staphylococcus aureus*. Contiene las fuentes de carbono y nitrógeno necesarias para el crecimiento de este microorganismo. La glicina, el cloruro de litio y el telurito potásico actúan como agentes selectivos. La yema de huevo constituye el sustrato que actúa como agente diferencial para determinar la producción de lecitinasa y, además, la actividad de lipasa.

Los estafilococos producen colonias de color de gris oscuro a negro debido a la reducción del telurito y producen lecitinasa que descomponen la yema de huevo y crean zonas transparentes alrededor de las colonias correspondientes. También es posible que se forme una zona de precipitación debido a la actividad de lipasa (Finegold y Sweeney, 1961).

### 9.1.5. Medios empleados en las pruebas del IMVIC

#### 9.1.5.1. Agua de peptona (Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra)

Peptona	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agua destilada	1000 ml

pH final (25°C):  $7,2 \pm 0,2$ . Se esteriliza en autoclave a 121°C 15 min.

El agua de peptona se puede utilizar como un medio de crecimiento o como la base de medios de fermentación de hidratos de carbono, mientras que un cultivo puro en agua de peptona es un inóculo conveniente para una serie de tubos de fermentación u otros medios de diagnóstico.

Para la preparación de agua de peptona, se disolvieron 15 g de peptona de Oxoid en 1 litro de agua destilada. Luego de mezclar bien y distribuir en los recipientes finales, se procedió a su esterilización.

#### 9.1.5.2. Caldo Rojo de Metilo/Voges Proskauer (Caldo RM/VP (Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra)

Peptona de carne	7,0 g
Fosfato dipotásico	5,0 g

Glucosa	5,0 g
Agua destilada	1000 ml
pH final: 6,9 ± 0,1. Se esteriliza en autoclave a 121°C 15 min.	

**9.1.5.3. Agar Citrato según Simmons** (Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra)

Citrato de sodio	5,0 g
Fosfato diácido de amonio	1,0 g
Fosfato dipotásico	1,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Sulfato de magnesio	0,2 g
Azul de bromotimol	0,08 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1000 ml
pH final: 6,9 ± 0,1. Se esteriliza en autoclave a 121°C 15 min.	

**9.1.6. Reactivos empleados en las pruebas de tinción de Gram**

**9.1.6.1. Solución de Cristal violeta**

Cristal violeta (Biopack, Buenos Aires, Argentina)	2,0 g
Oxalato de amonio (Mallinckrodt, Nueva York, EE UU)	0,8 g
Alcohol etílico 95% (Biofarma, Buenos Aires, Argentina)	20 ml
Agua destilada	80 ml

**9.1.6.2. Lugol**

Iodo (Mallinckrodt, Nueva York, EE UU)	1,0 g
Ioduro de potasio (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)	2,0 g
Agua destilada	300 ml

**9.1.6.3. Solución de Safranina**

Safranina (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)	0,25 g
Alcohol etílico (95%)	10 ml
Agua destilada	100 ml

### **9.1.7. Reactivos empleados en las pruebas bioquímicas de identificación de *Escherichia coli***

#### **9.1.7.1. Reactivo de Indol según Kovacs (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)**

p-Dimetilaminobenzaldehído	10,0 g
Alcohol amílico	150 ml
Ácido clorhídrico concentrado	50 ml

#### **9.1.7.2. Reactivo de Rojo de Metilo (Mallinckrodt, Nueva York, EE UU)**

Rojo de metilo	0,1 g
Etanol 95%	300 ml
Agua destilada	200 ml

#### **9.1.7.3. Reactivos de Reacción de Voges-Proskauer**

##### Solución de Alfa-naftol

Alfa-naftol (Anedra, Buenos Aires, Argentina)	5,0 g
Alcohol etílico absoluto (Anedra, Buenos Aires, Argentina)	100 ml

##### Solución de Hidróxido de potasio

Hidróxido de potasio (Anedra, Buenos Aires, Argentina)	40,0 g
Agua destilada	100 ml

## **9.2. Pruebas para determinación de la pureza e identificación de las cepas bacterianas**

### **9.2.1. Tinción de Gram**

Inicialmente se extendió y fijó el material (obtenido a partir del crecimiento de 24 h en TSA) sobre un portaobjetos limpio, desengrasado y seco. Se cubrió el preparado con la solución de cristal violeta durante 1 minuto y se lavó posteriormente con agua corriente.

Luego se añadió Lugol al preparado durante 1 minuto y se lavó con agua. Se decoloró con alcohol 95° durante 30 segundos y nuevamente se lavó con agua.

Posteriormente se tiñó con solución de safranina durante 1 minuto y se volvió a lavar.

Finalmente se secó y observó en microscopio con objetivo de inmersión.

### 9.2.2 Pruebas del IMVIC

Para corroboración de pureza de la cepa de *Escherichia coli* se realizaron las pruebas bioquímicas del IMVIC. La cepa empleada debe dar los siguientes resultados: positivo para las reacciones de Indol y Rojo de Metilo y negativo para las pruebas de Voges Proskauer y Citrato. Para realizar estas pruebas, el inóculo empleado fue un cultivo de la cepa desarrollado en tubos con picos de flauta de TSA, incubado durante 24 h a 37°C, al cabo de los cuales se siembra con un ansa y bajo mechero de Bunsen—en los medios de cultivos correspondientes a dichas pruebas.

#### 9.2.2.1 Prueba de indol

El indol es uno de los productos de degradación metabólica del aminoácido triptofano. Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptofano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. El indol, desdoblado de la molécula de triptofano, puede ser detectado por la formación de un complejo de color rojo cuando éste reacciona con el grupo aldehído del para-dimetilaminobenzaldehído. Este es el principio activo de los reactivos de Kovac y Ehrlich. Se debe utilizar un medio rico en triptófano para corroborar la presencia de la enzima triptofanasa (MacFaddin, 2004).

Se inocularon 2 ml de agua de peptona en tubo de Khan con una ansada del cultivo activo a investigar y se incubó a 37 °C durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 0,5 ml de reactivo de Kovac.

Prueba positiva (*E. coli*): presencia de indol, color rojo fucsia en la interfase del reactivo y el caldo.

Prueba negativa: ausencia de indol, no hay modificación del color en la interfase del reactivo y el caldo.

#### 9.2.2.2. Prueba de Rojo de Metilo

El objetivo de la prueba de Rojo de Metilo es comprobar la capacidad de un microorganismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa, venciendo la capacidad amortiguadora del sistema. Es una prueba cualitativa de la producción de ácido, cuya corroboración se realiza utilizando como reactivos soluciones indicadoras de pH. Algunos organismos producen más ácidos que otros. La prueba del Rojo de Metilo (RM) se basa en el empleo del indicador de pH rojo de metilo para determinar la concentración de iones hidrógeno presente cuando un organismo fermenta la glucosa. Todos los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son, por definición, fermentadores de la glucosa. Cuando los microorganismos pertenecientes a esta familia son sembrados en el caldo RM/VP, después de 18-24 horas de incubación por fermentación generan productos secundarios ácidos, por lo tanto inicialmente todas las enterobacterias darán una reacción positiva con el Rojo de Metilo. Con un período de incubación más prolongado (48 horas), los organismos RM negativos continúan metabolizando los productos iniciales de la fermentación por decarboxilación, produciendo acetilmetil carbinol (acetoína), dando un pH final mayor o igual a 6 por ser un producto de naturaleza neutra (MacFaddin, 2004).

Se inocularon 3 ml de caldo RM/VP en un tubo de Khan con una ansada del cultivo activo a investigar y se incubó a 37 °C durante 48 horas.

Luego se añadieron 0,5 ml del indicador rojo de metilo

Prueba positiva (*E. coli*): desarrollo de color rojo estable (pH: 4,4 rojo).

Prueba negativa: desarrollo de color amarillo (pH: 6 amarillo).

### 9.2.2.3. Prueba de Voges Proskauer

Mediante la prueba de Voges Proskauer se determina la capacidad de algunos organismos de producir un producto final neutro, el acetilmetil-carbinol (acetoína), a partir de la fermentación de la glucosa. En presencia de oxígeno atmosférico y en medio altamente alcalino la acetoína se convierte en diacetilo, el cual al reaccionar con creatina proveniente del catabolismo de las peptonas, forma un complejo de color rojo, cuyo color se intensifica ante el agregado de alfa-naftol (MacFaddin, 2004).

Se inoculó un tubo con 2 ml de caldo RM/VP con una ansada del cultivo activo a investigar y se procedió a incubar a 37 °C durante 48 horas. Se añadieron 0,6 ml de alfa naftol 5 %, se agitó y se agregaron también 0.2 ml de KOH 40 %.

Finalmente se agitó el tubo cuidadosamente para exponer el medio al oxígeno, se dejó reposar y se efectuó la lectura a los 15-30 minutos.

Prueba positiva: desarrollo de color rojo.

Prueba negativa (*E. coli*): no hay formación de color.

#### 9.2.2.4. Prueba de la utilización de citrato

Mediante la prueba de la utilización del citrato se determina si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono para el metabolismo, produciendo alcalinidad. El medio utilizado contiene también sales de amonio inorgánicas. Un organismo que es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono, utiliza también las sales de amonio como su única fuente de nitrógeno. Las sales de amonio se desdoblan en amoníaco con la consiguiente producción de alcalinidad. El indicador de pH usado es el azul de bromotimol, el cual en medio alcalino vira al color azul, indicando una prueba positiva. El medio no inoculado tiene color verde (MacFaddin, 2004).

A partir del inóculo se sembró una placa con medio agar Citrato de Simmons en forma estriada, y se incubó a 37 °C durante 24-48 horas. Luego se observó la producción de viraje de color del medio.

Prueba positiva: desarrollo de color azul intenso.

Prueba negativa (*E. coli*): el medio conserva el color verde original y hay ausencia de desarrollo bacteriano.

#### 9.2.2.5. Prueba de la coagulasa

La coagulasa es una enzima presente en *Staphylococcus aureus* que es capaz de desnaturalizar la fibrina del plasma.

El objetivo de esta prueba es la búsqueda del factor de aglutinación de los microorganismos cuando estos se mezclan con el plasma. Esta prueba se utiliza para diferenciar microorganismos del género *Staphylococcus* (Acharya, 2012).

En un tubo de ensayo estéril se colocaron 0,3 ml de plasma de conejo y 0,1 ml de cultivo de *S. aureus* desarrollado en BHI durante 24 h a 37°C. La mezcla se incubó a 37°C durante cuatro horas y se observó el tubo cada 15 minutos para registrar la formación o no de coágulos.