



**ESTUDIO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE NANOPARTÍCULAS DE
PLATA EN CEPAS MULTI-RESISTENTES DE
*Pseudomonas aeruginosa***

**CRISTHIAN CAMPO BELEÑO
C.C 1096244024**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA, COLOMBIA
2019**



**ESTUDIO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE NANOPARTÍCULAS DE
PLATA EN CEPAS MULTI-RESISTENTES DE
*Pseudomonas aeruginosa***

CRISTHIAN CAMPO BELEÑO
Cod: 1096244024

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR EL TÍTULO DE
MICROBIÓLOGO**

TUTOR: RODOLFO GARCIA CONTRERAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

COTUTORA: RAQUEL AMANDA VILLAMIZAR GALLARDO
UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA, COLOMBIA
2019

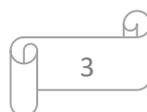


Nota de aceptación:

Firma del Primer Jurado

Firma del Segundo Jurado

**Pamplona, Norte de Santander
Colombia**





DEDICATORIA

A Dios; por su incondicionalidad. Por su inconmensurable e inmarcesible amor, el cual me sostiene aún para escribir estas palabras hoy día.

A mis sobrinos; Santiago, Gustavo y Samuel, por su diáfano amor, son la fuente de mi inspiración y motivación, y los que me impulsan a ser cada vez más resiliente.

A mis papas y hermanas, con ellos, todo. Sin ellos, nada.

Y finalmente, a la persona que me enseñó y me instruyo arduamente, que con su esfuerzo me demostró que solo él va a estar ahí para siempre, pase lo que pase, yo.



AGRADECIMIENTOS

A Dios, por elegirme en esta profesión, porque su amor y compasión siempre han estado sobre mi familia y sobre mí. A Él, siempre gracias por todas sus infinitas bendiciones.

A mi Familia y amigos, ellos son parte de este proceso, ya que siempre han confiado en mí y permitieron que este sueño fuera posible.

A la Universidad de Pamplona y el Departamento de Microbiología, porque fueron la fuente de mi conocimiento y de un aprendizaje integro durante toda la carrera. Así como al Grupo de Investigación NANOSOST, que me permitió fortalecer y forjar mi espíritu investigador.

A mis tutores; La Doctora Raquel Villamizar, en Colombia, y los Doctores, Rodolfo García y Ana María Fernández, en México. Porque su pericia fue indispensable y admirable en esta investigación, ejemplos de vida.

A la Doctora Reyna Lara Martínez, por las micrografías elaboradas de *P. aeruginosa*.

A todos y a cada uno de los que nunca dudaron de mí, que creyeron y lo siguen haciendo, GRACIAS.



*“No temas, porque yo estoy contigo; no
desmayes, porque yo soy tu Dios
que te esfuerzo; siempre te ayudaré,
siempre te sustentaré con la
diestra de mi justicia”*

Isaías 41:10



TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	14
1.OBJETIVOS.....	18
1.1. OBJETIVO GENERAL.....	18
1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	18
2.JUSTIFICACIÓN.....	19
3.MARCO TEÓRICO.....	22
3.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
3.1.1. Factores de virulencia.....	23
3.1.2. Mecanismos de resistencia.....	25
3.2. Nanopartículas de plata.....	27
3.2.1. Aproximaciones para síntesis de nanopartículas de plata.....	28
3.2.1.1. Aproximación Bottom-Up.....	28
3.2.1.2. Aproximación Top-Down.....	28
3.2.2. Mecanismo antibacteriano de las nanopartículas de plata.....	30
4. MARCO LEGAL.....	33
5. ANTECEDENTES.....	38
6. METODOLOGÍA.....	40
6.1. Enfoque.....	40
6.2. Nivel o tipo de investigación.....	40
6.3. Microorganismos.....	40
6.4. Medios de cultivo.....	39
6.5. Síntesis biológica de nanopartículas de plata.....	41
6.5.1. Síntesis de AgNPs con <i>A. flavus</i>	41
6.5.2. Síntesis verde de AgNPs con <i>Citrus latifolia tan</i>	42
6.6. Síntesis química de nanopartículas de plata.....	42
6.7. Caracterización de las nanopartículas de plata.....	43
6.8. Preparación de las concentraciones de las AgNPs.....	43
6.8.1. Evaluación del efecto antimicrobianos de las AgNPs.....	44
6.9. Determinación de la CMI y CMB.....	44
6.10. Ensayo de difusión en disco.....	45



6.11. Análisis del efecto antibacteriano de las AgNPs a través de TEM.....	45
6.12. Evaluación de la citotoxicidad de las nanopartículas de plata.....	46
6.13. Análisis estadístico.....	46
6.14. Seguridad en el laboratorio.....	47
6.14.1. Nivel de contención 2.....	47
7. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	48
8.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
8.1. Biosíntesis de nanopartículas de plata.....	49
8.1.2. Caracterización de las nanopartículas de plata.....	50
8.1.2.1. Espectroscopia Uv-Vis.....	50
8.1.2.2. Microscopia electrónica de transmisión (TEM).....	51
8.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida (CMI y CMB) de las nanopartículas de plata sobre las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	53
8.2.1. Cepas de <i>P. aeruginosa</i> multirresistentes a antibióticos.....	54
8.2.1.2. Ensayo de difusión en disco.....	56
8.3. Efecto antibacteriano de las nanopartículas de plata sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con microscopia electrónica de transmisión (TEM).....	62
8.4. Evaluación de la toxicidad de las AgNPs en el modelo animal <i>Galleria mellonella</i>	64
9. CONCLUSIONES.....	68
10. BIBLIOGRAFÍA.....	69
11.ANEXOS.....	79



TABLA DE FIGURAS

FIGURA 1. Principales microorganismos patógenos sobre los que actúa las AgNps.....	16
FIGURA 2. Morfología y tinción Gram de <i>P. aeruginosa</i>	22
FIGURA 3. Mecanismos de resistencia a antibióticos en <i>P. aeruginosa</i>	25
FIGURA 4. Aproximaciones empleadas para la síntesis de nanopartículas (bottom-up y top-down).....	29
FIGURA 5. Mecanismo bactericida de las nanopartículas de plata (AgNPs).....	31
FIGURA 6. Síntesis de nanopartículas de plata por <i>A. flavus</i>	49
FIGURA 7. Espectros UV-vis de las nanopartículas de plata.....	52
FIGURA 8. Imágenes de nanopartículas de plata por TEM.....	52
FIGURA 9. Halos de inhibición de la cepa INP 62.....	58
FIGURA 10. Halos de inhibición de la cepa INP 64.....	58
FIGURA 11. Halos de inhibición de la cepa H278.....	59
FIGURA 12. Halos de inhibición de la cepa H039	59
FIGURA 13. Halos de inhibición de la cepa 27.....	60
FIGURA 14. Halos de inhibición de la cepa 124.....	60
FIGURA 15. Micrografías en (TEM) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> incubadas con nanopartículas de plata	63
FIGURA 16. Curva de supervivencia de <i>Galleria mellonella</i>	65
FIGURA 17. Larvas inyectadas con nanopartículas de plata.....	66



LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Clasificación de bacterias patógenas multirresistentes a antibióticos según la OMS.....	15
TABLA 2. Toxinas y enzimas producidas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
TABLA 3. Cepas multidrogo resistentes, aisladas de <i>P. aeruginosa</i> de pacientes mexicanos	41
TABLA 4. CMI y CMB en la cepa PA14.....	53
TABLA 5. CMI y CMB en cepas de <i>P. aeruginosa</i> multirresistentes con L-AgNPs.....	55
TABLA 6. CMI y CMB en cepas de <i>P. aeruginosa</i> multirresistentes con AF-AgNPs.....	56



LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Carta de consentimiento para usar las cepas clínicas.....	79
ANEXO 2. Constancia del seminario realizado en el Instituto Nacional de Cardiología de la Ciudad de México.....	80
ANEXO 3. Carta de aceptación del VI Congreso de Bioquímica y Biología molecular de bacterias.....	81



GLOSARIO, SIGLAS Y ABREVIATURAS

°C: grados centígrados

µm: micrómetro

ADN: ácido desoxirribonucleico

Ag+: ion plata

AgNPs: nanopartículas de plata

ATP: adenosín trifosfato

Bottom-Up: aproximación constructiva para la síntesis de nanomateriales

CLSI: Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio

CMB: concentración mínima bactericida

CMI: concentración mínima inhibitoria

EPS: exopolisacáridos

Exo S: exoenzima S

Exo T: exoenzima T

Exo U: exoenzima U

AF-AgNPs: nanopartículas de plata sintetizadas por *A. flavus*

HAI: infecciones adquiridas en el hospital

L-AgNPs: nanopartículas de plata sintetizadas por extracto de lima

LB: medio de cultivo, Luria-Bertani

ml: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

NaCl: cloruro de sodio



nm: nanómetro

NPs: nanopartículas

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONU: Organización de las Naciones Unidas

PBP: proteínas fijadoras de penicilina

Q-AgNPs: nanopartículas de plata sintetizadas por vía química

ROS: especies reactivas de oxígeno

SPR: resonancia de plasmones de superficie

TEM: microscopio electrónico de transmisión

Top-Down: método destructivo para de síntesis de nanomateriales

UFC: unidades formadoras de colonia



INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas, pero en la actualidad muchas de estos microorganismos han presentado resistencia a diferentes fármacos. Esta resistencia a los antibióticos hace que se incrementen los costos médicos, se prolonguen las estancias hospitalarias y aumente la mortalidad de la población. Día tras día están apareciendo y propagándose en todo el planeta nuevos mecanismos de resistencia que ponen en peligro la capacidad para tratar las enfermedades infecciosas comunes. Un creciente número de infecciones, como la neumonía, la tuberculosis y la septicemia, son cada vez más difíciles y a veces imposibles de tratar, a medida que los antibióticos van perdiendo su función (WHO, 2018).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó recientemente las principales bacterias resistentes a los antibióticos para buscar alternativas que faciliten su eliminación de las diferentes patologías que generan. La lista de la OMS se divide en tres categorías con arreglo a la urgencia en que se necesitan los nuevos antibióticos: prioridad crítica, alta o media (tabla 1). El grupo de prioridad crítica incluye tres bacterias multirresistentes (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*) que son especialmente peligrosas en hospitales, residencias del adulto mayor y pacientes inmunosuprimidos. Estas bacterias han adquirido resistencia a un elevado número de antibióticos, como los carbapenémicos y las cefalosporinas de tercera generación (antibióticos más efectivos para tratar bacterias multirresistentes) (WHO, 2018).

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria oportunista en pacientes con quemaduras, fibrosis quística e inmunosuprimidos. Su importancia epidemiológica radica en su notable capacidad de desarrollar resistencia a múltiples antibióticos con sistemas de expulsión de fármacos y otros mecanismos (Bush L & Pérez M, 2015). *P. aeruginosa* es una bacteria ubicua que además de encontrarse en el suelo y el agua estancada, puede colonizar soluciones desinfectantes y jabón, también tiene la capacidad de acoplarse como parte de la microbiota mucocutánea en piel, uñas, tracto gastrointestinal y

tracto urinario. Por este motivo cuando un paciente presenta un factor de predisposición, puede producir rápidamente infecciones oportunistas; un claro ejemplo de esto, es un paciente con quemadura o con VIH en estadio de SIDA, ya que puede desarrollar complicaciones de las quemaduras y neumonía, si aunado a esto, la bacteria *P. aeruginosa* presenta resistencia a varios antibióticos, y por ende su tratamiento y el pronóstico son asociados a una mortalidad elevada (Bush L & Pérez M, 2015).

Tabla 1. Clasificación de bacterias patógenas multirresistentes a antibióticos según la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés; World Health Organization).

Prioridad 1: Crítica	Prioridad 2: Alta	Prioridad 3: Moderado
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
Enterobacteriaceae*	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Shigella</i> spp.
	<i>Salmonella</i> spp.	
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	

**Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., and *Providencia* spp., *Morganella* spp.

La segunda revisión de la normativa sobre los nanomateriales define nanomaterial como «un material natural, secundario o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado y en el que el 50% o más de las partículas en la granulometría numérica presenta una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 nm y 100 nm» (Comisión Europea, 2012). Entendiendo así, que una nanopartícula, es una partícula nanoscópica, que presenta una dimensión menor a 100 nm y

actualmente muy empleadas en la investigación científica, debido a una amplia variedad de aplicaciones potenciales en el área biomédica, electrónica, entre otras.

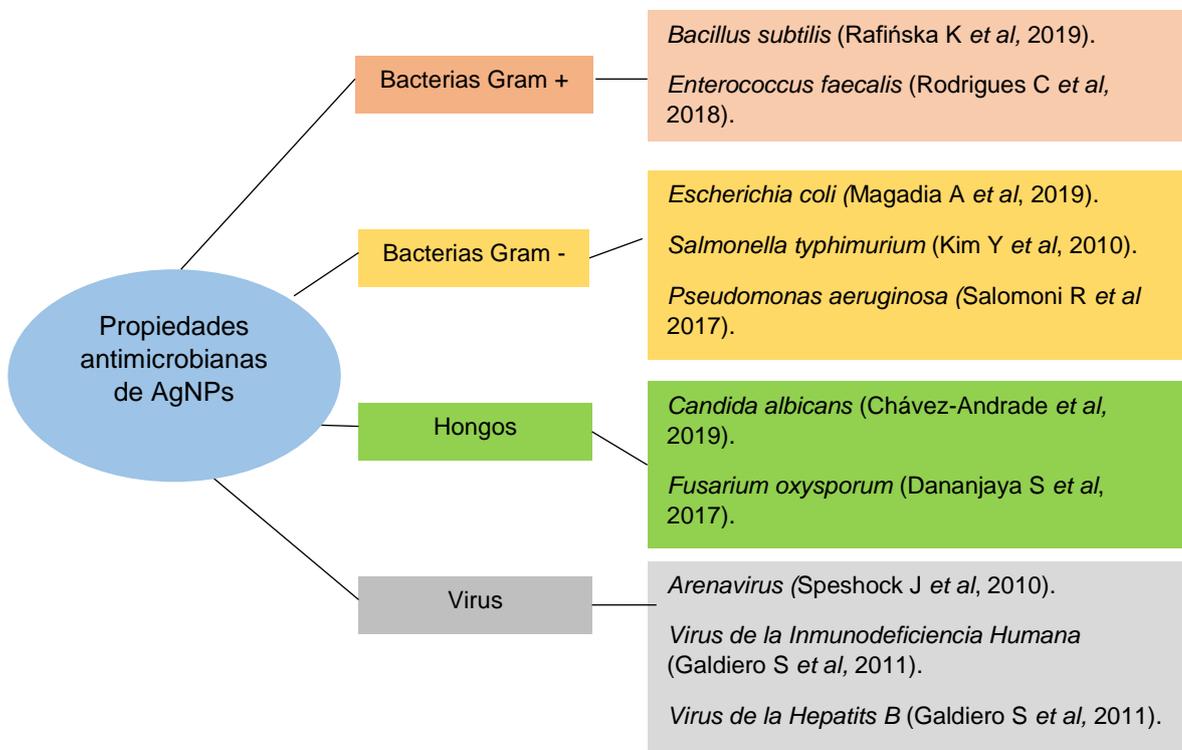


Figura 1. Principales microorganismos patógenos sobre los que actúa las AgNps. Fuente propia.

La plata es conocida por su amplio espectro de actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos, protozoos y ciertos virus, incluidas las cepas resistentes a los antibióticos (figura 1). Las nanopartículas de plata han tenido un interés creciente debido a que presentan importantes propiedades como; estabilidad química, actividad catalítica, resonancia de plasmón superficial y alta conductividad. Además, se ha reportado que las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) que se generan después de estar en contacto con la célula bacteriana, se acumulan en la superficie de las nanopartículas de plata, induciendo la muerte celular en diferentes microorganismos, lo que confiere a las nanopartículas de plata importantes funciones bactericidas y antimicrobianas únicas (Wang, et al, 2016).



Por tanto, el objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto antibacteriano de nanopartículas de plata sintetizadas por diferentes rutas, en cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*, aisladas de pacientes con fibrosis quística, quemaduras y neumonía.



1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo General

- Estudiar el efecto antibacteriano de nanopartículas de plata (AgNps) en cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*.

1.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar las nanopartículas de plata sintetizadas, a través de espectroscopia UV-Vis y Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).
- Establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) y mínima bactericida (CMB) de las nanopartículas de plata, para la eliminación de cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Analizar el efecto de las nanopartículas de plata en la ultraestructura de *Pseudomonas aeruginosa* por microscopía electrónica de transmisión.
- Evaluar la toxicidad de las nanopartículas de plata sintetizadas, en el modelo *in vivo* de *Gallería mellonella*.



2. JUSTIFICACIÓN

Una de las prioridades de la investigación para controlar la resistencia bacteriana, es el desarrollo y mantenimiento de los programas, ya sean nacionales o mundiales, orientados a la vigilancia de la evolución de la resistencia bacteriana a los antibióticos y del uso adecuado de los tratamientos antimicrobianos. La detección de patógenos causantes de infecciones, el control de infecciones y la prevención de infecciones nosocomiales son factores claves de confrontación con la comunidad científica. Las infecciones adquiridas en el hospital (HAI) o también conocidas como infecciones nosocomiales, son infecciones adquiridas en los hospitales o centros de atención médica que no estaban presentes en el momento de ingreso del paciente. Muchos son los factores responsables de las HAI, como la disminución de la inmunidad del paciente, la propagación de bacterias resistentes a los medicamentos y menor atención al emplear protocolos de infección bacteriana (Deshmukh, P *et al*, 2019). La resistencia bacteriana a los antibióticos que más preocupa al área de la salud es la llamada resistencia adquirida, la cual ocurre en una bacteria inicialmente sensible a los antibióticos por cambios, por mutaciones o por la adquisición de genes de resistencia durante el fenómeno conocido como transferencia genética horizontal (Rodríguez, E *et al*, 2014).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha informado en su nuevo sistema de vigilancia microbiana la resistencia que los agentes patógenos han adquirido a los antimicrobianos, convirtiéndose en un peligro para el tratamiento y la prevención eficaz de una serie cada vez mayor de infecciones por virus, bacterias, hongos y parásitos (OMS, 2013). Asimismo, la Organización de la Naciones Unidas (ONU) establece que la resistencia a los antimicrobianos representan una grave amenaza en la salud mundial, debido a los altos índices de mortalidad que se presentan anualmente, ya que los medicamentos son menos efectivos para eliminar estos patógenos (Schlagenhau P *et al*, 2016).

En Estados Unidos, las infecciones causadas por bacterias resistentes generan incrementos anuales en los costos globales del tratamiento, aproximadamente



de US\$ 20 billones, de los cuales \$8 billones se pierden por el aumento en los días de hospitalización del paciente infectado (Rodríguez, E *et al*, 2014).

En Colombia, los datos epidemiológicos de multirresistencia por parte de este microorganismo, preocupan a los entes gubernamentales y las autoridades de salud pública. El Instituto Nacional de Salud reporta la presencia de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, con tasas de una resistencia global incluso del 97% y con una tendencia anual al incremento, en los aislamientos en unidades de cuidado intensivo. Es por esto, que en Colombia la problemática frente a este escenario está enfocada en las salas de hospitalización, especialmente en los pacientes admitidos en la UCI, ya que la tasa de mortalidad ocasionada por la resistencia a fármacos es cada vez más elevada y esto representa un reto para implementar nuevas estrategias antimicrobianas (Saavedra S *et al*, 2014).

Por otra parte, los antimicrobianos se encuentran entre los medicamentos que más se venden y se consumen en México; representando un mercado anual de 960 millones de dólares y un segundo lugar en ventas anuales (14.3%) en farmacias privadas del país. Esto muestra una proporción mayor cuando se compara con otros países desarrollados o en transición, con mercados farmacéuticos grandes (Dreser A *et al*, 2008). El Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA) de México, estableció en el 2018 una estrategia para fomentar una amplia respuesta nacional, que reportó más de 100,000 egresos hospitalarios en más de 3,000 camas censables y 11,900 aislamientos bacterianos, que presentaron un elevado nivel de resistencia, principalmente en bacterias Gram negativas (PUCRA, 2018).

Desde la década de los ochenta, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha promovido el uso racional de medicamentos y ha recomendado que este aspecto sea integrado en las políticas nacionales de medicamentos. La Asamblea Mundial de la Salud (AMS) de 1998 instó a los países miembros a desarrollar acciones dirigidas a mejorar el uso de los antibióticos, y en este mismo año, la conferencia panamericana de resistencia antimicrobiana hizo recomendaciones



claves para los países de la región dirigidos al mejoramiento del uso de antibióticos. En el año 2001, la OMS dio a conocer la estrategia global para contener la resistencia antimicrobiana. En su 60ava reunión (2006), la AMS reconoció que no es posible aplicar resoluciones sobre resistencia antimicrobiana sin abordar el problema del uso irracional de medicamentos en los sectores públicos y privados, y para ello instó a los países miembros a invertir lo necesario en recursos humanos y financiamiento (Dresler, A *et al*, 2008). En respuesta al plan de acción mundial de la OMS, se emitió en México la estrategia nacional de acción contra la resistencia a los antimicrobianos, de aplicación obligatoria para todas las instituciones que integran al sistema nacional de salud. (Rodríguez, E *et al*, 2014).

En la asamblea de la OMS que se llevó a cabo en 2015, se ha consensuado la necesidad de un plan de acción global para combatir la resistencia a antimicrobianos, que apunte a concientizar y educar sobre la resistencia antimicrobiana, reducir la incidencia de la infección hospitalaria y asegurar una sostenible inversión en la investigación para la lucha contra la resistencia antimicrobiana. América Latina y México como parte de ella no escapan a esta problemática, que se considera extremadamente difícil de vencer; pero posible si se encaminan todos los esfuerzos (Serra-Valdés M, 2017). Los niveles actuales de resistencia a los antimicrobianos son alarmantes y las proyecciones indican que, si no se introducen nuevos antimicrobianos efectivos, para el año 2050 habrá más muertes causadas por bacterias resistentes a múltiples medicamentos que por las principales causas actuales de muerte incluyendo el cáncer (De Kraker, M *et al*, 2016).

Es por ello, que el presente trabajo de investigación presenta una posible alternativa prometedora para el futuro, de poder combatir cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes a antibióticos, aislada de diferentes infecciones y patologías, empleando nanopartículas de plata sintetizadas por diferentes rutas, como una posible vía, en sustitución o complemento a los antibióticos de uso actual.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria perteneciente a la familia Pseudomonaceae: bacilo recto o ligeramente curvado Gram negativo, con un tamaño de 2–4 x 0,5-1 micras, y móvil gracias a la presencia de un flagelo polar. En relación con su metabolismo, es una bacteria aerobia (aunque puede desarrollarse en condiciones anaerobias utilizando nitrato), catalasa y oxidasa positiva. Se caracteriza por producir una variedad de pigmentos, como la plocianina (de color azul verdoso), la pioverdina (pigmento fluorescente de color verde amarillento) y la piorrubina (de color rojo), su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, pero puede tolerar temperaturas de hasta 45°C-50°C (figura 2). Estas características le permiten adherirse, sobrevivir en equipos médicos y en otras superficies hospitalarias (Lujan D, 2014).

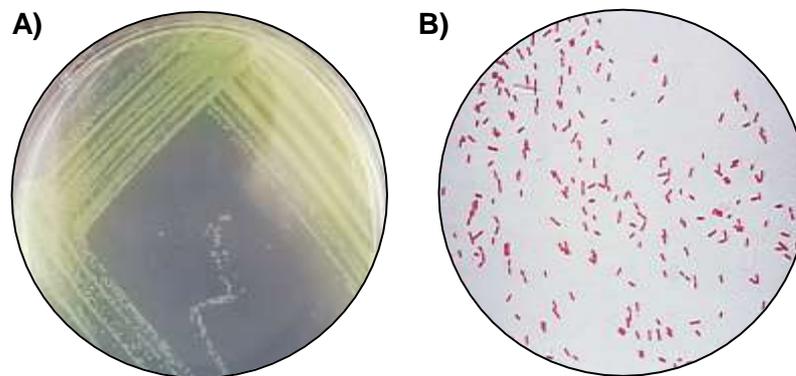


Figura 2. *Pseudomonas aeruginosa*: **A)** colonias en medio agar Luria-Bertani (LB) y **B)** Bacilos Gram negativos observados en microscopio óptico (objetivo 100x). Fuente propia.

P. aeruginosa, crece en áreas húmedas, tales como fregaderos, lavabos, piscinas inadecuadamente cloradas y jacuzzis, y en soluciones antisépticas caducadas o inactivadas. En ocasiones, estas bacterias están presentes en las axilas y área genital de las personas sanas. Las infecciones por *P. aeruginosa* varían desde infecciones externas leves hasta enfermedades graves



potencialmente mortales. Las infecciones son más frecuentes y suelen ser más peligrosas en personas que estén debilitadas por ciertas enfermedades o trastornos graves; diabetes, fibrosis quística, que se encuentren hospitalizadas o padezcan una enfermedad que debilite su sistema inmunitario, como la infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). Esta bacteria infecta la sangre, la piel, los huesos, los oídos, los ojos, el sistema urinario, las válvulas cardíacas y los pulmones, así como heridas (quemaduras, lesiones o heridas quirúrgicas). El uso de dispositivos médicos, como catéteres insertados en la vejiga o en una vena, tubos de respiración y ventiladores mecánicos, aumenta el riesgo de infecciones por *P. aeruginosa*, ya que estas infecciones se adquieren habitualmente en los hospitales (Bush L & Perez M, 2015). Estas condiciones han provocado que la bacteria pueda desempeñar un papel importante en las infecciones nosocomiales, y según estudios, *P. aeruginosa* es responsable de aproximadamente >20% de las infecciones adquiridas en los hospitales, con más frecuencia en pacientes inmunodeprimidos, con quemaduras, fibrosis quística, leucemia aguda, trasplantes de órganos y adictos a las drogas por vía intravenosa. Muchas de estas infecciones son difíciles de erradicar debido a su elevada resistencia intrínseca, además de su capacidad para adquirir resistencia a diversos antibióticos (Emamia A, *et al* 2019).

3.1.1. Factores de virulencia

Pseudomonas aeruginosa produce una amplia variedad de factores de virulencia, por lo tanto, la patogénesis de esta bacteria puede ser descrita como multifactorial. Algunos de estos factores son el flagelo, fimbrias (pili), matriz exopolisacárida, los pigmentos, las elastasas, las proteasas alcalinas, las lectinas solubles, la fosfolipasa C, exoenzimas y diversas toxinas, algunas de las cuales se indican en la Tabla 2. El alginato (producido por un subgrupo de cepas), polímero de polisacáridos, facilita la adherencia a la superficie epitelial pulmonar, y es una barrera para los fagocitos, para los antibióticos, y atenúa la respuesta del hospedero (Chiriac, A *et al*,2015).

La exotoxina A daña el epitelio alveolar y las células endoteliales pulmonares, inhibe la síntesis de proteínas de la célula hospedera y afecta la respuesta del hospedero a la infección. El sistema de secreción de tipo III es el responsable por la secreción de las toxinas exoS, exoT, exoU y exoY; las primeras 3 han sido vinculadas a la virulencia. Exo S y Exo T desorganizan el citoesqueleto de actina de la célula hospedera, bloquean la fagocitosis y causan la muerte celular, en tanto ExoU favorece la inflamación excesiva, incrementa el daño tisular y también causa la muerte celular. Las biopelículas son comunidades bacterianas intrincadas, altamente organizadas, encajadas en una matriz compuesta de exopolisacáridos, ADN y proteínas que están unidas a una superficie dificultando la acción antimicrobiana (Zhang, L *et al*, 2011).

Tabla 2. Toxinas y enzimas producidas por *Pseudomonas aeruginosa* y su efecto en la célula hospedera (fuente propia).

TOXINA/ENZIMA	EFECTO
Endotoxina	Inhibe la síntesis de proteínas, shock séptico y en algunos casos provoca la muerte.
Exotoxina A	Afección de la respuesta del hospedador y responsable de necrosis tisular. Inmunodepresora y citotóxica.
Exoenzima S (ExoS)	Facilita la adhesión e invasión de la bacteria a las células del epitelio, invasión tisular y necrosis.
Exoenzima T (ExoT)	
Exoenzima U (ExoU)	Lesiones en las células epiteliales, shock térmico, bacteriemia.
Elastasa	Degradación elastina, lesión vascular y tisular.
Fosfolipasa C	Hemolisina termolábil: facilita la destrucción tisular, degrada lípidos y la lecitina.

3.1.2. Mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa produce diversos mecanismos de resistencia a antibióticos (intrínsecos o extrínsecos); mutación o pérdida de porinas, presencia de β -lactamasas de amplio espectro, metalo- β -lactamasas (MBL), alteración de proteínas fijadoras de penicilina (PBP), bombas de expulsión, enzimas modificadoras de antibióticos, mutación de ADN-girasas, adquisición de genes de resistencia por transferencia horizontal genética, entre otros (figura 3) (Peleg, Y & Hooper, D, 2010).

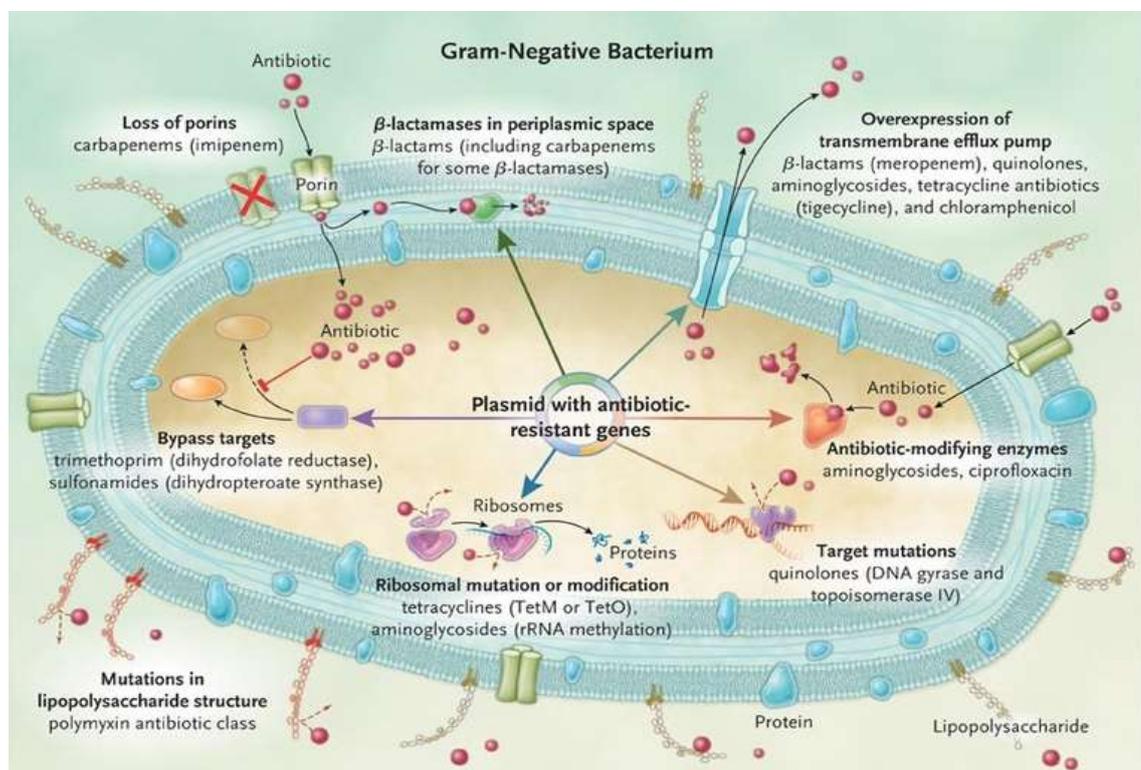


Figura 3: Mecanismo de resistencia a antibióticos en *P. aeruginosa* (bacteria Gram negativa); pérdida de porinas, presencia de β -lactamasas, aumento de expresión de bombas de eflujo, enzimas modificadoras de antibióticos, mutaciones del sitio objetivo, modificaciones ribosómicas, mecanismos de derivación metabólica, mutaciones en el lipopolisacárido o algún mecanismo mediado por plásmidos móviles (Peleg, Y & Hooper, D, 2010).



Los carbapenémicos (imipenem y meropenem) son antibióticos de amplio espectro empleados para el tratamiento de infecciones nosocomiales producidas por *P. aeruginosa* (Pang Z *et al*, 2019). La resistencia específica a carbapenémicos es atribuida a la falta de permeabilidad en la porina, un incremento en la expresión de las bombas de expulsión activa y a la producción de metaloenzimas. *Pseudomonas aeruginosa* resistente a los carbapenémicos está asociada con la producción de metaloenzimas y tiene la capacidad para hidrolizar todos los antibióticos β -lactámicos, excepto el aztreonam. Tres grupos de MBL han sido identificados: clase A (dependientes de serina e inhibidas parcialmente por el ácido clavulánico, son inducibles y no transferibles), clase B (dependientes de zinc, inhibidas por el EDTA, inducibles o asociadas a plásmidos conjugativos) y clase C (oxacilinasas) (Sanchez A *et al*, 2004). La resistencia a diversos antibióticos y sustancias con actividad antimicrobiana ha sido asociada con la formación de biopelículas bacterianas, así como la fagocitosis por componentes del sistema inmune adaptativo. Asimismo, diversas infecciones nosocomiales producidas por *P. aeruginosa* han sido relacionadas con su capacidad para desarrollar biopelículas; las cuales, están embebidas en una matriz extracelular formada por proteínas de membrana externa, pili, exopolisacáridos (EPS) y ácidos nucleicos (Ryder C *et al*, 2007). Los pili tipo IV (T4P) producidos por *P. aeruginosa* presentan un movimiento independiente del flagelo, por una acción de relajación y contracción, llamado *twitching motility*. Los T4P han sido asociados con la formación de biopelículas, un evento esencial en la colonización del hospedero. Estas estructuras filamentosas, localizadas en un polo de la bacteria, están involucradas en diversos mecanismos, como la adhesión a células humanas, formación de microcolonias, agregación bacteriana, receptor por fagos, evasión de la respuesta inmune y señalización celular (Ochoa S *et al*, 2013).



3.2. Nanopartículas de plata (AgNps)

La Nanotecnología se puede definir como el estudio y manipulación de materiales, equipos y sistemas funcionales a través del control de la materia en la nanoescala, siendo un nanómetro (nm) la billonésima parte de un metro (Camacho J & Descamps L, 2013).

Las nanopartículas (NPs) presentan un desarrollo en el área de la ciencia, debido a que poseen propiedades químicas, ópticas, eléctricas, magnéticas y mecánicas únicas, que crean y mejoran productos, realizándose síntesis de nanopartículas de diferentes materiales, como polímeros naturales como la celulosa, inclusive nanopartículas metálicas de diferentes tipos como Cobre, Plata, Zinc, Oro o Titanio (Anand, K *et al*, 2018).

Se ha datado que Aristóteles (335 a.C) empleaba un polvo ultrafino de plata (que él llamaba “flor de plata”) que aplicaba sobre las heridas de los soldados que venían de la guerra y favorecía su cicatrización (Graham, C, 2013). De todos los usos de la plata (utensilios, explosivos, monedas, entre otros), uno de los más importantes fue como agente desinfectante o antimicrobiano con fines higiénicos y médicos, aun sin conocer su mecanismo. Sin embargo, después de la introducción de los antibióticos en 1940 el uso de sales de plata disminuyó (Monde, M, 2009).

Las nanopartículas, incluidas las de plata, están ganando un interés considerable debido a sus enormes aplicaciones en diferentes campos. Muchos investigadores han comenzado a usar nanopartículas en sistemas de administración de fármacos y genes, biosensores, terapias contra el cáncer, catálisis, detección de proteínas y por su actividad antimicrobiana de amplio espectro han sido empleadas contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos, protozoos y ciertos virus. Es por ello, que las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de plata han ido explotando el interés en el área de la salud frente a la problemática de la persistencia de bacterias resistentes a los antibióticos (Premkumara, J, 2018).



3.2.1. Aproximaciones para la síntesis de las nanopartículas

Existen diferentes aproximaciones o métodos que pueden utilizarse para sintetizar nanopartículas y todos esos métodos se clasifican de forma aproximada en dos categorías principales; Bottom-up (de abajo a arriba) y Top-down (de arriba abajo) (figura 4). Ambas metodologías se dividen en varias subclases según la operación, la condición de reacción y los protocolos adoptados (Flores C, 2014).

3.2.1.1. Aproximación Bottom-up (Constructivo)

Esta aproximación consiste en la construcción del material a partir de átomos, luego grupos y finalmente nanopartículas. Entre los métodos Bottom-up, sol-gel es generalmente un método ideal para la síntesis de nanopartículas debido a su simplicidad. La pirólisis es el método más utilizado para la síntesis a gran escala de nanopartículas en industrias e implica la combustión de un precursor (ya sea líquido o vapor) con llama. La biosíntesis de nanopartículas se refiere al método ecológico o amigable con el medio ambiente, para sintetizar nanopartículas que no son tóxicas y biodegradables. La biosíntesis de nanopartículas utiliza bacterias, hongos, actinomicetos o extracto de plantas junto con algunos precursores. En síntesis, los métodos “bottom-up” construyen estructuras complejas a partir de otras más simples (Arole & Munde, 2014).

3.2.1.2. Aproximación Top-down (Destructivo)

La aproximación Top-Down, implica la conversión de una sustancia masiva a dimensión nanoescala, ejemplo de ellos es la nanolitografía, de igual forma, la descomposición térmica, que implica la descomposición química endotérmica de los enlaces químicos a través del calor, siendo la temperatura de descomposición aquella temperatura particular donde se descompone químicamente y la descomposición conduce a la síntesis de nanopartículas (Flores C, 2014).

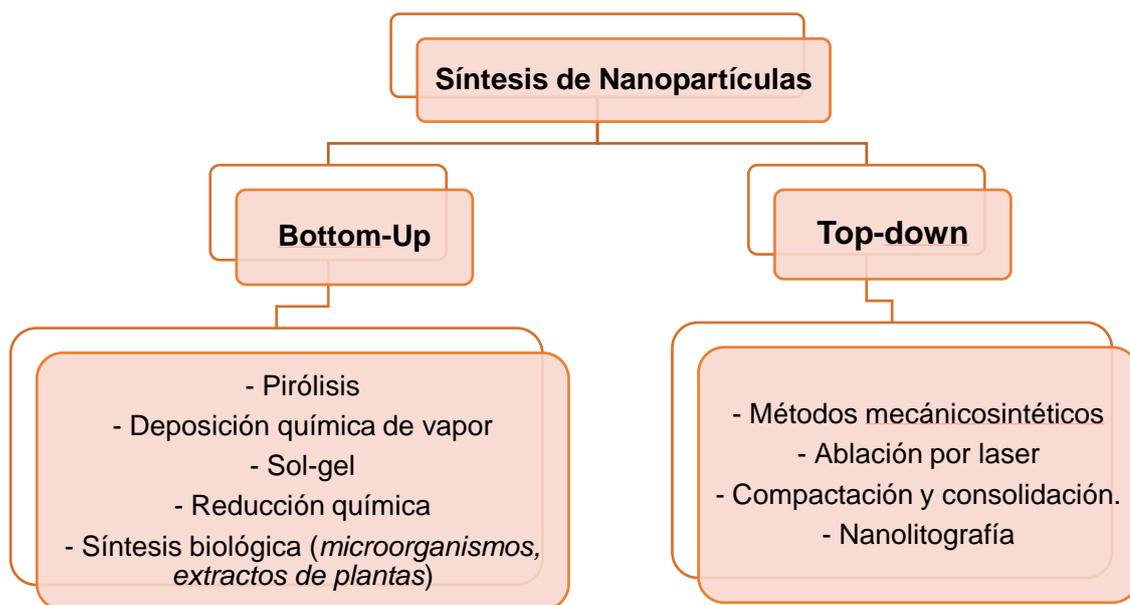


Figura 4. Métodos empleados para la síntesis de nanopartículas (bottom-up y top-down). Fuente propia.

Los métodos utilizados para la obtención de nanopartículas también se pueden subclasificar en; métodos químicos (reducción del metal, síntesis electroquímica, micelas y micro emulsiones), físicos (condensación con un gas inerte, corte por láser, pirólisis), biológicos (uso de microorganismos o extractos de plantas como factorías para la síntesis de NPs), o híbridos (una mezcla de los métodos anteriores). Los métodos físicos y químicos son los más empleados en la síntesis de nanopartículas debido a su potencial para controlar adecuadamente el tamaño, la distribución de tamaño y la forma de las nanopartículas. En los métodos químicos de síntesis de nanopartículas se utilizan agentes reductores y estabilizadores que en ocasiones resultan tóxicos y contaminantes peligrosos que son perjudiciales tanto para el medio ambiente como para la salud humana lo que limita en gran medida sus aplicaciones. Por tanto, el desarrollo de métodos fiables, no tóxicos y respetuosos con el medio ambiente para la síntesis de las NPs es de suma importancia para ampliar sus aplicaciones biomédicas y una de las opciones para alcanzar este objetivo es el uso de microorganismos o plantas para sintetizar nanopartículas mediante procesos enzimáticos (Zhang X *et al*, 2011).



3.2.2. Mecanismo antibacteriano de las nanopartículas de plata (AgNps).

Se ha propuesto que el efecto bactericida de las AgNPs está asociado de un contacto directo de las nanopartículas con la pared celular bacteriana, seguido de la penetración en el citoplasma. El contacto directo de las AgNPs con grandes áreas de superficie en una pared celular bacteriana podría causar daño a la membrana, lo que provocaría la fuga de contenidos y finalmente la muerte celular (Barros, C *et al*, 2018).

Además, las AgNPs pueden interactuar con el sistema de enzimas respiratorias, generando especies reactivas de oxígeno (ROS), como los radicales, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), hidroxilo (OH^-) y superóxido (O_2^-) que inducen estrés oxidativo y daño a proteínas y ácidos nucleicos. Las nanopartículas también penetran en el citoplasma e interactúan con las proteínas y el ADN, lo que lleva a la muerte celular. La generación de ROS es mayormente responsable de la muerte bacteriana porque facilita la peroxidación de lípidos, inhibe la producción de ATP y la replicación del ADN. Asimismo, las AgNPs también pueden liberar iones de plata, lo que resulta en un mayor daño celular. Los iones de plata liberados de las AgNPs interactúan con el fósforo en el ADN o algunas proteínas, resultando la inhibición de las actividades enzimáticas (García-Contreras *et al*, 2011). La acción antimicrobiana de los iones Ag^+ está estrechamente relacionada con su interacción con los grupos tiol (sulfhidriilo). Por tanto, los iones Ag^+ pueden reaccionar con los grupos $-SH$ de enzimas y proteínas unidas a la pared celular, interfiriendo con la cadena respiratoria de las bacterias y rompiendo la pared celular bacteriana. En consecuencia, el ADN pierde su capacidad de replicación y las proteínas esenciales para la producción de ATP se desactivan. La figura 5 representa los diferentes efectos bactericidas inducidos por AgNPs y la liberación de iones de plata de las NPs, o la combinación de estos dos efectos (Hsueh, Y *et al*, 2015).

La acción bactericida dependerá de una amplia variedad de factores entre los que se pueden mencionar: el tamaño, la forma y la concentración de NPs usada. Esto debe considerarse junto con la alta relación superficie/volumen, típicamente presente en los nanomateriales, ya que cuanto más pequeñas son las partículas,

mayor es la superficie metálica expuesta y, por tanto, se puede esperar un mayor efecto microbicida. Se ha demostrado una relación inversa entre el tamaño de las NPs y su actividad antimicrobiana, donde las NPs en el rango de tamaño de 1-10 nm han mostrado tener la mayor actividad antibacteriana. Si un tamaño de NP es <20 nm, puede exhibir una mayor unión de la proteína que contiene azufre de la membrana, dando como resultado el máximo de permeabilidad a través de la membrana y finalmente la muerte celular de las bacterias. Las AgNPs <10 nm crean poros en la pared celular, debido a estos poros, la cantidad citoplásmica se descarga en el medio, que gobierna la muerte celular sin interactuar las proteínas intracelulares, extracelulares y los ácidos nucleicos de las bacterias (Deshmukh S *et al*,2019).

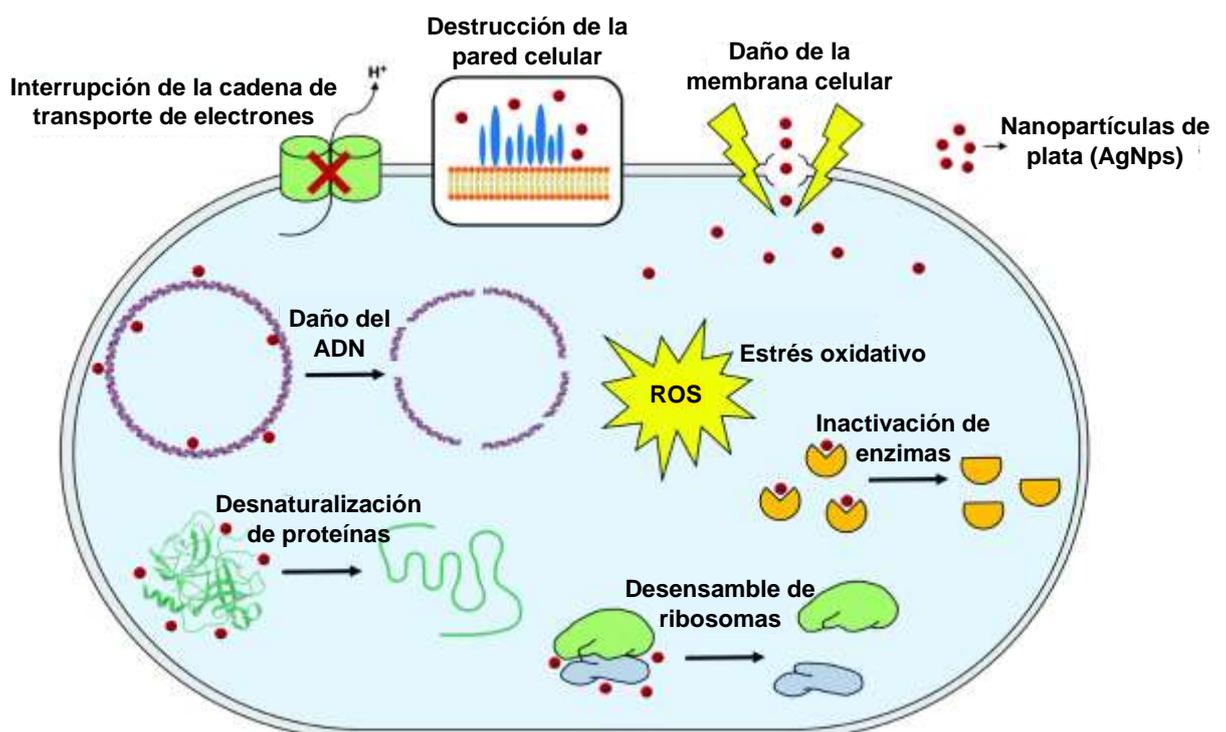


Figura 5. Mecanismo bactericida de las nanopartículas de plata (AgNPs) en una bacteria Gram negativa, estos efectos se resumen en: Unión inicial de las AgNPs o iones Ag^+ a la pared y membrana celular de la bacteria, posterior penetración en la célula, generación de ROS y radicales libres, daño en el ADN y desnaturalización de proteínas (modificado de Roy A *et al*, 2019).



La actividad antibacteriana de las AgNPs también se relaciona con la morfología de muchos tipos de bacterias. Las bacterias Gram negativas son generalmente más propensas a la invasión de Ag^+ que las bacterias Gram positivas debido a la diferencia en sus estructuras de pared celular, ya que las bacterias Gram positivas poseen una pared celular muy gruesa que contiene muchas capas de peptidoglicano, lo que sirve de barrera para la penetración de iones Ag^+ en el citoplasma, mientras que las bacterias Gram negativas, solo tienen una única capa de peptidoglicano, y por esta característica los iones Ag^+ pueden dañar fácilmente la pared celular (Khalandi B *et al*, 2016).

Las células microbianas son sensibles a especies reactivas de oxígeno y cualquier terapia que genere suficientes ROS, que puedan pasar por alto el mecanismo de defensa antioxidante de las células microbianas, será una estrategia prometedora para tratar la infección y la resistencia microbiana emergente. En este contexto, las nanopartículas metálicas se consideran agentes promisorios, que producen un nivel significativo de ROS, con capacidad de superar el sistema de defensa antioxidante microbiano y consecuentemente causar el daño celular (Ahmad A *et al*, 2017). La plata a escala nano ha ganado considerable atención debido a sus propiedades antimicrobianas, anticoagulantes, de inhibición de biopelículas, anticancerígenas y antiinflamatorias, que la convierten en un candidato ideal en la plataforma biomédica (Yin N *et al*, 2019).



4. MARCO LEGAL

ORGANISMOS INTERNACIONALES DE COMERCIO RELACIONADOS CON LA BIOTECNOLOGÍA

LA ORGANIZACIÓN PARA LA COOPERACIÓN Y EL DESARROLLO ECONÓMICOS (OCDE); es una organización intergubernamental y su principal objetivo es la promoción de políticas para alcanzar el empleo y el crecimiento económico sustentables, el aumento del nivel de vida y la liberalización comercial. La organización ha trabajado en aspectos de la biotecnología, entre los que se incluyen: la elaboración de soluciones para las infraestructuras de ciencia y tecnología, las incidencias de los derechos de propiedad intelectual y los regímenes de licencia o la atención prestada a la salud humana y a la seguridad del medio ambiente (OCDE, 2019).

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS)

Aunque no interviene directamente en el establecimiento de normas internacionales para los aspectos de la salud humana relativos a la bioseguridad, contribuye activamente a las bases de datos mundiales sobre estos temas y ayuda a los gobiernos, la sociedad civil, la industria y los consumidores, a adquirir información científica actualizada sobre los peligros nuevos y emergentes (OMS, 2007).

CONVENIO SOBRE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA (CDB)

El Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) fue adoptado en 1992 en Nairobi y se abrió a firma durante la Conferencia de las Naciones Unidas sobre Medio Ambiente y Desarrollo. Entre los principales temas que se abordan en el convenio se encuentran: conservación *in situ* y *ex situ*, uso sustentable, acceso a los recursos genéticos y distribución de beneficios, acceso a la tecnología y transferencia de tecnología, evaluación de impacto ambiental, educación y conciencia pública, suministro de recursos financieros, presentación de informes nacionales, sobre las medidas para poner en práctica los compromisos asumidos en virtud del tratado y medidas e incentivos para la conservación y uso sostenible



de la diversidad biológica. De la misma forma, abarca la rápida expansión en el ámbito de la biotecnología, aborda los temas de desarrollo y transferencia de tecnologías, la distribución de beneficios y la seguridad de la biotecnología. (CDB, 1992).

Las disposiciones sobre biotecnología contenidas en el CDB dieron origen al Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica, conocido como Protocolo de Cartagena.

PROTOCOLO DE CARTAGENA

En el protocolo se establece el mandato para que cada país adopte las medidas legales y administrativas que permitan instrumentar las obligaciones derivadas del mismo, con base en el principio de precaución, el protocolo de Cartagena tiene por objeto garantizar que el movimiento transfronterizo de organismos vivos modificados resultantes de la biotecnología moderna se haga en condiciones seguras para la conservación de la biodiversidad y la salud humana (Protocolo de Cartagena, 2000).

La nanotecnología en Colombia no se encuentra actualmente regulada por la legislación en cuanto a su manipulación y utilización en proyectos científicos y tecnológicos, solo se ha llegado a las esferas de la nanotecnología con investigaciones paralelas por las universidades, cada una en su campo de acción y de investigación.

NORMA TÉCNICA COLOMBIANA (NTC 6148. 2015). NANOTECNOLOGÍA. TERMINOLOGÍA Y DEFINICIONES PARA NANOOBJETOS, NANOPARTÍCULA, NANOFIBRA Y NANOPLACA.

Esta norma lista los términos y las definiciones relacionadas a las nanopartículas en el campo de la nanotecnología (NTC,2015).



NORMA TÉCNICA COLOMBIANA (NTC-ISO/TS 80004-5. 2017-09-13). NANOTECNOLOGÍA. VOCABULARIO. PARTE 5: INTERFASE NANO/BIO

Esta norma técnica contiene los términos y definiciones relacionados con la interfase existente entre los nanomateriales y la biología. Además pretende facilitar la comunicación entre científicos, ingenieros, tecnólogos, diseñadores, fabricantes, reguladores, ONGs, organizaciones de consumidores, miembros del público y otros con algún interés en la aplicación o uso de nanotecnología en biología o biotecnología y el uso de material biológico o sus principios en nanotecnología (NTC, 2017).

CONSTITUCIÓN POLÍTICA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

En la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos se abordan aspectos relacionados con la biotecnología, de los cuales se desprenden:

Artículo 3, Fracción V. Determina que el Estado debe apoyar la investigación científica y tecnológica.

Artículo 4. Establece el derecho a un medio ambiente adecuado.

Artículo 73, Fracciones D, E, F, y G. Señalan que el Congreso de la Unión está facultado para expedir leyes sobre: la planeación nacional del desarrollo económico y social, la programación, promoción, concertación y ejecución de acciones de orden económico; la transferencia de tecnología y la generación, difusión y aplicación de los conocimientos científicos y tecnológicos que requiere el desarrollo nacional y establecer la concurrencia de los gobiernos federal, estatales y municipal en materia de protección al ambiente y de preservación y restauración del equilibrio ecológico. (Constitución política de los EUM, 2008).

Disposiciones sobre promoción de la biotecnología en la **Ley de Ciencia y Tecnología (LCT)**: tiene por objeto regular los apoyos que el gobierno federal está obligado a otorgar para impulsar, fortalecer y desarrollar la investigación científica y tecnológica en el país; determinar los instrumentos mediante los cuales el gobierno federal cumple con la obligación de apoyar la investigación científica y tecnológica; establecer los mecanismos de coordinación de acciones entre las dependencias y entidades de la administración pública federal y otras



instituciones que intervienen en la definición de políticas y programas en materia de desarrollo científico y tecnológico, o que llevan a cabo directamente actividades de este tipo; establecer las instancias y los mecanismos de coordinación con los gobiernos de las entidades federativas, así como de vinculación y participación de la comunidad científica y académica de las instituciones de educación superior, de los sectores público, social y privado para la generación y formulación de políticas de promoción, difusión, desarrollo y aplicación de la ciencia y la tecnología, y la formación de profesionales de la ciencia y la tecnología; vincular la investigación científica y tecnológica con la educación; apoyar la capacidad y el fortalecimiento de los grupos de investigación científica y tecnológica que lleven a cabo las instituciones públicas de educación superior; entre otras (LCT, 2015).

LA LEY DE LOS INSTITUTOS NACIONALES DE SALUD (LINS): tiene por objeto regular la organización y funcionamiento de los Institutos Nacionales de Salud, así como fomentar la investigación, enseñanza y prestación de servicios que se realice en ellos (LINS, 2018).

NMX-R-27687-SCFI-2014. NANOTECNOLOGÍAS-TERMINOLOGÍA Y DEFINICIONES PARA NANO-OBJETOS-NANOPARTÍCULA, NANOFIBRA Y NANOPLACA.

Esta norma mexicana lista términos y definiciones relativas a partículas en el campo de las Nanotecnología. Tiene el objetivo de facilitar las comunicaciones entre organizaciones e individuos en la industria y aquellos con quienes interactúan (NOM, 2014).

NORMA MEXICANA NMX-R-80004-5-SCFI-2015. NANOTECNOLOGÍAS-VOCABULARIO-PARTE 5: INTERFAZ NANO/BIO.

Esta Norma Mexicana contiene términos y definiciones relacionadas a la interfaz entre nanomateriales y biología. Tiene el propósito de facilitar las comunicaciones entre científicos, ingenieros, tecnólogos, diseñadores, productores, reguladores, ONG, organizaciones representativas del consumidor, público en general y otros interesados en: la aplicación y uso de las



nanotecnologías en biología y biotecnología, y el uso de materia biológica o de principios biológicos en nanotecnología. Esta Norma Mexicana no es equivalente (NEQ) con ninguna Norma Internacional por no existir Norma Internacional sobre el tema tratado (NOM, 2015).

ACUERDO; POR EL QUE SE DECLARA LA OBLIGATORIEDAD DE LA ESTRATEGIA NACIONAL DE ACCIÓN CONTRA LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS.

Objetivo 2. Reforzar los conocimientos y la evidencia de los RAM a través de la vigilancia y la investigación, tanto en salud humana como en salud animal (incluyendo vigilancia epidemiológica, sanitaria y del uso de antimicrobianos).

Objetivo 5. Desarrollo de la evaluación económica del problema en el país con el fin de asegurar una inversión sostenible para abordar y combatir la RAM, incluyendo el desarrollo de nuevos medicamentos, herramientas diagnósticas, vacunas y otras intervenciones (DOF, 2018).



5. ANTECEDENTES

Dentro del marco investigativo, a nivel internacional diversos estudios han descrito la capacidad y efecto bactericida de las nanopartículas de plata contra agentes patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*; así lo han reportado científicos en Australia, quienes en 2019 formularon nanopartículas de plata estabilizadas con quitosán (CH-AgNP) y las evaluaron para determinar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida en *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y 20 aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (SARM) (Pansara C, *et al* 2019). De igual forma, en el presente año, Srivastava S *et al*, en la India, sintetizaron nanopartículas de plata utilizando *Fusarium oxysporum* y evaluaron el efecto antibacteriano de las nanopartículas, cuya morfología fue variable, la mayoría de ellas esféricas en el rango de tamaño de 1 a 50 nm y realizaron estudios *in silico*, seleccionando dos microorganismos; *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los resultados mostraron que la plata puede ser un agente antibacteriano fuerte contra ambos patógenos, siendo la acción antibacteriana mayor en *P. aeruginosa* (Srivastava, S *et al*, 2019). En Corea, en el 2018, Singh, H *et al* sintetizaron AgNPs utilizando *Pseudomonas* spp, las cuales fueron caracterizadas por microscopía electrónica de emisión-transmisión de campo (FE-TEM), y ensayaron contra patógenos como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Candida tropicalis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, mostrando la eficiencia en la eliminación de biopelículas formadas por estas bacterias, exhibiendo potente efecto contra los patógenos probados (Singh, H *et al*, 2018). En China, Xueting Y *et al*, en el 2018 estudiaron el mecanismo antibacteriano de nanopartículas de plata sintetizadas químicamente en una cepa ATCC de *Pseudomonas aeruginosa*, analizando la respuesta bacteriana a nivel proteómico, prediciendo que las especies reactivas de oxígeno eran la causa principal de la muerte celular (Xueting Y, *et al*, 2018).



En Latinoamérica, específicamente en Colombia, Villamizar y Monroy en el 2015 usaron nanopartículas de plata sintetizadas biotecnológicamente para el control de microorganismos patógenos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, microorganismos encontrados en algunos alimentos. Los autores emplearon ensayos *in vitro* para inhibir el crecimiento microbiano y bolsas de polietileno modificados con una solución de AgNPs, determinando que las AgNPs ejercen un mayor efecto microbicida sobre levaduras, seguido de bacterias Gram negativas y en último lugar, las bacterias Gram Positivas. Los ensayos en fruta permitieron determinar que las nanopartículas de plata ejercen un efecto inhibitorio de 3 a 4 unidades logarítmicas acompañado de procesos de desinfección y refrigeración (Villamizar R & Monroy L, 2015). Por otro lado, un grupo de investigación de La Universidad de Antioquia, en Colombia, evaluó el comportamiento antimicrobiano de nanopartículas de plata sintetizadas electroquímicamente, el ensayo consistió en abordar diferentes tópicos que demostraran cómo las técnicas electroquímicas pueden ser utilizadas para la fabricación de materiales nanométricos con actividad antimicrobiana, que podrían ser implementados en aplicaciones clínicas (Vázquez, M *et al*, 2014).

En México también se han registrado estudios sobre la potente acción de las nanopartículas frente a microorganismos patógenos, Aguilar N *et al* en el 2018, sintetizaron AgNPs usando el extracto de residuos de la industria del azúcar, la caña de azúcar y bagazo, llevando a cabo la caracterización por técnicas de absorción Uv-vis, SEM y TEM. Además, se observó una alta actividad bactericida cuando se usaron contra de patógenos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (bacterias Gram negativas) y *Staphylococcus aureus* (bacterias Gram positivas), obteniendo los mejores resultados de inhibición con las bacterias Gram negativas, *E.coli* y *P. aeruginosa* (Aguilar N *et al*, 2018).

No obstante, aunque se hayan realizado algunos estudios de nanopartículas de plata sobre *Pseudomonas aeruginosa*, este es el primer trabajo que emplea nanopartículas de plata sintetizadas por diferentes rutas (biológicas y química) para ser evaluadas sobre cepas multirresistentes a antibióticos, aisladas de pacientes mexicanos con neumonía, fibrosis quística y quemaduras.



6. METODOLOGÍA

6.1. ENFOQUE

El enfoque de esta investigación fue de carácter mixto (cualitativo-cuantitativo). Los métodos mixtos representan un conjunto de procesos sistemáticos, empíricos y críticos de investigación e implican la recolección y el análisis de datos cuantitativos y cualitativos, así como su integración y discusión conjunta, para realizar inferencias producto de toda la información obtenida y lograr un mayor entendimiento del fenómeno bajo estudio (Sampieri *et al*, 2003).

6.2. NIVEL O TIPO DE INVESTIGACIÓN

La investigación fue de tipo aplicativo/experimental ya que se manipuló la variable independiente, siendo esta, el manejo de cepas bacterianas, para determinar el efecto antibacteriano de las nanopartículas de plata *in vitro* y el grado de citotoxicidad *in vivo* en larvas de *Galleria mellonella*.

6.3. MICROORGANISMOS

La cepa del hongo *Aspergillus flavus*, empleado para la síntesis biológica de las nanopartículas se obtuvo del laboratorio NANOSOST, ubicado en el campus principal de la Universidad de Pamplona, Colombia.

Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* se adquirieron del laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), aislada de pacientes con quemaduras, fibrosis quística y neumonía, que presentan resistencia a antibióticos (Tabla 3).

Tabla 3. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes a antibióticos, aisladas de pacientes mexicanos que presentaban alguna de las patologías enlistadas (fuente propia).

Patología	Cepa de <i>P. aeruginosa</i>	Lugar de origen
Fibrosis quística	INP-62	Instituto Nacional de Pediatría
	INP-64	Instituto Nacional de Pediatría
Quemaduras	H278	Instituto Nacional de Rehabilitación
	H039	Instituto Nacional de Rehabilitación
Neumonía	27	UNAM
	124	UNAM

6.4. MEDIOS DE CULTIVO

Las bacterias se cultivaron en caldo Luria-Bertani (LB) en agitación constante a 37°C durante 18 -24 h. La solución Stock preparada a partir de este cultivo, se ajustó a una concentración de 0.5 McFarland (1.5×10^8 UFC/mL).

6.5. SÍNTESIS BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

6.5.1. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON *A. flavus*.

Se preparó una solución madre con 15 mL de agua destilada estéril, realizándose un raspado de las siembras con crecimiento típico de este hongo. Seguido a ello, se inoculó en 3 fiolas de 225 ml (contenidas con 150 ml de caldo malta cada una) un volumen de 4 ml de la solución madre. Las fiolas se incubaron a 25°C en un Bioshaker a 100 rpm/ por 8 días para la obtención de biomasa fúngica. Posteriormente las fiolas fueron refrigeradas para detener la cinética de crecimiento del hongo y así evitar productos tóxicos en el proceso. La biomasa resultante en el filtrado fue adicionada en una fiola estéril con 200 ml de agua destilada estéril para generar estrés nutricional al microorganismo y obtener los metabolitos secundarios que se interesan producir (enzimas y agentes



reductores). La solución fúngica obtenida se pasó por un filtro Whatman N°1 y se expuso a una solución de Nitrato de Plata (AgNO_3) (Sigma-Aldrich), 1 mM pH 6,5 en relación V: V, la cual se mantuvo a temperatura ambiente hasta el cambio de coloración, indicando la síntesis biológica de nanopartículas de plata (AF-AgNps) (Villamizar R, 2016).

6.5.2. SÍNTESIS VERDE DE NANOPARTICULAS DE PLATA CON *Citrus latifolia* Tan.

Las nanopartículas de plata se sintetizaron utilizando nitrato de plata (AgNO_3) 5 mM (Sigma Aldrich, USA) como precursor de la sal metálica, ácido ascórbico y ácido cítrico como agentes reductores y estabilizadores, obtenidos del extracto de lima de Tahití (*Citrus latifolia* Tan). El extracto se preparó filtrando el jugo de fruta con filtro Whatman, se calentó a temperatura de ebullición durante 5 minutos y se centrifugó a 8000 rpm durante 15 minutos para eliminar las impurezas. Un porcentaje de ácido cítrico igual a 4.8 +/- 0.4% se determinó por titulación con hidróxido de sodio 0.095 N y 1% de fenolftaleína, mientras que 0.4 +/- 0.1% de la concentración de ácido ascórbico se determinó por titulación con yodo. Una relación 1:3 (vol: vol) de solución de sal de plata y extracto se dejó reaccionar durante 5 horas a 25°C para obtener nanopartículas prístinas (González, E *et al*, 2015).

6.6. SÍNTESIS QUÍMICA DE NANOPARTICULAS DE PLATA

Para sintetizar nanopartículas de plata por vía química; se agregó gota a gota, 5 ml de citrato trisódico ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) al 1% en 50 ml de agua desoxigenada hirviendo, la cual contenía nitrato de plata (AgNO_3) 1 mM. La solución se mantuvo en agitación constante hasta que el cambio de color indicó la formación de nanopartículas de plata (Garcia A *et al*, 2012).

Las nanopartículas de plata sintetizadas de forma química (Q-AgNps) y las obtenidas por síntesis verde (L-AgNps), fueron adquiridos por el Grupo de Nanociencia y Nanotecnología de la Universidad Javeriana de Colombia.



6.7. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTICULAS DE PLATA SINTETIZADAS.

En un tubo eppendorf se adicionaron 2 ml de la solución coloide obtenida y fue llevado a un sonicador por 10 minutos. Seguido esto, se pasó la muestra por un espectrofotómetro UV-Vis para observar el pico de absorbancia generada en un rango de longitud de onda entre 350 y 700 nm. La espectroscopia UV-Vis es un método que puede monitorear y medir las interacciones de la luz UV y visible con diferentes compuestos químicos, basado en la ley de Beer-Lambert, la cual se define como la correlación entre la cantidad de luz incidente absorbida por la muestra y la concentración del compuesto o molécula absorbente y la radiación absorbida por las moléculas, lo cual provocará transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas (Power A *et al*, 2019).

La caracterización microscópica de las AgNPs se llevó a cabo en un Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) de la facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. Esta técnica implica el paso de un haz de electrones a través de un espécimen ultrafino que, después de interactuar y pasar a través de la muestra, da lugar a la formación de una imagen que se amplía mediante una lente. Las NPs se analizaron a través de TEM para obtener un resultado detallado de su morfología y tamaño (Mangala & Bhattacharyya, 2008).

6.8. PREPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE LAS AgNPS

Se prepararon patrones de cada síntesis de nanopartículas de plata (Q-AgNps, L-AgNps y AF-AgNps) realizando diluciones, hasta tener concentraciones de 1% con agua destilada estéril. Para un total de 11 concentraciones diferentes de nanopartículas de plata (100% - 90 - 80 - 70 - 60 - 50 - 40 - 30 - 20 - 10 y 1%).



6.8.1. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LAS AgNPS

Se prepararon medios de cultivo con agar LB, y se realizaron siembras por agotamiento con *Pseudomonas aeruginosa*, cepas, caracterizadas molecularmente, proporcionadas por el laboratorio de Microbiología y Parasitología de la UNAM. Se evaluaron 6 cepas diferentes, obtenidas de diferentes patologías, como se mencionó en la tabla 3. Como cepa de referencia para los estudios preliminares se estudió la cepa PA14. Las nanopartículas que mostraron efecto antibacteriano fueron las empleadas para las 6 cepas aisladas de los pacientes enfermos (Modificado de Venegas M *et al*, 2018).

El ensayo experimental consistió en determinar la capacidad de inhibición de las AgNPs en la cepa patógena. Para ese propósito, se ubicó un sensidisco en la caja de Petri y se agregó solución coloidal de las nanopartículas de plata a una concentración determinada. La inhibición del crecimiento alrededor del sensidisco se siguió durante 24 a 48 horas de incubación a 37°C. Se utilizaron placas de Petri sin AgNPs e inoculadas con el patógeno, además de realizar un antibiograma con 8 ug/mL de gentamicina y 16 ug/ml de ceftazidima como control positivo de inhibición para la cepa PA14.

6.9. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)

La CIM se define como la concentración de un agente antibacteriano en el que el crecimiento no se puede visualizar a simple vista. La CMI se determinó mediante el método de microdilución en caldo utilizando una placa de 96 pocillos. En cada pocillo se adicionó 100 µL de medio del cultivo LB y 10 µL de cloruro de trifetil tetrazolio (CTT) al 0,5 % (Sigma Aldrich, EE. UU). Luego se introdujo 50 µL de suspensión bacteriana (0,5 McFarland Standard) y 50 µL del agente de inhibición a diferentes concentraciones. El caldo LB con el CTT más el cultivo bacteriano sirvió como control positivo. El caldo LB con AgNPs fue utilizado como control negativo. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h. La CMI se determinó como la concentración más baja a la que no se observó la viabilidad



celular después de 24 horas de incubación. La CMB se determinó extrayendo 100 μL de los pozos en los que se inhibió el crecimiento bacteriano (no coloración). Esta suspensión se inoculó en placas de Petri con agar LB y se incubó durante 24 horas a 37°C. Se consideró la CMB cuando se inhibió todo el crecimiento bacteriano o cuando se eliminó el 99,9% de las bacterias. Todos los ensayos se realizaron por triplicado (Ochoa S, *et al* 2013).

6.10. ENSAYO DE DIFUSIÓN EN DISCO

Las pruebas de difusión en disco se realizaron por triplicado, utilizando placas de Petri (60 x 15 mm) con medio de cultivo LB y sembrando 100 μL de la cepa a una concentración de 0.5 McFarland (1.5×10^8 UFC / mL). Sensidiscos de 6 mm, impregnados con 20 μL de nanopartículas se depositaron en las placas de Petri y se incubaron a 37°C. El crecimiento bacteriano alrededor de los sensidiscos se controló continuamente de 24 a 96 h, midiendo los halos de inhibición con un calibrador. Los niveles de susceptibilidad y / o resistencia se evaluaron de acuerdo con los halos de inhibición estándar del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) establecidos para *Pseudomonas aeruginosa* contra diferentes grupos de antibióticos (CLSI, 2018) (Modificado de Ochoa S, *et al* 2013).

6.11. EFECTO DE LAS AgNPs SOBRE *Pseudomonas aeruginosa* A TRAVES DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISION (TEM)

Se procesaron muestras de *Pseudomonas aeruginosa* antes y después de la exposición a nanopartículas de plata y se trataron de la siguiente forma: se incubó una suspensión bacteriana de 1.5×10^8 UFC / mL en medio de cultivo LB durante 24 horas a 37°C (control) y otra muestra se incubó con nanopartículas de plata sintetizadas por *A. flavus* (AF-AgNPs). Luego, las bacterias se lavaron tres veces en PBS fresco, pH 5,2 a 4°C, resuspendiendo en cacodilato 0,15 M y fijando con solución de Karnovskýs durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se transfirieron a tampón de cacodilato 0,1 M, se



fijaron en tetróxido de osmio al 1% , se deshidrataron en etanol [30,50, 70, 90 y 100%] y óxido de propileno (1 h) y se incluyeron en Poly/Bed 812/ DMP30. Las secciones se fotografiaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM 1200 EXII (Fernández-Presas A, *et al*, 2018).

6.12. EVALUACION DE LA CITOTOXICIDAD DE LAS AgNPs.

Se utilizó como modelo animal el gusano de cera (*Galleria mellonella*) para el ensayo de toxicidad *in vivo*, el cual se llevó a cabo en grupos de a tres larvas, para evaluar el efecto citotóxico de las AgNps. Se tomó un volumen de 20 uL de diferentes concentraciones (10%, 50 y 100%) de las nanopartículas y se inyectó a las larvas con una jeringa de insulina U-100 (BD Ultra-fine 6mm). Se hizo un control negativo con solución salina estéril al 0,9% y un control positivo de una dilución seriada (10^8) de la suspensión bacteriana preparada con la cepa PA14. Las larvas se incubaron a 37°C y se observó su comportamiento durante 5 días después de la inyección (Modificado de Rossoni R *et al* 2019).

6.13. ANALISIS ESTADISTICO.

Todos los datos fueron adquiridos a partir de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con el programa Graphpad instatse mediante la prueba t de Student y se consideró una diferencia estadísticamente significativa con $P < 0,001$.



6.14. SEGURIDAD EN EL LABORATORIO.

6.14.1. NIVEL DE CONTENCIÓN 2.

Los principales riesgos son la inoculación accidental, la ingesta accidental o el contacto dérmico directo. Las muestras o especímenes más peligrosos son: los hemocultivos, los exudados de heridas y las muestras de agua. Se requieren las prácticas y la contención de un nivel 2 de bioseguridad, se debe evitar o reducir al mínimo el empleo de material cortante o punzante y trabajar dentro de una cabina de seguridad biológica en aquellas operaciones que impliquen la generación de bioaerosoles, proyecciones o salpicaduras (INSHT, 2016).

7. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDAD	SEMANAS															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
I	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
II	✓	✓														
III			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
IV				✓	✓	✓	✓	✓								
V					✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
VI								✓	✓	✓	✓	✓	✓			
VII										✓						
VIII									✓	✓	✓	✓	✓			
IX			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
X																✓

Descripción de Actividades

- I. Revisión bibliográfica.
- II. Síntesis y caracterización de las nanopartículas de plata (AgNps).
- III. Conservación de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.
- IV. Caracterización de las AgNps.
- V. Evaluación del efecto antimicrobiano de las AgNPs sobre el patógeno objeto de estudio.
- VI. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB).
- VII. Análisis microscópico del efecto antibacteriano de las AgNps.
- VIII. Ensayo de toxicidad de las AgNps.
- IX. Seguimiento y análisis de datos.
- X. Divulgación de resultados y sustentación del proyecto.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Las nanopartículas de plata se sintetizaron exitosamente en un marco de tiempo de 4 horas, tiempo en el cual se observó cambio en la coloración, producto de la resonancia de plasmón de los electrones superficiales que presentan las nanopartículas (figura 6). El cambio de coloración es el criterio más aceptado para indicar la síntesis de nanopartículas de plata con los iones de plata, cuando se emplean; hongos, bacterias o extractos de plantas, como lo ha reportado AbdelRahim, K *et al* en el 2017.



Figura 6. Solución coloidal de nanopartículas de plata; **A)** solución enzimática obtenida del filtrado de micelios de *A. flavus* y **B)** solución coloidal indicadora de la biosíntesis de las nanopartículas de plata a las 4 horas, después de la exposición con solución de AgNO_3 (1 mM).

El mecanismo comúnmente aceptado de la formación de nanopartículas de plata es explicado por la reducción enzimática de las reductasas de nitrato. Enzimas proporcionadas por el propio microorganismo, como productos metabólicos que requieren NADH/NADPH como coenzima y subrayando que su conversión es de tipo extracelular. Las enzimas catalizan la formación de nanopartículas de plata, únicamente cuando la reacción se realiza en condiciones adecuadas, dependiendo de pH, temperatura, tiempo de reacción, velocidad de agitación, el sustrato empleado y la condición de la luz durante la síntesis (Dattu S *et al*, 2013).



8.1.2. CARACTERIZACION DE LAS NANOPARTICULAS

8.1.2.1. ESPECTROSCOPIA UV-VIS

La medición del estado de agregación de las partículas requiere una técnica para medir el tamaño efectivo de las partículas, como la dispersión dinámica de la luz (DLS) o la centrifugación analítica de discos. Sin embargo, debido a las propiedades ópticas únicas de las nanopartículas, se puede obtener una gran cantidad de información sobre el estado físico de estos nanomateriales, analizando las propiedades espectrales de las nanopartículas de plata (Li, W *et al* 2010).

La caracterización de las nanopartículas se llevó a cabo mediante espectroscopia Uv-Vis en el rango de 300-700 nm. La formación de las nanopartículas de plata se monitoreó a partir de los espectros de absorción, ya que las pequeñas partículas de metal revelan una banda de absorción en la región espectral UV-Vis.

La espectrometría UV-visible mostró espectros de absorción óptica de AgNPs que van de 380 a 430 nm. Esto es como resultado de la resonancia de plasmones de superficie (SPR) de las AgNPs (AbdelRahim, K *et al*, 2017). Las nanopartículas de plata son extraordinariamente eficientes para absorber y dispersar la luz. La fuerte interacción de las nanopartículas de plata con la luz ocurre porque los electrones de conducción en la superficie del metal experimentan una oscilación colectiva cuando son excitados por la luz en longitudes de onda específica, conocida como una resonancia de plasmón superficial, esta oscilación da como resultado propiedades de absorción y dispersión fuertes. En las AgNPs, la banda de conducción y la banda de valencia se encuentran muy próximas entre sí, lo que facilita que los electrones se muevan libremente. Los espectros de absorción que se obtienen se centran en la banda de SPR. La posición y la forma de esta banda están influenciadas por diferentes factores tales como el medio circundante, el tamaño, la forma y la polidispersidad de las partículas (Vallejo S, 2012).



La aparición de un pico de absorción alrededor de los 350-450 nm es un indicativo de la presencia de AgNPs. La presencia de los picos a 380, 400 y 420 nm de las nanopartículas sintetizadas química y biológicamente (con lima y *A. flavus*) muestran que dichas AgNPs tienen posiblemente una forma esférica debido a la resonancia del plasmón, lo cual confirma que la SPR ayuda a revelar la morfología de las nanopartículas (figura 7). La emisión de un pico a 400 nm corresponde a AgNPs de menos de 5 nm de diámetro, mientras que, si el pico de absorción se desplaza a 420 nm, el tamaño predominante de las AgNPs es de alrededor de 20 nm (Vallejo S, 2012).

8.1.2.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

Las características adicionales de las nanopartículas de plata fueron proporcionadas por el análisis de Microscopía electrónica de transmisión (TEM). La microscopía electrónica de transmisión es una técnica que utiliza un haz de electrones para obtener imágenes de una muestra de nanopartículas, lo que brinda una resolución mucho más alta que la posible con las técnicas de imágenes basadas en la luz. Esta microscopia es una técnica valiosa, de uso frecuente e importante para la caracterización de los nanomateriales, utilizada para obtener medidas cuantitativas del tamaño de partícula y/o grano, distribución del tamaño y morfología (Zhang X *et al* 2016). El tamaño de las nanopartículas de plata sintetizadas biológicamente estuvo de 5,34 a 70nm y presentaron un tamaño promedio de 26,06 nm. La distribución de tamaños dada por el histograma indicó que casi el 50% de las nanopartículas de plata estaban en el rango de tamaño de 20-30 nm (figura 8), estas características (estructural y morfológica) facilitan que las nanopartículas penetren y destruyan más rápido a la célula bacteriana en comparación con nanopartículas mayores de 30 nm, como ha sido reportado en la literatura (Vallejo S, 2012).

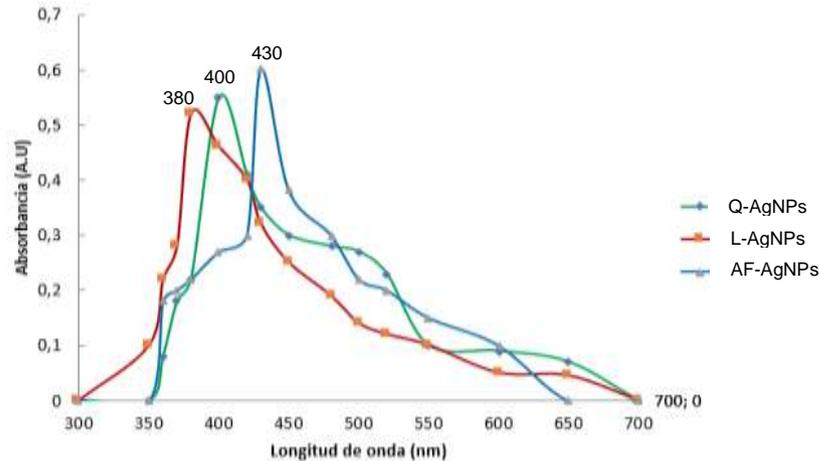


Figura 7. Espectros UV-vis (300-700 nm) de nanopartículas de plata sintetizadas por ruta química (Q-AgNPs), verde (L-AgNPs) y con *A. flavus* (AF-AgNPs), observando picos de absorción por SPR a 380, 400 y 430 nm.

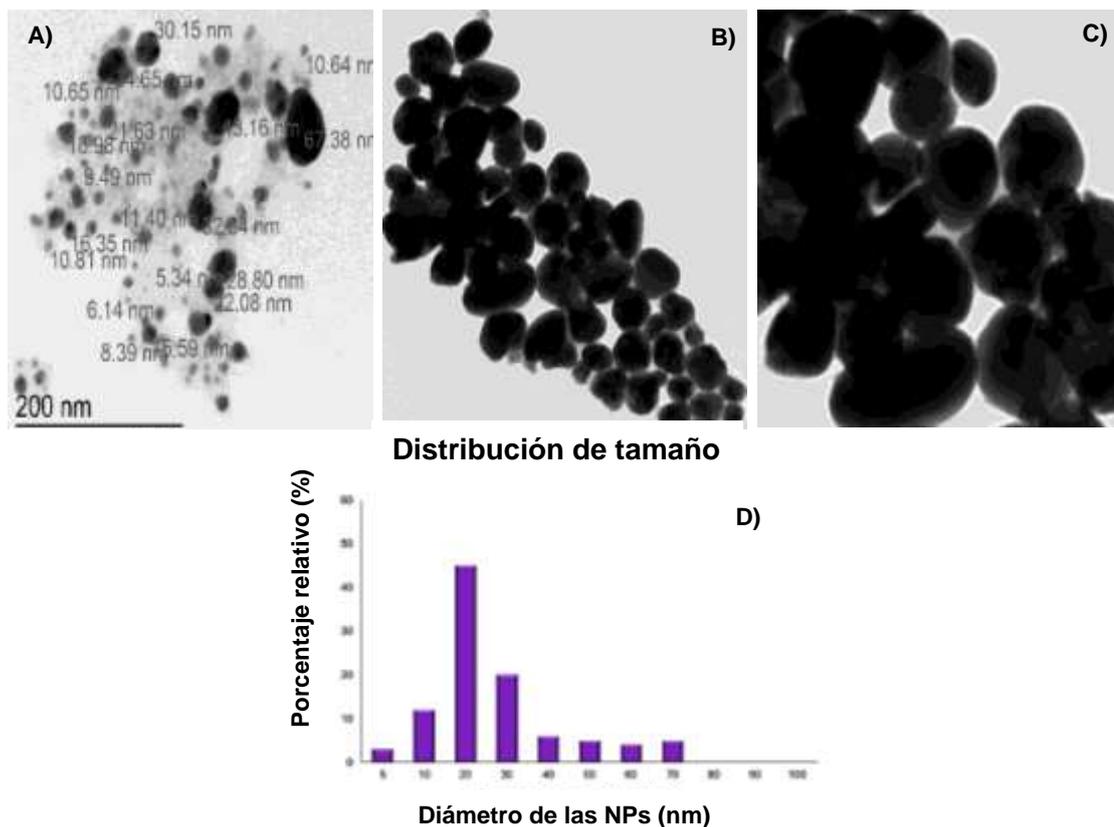


Figura 8. (A-C): Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas de plata sintetizadas biológicamente con *A. flavus* (AF-AgNPs), con morfologías esféricas/ovales y diámetros entre 5,34 y 70 nm. **(D)** la distribución de tamaño mostró que las AgNPs eran en su mayoría de 20 a 30 nm, con un promedio de 26,06 nm. (No se muestran las nanopartículas sintetizadas de forma verde y química).

8.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMI Y CMB) DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE LAS CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa*.

Se realizó un estudio preliminar en la cepa de referencia PA14 para evaluar el efecto bactericida de las AgNps, y aquellas AgNps que presentaron dicho efecto, fueron evaluadas en las cepas multirresistentes a antibióticos, aisladas de muestras clínicas. La placa se analizó visualmente y se estableció la CMI, como la concentración de nanopartículas en donde no hubo crecimiento bacteriano (sin coloración) y la CMB como la concentración capaz de eliminar el 99% de las bacterias (Ochoa S, *et al* 2013). Los resultados de CMI y CMB para las L-AgNPs fue de 10% y 20%, mientras que las AF-AgNPs tuvo efecto al 30 y 40%, respectivamente. Las nanopartículas sintetizadas por ruta química (Q-AgNPs) no presentaron efecto microbicida, y por ello no fueron empleadas en las cepas aisladas clínicamente. Los valores de CMI y CMB de esta cepa se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. CMI y CMB de nanopartículas de plata sintetizadas por diferentes rutas: Biológica, con extracto de lima (L-AgNPs) y *A. flavus* (AF-AgNPs) y química (Q-AgNPs), evaluadas en la cepa de referencia *Pseudomonas aeruginosa* PA14 (fuente propia).

Nanopartículas de plata (AgNPs)	CMI (%)	CMB (%)
Q-AgNPs	N.E	N.E
L-AgNPs	10	20
AF-AgNPs	30	40

N.E: no hubo efecto de las AgNps en la cepa.



La posible razón por la cual las nanopartículas sintetizadas químicamente (Q-AgNPs) no tuvieron el efecto esperado se podría explicar por la presencia de diferentes factores durante su síntesis, ya que estos nanomateriales son extremadamente sensibles en el proceso de aproximación: El uso de agentes reductores y estabilizantes, estos últimos son determinantes durante el proceso de agregación debido a que estabilizan las nanopartículas, y consiste en imponer una fuerza repulsiva controlando las nanopartículas en términos de tamaño y forma durante su síntesis, dando lugar a nanopartículas relativamente grandes de (80-100 nm). Lo antes expuesto es neurálgico para la penetración y destrucción de las bacterias, ya que entre más pequeñas sean las nanopartículas, mayor efecto antimicrobiano mostrarán (Zhao & Astruc, 2013). Otra causa podría ser por parte del analista durante la síntesis, al utilizar un instrumento como la pipeta, que puede fácilmente ser contaminada y esto conlleva a adicionar suficiente material extraño como para desplazar el agente estabilizador, debido a que la superficie de las nanopartículas es dinámica y se encuentran fuertemente influenciada por el entorno local (Schleh M *et al*, 2012). Otro factor importante, son las soluciones ácidas o básicas empleadas en la síntesis, estas soluciones pueden cambiar el diámetro y el tamaño de las nanopartículas al aumentar la velocidad de disolución a una forma iónica (Ji X *et al*, 2007). En general, la temperatura de reacción, velocidad de agitación, la relación de plata y agente reductor y los ambientes con alto contenido de sal que causen la agregación de nanopartículas, son algunas de las limitaciones. De igual modo, la formación, el tamaño, la forma y función de las AgNPs están muy influenciadas por las características físicas y químicas de su síntesis (Toma H *et al*, 2010).

8.2.1. CEPAS DE *P. aeruginosa* MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

Las nanopartículas de plata sintetizadas biológicamente (L-AgNps y AF-AgNPs) fueron empleadas sobre las seis cepas multidrogo resistentes después de ser evaluadas en la cepa de referencia PA14. Las AgNPs se evaluaron metodológicamente de forma similar a la cepa de referencia PA14, es decir,

determinando la CMI y CMB, mediante el método de microdilución en caldo y posterior a ello, se realizó el ensayo de difusión en disco con todas las concentraciones y cepas de estudio.

Las nanopartículas sintetizadas de forma verde (L-AgNPs) mostraron un efecto bactericida sobre todas las cepas, aunque fueron más efectivas sobre las dos cepas de neumonía, 27 y 124, ya que la concentración requerida para la inhibición y destrucción bacteriana fue menor que en el resto de las cepas (tabla 5). A su vez, las nanopartículas sintetizadas por el hongo *A. flavus* (AF-AgNPs), también mostraron un efecto microbicida sobre las seis cepas, y al igual que las L-AgNPs, las concentraciones bactericidas fueron más efectivas para las cepas 27 y 124, seguido de las cepas de quemaduras, H039 y H278, y finalmente las concentraciones más altas fueron mostradas sobre las cepas de fibrosis quística, INP-62 e INP-64 (tabla 6).

Tabla 5. CMI y CMB de nanopartículas de plata sintetizadas por extracto de lima (L-AgNPs) en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes a antibióticos (fuente propia).

CEPA	CMI (%)	CMB (%)
INP-62	20	30
INP-64	20	40
H278	20	30
H039	20	40
27	10	30
124	10	20

Tabla 6. CMI y CMB de nanopartículas de plata sintetizadas por *A. flavus* (AF-AgNPs) en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes a antibióticos (fuente propia).

CEPA	CMI (%)	CMB (%)
INP-62	60	70
INP-64	50	60
H278	50	60
H039	20	30
27	10	20
124	10	30

8.2.1.2. ENSAYO DE DIFUSIÓN EN DISCO

El ensayo de difusión en disco se llevó a cabo con sensidiscos impregnados con 20 uL de las nanopartículas de plata a todas las concentraciones previamente preparadas. La prueba se evaluó de 24 a 96 h, midiendo los halos inhibición con un calibrador. Los resultados permiten analizar que las nanopartículas sintetizadas por ruta verde mostraron mayor efecto que las sintetizadas por *A. flavus*, sobre todas las cepas estudiadas, a excepción de la cepa 27 (figuras 9-14). Los niveles de susceptibilidad y/o resistencia se evaluaron de acuerdo con los halos de inhibición estándar establecidos para *P. aeruginosa* por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI), tomando como antibiótico de referencia la familia de los carbapenémicos; sensible (>16 mm), intermedio (14-16 mm) y resistente (<13 mm), (CLSI, 2018).

Las cepas obtenidas de pacientes con fibrosis quística, INP-62 y INP-64, mostraron mayor efecto bactericida con las nanopartículas sintetizadas por ruta verde (L-AgNPs) debido a que se observaron halos de inhibición a concentraciones de 30 % para la cepa INP-62 (figura 9) y 20% para la cepa INP-



64 (figura 10), mientras que las nanopartículas sintetizadas por *A. flavus* (AF-AgNPs) mostraron halos a 40 y 70%, respectivamente. De acuerdo con la CLSI, la cepa INP-62 fue sensible a las nanopartículas de plata verde a concentraciones de 80%, mientras las sintetizadas por *A. flavus*, se denominaron sensibles cuando se emplearon al 100%. En el caso de la cepa INP-64, se denominó sensible con L-AgNPs al 40%, en contraste las AF-AgNPs, no presentaron efecto microbicida, ya que los halos expresados estaban debajo de 13 mm, es decir, resistentes, según la CLSI.

De igual forma, las cepas aisladas de pacientes con quemaduras, H278 y H039, mostraron mejor efecto antibacteriano con las L-AgNPs que con las AF-AgNPs; la cepa H278 tratada con L-AgNPs fue sensible cuando se empleó una concentración de 20%. A su vez, las AF-AgNPs expresaron sensibilidad sobre esta cepa a una concentración de 40% (figura 11). La cepa H039 mostró resultados similares, con la diferencia que en esta cepa se exhibieron halos de inhibición a concentraciones menores, pero fue sensible a concentraciones mayores que en la cepa H278, es decir, al 30 % con L-AgNPs y 60% con AF-AgNPs (figura 12).

En el caso de las cepas 124 y 27 (neumonía), los resultados divergieron, debido a que la primera fue más sensible con L-AgNPs, pero en la segunda, las AF-AgNPs predominaron en el efecto antimicrobiano. Tanto las L-AgNPs como las AF-AgNPs presentaron resultados similares en la cepa 124, pero al igual que en los casos anteriores, predominó el efecto de las L-AgNPs, siendo 80% la concentración mínima requerida para que las bacterias fueran sensibles, mientras que para las AF-AgNPs, se necesitó 90% (figura 13). Por otro lado, las L-AgNPs no presentaron un efecto bactericida sobre la cepa 27 como sucedió en las cepas de fibrosis, quemaduras y la 124 de neumonía, ya que las AF-AgNPs expresaron efecto a una concentración del 50%, mientras que las L-AgNPs se requirieron al 90 y 100 % para la destrucción de la cepa (figura 14).

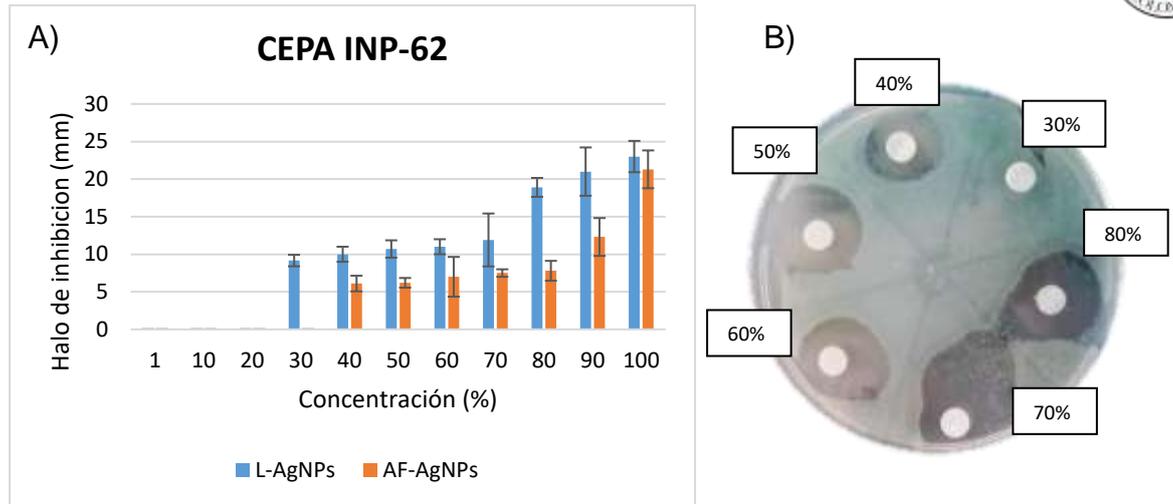


Figura 9. A) Halos de inhibición en milímetros (mm) a diferentes concentraciones (%) de nanopartículas de plata sintetizadas biológicamente, con extracto de lima (L-AgNPs) y *A. flavus* (AF-AgNPs) y **B)** Ensayo de difusión en disco de la cepa *P. aeruginosa* INP-62 (fibrosis quística) con sensidiscos impregnados con AF-AgNPs a concentraciones de 30 al 80%.

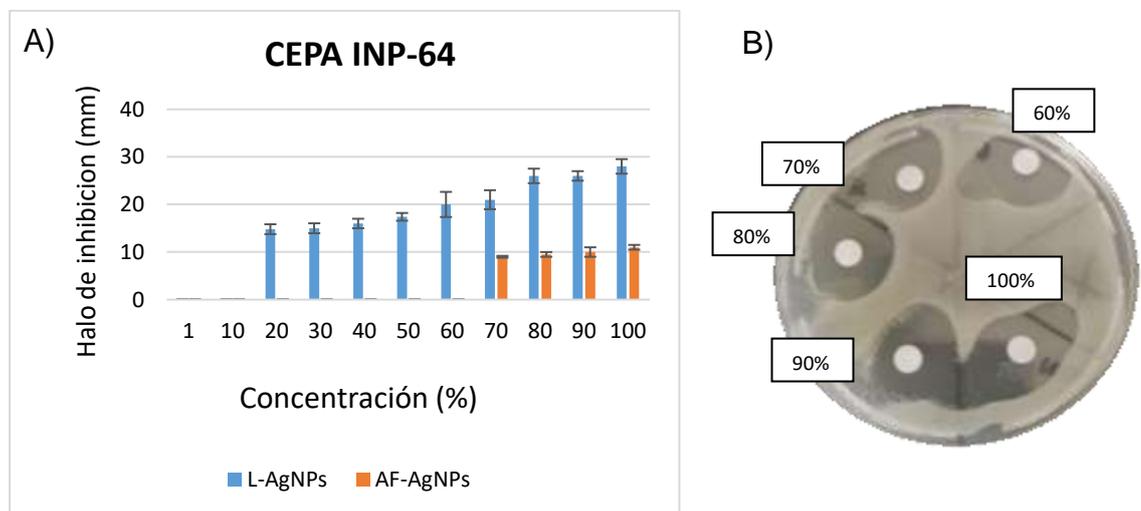


Figura 10. A) Halos de inhibición en milímetros (mm) a diferentes concentraciones (%) de nanopartículas de plata sintetizadas biológicamente, con extracto de lima (L-AgNPs) y *A. flavus* (AF-AgNPs) y **B)** Ensayo de difusión en disco de la cepa *P. aeruginosa* INP-64 (fibrosis quística) con sensidiscos impregnados con L-AgNPs a concentraciones de 60 al 100%.

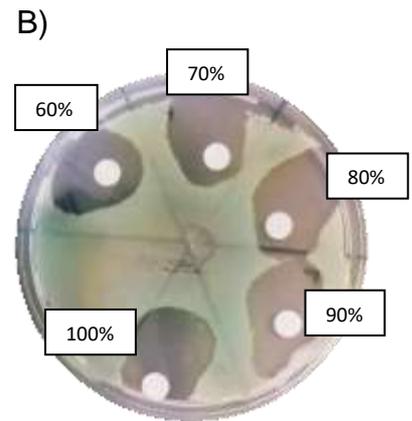
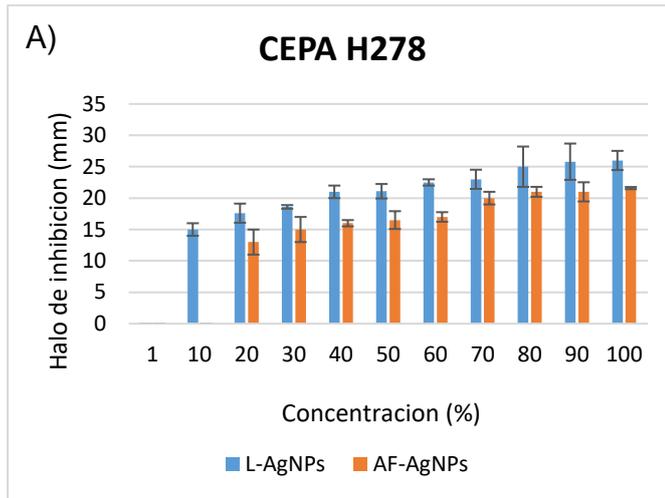


Figura 11. A) Halos de inhibición en milímetros (mm) a diferentes concentraciones (%) de nanopartículas de plata sintetizadas biológicamente, con extracto de lima (L-AgNPs) y *A. flavus* (AF-AgNPs) y **B)** Ensayo de difusión en disco de la cepa *P. aeruginosa* H278 (quemadura) con sensidiscos impregnados con AF-AgNPs a concentraciones de 60 al 100%.

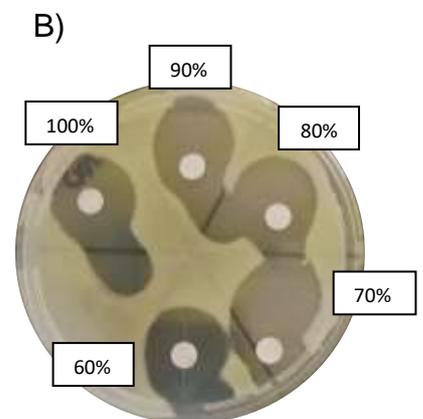
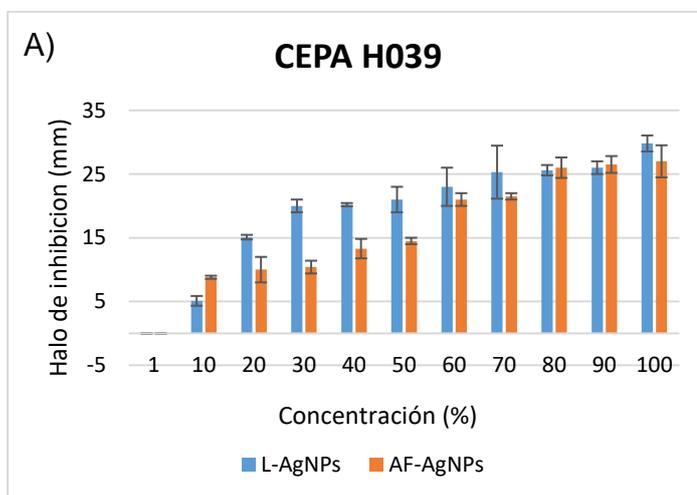


Figura 12. A) Halos de inhibición en milímetros (mm) a diferentes concentraciones (%) de nanopartículas de plata sintetizadas biológicamente, con extracto de lima (L-AgNPs) y *A. flavus* (AF-AgNPs) y **B)** Ensayo de difusión en disco de la cepa *P. aeruginosa* H039 (quemadura) con sensidiscos impregnados con L-AgNPs a concentraciones de 60 al 100%.

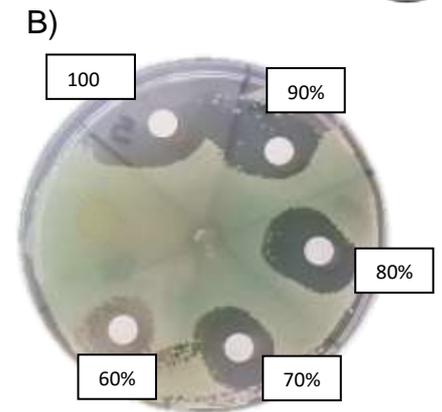
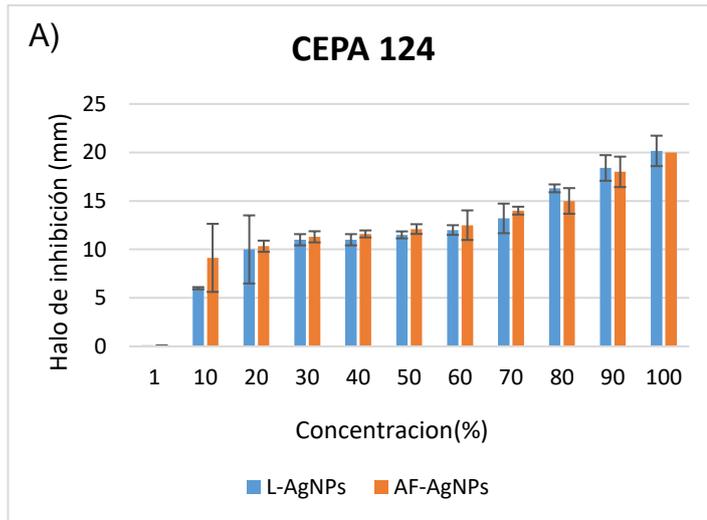


Figura 13. A) Halos de inhibición en milímetros (mm) a diferentes concentraciones (%) de nanopartículas de plata sintetizadas biológicamente, con extracto de lima (L-AgNPs) y *A. flavus* (AF-AgNPs) y **B)** Ensayo de difusión en disco de la cepa *P. aeruginosa* 124 (neumonía) con sensidiscos impregnados con AF-AgNPs a concentraciones de 60 al 100%.

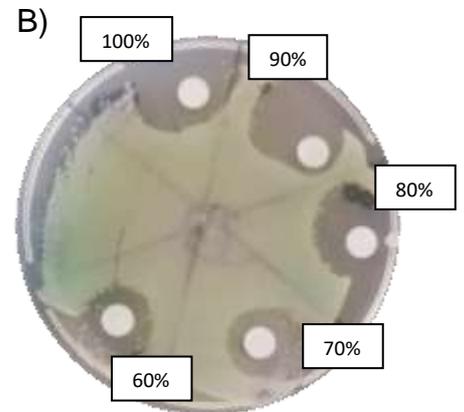
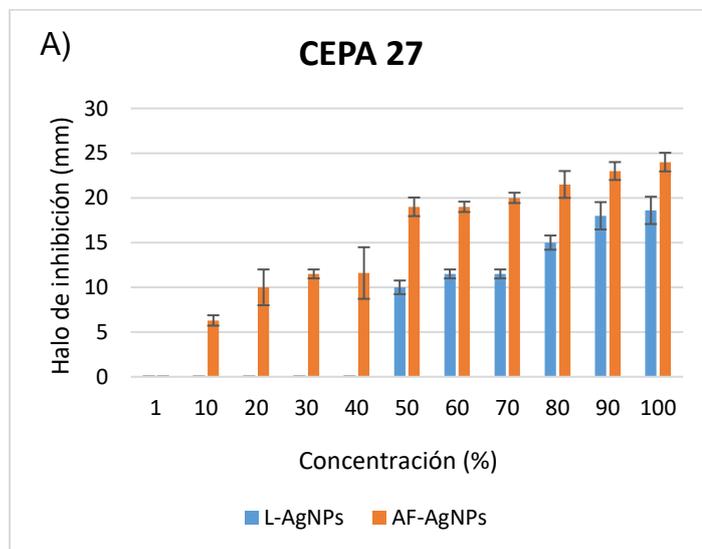


Figura 14. A) Halos de inhibición en milímetros (mm) a diferentes concentraciones (%) de nanopartículas de plata sintetizadas biológicamente, con extracto de lima (L-AgNPs) y *A. flavus* (AF-AgNPs) y **B)** Ensayo de difusión en disco de la cepa *P. aeruginosa* 27 (neumonía) con sensidiscos impregnados con L-AgNPs a concentraciones de 60 al 100%.



A partir de los valores de CMI y CMB obtenidos, se puede interpretar que las nanopartículas de plata sintetizadas por ruta biológica, específicamente, de forma verde, fueron más efectivas para las cepas INP-62, INP-64, H278, H039 y 124 ($p < 0.001$), mientras que en la cepa 27, las sintetizadas con *A. flavus* fueron más eficientes, $p < 0.001$.

Aunque los dos métodos biológicos (extracto de lima y *A. flavus*) para las síntesis de nanopartículas de plata mostraron efectos bactericidas, se puede observar en los resultados que las nanopartículas sintetizadas de forma verde fueron más efectivas que las sintetizadas por el hongo. Afortunadamente, los métodos biológicos han surgido como enfoques simples y no tóxicos, sin embargo, se ha reportado y preferido en la "química verde", los fitocompuestos extraídos de fuentes vegetales, ya que son agentes reductores y protectores adecuados para la síntesis de nanopartículas metálicas, considerando el alto potencial antioxidante, la falta de patogenicidad y la reproducibilidad. Seguido a esto, las nanopartículas sintetizadas de forma verde han mostrado aplicaciones biomédicas apartes de las antimicrobianas, como propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, nefroprotectoras y antioxidantes que contribuyen a perfilar estas nanopartículas en las actividades terapéuticas (Loiola L *et al*, 2019).

Por otra parte, el efecto de las nanopartículas biosintetizadas por *A. flavus* fue inferior, posiblemente por la presencia de grupos funcionales durante la síntesis, debido a que los grupos funcionales que están en los fluidos biológicos, también pueden interferir en la estabilidad coloidal de las nanopartículas de plata y consecuentemente provocar la adsorción de moléculas inespecíficas, lo cual se disminuye el efecto antibacteriano al ir las NPs conjugadas con otros compuestos, que en gran parte le restan su actividad en el microorganismo (Palanivel, S *et al*, 2019).



8.3. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA SINTETIZADAS, EN LA ULTRAESTRUCTURA DE *P. aeruginosa* POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM).

El estudio ultraestructural de *Pseudomonas aeruginosa* incubadas con nanopartículas de plata mostró daño producido en las diferentes estructuras de la bacteria. Los resultados obtenidos de la incubación de *P. aeruginosa* con el medio de cultivo, LB (control) muestran la pared celular y la membrana plasmática integras y bien definidas. Además, la electrodensidad del citoplasma y el ADN de la bacteria es homogéneo, como se observa en la figura 15.a. En contraste, las bacterias tratadas con las nanopartículas de plata exhibieron daño extenso; mostrando acumulación de nanopartículas en la pared celular y en los polos anteriores y posteriores de la bacteria. Asimismo, la pared celular se observa festoneada e interrumpida, la membrana plasmática presenta interrupciones y a nivel citoplasmático se exhibe un patrón granular que probablemente corresponde a los ribosomas bacterianos. Por otro lado, se aprecian cúmulos cercanos a la membrana plasmática, probablemente de cromatina, y la electrodensidad del citoplasma se encuentra disminuida, con pérdida del material celular, que se evidencia por la presencia de zonas claras (figura 15 b y c).

Con base en las micrografías, se puede predecir que el efecto bactericida inicia del contacto directo de las AgNPs con la pared y membrana celular, ya que la interrupción de estas estructuras provoca la liberación de material citoplasmático y finalmente la muerte celular, como lo describe Barros, C *et al*, en el 2018. Igualmente, las AgNPs pueden interactuar con el sistema de enzimas respiratorias, una vez que logran penetrar al citoplasma de la bacteria, y de esta forma generar las ROS que inducen estrés oxidativo, desnaturalización o daño de proteínas y ácidos nucleicos (García-Contreras *et al*, 2011). Otro posible mecanismo antibacteriano es debido a la gran cantidad de proteínas que contienen azufre en la superficie de la célula bacteriana, ya que los iones de plata pueden interactuar con proteínas que contienen azufre dentro o fuera de la membrana celular, lo que afecta la viabilidad de la célula bacteriana. Los iones

de plata actúan sustituyendo otros iones metálicos necesarios para la célula, como Ca^{2+} o Zn , paralelo a esto, se cree que los iones de plata pueden interactuar con los restos de fósforo en el ADN, lo que lleva a la inactivación de la replicación del ADN o reaccionar con grupos sulfhidrilos de enzimas metabólicas de la cadena de transporte de electrones, provocando su inactivación (Vasil'kov Y *et al*, 2018).

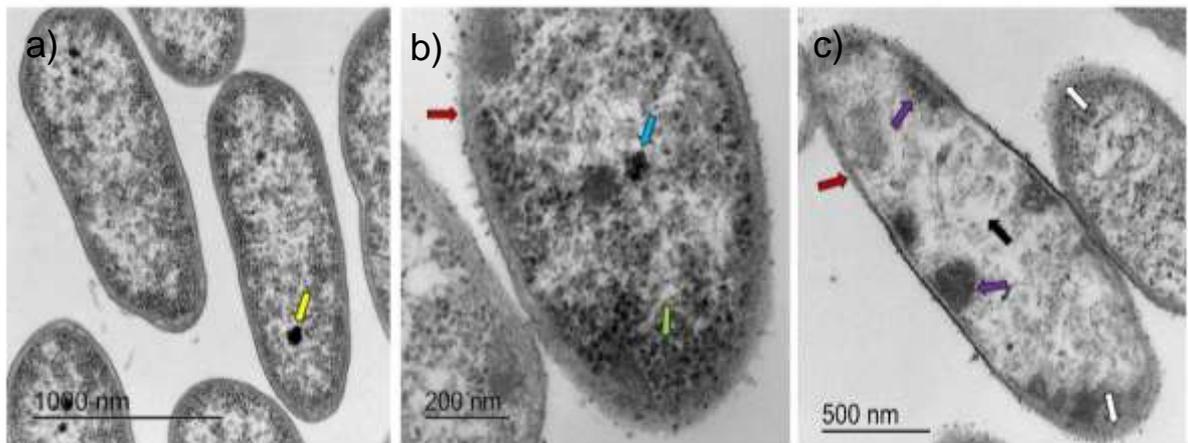


Figura 15. Micrografías de *Pseudomonas aeruginosa* (cepa PA14), incubadas con: **a)** Medio de cultivo LB (control), se observa la pared celular intacta y las membranas bien definidas, la electrodensidad del citoplasma es homogénea y el ADN se observa muy electrodensito (flecha amarilla), **b)** Nanopartículas de plata sintetizadas biológicamente por *A. flavus* (AF-AgNPs); las bacterias exhiben un daño extenso con interrupciones en la pared celular (flechas rojas), acumulación de ribosomas (flecha verde), y el ADN bacteriano se muestra con menor electrodensidad que en la bacteria no tratada (flecha azul), **c)** Las nanopartículas se encuentran distribuidas a lo largo de toda la pared celular, predominando en el extremo anterior y posterior de la bacteria, de igual forma se puede apreciar pérdida de la integridad de las membranas (flechas blancas), acumulación de probable cromatina que se localiza adosada en la membrana plasmática (flechas moradas), como la disminución en la electrodensidad del citoplasma y salida del material celular (flecha negra).



8.4. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LAS AgNPS EN EL MODELO ANIMAL *Galleria mellonella*

En la actualidad, existe la necesidad de realizar estudios *in vivo* que evalúen el potencial tóxico de diferentes compuestos antibacterianos que surgen en la investigación. Para llevar a cabo el ensayo de la toxicidad de las nanopartículas de plata se utilizó el modelo animal, *Galleria mellonella*. El uso del insecto *Galleria mellonella* como modelo experimental se ha vuelto bastante conocido en los últimos años, especialmente para el estudio de citotoxicidad de compuestos antimicrobianos (Binder *U et al*, 2016). Los insectos no tienen la respuesta inmunitaria adaptativa que tienen los mamíferos y tampoco pueden generar anticuerpos, sin embargo, muestran algunas similitudes con la función de la respuesta inmunitaria adaptativa de los mamíferos (Pereira T *et al*, 2018).

Asimismo, el sistema inmunológico de *G. mellonella* muestra similitudes estructurales y funcionales con la respuesta inmunitaria innata de los mamíferos, ya que la cutícula de *G. mellonella* es una barrera para la infección como lo es la piel de los mamíferos. La hemolinfa, análoga a la sangre de los mamíferos, contiene células inmunes llamadas hemocitos, que pueden compararse con los neutrófilos de los mamíferos en términos de su capacidad para fagocitar y matar patógenos o sustancias extrañas, que componen la respuesta inmunitaria celular. La respuesta humoral de estos insectos está constituida por moléculas efectoras que incluyen opsoninas, melanina y péptidos antimicrobianos. En este contexto, la respuesta inmune innata de los mamíferos es un componente importante ante la presencia de alguna sustancia, molécula o microorganismos extraño y los resultados alcanzados utilizando este insecto muestran una fuerte correlación con los obtenidos si se llegaran a emplear ratones (Rossoni R *et al*, 2019).

El ensayo se realizó con las L-AgNPs y AF-AgNps, debido a que estas nanopartículas fueron las que presentaron un efecto antibacteriano sobre las cepas multirresistentes empleadas. Se inoculó 20 uL sobre cada grupo de gusanos, concentraciones de 10, 50 y 100% de las nanopartículas de plata previamente mencionadas. Los controles se llevaron a cabo con NaCl al 0,9%

(control negativo) y 20 uL de la dilución seriada 10^8 , preparada con la cepa de *P. aeruginosa* PA14. Los gusanos se estudiaron y observaron durante cinco días, realizando una curva de crecimiento del porcentaje de gusanos sobrevivientes versus el tiempo en días, como se ve en la figura 16. Se muestran los resultados para las concentraciones más altas (100%) tanto de las L-AgNPs como las AF-AgNps.

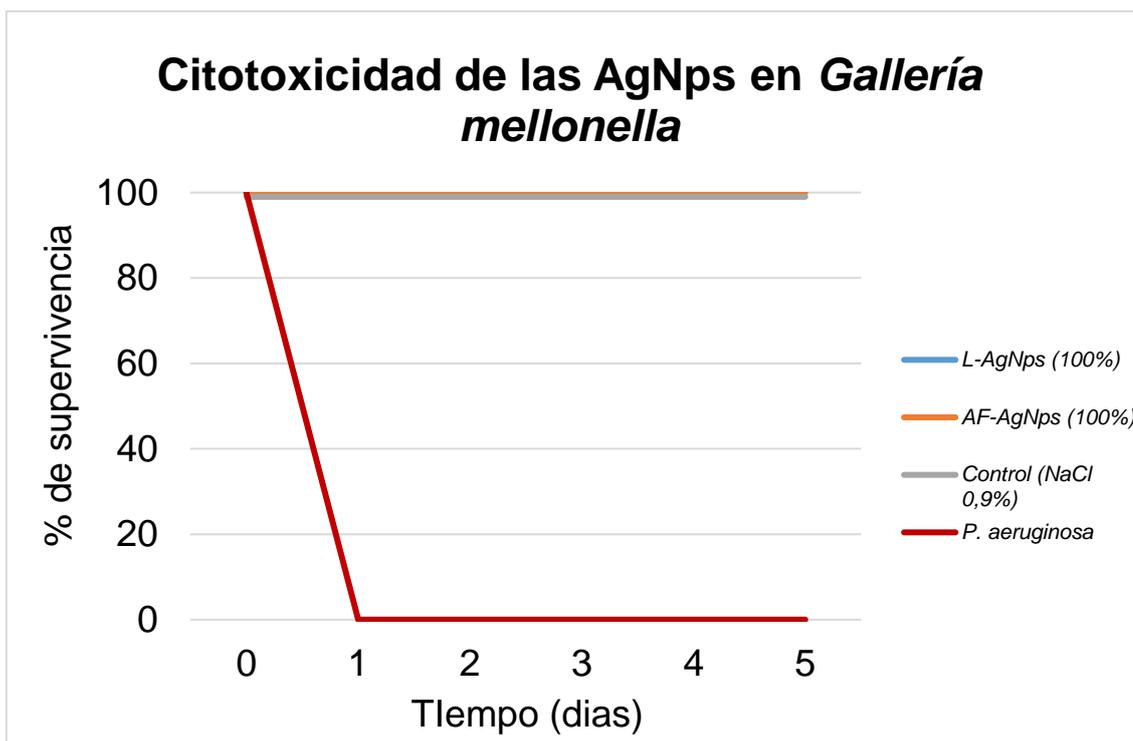


Figura 16. Curva de supervivencia de los gusanos *Gallería mellonella* durante cinco días, después de ser inyectados con nanopartículas de plata sintetizadas de forma verde (L-AgNPs) y con *A. flavus* (AF-AgNPs) a una concentración de 100%. Control negativo con NaCl al 0,9% y control positivo con *P. aeruginosa*.

Los gusanos inyectados con las nanopartículas de plata (L-AgNPs y AF-AgNps) y NaCl al 0,9% sobrevivieron en su totalidad (100%), desde el día cero hasta el día quinto. Por otro lado, los gusanos que fueron inyectados con las bacterias descendieron su supervivencia del 100 al 0% al día uno, como se esperaba observar (figura 17).

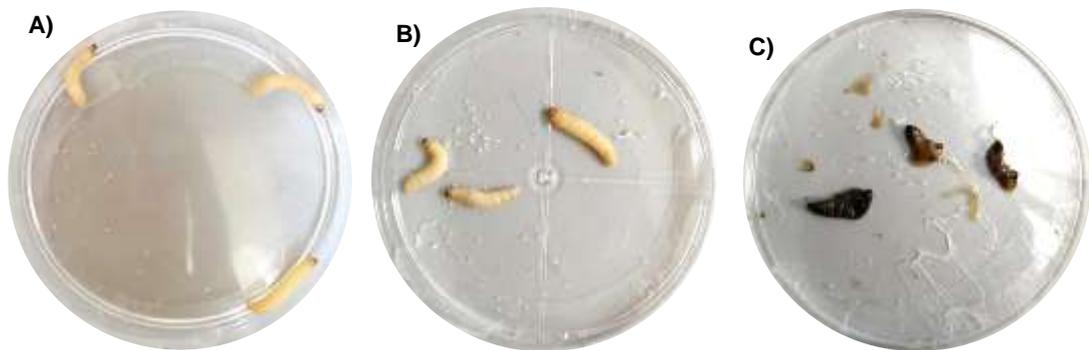


Figura 17. Larvas de *Gallería mellonella* inyectadas con; **A)** NaCl al 0,9 %, (control negativo), **(B)** Nanopartículas de plata sintetizadas por *A. flavus*, (AF-AgNPs) y **(C)** Inyectadas con *P. aeruginosa* (control positivo).

Aunque no se haya visto un efecto secundario o citotóxico de las nanopartículas de plata en el modelo animal, se recomienda evaluar la citotoxicidad en estudios posteriores con líneas celulares, fibroblastos o algún modelo más complejo, ya que sería arbitrario afirmar que las AgNPs no son tóxicas, o que no generan efectos colaterales, sin conocer si la viabilidad celular se ve afectada o no.

En las últimas décadas, las infecciones derivadas de microorganismos resistentes a los antibióticos han planteado una gran amenaza en el campo de la ciencia médica debido a una mayor tolerancia de los microorganismos contra los agentes antimicrobianos. El uso generalizado de antibióticos para el tratamiento y la prevención de enfermedades bacterianas conduce a un aumento significativo de la resistencia antibacteriana de los microorganismos a través de la adquisición de genes de resistencia exógenos o mutaciones cromosómicas. Esto incita no solo la búsqueda de nuevos compuestos antibacterianos, sino también las posibles alternativas a estos últimos. El efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata sintetizadas por diferentes rutas fue evaluado y resultó efectivo cuando se emplearon nanopartículas de plata sintetizadas biológicamente, el mecanismo en que estas AgNPs destruye a la bacteria son hipotéticos, pero pudiese ser por el contacto directo de las nanopartículas con la pared celular, el estrés oxidativo causados por ROS o que



los iones de plata formados en el citoplasma se unen a grupos -SH o fósforos de biomoléculas como proteínas o ADN, y de esta forma interrumpir la actividad celular y ocasionar la muerte bacteriana.

En este contexto y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta investigación, se puede predecir que las nanopartículas de plata sintetizadas biológicamente, no tienen un efecto secundario en células animales, sin embargo, se sugiere realizar un estudio más completo del efecto de las AgNPs y a la par evaluar la inoculación combinada de *P. aeruginosa* con nanopartículas de plata en un modelo animal de mayor complejidad, para confirmar que no existe efecto alguno, y de ser así, proyectar las nanopartículas de plata como una alternativa en potencia en la biomedicina.



9. CONCLUSIONES

- ✓ Se logró evaluar el efecto antibacteriano de las nanopartículas de plata sobre las seis cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes a antibióticos, aisladas de pacientes con fibrosis quística (INP-62 e INP-64), quemaduras (H278 y H039) y neumonía (27 y 124).
- ✓ La espectroscopia UV-Vis y microscopia avanzada permitió caracterizar las nanopartículas de plata sintetizadas, determinado que las nanopartículas eran ovoides o esféricas y de tamaño relativamente pequeñas.
- ✓ El efecto antibacteriano de las nanopartículas a través de la CMI y CMB, lo presentaron las NPs sintetizadas por extracto de lima (L-AgNps) y el hongo *A. flavus* (AF-AgNPs), siendo las primeras más efectivas, mientras que las NPs sintetizadas de forma química, no mostraron efecto antimicrobiano.
- ✓ La Microscopia electrónica de transmisión permitió observar que las nanopartículas de plata actúan principalmente sobre la pared celular y la membrana plasmática, al igual que a nivel citoplasmático y de esta forma causar la muerte celular del microorganismo.
- ✓ El ensayo de toxicidad permitió determinar que las NPs no presentaron efectos sobre el modelo animal ensayado, no obstante, se sugiere realizar un estudio más completo en líneas celulares, como también la inoculación combinada de las NPs con la bacteria.



10. BIBLIOGRAFIA

- AbdelRahim, K., Mahmoud, S., Ali, A., Almaary, K., Mustafa A., Husseinye, S. (2017). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Rhizopus stolonifer*. Saudi Journal of Biological Sciences. P 208-216. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.025>
- Aguilar, N. M., Arteaga-Cardona, F., Estévez, J. O., Silva-González, N. R., Benítez-Serrano, J. C., Salazar-Kuri, U. (2018). Controlled biosynthesis of silver nanoparticles using sugar industry waste, and its antimicrobial activity. Journal of Environmental Chemical Engineering.
- Ahmad, A., Wei, Y., Fatima, T. Kamran., Rehman, Aziz U., Khan, Arifullah., Ullah, Sadeeq., Yuan, Qipeng. (2017). The effects of bacteria-nanoparticles interface on the antibacterial activity of green synthesized silver nanoparticles. Vol: 102, Page: 133-142.
- Anand, K., Ragini, S., Payal, S., Virendra, B., Gopal, N. (2018). Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cestrum nocturnum*. Journal of Ayurveda and Integrative Medicine, p.1-8.
- Arole, M., Munde, V. (2014). Fabrication of nanomaterials by top-down and bottom-up approaches – an overview. JAAST:Material Science (Special Issue).
- Barros, C., Fulaz, S., Stanisic, D., & Tasic, L. (2018). Biogenic Nanosilver against Multidrug-Resistant Bacteria (MDRB). Antibiotics (Basel, Switzerland), 7(3), 69.
- Binder, U., Maurer, E., Lass-Flörl. (2016). *Galleria mellonella*: An invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species. Fungal Biology. Pages 288-295.
- Bush, L., Perez, M. (2015). Infecciones por *Pseudomonas* y patógenos relacionados. Manual MSD. En línea: <https://www.msdmanuals.com/es-mx/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas/infecciones-por-pseudomonas>
- Camacho, J., Descamps, L. (2013). Síntesis de nanopartículas de plata y modificación con pulpa de papel para aplicación antimicrobial. Universidad de Cartagena, p.6-73.



- Chávez-Andrade, M., Tanomaru-Filho, M., Basso, M., Leonardo, R., Faria, G., Guerreiro-Tanomaru, J. (2019). Antimicrobial and biofilm anti-adhesion activities of silver nanoparticles and farnesol against endodontic microorganisms for possible application in root canal treatment. *Archives of Oral Biology*. Volume 107. DOI: <https://doi-org.ezproxy.unal.edu.co/10.1016/j.archoralbio.2019.104481>
- Chiriac, A., Brzezinski, P., Foia, L., Marincu, I. (2015). Chloronychia: green nail syndrome caused by *Pseudomonas aeruginosa* in elderly persons. *Clinical Interventions in Aging*. 10 265–267.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2018), M100; Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 29th Edition. Free Acces: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>
- Comunicación de la Comisión Europea. (2012). Segunda revisión de la normativa sobre los nanomateriales. 572. En línea: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A52012DC0572>
- Constitución política de los estados unidos mexicanos. Constitución publicada en el Diario Oficial de la Federación el 5 de febrero de 1917. Última reforma publicada DOF 18-06-2008. En línea: <http://pdba.georgetown.edu/Constitutions/Mexico/textovigente2008.pdf>
- Convenio sobre la Diversidad Biológica. (1992). Organización de las Naciones Unidas. En: <https://www.cbd.int/convention/text/default.shtml>
- Dananjaya, S., Erandani, W., Kim, C., Nikapitiya, C., Lee, J., De Zoysa, M. (2017). Comparative study on antifungal activities of chitosan nanoparticles and chitosan silver nano composites against *Fusarium oxysporum* species complex. *International Journal of biological macromolecules*, ISSN: 1879-0003, Vol: 105.
- Dattu, S., Vandana, R., Shivaraj, N., Jyothi, H., Perma K. (2013). Biosynthesis of silver nanoparticle by endophytic fungi *Penicillium sp.* isolated from *Curcuma longa* (turmeric) and its antibacterial activity against pathogenic Gram negative bacteria. *Journal of Pharmacy Research*, ISSN: 0974-6943, Vol: 7, Issue: 5, Page: 448-453.



- De Kraker, M., Stewardson, E., Harbarth, S. (2016). Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050. *PLoS medicine*, 13(11).
- Deshmukh, S., Patil., Mullani, S., Delekar, S. (2019). Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review. *Materials Science and Engineering C*. Volume 97. P: 954-965.
- Diario Oficial de la Federacion (DOF). (2018). ACUERDO por el que se declara la obligatoriedad de la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos. En línea: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5525043&fecha=05/06/2018&print=true
- Dreser, A., Wirtz, V., Corbett, K., Echániz, G. (2008). Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Salud Pública de México*, 50(Supl. 4), S480-S487.
- Emamia, A., Abdolkhalegh, K., Neda, P., Mahrokh Rajaei, B. (2019). Identification of different faces of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in burn patients by genetic fingerprinting. *Gene Reports*. Vol 15.
- Fernández-Presas, A., Márquez, Y., García González, R., Reyes, A., Rodríguez, H., García, B., Toloza, R., Becker, I., Delgado, J., Molinarí, J. (2018). Ultrastructural damage in *Streptococcus mutans* incubated with saliva and histatin 5. *Archives of oral biology*, ISSN: 1879-1506, Vol: 87, Page: 226-234.
- Flores, C.Y. (2014). Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida. Universidad nacional de la plata.
- Galdiero, S., Falanga, A., Vitiello, M. Cantisani, M., Marra, V., Galdiero, M. (2011). Silver Nanoparticles as potential antiviral agents. *Molecules*, 16, pp. 8894-8918.
- García, A., Delgado, L., Torà, J., Casals, E., González, E., Puntès, V., Font, X., Carrera, J., Sánchez, A. (2012). Effect of cerium dioxide, titanium dioxide, silver, and gold nanoparticles on the activity of microbial communities intended in wastewater treatment. *Journal Hazard Mater*. 199-200: 64–72.



- García-Contreras, R., Argueta-Figueroa, L., Mejía-Rubalcava, C., Jiménez-Martínez, R., Cuevas-Guajardo, S., Sánchez-Reyna, P. A., Mendieta-Zeron, H. (2011). Perspectives for the use of silver nanoparticles in dental practice. *International Dental Journal*, Vol. 61, pp. 297–301.
- González, E., Puentes, V., Casals, E. (2015). *Nanomateriales. Nanopartículas Coloidales*. Fundación Instituto Geofísico Javeriana. ISBN 978-958-46-6931-5- Pg. 265
- Graham, C. (2013). The role of silver in wound healing. *British Journal of Nursing*. Vol. 14, No. Sup5.
- Hsueh, Y. H., Lin, K. S., Ke, W. J., Hsieh, C. T., Chiang, C. L., Tzou, D. Y., & Liu, S. T. (2015). The Antimicrobial Properties of Silver Nanoparticles in *Bacillus subtilis* Are Mediated by Released Ag⁺ Ions. *PloS one*, 10(12).
- Instituto Nacional de seguridad e higiene en el trabajo (INSHT). (2016). En línea:<http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Pseudomonas%20aeruginosa%202017.pdf>
- Ji, X., Song, X., Li, J., Bai, Y., Yang, W., Peng, X. (2007). Size control of gold nanocrystals in citrate Reduction: the third role of citrate. *J. Am. Chem. Soc.*, 129- pp. 13939-13948
- Kim Y., Song Y., Park J., Song K., Ryu H., Chung Y., Chang H., Lee J., Oh K., Kelman B., Hwang I., Yu I. (2010). Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Part Fibre Toxicol.* 6;7:20. doi: 10.1186/1743-8977-7-20.
- La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). (2019). En línea: <https://www.oecd.org/centrodemexico/laocde/masinformacionsobrelaocde.htm>
- Ley de Ciencia y Tecnología. Última reforma publicada DOF 08-12-(2015). Ley publicada en el Diario Oficial de la Federación el 5 de junio de 2002. En línea: http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/242_081215.pdf
- Ley de los Institutos Nacionales de Salud. Última reforma publicada DOF 16-02-(2018). Ley publicada en el Diario Oficial de la Federación el 26 de mayo de 2000. En línea: http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/51_160218.pdf



- Li, W, Xie, X., Shi, Q., Zeng, H., Ou-Yang, Y.,Chen, Y. (2010). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. P: 85: 1115. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2159-5>
- Loiola, L.,Batista, M.,Capeletti, L.,Mondo, G.,Rosa, R.,Marques, R., Bajgelman, M., Cardoso, M. (2019). Shielding and stealth effects of zwitterion moieties in double-functionalized silica nanoparticles. *Journal of colloid and interface science*, ISSN: 1095-7103, Vol: 553, Page: 540-548.
- Luján, D. (2014). *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*,48 (4), 465-474.
- Magadia, A., Oluwole, D., Muthumuni, M. Nyokong, T. (2019). Physicochemical and antimicrobial photodynamic chemotherapy (against *E. coli*) by indium phthalocyanines in the presence of silver–iron bimetallic nanoparticles. *Polyhedron Volume 162*, Pages 30-38.
- Mangala, J., Bhattacharyya, A. (2008). Characterization techniques for nanotechnology applications in textiles. *Indian Journal of Fibre and Textile Research*. 33. 304-317.
- Monde, M. (2009). Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *Anales de química*, 105(1), 33-41.
- Norma Oficial Mexicana (NOM). (2014). NMX-R-27687-SCFI-2014. Nanotecnologías-Terminología y definiciones para nano-objetos- Nanopartícula, nanofibra y nanoplaca. En línea: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5364702
- Norma Oficial Mexicana (NOM). (2015). NMX-R-80004-5-SCFI-2015. Nanotecnologías-Vocabulario-Parte 5: Interfaz nano/bio. En línea: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5470637&fecha=01/02/2017
- Norma Oficial Mexicana (NOM). (2018). Acuerdo; por el que se declara la obligatoriedad de la estrategia nacional de acción contra la resistencia a los antimicrobianos. En línea: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5525043&fecha=05/06/2018



- Norma técnica colombiana (NTC). (2015). Nanotecnología. Terminología y definiciones para nanoobjetos, nanopartícula, nanofibra y nanopláca. En línea: <https://tienda.icontec.org/wp-content/uploads/pdfs/NTC6148.pdf>
- Norma técnica colombiana (NTC). (2017). Nanotecnología. Vocabulario. Parte 5: interfase nano/bio. En línea: <https://tienda.icontec.org/wp-content/uploads/pdfs/NTC-ISO-TS80004-5.pdf>
- Ochoa, S., López-Montiel, F., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L., López-Martínez, B., Jiménez-Tapia, Y., Giono, S., Eslava, C., Hernández-Castro, R., Xicohtencatl-Cortés, J. (2013). Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. Boletín médico del Hospital Infantil de México, 70(2), 136-150.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2007). Biotecnología. En línea: <https://www.who.int/es>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2013). Informe sobre el Sistema Mundial de Vigilancia Antimicrobiana. Ginebra, OMS. En línea: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/surveillance/glass/es/>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018). Resistencia a los antibióticos. En línea: https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1
- Palanivel, S., Zhaofa, L., Bingru, H., Xin, G., Qiuqiang, Z., Chaoyang, W., Feng, L. (2019). Understanding the surface functionalization of myricetin-mediated gold nanoparticles: Experimental and theoretical approaches. Applied Surface Science Volume 493, 1 November 2019, Pages 634-644.
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B., Lin, T., Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnology advances, ISSN: 1873-1899, Vol: 37, Issue: 1, Page: 177-192
- Pansara, C., Chan, W., Parikh, A., Trott, D., Mehta, T., Mishra, R., Garg, S. (2019). Formulation Optimization of Chitosan-Stabilized Silver



Nanoparticles Using *In Vitro* Antimicrobial Assay. Journal of pharmaceutical sciences. Vol: 108, Page: 1007-1016

- Peleg, Y & Hooper, D. (2010). Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *N Engl J Med.*; 362(19): 1804–1813.
- Pereira, T., De Barros, P., Fugisaki, L., Rossoni, R., Ribeiro, F., De Menezes, R., Junqueira, J., Scorzoni, L. (2018). Recent Advances in the Use of *Galleria mellonella* Model to Study Immune Responses against Human Pathogens. *Journal of Fungi* ; 4, 128.
- Power, A., Chapman, J., Chandra, S., Cozzolino, D. (2019). Ultraviolet-visible spectroscopy for food quality analysis. *Evaluation Technologies for Food Quality*, Page: 91-104.
- Premkumara, J. (2018). Synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) from cinnamon against bacterial pathogens, Elsevier: *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Volumen 15, 311-316.
- Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la biotecnología del convenio sobre la diversidad biológica. (2000). En línea: <https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/comunicacion/publicaciones/cartagena-protocol-es.pdf>
- Rafińska, K., Pomastowski, P., Buszewski, B. (2019). Study of *Bacillus subtilis* response to different forms of silver. *The Science of the total environment*, ISSN: 1879-1026, Vol: 661, Page: 120-129.
- Ramadan, M., Shawkey, A., Rabeh, M., Abdellatif, A. (2019). Promising antimicrobial activities of oil and silver nanoparticles obtained from *Melaleuca alternifolia* leaves against selected skin-infecting pathogens. *Journal of Herbal Medicine*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2019.100289>
- Reporte de los Hospitales de la Red del PUCRA: Resistencia antimicrobiana y Consumo de antibióticos. (2018). Estado Actual de la Resistencia Antimicrobiana en México Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rodrigues, C., de Andrade, F., Vasconcelos, L., Midena, R., Pereira, T., Kuga, M., Duarte, M., Bernardineli, N. (2018). Antibacterial properties of silver nanoparticles as a root canal irrigant against *Enterococcus faecalis* biofilm



and infected dentinal tubules. *International Endodontic Journal*, 51, 901– 911.

- Rodríguez-Noriega, E., León-Garnica, G., Petersen-Morfín, S., Pérez-Gómez, H. (2014). La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. In *Biomédica* (Vol. 34).
- Rossoni, R.,Ribeiro, F., Dos Santos, H.,Dos Santos, J.,Oliveira, N.,Dutra, M., de Lapena, S., Junqueira, J. (2019). *Galleria mellonella* as an experimental model to study human oral pathogens. *Archives of Oral Biology*. P: 13-22.
- Roy, A., Bulut, O., Some, S., Mandal, A., Yilmaz, D. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles:biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. *Royal Society of Chemistry (RSC)*: 9, 2673-2702
- Ryder C., Byrd M., Wozniak DJ.(2007). Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol*; 10:644-648.
- Saavedra, S., Duarte, C., González, M., Realpe, M. (2014). Caracterización de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de carbapenemasas de siete departamentos de Colombia. *Biomédica (INS)*: 34(Supl.1):217-23.
- Salomoni R., Léo, P., Montemor, A., Rinaldi, B., Rodrigues, M.(2017). Antibacterial effect of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nanotechnology, Science and Applications*. 10:115-121.
- Sampieri, R., Collado, C., Lucio, P., & Pérez, M. (2003). Metodología de la investigación. *Metodologia de La Investigacion*, 1–25. Retrieved from http://www.univo.edu.sv:8081/tesis/021552/021552_Cap3.pdf
- Sánchez A., Salso S., Culebras E., Picazo JJ. (2004). Resistencia a carbapenemes por metaloenzimas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* . *Rev Esp Quimioter.*;17:336-340.
- Schlagenhauf, P., Gautret, P., Rodriguez-Morales, A., Jones, M., Toovey, S., Petersen, E., Chen, L.(2016). Drug resistant pathogens and travel: No road map but a new initiative from Travel Medicine and Infectious Disease. *Travel Medicine and Infectious Disease*, Volume 14, Issue 6; 543-545.



- Schleh, M., Semmler-Behnke, J., Lipka, A., Wenk, S., Hirn, M., Schäffler, G., Schmid, U., Simon, W., Kreyling, G. (2012). Size and surface charge of gold nanoparticles determine absorption across intestinal barriers and accumulation in secondary target organs after oral administration. *Nanotoxicology*, pp. 36-46.
- Serra-Valdés, Miguel. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16(3), 402–419.
- Singh, H., Du, J., Singh, P., & Yi, T. H. (2018). Extracellular synthesis of silver nanoparticles by *Pseudomonas* sp. THG-LS1.4 and their antimicrobial application. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 8(4), 258–264.
- Speshock, J., Murdock, R., Braydich-Stolle, L., Schrand, A., Hussain, S. (2010). Interaction of silver nanoparticles with *Tacaribe virus*. *J. Nanobiotechnol.*, 8, pp. 19-27.
- Srivastava, S., Bhargava, A., Pathak, N., Srivastava, P. (2019). Production, characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles produced by *Fusarium oxysporum* and monitoring of protein-ligand interaction through in-silico approaches. *Microbial pathogenesis*, Vol: 129, Page: 136-145.
- Toma, H., Zamarion, V., Toma, S., Araki, K. (2010). The coordination chemistry at gold nanoparticles. *J. Braz. Chem. Soc.*, pp. 1158-1176
- Vallejo, S. (2012). Síntesis de nanopartículas plata-sílice a través de un método organometálico. Universidad de la Rioja.
- Vasil'kov, Y., Dovnar, R., Smotryn, S., Iaskevich, N., Naumkin, A. (2018). Plasmon Resonance of Silver Nanoparticles as a Method of Increasing Their Antibacterial Action. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 7(3), 80. doi:10.3390/antibiotics7030080
- Vázquez M., Blandón-Naranjo, L. (2014). Comportamiento antimicrobiano de nanopartículas de plata sintetizadas electroquímicamente. Universidad de Antioquia. 6, pp 99-107.2
- Venegas, M., Bollaert, M., Jafari, A., Bondoc, J., Twilley, J., Thompson, W., Movahedzadeh, F. (2018). Nanoparticles against resistant *Pseudomonas* spp. *Microbial pathogenesis*, ISSN: 1096-1208, Vol: 118, Page: 115-117.



- Villamizar, R. (2016). Biotechnological synthesis of silver nanoparticles using phytopathogenic fungi from cocoa. En *Bionanotechnology for Sustainable Environmental Remediation and Energy Production*. Primera Ed: Academia de Ciencias Físicas, Exactas y Naturales. Colombia. pp.135 – 150.
- Villamizar, R., Monroy, L. (2015). Uso de Nanopartículas de plata en el control de microorganismos patógenos presentes en alimentos. *Revista Alimentech*. ISSN 1692-7125. Volumen 13, No. 1, p.54-59.1
- Wang, M., Marepally, S. K., Vemula, P. K., & Xu, C. (2016). Inorganic Nanoparticles for Transdermal Drug Delivery and Topical Application. In *Nanoscience in Dermatology*. pp. 57–72.
- Xueting, Yan., He, B., Liu, L., Qu, G., Shi, J., Hu, L., Jiang, G. (2018). Antibacterial mechanism of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*: proteomics approach. *Metallomics*. 10: 557-564.
- Yin, Naiyi., Gao, Rui., Knowles, Brett., Wang, Jiasheng., Wang, Pengfei., Sun, Guoxin., Cui, Yanshan. (2019). Formation of silver nanoparticles by human gut microbiota. Vol: 651: 1489-1494.
- Zhang, L., Hinz, A. J., Nadeau, J. P., & Mah, T. F. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* tssC1 links type VI secretion and biofilm-specific antibiotic resistance. *Journal of bacteriology*, 193(19), 5510–5513.
- Zhang, X., Liu, G., Shen, W.,Gurunathan, S. (2016). Silver Nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International Journal of molecular sciences*, 17(9), 1534. doi:10.3390/ijms17091534
- Zhang, X., Yan, S., Tyagi, R., Surampalli, R. (2011). Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. *Chemosphere*, ISSN: 1879-1298, Vol: 82, Issue: 4, Page: 489-94.
- Zhao, P., Astruc, D. (2013). State of the art in gold nanoparticle synthesis. *Coordination Chemistry Reviews* Volume 257, Issues 3–4, Pages 638-665.