

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Doctorado en Ciencias  
en Física de Materiales**

---

**Evaluación de las interacciones entre las nanopartículas de  
plata y microorganismos patógenos**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias

Presenta:

**Roberto Vazquez Muñoz**

Ensenada, Baja California, México  
2017

Tesis defendida por  
**Roberto Vazquez Muñoz**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dr. Alejandro Huerta Saquero**  
Co-Director de tesis

---

**Dra. Nina Bogdanchikova**  
Co-Directora de tesis

Miembros del comité

**Dr. Rafael Vázquez Duhalt**

**Dr. Oscar Raymond Herrera**

**Dr. Miguel José Yacamán**



---

**Dr. Sergio Fuentes Moyado**  
Coordinador del Posgrado en Física de Materiales

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

*Roberto Vazquez Muñoz © 2017*

*Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.*

Resumen de la tesis que presenta **Roberto Vazquez Muñoz** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Física de Materiales.

### **Evaluación de las interacciones entre las nanopartículas de plata y microorganismos patógenos**

Los nanomateriales antimicrobianos –nanoantibióticos- tales como las nanopartículas de plata –AgNPs-, podrían ayudar a mitigar el reto de las enfermedades infecciosas, que son una de las principales causas de muerte en el mundo. Las AgNPs presentan actividad antiviral y antimicrobiana, aunque pueden afectar a todos los sistemas biológicos (SB). A pesar de su uso, se desconoce la toxicidad relativa de las AgNPs en los diferentes SB, así como qué parámetros fisicoquímicos–medio de cultivo, pH, entre otros- afectan su estabilidad o actividad. Por otro lado, aunque se ha demostrado que pueden mejorar la actividad de algunos antibióticos, hasta el momento no se conoce el mecanismo que favorece la sinergia. El objetivo del presente trabajo fue establecer la toxicidad relativa de las AgNPs en sistemas biológicos de distinto grado de complejidad, desde virus hasta células humanas. Además, se buscó esclarecer qué factores influyen en la estabilidad y actividad de las AgNPs, así como elucidar el mecanismo que favorece la sinergia en los tratamientos combinados AgNPs- antibióticos. Se encontró que las Concentraciones Inhibitorias (CI) de las AgNPs fueron: 10-12  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de plata en bacterias (*E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. aureus* y *B. subtilis*), 20 para *Fusarium oxysporum* y 45 para *Candida albicans*, independientemente de su perfil de susceptibilidad a antibióticos. La mayoría de las CI de las AgNPs en todos los sistemas biológicos *in vitro* –desde virus hasta líneas celulares de cáncer- estuvieron en el orden de  $10^1 \mu\text{g ml}^{-1}$  de plata. Por otro lado, dependiendo del medio de cultivo usado, las AgNPs mostraron diferencias en sus características –plasmón superficial, tamaño, estabilidad- y su actividad antimicrobiana –variaciones en las CI- en hongos y bacterias. Las AgNPs alteran la estructura celular de bacterias y hongos; asimismo, se bioacumulan y se pueden biosintetizar en el medio intracelular. Además, las AgNPs despolarizan la membrana celular de manera significativa. Algunas combinaciones de AgNPs con antibióticos muestran una actividad potenciada; particularmente con aquellos que se internalizan para ejercer su efecto antimicrobiano. Considerando lo anterior, proponemos que el efecto sinérgico se debe al mecanismo de acción de los antibióticos, facilitado por la actividad de las AgNPs sobre la membrana de la célula bacteriana. Hasta donde sabemos, éste es el primer estudio experimental –y sustentado por un meta-análisis- que evalúa el efecto tóxico del mismo nanomaterial en una diversidad tan amplia de sistemas biológicos. La toxicidad de las AgNPs es independiente de la complejidad –fisiológica o estructural- del sistema biológico, *in vitro*, a nivel celular, pues las CI fueron similares ( $10^1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) en todos los SB. El medio de cultivo influye directamente en las propiedades de las AgNPs y su actividad antimicrobiana –variando las CI hasta en 3 órdenes de magnitud. Hasta donde sabemos, es la primera vez que se da una aproximación experimental al mecanismo que favorece la sinergia en los tratamientos combinados de AgNPs con antibióticos; esto permitirá predecir combinaciones favorables de ambos antimicrobianos.

Resumen aprobado por:

---

**Dr. Alejandro Huerta Saquero**  
Co-Director de tesis

---

**Dra. Nina Bogdanchikova**  
Co-Directora de tesis

**Palabras clave:** nanoantibióticos, nanopartículas de plata, efecto sinérgico, meta-análisis

Abstract of the thesis presented by **Roberto Vazquez Muñoz** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Material Physics.

### **Evaluation of the interactions of silver nanoparticles and pathogenic microorganisms**

Antimicrobial nanomaterials –nanoantibiotics- such as silver nanoparticles –AgNPs- could help to mitigate the challenge of infectious diseases, which are one of the leading causes of death in the world. AgNPs have antiviral and antimicrobial activity, although they can affect all biological systems (BSs). In spite of their use, the relative toxicity of AgNPs in different BSs is unknown, as well as what physicochemical parameters –culture medium, pH, among others- affect their stability or activity. On the other hand, although it has been shown that they can improve the activity of some antibiotics, so far the mechanism that favors synergy is unknown. The objective of the present work was to establish the relative toxicity of AgNPs in biological systems of varying degrees of complexity, from viruses to human cells. In addition, it was sought to clarify which factors influence the stability and activity of AgNPs, as well as to elucidate the mechanism that favors synergy in the combined AgNPs-antibiotic treatments. It was found that the Inhibitory Concentrations (ICs) of the AgNPs were: 10-12  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of silver in bacteria (*E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. aureus* and *B. subtilis*), 20 for *Fusarium oxysporum* and 45 for *Candida albicans*, regardless of their susceptibility profile to antibiotics. The majority of ICs of AgNPs in all *in vitro* biological systems –from viruses to cancer cell lines- were on the order of  $10^1 \mu\text{g ml}^{-1}$  of silver. On the other hand, depending on the culture medium used, the AgNPs showed differences in their characteristics –surface plasmon, size, stability - and their antimicrobial activity- variations in ICs in fungi and bacteria. AgNPs alter the cellular structure of bacteria and fungi; they also bioaccumulate and can be biosynthesized in the intracellular medium. In addition, AgNPs depolarize the cell membrane significantly. Some combinations of AgNPs with antibiotics show enhanced activity; particularly with those that are internalized to exert their antimicrobial effect. Considering the above, we propose that the synergistic effect is due to the mechanism of action of antibiotics, facilitated by the activity of AgNPs on the membrane of the bacterial cell. As far as we know, this is the first experimental study –and supported by a meta-analysis- that evaluates the toxic effect of the same nanomaterial on such a wide range of biological systems. The toxicity of AgNPs is independent of the physiological or structural complexity of the biological system, *in vitro*, at cellular level, since ICs were similar ( $10^1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) in all BSs. The culture medium directly influences the properties of the AgNPs and their antimicrobial activity –varying the ICs up to 3 orders of magnitude. As far as we know, it is the first time that an experimental approach to the mechanism that favors synergy in the combined treatments of AgNPs with antibiotics is given; this will allow predicting favorable combinations of both antimicrobials.

Abstract approved by:

---

**Dr. Alejandro Huerta Saquero**  
Thesis CoDirector

---

**Dra. Nina Bogdanchikova**  
Thesis Codirector

**Keywords:** nanoantibiotics, silver nanoparticles, synergistic effect, meta-analysis

## Dedicatoria

A mi familia, de sangre y adquirida

A mis amistades, por todo lo que representan

A las personas que dedican su vida a entender los secretos de la materia y la vida

A aquellos que hacen que la comunicación pública de la ciencia sea una realidad

## Agradecimientos

A la UNAM y al CICESE, por recibirme en el programa de posgrado, por el apoyo en las instalaciones, equipos y respaldo –logístico, económico y en gestión- para poder presentar mi proyecto en distintos foros. Al CONACYT, por la beca que me permitió dedicarme al cumplimiento de mi trabajo doctoral, mismo que culmina con la realización del presente reporte. Por las estancias y apoyos de movilidad y materiales, agradezco al CONACYT proyectos 264217, al PAPIIT-UNAM proyecto IN204815, al programa UC MEXUS – CICESE proyecto CN 15-46 y al National Institutes of Health de Estados Unidos

### A mis directores y comité de tesis

Al Dr. Alejandro Huerta Saquero y a todo su equipo, por recibirme en el grupo, por creer en la propuesta del proyecto y, además, mejorarla para lograr una contribución más significativa. También por el apoyo moral, logístico y material, que facilitó enormemente el desarrollo del trabajo; así como la oportunidad de trabajar con libertad, lo que me permitió desarrollarme otros aspectos igual de relevantes, tales como el de académico y divulgador de la ciencia. Agradezco también su integridad como investigador y como persona, así como su compromiso con los estudiantes del grupo. Pertenecer a éste grupo de trabajo fue una oportunidad maravillosa, que fomentó no sólo un buen ambiente de trabajo, sino que llevó a formar lazos de amistad y a fortalecer el espíritu por la divulgación de la ciencia y el compromiso por hacer un mejor trabajo. A la Dra. Nina Bogdanchikova, por darme la oportunidad de ingresar al mundo de la investigación científica y participar en su grupo de trabajo, lo que incrementó mi interés por la bionanotecnología. Agradezco su apoyo en mi formación profesional y por invitarme a formar parte, desde su fundación, a lo que es ahora la Red Internacional de Bionanotecnología.

Al Dr. Rafael Vázquez Duhalt, por permitirme ser parte del Departamento de Bionanotecnología, por facilitar el que éste grupo tenga instalaciones e instrumentos de primer nivel y, además, que se fomente una buena convivencia, un trabajo ético y la participación activa por parte de todos los miembros del Departamento. También agradezco que haya aceptado participar en mi comité de tesis. Sin duda alguna, este trabajo no sería el mismo sin sus contribuciones y guía para darle sentido a la información generada durante todo este proceso. Al Dr. Oscar Raymond Herrera, por su apoyo en el desarrollo del proyecto, particularmente en lo relacionado con los aspectos de la física que sustenta el presente trabajo. Sus observaciones en cuanto a los métodos de caracterización e interpretación de los resultados, fomentó un mayor entendimiento de los fenómenos asociados a la estabilidad de las AgNPs. Finalmente, al Dr. Miguel José Yacamán y su equipo, de la Universidad de Texas, en San Antonio (EUA), por recibirme en su laboratorio y apoyarme en el desarrollo adecuado del proyecto, y por ilustrarme en la importancia y alcance de la microscopia electrónica para entender mejor cómo los nanomateriales interactúan con los sistemas biológicos. Asimismo, por haber pavimentado el camino para realizar un trabajo de ésta naturaleza, pues sus publicaciones previas, relativas al uso de nanoantibióticos, sustentó en gran medida el entendimiento de la interacción de éstos con las células. Un agradecimiento especial a los miembros de su laboratorio, por todo el apoyo en general: Dres. Josefina Arellano, German Plascencia, Rubén y Lulú Bazán.

Sin duda, un agradecimiento especial al personal técnico del Centro de Nanociencias y Nanotecnología del CNyN-UNAM. A la Dra Katrin Quester, por todo el apoyo técnico y logístico en el Departamento de Bionanotecnología; al Ing. Francisco Ruiz Medina, por su apoyo en el TEM, al Ing. Israel Gradilla Martínez por el SEM y a la M.C. Eloísa Aparicio Ceja en difracción de Rayos X. También a la Psic. Laura Rosales, de servicios escolares del CNyN-UNAM; así como a todo el personal administrativo y de la biblioteca, tanto del CNyN-UNAM como del CICESE, por su apoyo en todos los trámites y gestiones.

Agradezco también a los integrantes del Departamento de bionanotecnología, por todo: las celebraciones juntos y la buena convivencia; agradezco particularmente al Saquero's team *et al*: Anaid, Ramiro, Cristina, Iván, Paulina, Luis y Santino, por los buenos momentos, así como a la Dra. Ana Rodríguez y a la Ing. Itandehui Betanzo.

A mi familia, especialmente a mi hermana Adrianna, por todo su apoyo e interés en la ciencia, particularmente en la parte final de éste proyecto; también a mi madre Graciela, mi abuela Urbana Covarrubias y mi hermana Patricia. A mis amistades que me han acompañado en éste proceso, una mención no le haría justicia a todo lo que representan. Aun así, gracias a Nayeli Girón, Rosario Andrade y Marina Jiménez, mis amigas y colegas en esta aventura de estudiar la vida y sus secretos; a Kathy Avalos y a Javier Colín, mi pareja favorita; a Paola Kotkoff, Gustavo Torres y todo su equipo, este trabajo no hubiera salido sin el espacio y los buenos momentos que pasé en el Café con leche, y el ejemplo de vida de Paola. Gracias a Salma Carballo, quien en poco tiempo se convirtió en una persona muy importante en mi vida, compartiendo tiempos maravillosos e intercambiando perspectivas de vida; también a Mariana Beltrán y Regina Jasso, por todos los momentos únicos. Al equipo de Sparta55, que influyó mucho a nivel personal, impulsando a vencer nuevos retos y cambiar mi estilo de vida, sobre todo durante éste último año de mi trabajo.

También a quienes han sido mis estudiantes y ahora son colegas –o ya están cerca de serlo. Fue un placer haber trabajado con ustedes y que me hayan permitido guiarlos en este sendero maravilloso que es la bionanotecnología; espero que pronto podamos colaborar juntos en proyectos: Melissa Guiochin, Yarithza Pérez, Karen Olivares, Nancy Valiente, Mayra Cervantes, Rosario Valdespino y especialmente a Andrea Cázares, quien además de tener un fuerte espíritu por la ciencia, ha participado entusiastamente en la divulgación de la misma.

Agradezco infinitamente a Noboru Takeuchi y a Marisol Romo, por su amistad y su apoyo; así como por invitarme a ser parte de Ciencia Pumita y llevar la divulgación de la ciencia de manera inclusiva. A la Maestra Mirna Villanueva, al equipo de programa Pasaporte al Camino del Conocimiento Científico de la Academia Mexicana de Ciencias. Al Dr. Miguel Méndez (UDLAP), Dr. Ismael Plascencia (UABC), Dr. Rolando Ísita (UNAM), Maestra Martha Alcaraz (UABC), por la oportunidad de trabajar la ciencia de manera transversal, ya sea en la comunicación pública de la misma, o en proyectos ligados a la industria y a la aplicación del Conocimiento. Al Museo Caracol, en particular a las Lic. Antonia Martínez; Al grupo artístico *Sonat vitae*, cuyo proyecto de BioArte me ha dado buenas satisfacciones, con Arturo Guevara y Juan Pablo Uribe.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista Figuras.....	viii
Lista Tablas.....	x
Glosario.....	xi
<b>Capítulo 1. Introducción</b>	
1.1 Las enfermedades infecciosas y la nanotecnología.....	1
1.2 Antecedentes.....	4
1.3 Justificación.....	13
1.4 Hipótesis.....	14
1.5 Objetivos.....	15
<b>Capítulo 2. Materiales Y Método</b>	
2.1 Materiales.....	16
2.2 Caracterización de los tratamientos .....	18
2.3 Determinación del efecto de los tratamientos en el crecimiento, fisiología y estructura de los microorganismos .....	21
2.4 Influencia del medio de cultivo en la actividad antimicrobiana de las AgNPs.....	28
<b>Capítulo 3. Resultados Y Discusión</b>	
3.1 Análisis comparativo del efecto de las AgNPs en organismos de distinto grado de complejidad biológica.....	31
3.2 Efecto en la estructura celular .....	41
3.3 Efecto del medio de cultivo en la actividad antimicrobiana de las AgNPs .....	49
3.4 Mecanismos de acción de la combinación de las AgNPs y antibióticos .....	64
<b>Capítulo 4. Conclusiones</b>	
<b>Literatura citada</b> .....	74
<b>Apéndice</b> .....	94

## Lista Figuras

Figura		Página
1	Las enfermedades infecciosas.....	1
2	Nuevos antibacterianos aprobados por la FDA.....	2
3	Las NPs y la célula.....	3
4	Brotos de enfermedades infecciosas en el mundo.....	5
5	Efecto de las AgNPs en la cápside viral.....	6
6	Efecto de las AgNPs en la estructura bacteriana.....	7
7	Efecto de las AgNPs/TiO <sub>2</sub> NPs en los protistas.....	8
8	Las AgNPs se bioacumulan en las células fúngicas.....	8
9	Efecto de las AgNPs en células humanas.....	9
10	Bioacumulación de las AgNPs en <i>Daphnia</i> .....	10
11	Enlace entre AgNPs y amoxicilina.....	11
12	Número de artículos de investigación original sobre las AgNPs como antimicrobianos.....	12
13	Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias.....	22
14	Determinación del tipo de efecto antimicrobiano.....	23
15	Efecto paradoja.....	24
16	Tratamientos combinados.....	26
17	Caracterización espectrofotométrica de las AgNPs.....	32
18	Caracterización de las AgNPs mediante microscopía electrónica.....	33
19	Concentraciones efectivas de las AgNPs en los distintos Sistemas Biológicos.....	38
20	Las AgNPs y los antibióticos generan estrés oxidativo en <i>E. coli</i> .....	40
21	Efecto de las AgNPs en la estructura de <i>F. oxysporum</i> .....	42
22	Efecto de los tratamientos de plata en la ultraestructura celular de <i>B. subtilis</i> .....	43

23	Efecto de los tratamientos de plata en las células bacterianas.....	44
24	Efecto de los tratamientos de plata en las células fúngicas.....	46
25	Bioacumulación de las AgNPs en bacterias.....	47
26	Biosíntesis de AgNPs en el interior de las bacterias.....	48
27	Espectros de absorción de compuestos de plata en soluciones de peptona y dextrosa.....	50
28	Espectros de absorción de AgNPs en H <sub>2</sub> O en distintos pH.....	50
29	Espectro de transmitancia de la combinación AgNPs-peptona.....	51
30	Interacción química de la plata con el grupo tiol.....	52
31	Perfiles de absorbancia de las AgNPs en distintos medios de cultivo.....	53
32	Conductividad en los medios de cultivo.....	54
33	Potencial Z vs diámetro hidrodinámico de las AgNPs en los medios de cultivo.....	56
34	Concentración final de plata en los diferentes medios de cultivo.....	57
35	Crecimiento de <i>E. coli</i> en distintos medios.....	58
36	Crecimiento de <i>E. coli</i> en medio MH suplementado.....	59
37	Actividad antimicrobiana de las AgNPs en distintos medios.....	64
38	Efecto en la actividad antimicrobiana en tratamientos combinados AgNPs-antibióticos.....	67
39	Análisis por espectroscopia FT-IR de los tratamientos combinados.....	69
40	Efecto de la plata en la polarización de la membrana celular de <i>E. coli</i> .....	70
41	Propuesta del mecanismo de acción en tratamientos combinados de AgNPs-antibióticos.....	72
42	Análisis por espectroscopía FT-IR de los tratamientos combinados (Apéndice 3).....	99
43	Efecto en la actividad antimicrobiana en tratamientos combinados AgNPs-antibióticos (Apéndice 4).....	100
44	Perfiles de absorbancia de las AgNPs en distintos medios de cultivo (Apéndice 5).....	101

## Lista Tablas

Tabla		Página
1	Agentes antimicrobianos.....	17
2	Fluoróforos.....	18
3	Estabilidad de las AgNPs bajo distintas condiciones.....	19
4	Criterios de selección de publicaciones.....	25
5	Crecimiento de <i>E. coli</i> bajo distintas condiciones.....	28
6	Actividad antimicrobiana de las AgNPs.....	33
7	Concentraciones inhibitorias de las AgNPs.....	35
8	Características de las AgNPs e intervalo de su actividad en los SB.....	37
9	Diferencia en la conductividad en los diferentes medios de cultivo.....	54
10	Análisis DLS de las AgNPs en los diferentes medios de cultivo.....	55
11	Efecto de la suplementación del medio en la CMI de las AgNPs.....	60
12	Actividad de la Km en medio de cultivo suplementado.....	60
13	Efecto del medio en la CMI de las AgNPs.....	62
14	CMI de las AgNPs para <i>E. coli</i> y <i>C. albicans</i> en diferentes medios de cultivo.....	63
15	CMI de los tratamientos antimicrobianos en bacterias.....	65
16	CMI de los tratamientos antimicrobianos en hongos.....	65
17	Medios de cultivo (Apéndice 1).....	94
18	Agentes antibacterianos (Apéndice 2).....	96
19	Agentes antifúngicos (Apéndice 2).....	98

## Glosario

**AgNPs:** Nanopartículas de plata. Nanomateriales cero-dimensionales (Suresh 2013), compuestos principalmente de plata. Típicamente son esféricos y están estabilizados por polímeros orgánicos (PVP, PEG, entre otros) (ChEBI 2017).

**Antibiótico:** Fármaco que puede matar –o evitar el crecimiento- de las bacterias (CDC 2016).

**Bioacumulación:** Consiste en la captación, almacenamiento y acumulación –por los organismos- de contaminantes orgánicos e inorgánicos de su entorno. Por tanto, la bioacumulación se debe a interacciones complejas entre diversas vías de absorción, excreción, liberación pasiva y metabolización (Suresh 2013).

**Biosíntesis:** Consiste en la creación de un compuesto químico complejo –a partir de precursores más simples- mediante un organismo vivo o sus componentes (Drugsite Trust 2017). Por extensión se aplica a la formación de los nanomateriales, dentro de una célula o en su entorno –por influencia de ésta.

**CMI:** Concentración Mínima Inhibitoria. La concentración más baja de un agente antimicrobiano que –en pruebas de actividad antimicrobiana- previene el crecimiento visible de un microorganismo, tanto en placas de cultivo como en medio líquido (CLSI 2015).

**Diámetro hidrodinámico:** Llamado también diámetro de Stokes, es el tamaño de una esfera sólida hipotética que se difunde de la misma manera que la de la partícula que se mide, asumiendo una capa de hidratación que rodea a la partícula o molécula (Malvern Instruments 2011).

**DLS (*Dynamic Light Scattering*):** *Dispersión Dinámica de la Luz.* Mide las fluctuaciones tiempo-dependientes en la intensidad de dispersión que surgen de partículas sometidas a un movimiento browniano aleatorio. El coeficiente de difusión (potencial Z) y la información del tamaño de partícula (radio hidrodinámico) se pueden obtener del análisis de estas fluctuaciones (Arzenšek 2010).

**DL:** Dosis Letal. Cantidad de una sustancia o agente físico –como la radiación- que causa la muerte de un organismo –o célula- o un conjunto de éstos; modificado de (Duffus et al. 2017)

**EDX/EDS:** *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy.* Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X. Consiste en un análisis de composición elemental, mediante un detector acoplado a un microscopio electrónico.

**Efecto antagónico:** Interacción entre dos o más fármacos que tienen efectos opuestos. El antagonismo de fármacos puede bloquear o reducir la eficacia de uno o más de los fármacos involucrados.

**Efecto sinérgico:** Interacción entre dos o más fármacos que hacen que el efecto total de los fármacos sea mayor que la suma de los efectos individuales de cada uno.

**Enfermedades infecciosas:** Llamadas también “enfermedades contagiosas”, son causadas por algún agente infeccioso específico –o su producto tóxico-, resultado de la transmisión dicho agente –o producto- a un huésped susceptible –directa o indirectamente-, a partir de una persona infectada, animal o reservorio, mediante un vector o ambiente inanimado (Barreto et al. 2006).

**Nanoantibióticos:** Son nanomateriales –típicamente nanopartículas metálicas-, que muestran actividad antimicrobiana por sí mismos (modificado de Huh, 2011)

**Nanomaterial:** Estructuras con al menos una dimensión inferior a 100 nm.

**Plasmón superficial:** Se define como los quanta de las oscilaciones de densidad de carga de superficie, pero la misma terminología se utiliza comúnmente para las oscilaciones colectivas en la densidad electrónica en la superficie de un metal (Novotny & Hecht 2006).

**Potencial Z:** El potencial zeta es una medida de la magnitud de la electrostática o repulsión / atracción de carga entre partículas, y es uno de los parámetros fundamentales que se sabe afectan la estabilidad. Su medición aporta una comprensión detallada de las causas de dispersión, agregación o floculación, y puede aplicarse para mejorar la formulación de dispersiones, emulsiones y suspensiones (Singh 2015)

**Sistema biológico:** Hay muchas definiciones para sistema biológico, en este trabajo se toma la de Alcocer-Cuarón *et al* (2014): Un sistema biológico es un conjunto de componentes (elementos) auto-organizados y diferenciados que interactúan entre sí a través de varias redes y medios; aislados de otros conjuntos y cuya relación con otros sistemas puede describirse como un bucle cerrado en estado estacionario (Alcocer-Cuarón *et al.* 2014).

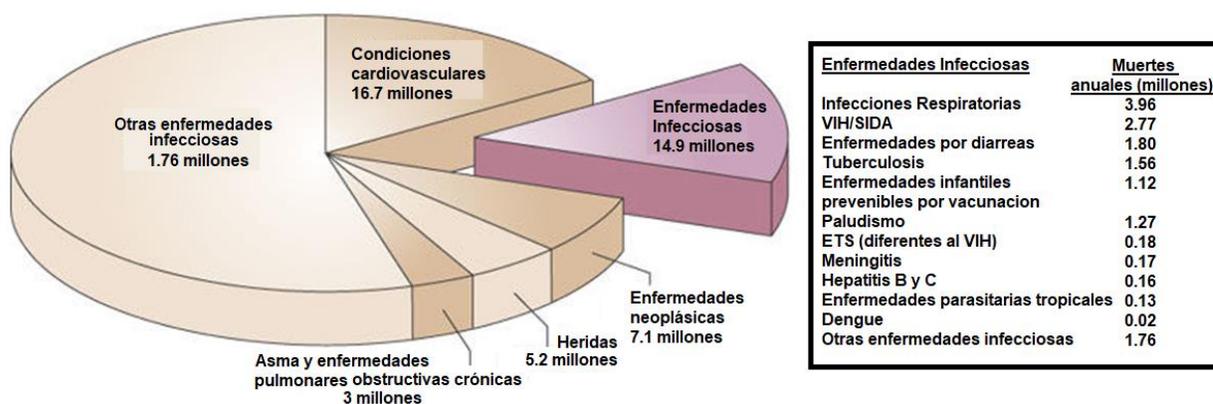
## Capítulo 1. Introducción

### 1.1 Las enfermedades infecciosas y la nanotecnología

#### 1.1.1 Las enfermedades infecciosas: un reto mundial para el presente y futuro

Las enfermedades infecciosas se encuentran entre las principales causas de muerte en el mundo, superadas sólo por las enfermedades del corazón (isquémicas y ataques) (Figura 1). Las primeras 10 causas de muerte en el mundo causaron, en 2015, 31 millones de defunciones; entre éstas, 7 millones se atribuyen a agentes infecciosos –como las infecciones respiratorias, diarrea, tuberculosis y VIH-SIDA- (WHO 2017a). El costo real de las enfermedades infecciosas en el mundo no puede ser estimado, debido a la complejidad del problema y a todos los factores involucrados (Fonkwo 2008; Smith & Coast 2013). Sólo en los Estados Unidos, combatirlas cuesta alrededor de 120 mil millones de dólares al año, de los cuales cerca de 20 mil millones se deben a la resistencia a antibióticos (NIH-NIAID 2009; CDC 2013; Rizzello et al. 2014).

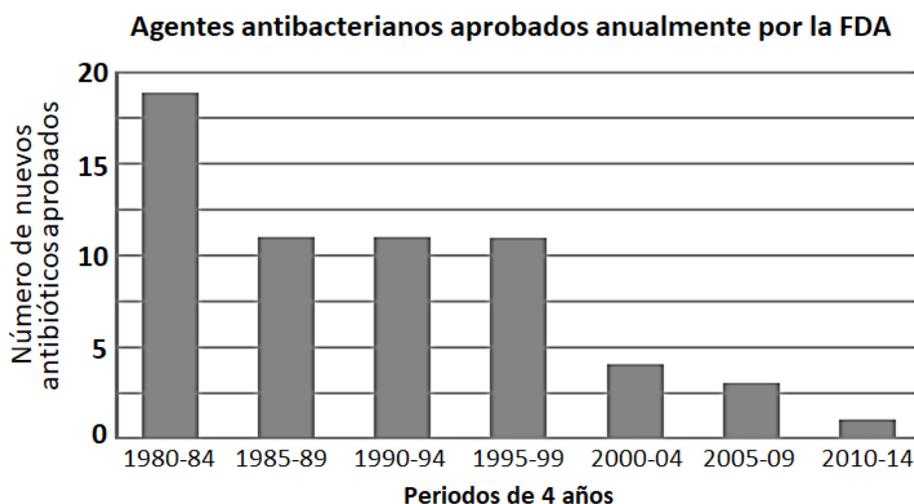
Por otro lado, en el sector de alimentos, los microorganismos son un tema de seguridad alimentaria de importancia global (Tauxe et al. 2010; Srey et al. 2013). El número de casos de envenenamiento por alimentos contaminados se ha incrementado en los últimos años (Zach et al. 2012; Notermans et al. 1994). Asimismo, la presencia de microorganismos fitopatógenos, como *Fusarium* spp, afecta la producción de alimentos, lo que incrementa el costo y disponibilidad de estos (Matny 2015; Wu 2007).



**Figura 1: Las enfermedades infecciosas.** Las enfermedades infecciosas ocupan el segundo lugar por causas de muerte en el mundo, y esta tendencia se ha mantenido constante en el tiempo.

Entre los retos de las enfermedades infecciosas, destacan la limitada diversidad de antibióticos y la resistencia contra estos que desarrollan los microorganismos. La producción de nuevos antibióticos es limitada, y la producción de nuevos tipos disminuye cada año (CDC 2015) (Figura 2). Por otro lado, los agentes patógenos tienen diversos mecanismos para resistir a los antibióticos, lo que disminuye drásticamente su efectividad. El problema es de tal magnitud, que se ha sugerido que no podemos generar nuevos antibióticos al ritmo que se requiere (Taubes 2008).

Actualmente se conciben propuestas y estrategias para reducir el impacto de la resistencia (Andersson & Hughes 2010; Theuretzbacher 2012; Cheng et al. 2016). Asimismo, se investigan alternativas para generar agentes antimicrobianos novedosos (péptidos, nuevas moléculas, materiales que dañen la estructura celular, etc.). Entre las propuestas novedosas destaca el uso de la nanotecnología para combatir a las enfermedades infecciosas, en especial con el uso de nanomateriales antimicrobianos –los nanoantibióticos (Huh & Kwon 2011).



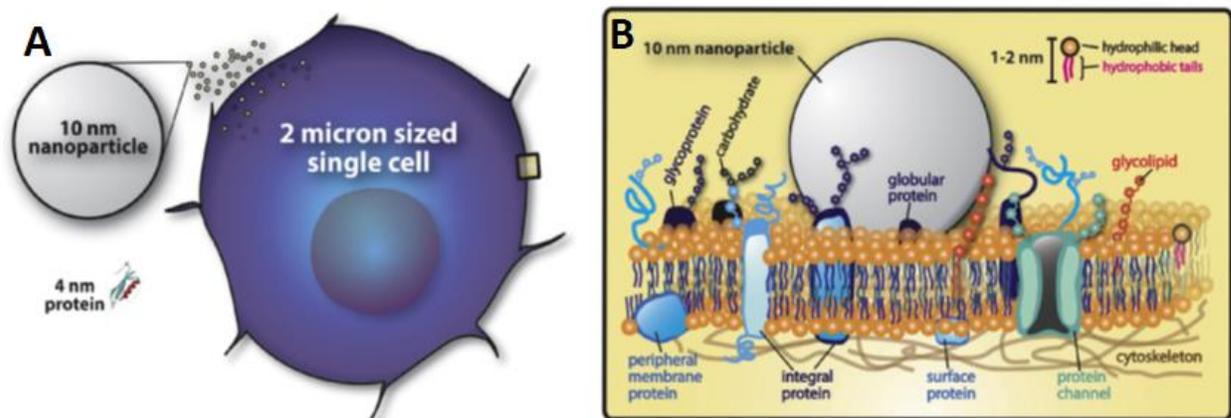
**Figura 2: Nuevos antibacterianos aprobados por la FDA.** Agentes antibacterianos aprobados por la FDA (Administración Federal de Medicamentos –de EUA-) en periodos de 4 años (modificado de CDC 2015).

### 1.1.2 Los nanoantibióticos

Los nanoantibióticos son una alternativa novedosa para combatir las enfermedades infecciosas. Entre los nanomateriales más estudiados se encuentran las nanopartículas de metales, –tales como oro o plata- u óxidos metálicos –de zinc, cobre o titanio, entre otros. El uso de nanopartículas (NPs) se justifica en la

ventaja que ofrecen con respecto a otras estructuras. Las NPs, al igual que otros nanomateriales, presentan ventajas asociadas a su forma y tamaño, tales como una mayor área superficial, menor toxicidad, estabilidad, etc. (Schröfel et al. 2014; Sweet et al. 2012).

Entre las NPs más prometedoras en el campo de a nanomedicina son las de plata (AgNPs), debido a sus múltiples propiedades y actividad de amplio espectro (Figura 3). Éstas NPs poseen actividad antiviral y antimicrobiano (Lara et al. 2011; Morones et al. 2005; Nasrollahi et al. 2011; Dorobantu et al. 2015; Navarro et al. 2008; Kvitek et al. 2009; Yan Xu et al. 2013). Se han utilizado para el tratamiento de quemaduras y otros problemas de la piel (Klasen 2000; Bianco et al. 2014) y su toxicidad ha sido muy estudiada (Beer et al. 2012; Dos Santos et al. 2014; Kaur & Tikoo 2013; Yingying Xu et al. 2013; Reidy et al. 2013). Además, ya se producen de manera masiva y se encuentran entre los nanomateriales más usados para diversas aplicaciones, principalmente en aquellas relativas a salud y bienestar (Vance et al. 2015). Por otro lado, a pesar de su uso en la vida cotidiana, se desconocen aspectos generales en cuanto a su toxicidad relativa, el efecto de combinarla con otros agentes terapéuticos y la influencia de los factores del entorno en su actividad y estabilidad.



**Figura 3: Las NPs y la célula.** (A) Se observa el tamaño representativo de una NP con respecto una célula y una proteína. (B) Interacción de las NPs con la membrana celular y sus componentes (modificado de (Suh et al. 2009))

Se sabe que las AgNPs son tóxicas para todos los sistemas biológicos, pero no hay una tendencia clara en cuanto a su toxicidad comparada en diferentes sistemas biológicos (SB). Se considera que la toxicidad depende –entre otros factores- de la complejidad del SB. Asimismo, a pesar de la abundante literatura sobre el efecto antimicrobiano de las AgNPs, en la interpretación regularmente se minimiza –u omite- el efecto de parámetros tales como las condiciones de cultivo, por lo que la actividad de las AgNPs se atribuye sólo a las características del nanomaterial y a la cepa evaluada. Finalmente, debido a su uso como agente antimicrobiano, se ha evaluado el efecto en su actividad cuando se combina con agentes antibióticos. Se ha descrito una gama de efectos, desde antagonismo hasta sinergia, en tratamientos combinados entre AgNPs-antibióticos, pero hasta el momento no se ha referido –con evidencia experimental- cómo funcionan estas combinaciones. Este trabajo aborda estos retos y proporciona nuevo conocimiento a cada uno de estos temas, con la finalidad de mejorar las aplicaciones de las AgNPs como nanoantibióticos.

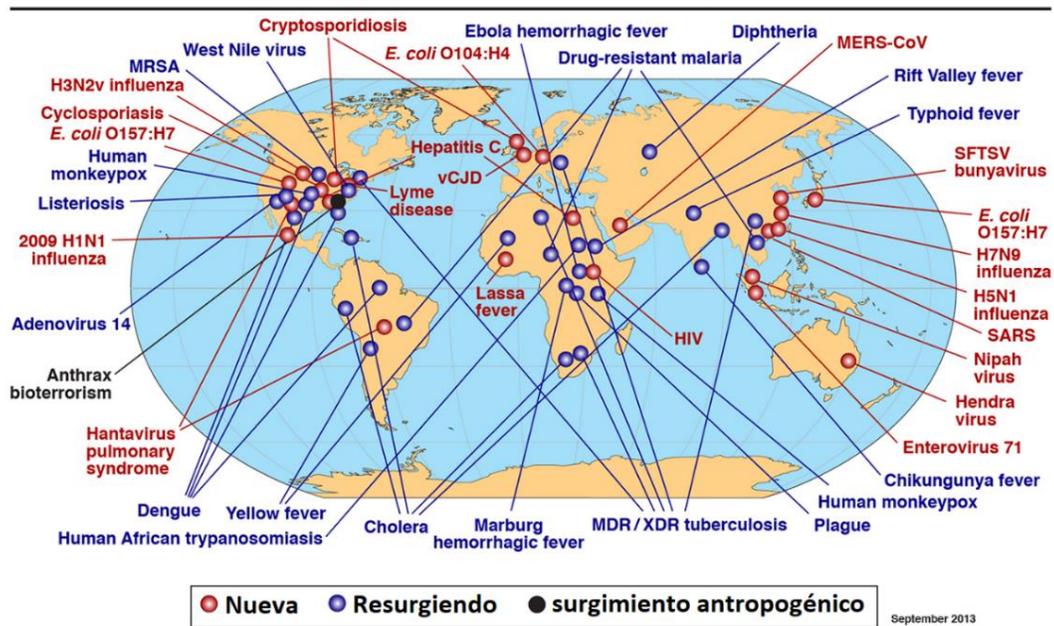
## 1.2 Antecedentes

### 1.2.1 El reto de las enfermedades infecciosas: su impacto actual

Las enfermedades infecciosas no sólo generan costos en el aspecto de salud y económico, debido a que afectan en múltiples aspectos de la vida diaria. No sólo se encuentran entre las primeras causas de muerte en el mundo, sino que además hay una gran cantidad de personas que viven infectadas por virus y/o microorganismos. A nivel mundial, en 2015, había alrededor de 212 millones de casos de malaria; mientras que por tuberculosis (TB) hubo 10.4 millones de nuevos casos y 1.8 millones de muertes. Para ese año, se estima que había 257 millones de personas infectadas de hepatitis B y 71 millones de hepatitis C (WHO 2017b).

Las enfermedades infecciosas han incrementado su tanto su incidencia como su número (Fonkwo 2008), por motivos tan variados como el cambio climático (Lafferty & Mordecai 2016), la resistencia a antibióticos (Jones & Pfaller 1998; Cohen et al. 2013) y la globalización (Cohen 1997). Inclusive se ha reportado que, a nivel mundial, se ha incrementado el número de brotes de enfermedades infecciosas –en humanos (Smith et al. 2014). Es tal el impacto de las enfermedades infecciosas que se consideran una crisis y se ha buscado evaluación de la vulnerabilidad económica a partir de estas enfermedades (Sands et al. 2016). Asimismo, se generan cartografías para entender su epidemiología e identificar riesgos de brotes en las poblaciones (Kraemer et al. 2016) (Figura 4).

## Ejemplos globales de surgimiento -y resurgimiento- de enfermedades infecciosas



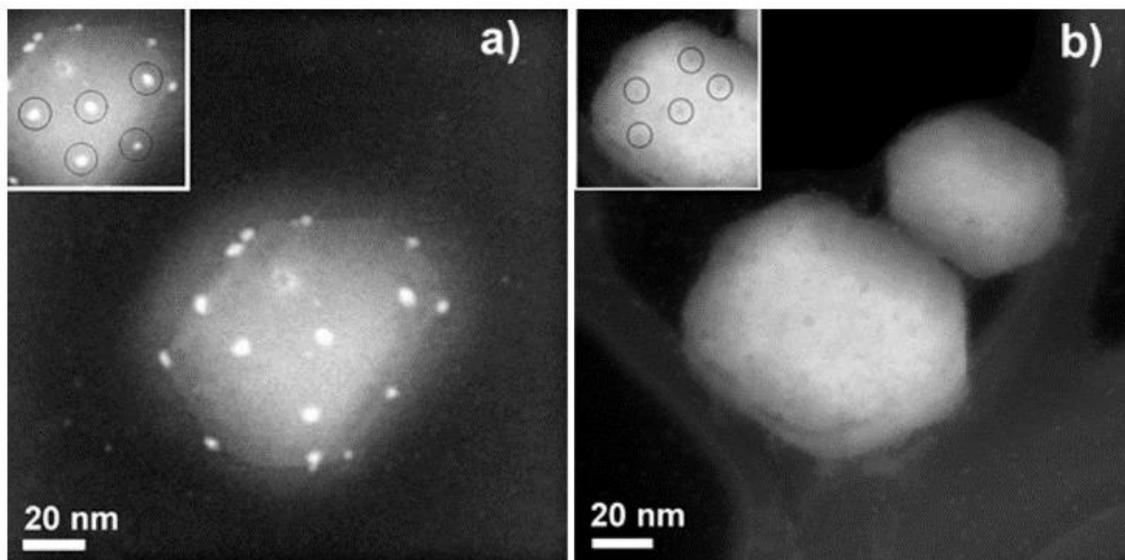
**Figura 4: Brotes de enfermedades infecciosas en el mundo.** Nuevos surgimientos y resurgimientos, modifica de la Universidad de Boston (<https://www.bu.edu/>)

El uso de nanoantibióticos podría ayudar a mitigar el problema de las enfermedades infecciosas. Las AgNPs se encuentran entre los nanomateriales más estudiados y comercializados, inclusive en combinación con otros nanomateriales en usos que van desde salud y cosmética, hasta para limpieza (Vance et al. 2015). El uso principal de las AgNPs es como agentes antivirales y antimicrobianos. Su actividad contra los patógenos ha sido muy estudiada, pero hasta el momento no se han encontrado tendencias en cuanto a su actividad o en cómo influyen las condiciones de cultivo para su análisis.

### 1.2.2 Las AgNPs afectan a todos los sistemas biológicos, desde virus hasta organismos multicelulares.

Como agente antiviral, se ha encontrado que las AgNPs se han evaluado en distintas familias de virus, que se distinguen por su diversidad de estructura, porque pueden –o no- estar con envoltura y presentan diferente tipo de información genética (ADN o ARN, de cadena sencilla o doble) (Elechiguerra et al. 2005; Rogers et al. 2008; Speshock et al. 2010; Trefry & Wooley 2013; Lu et al. 2008; Borrego et al. 2016; Orłowski

et al. 2014; Sun et al. 2005; H. H. Lara, Ixtepan-Turrent, et al. 2010). Además de evaluar la capacidad de las AgNPs para inactivar a los virus, también se ha explorado los posibles mecanismos de interacción. Se ha descrito, por ejemplo, que las AgNPs bloquean a las proteínas gp120 del VIH, lo que le priva de su capacidad infectiva (H. H. Lara, Ayala-Nuñez, et al. 2010) (Figura 5). Se han publicado relativamente pocos trabajos de investigación original relacionados a la actividad antiviral de las AgNPs.

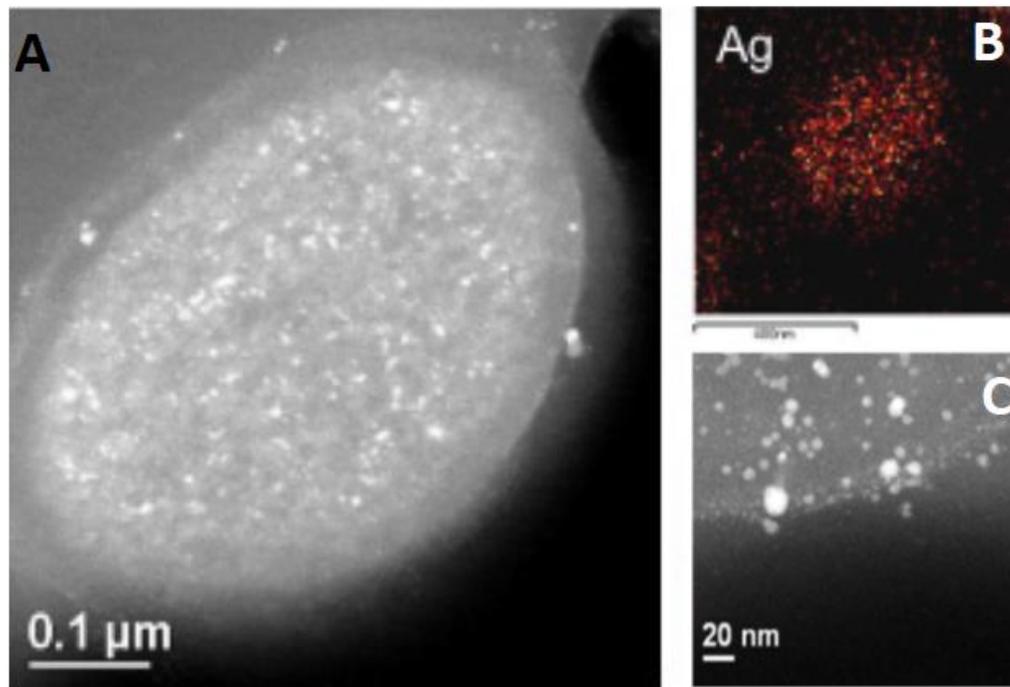


**Figura 5: Efecto de las AgNPs en la cápside viral.** A) Micrografía del virus VIH-1 expuesto a AgNPs, cuya distribución espacial coincide con las proteínas gp120. B) Micrografía del virus HIV-1 sin AgNPs (modificado de Lara *et al*, 2010).

Las AgNPs poseen propiedades antibacterianas; se ha evaluado su efecto en el crecimiento bacteriano (Singh et al. 2015; Wei et al. 2009; Lok et al. 2007; H. Lara et al. 2010). Diversos trabajos sugieren que la toxicidad de las AgNPs se asocia al tipo de bacteria, particularmente entre Gram-positivas y Gram-negativas (Yoon et al., 2007, Shrivastava et al., 2007). Las concentraciones mínimas inhibitorias son muy diferentes entre los artículos de investigación, variando dentro del intervalo de  $10^{-2}$  a  $10^2$   $\mu\text{g ml}^{-1}$  de plata.

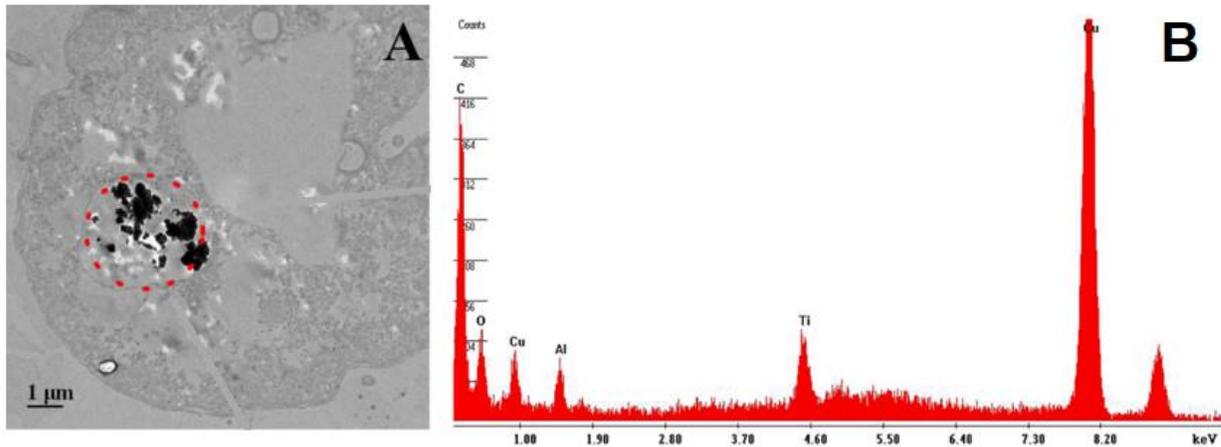
Los estudios relativos a la fisiología bacteriana buscan explicar los posibles mecanismos de acción de las AgNPs, y evalúan aspectos como el estrés oxidativo, daño en material genético e interacción con los diferentes componentes del entorno intracelular (Rizzello et al. 2014; Lok et al. 2006; W.-R. Li et al. 2010; Cao et al. 2013). Las AgNPs afectan la estructura celular y se pueden encontrar en el interior de la célula (Morones et al. 2005; Sondi & Salopek-Sondi 2004; Romero-Urbina et al. 2015) (Figura 6). Se ha buscado

relacionar las características de las AgNPs con su capacidad para ingresar y para dañar tanto a la pared como a la membrana celular



**Figura 6: Efecto de las AgNPs en la estructura bacteriana.** (A) Se observan AgNPs en la membrana y el interior de *E. coli*; (B) Análisis EDS que muestra que la plata está bien distribuida a través de la muestra; (C) Amplificación de la membrana bacteriana que muestra la presencia de AgNPs. Modificado de Morones (2015)

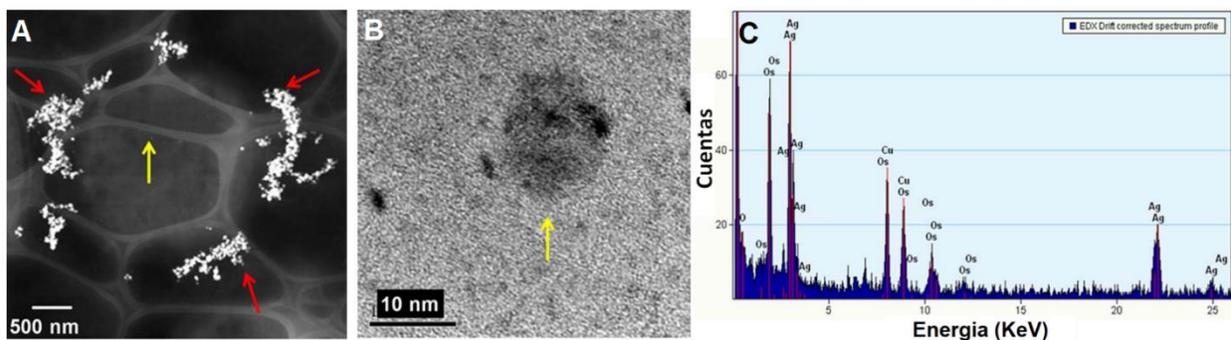
Hay muy pocos estudios sobre el efecto de las AgNPs en los protistas –microalgas y protozoarios. Estos trabajos muestran principalmente el efecto inhibitorio de las AgNPs, mientras que los aspectos fisiológicos o estructurales han sido muy poco estudiados. Aun así, los análisis por microscopía electrónica revelan que las AgNPs se bioacumulan en el interior de las células (Figura 7). Algunos trabajos de investigación sugieren que las microalgas pueden ser más susceptibles a las AgNPs que los protozoarios (Kvitek et al. 2009; Oukarroum et al. 2012; Taylor et al. 2016; Allahverdiyev et al. 2011; Moreno-Garrido et al. 2015; Zou et al. 2014) (Kvitek et al., 2009; Oukarroum et al., 2012; Taylor et al., 2016).



**Figura 7: Efecto de las AgNPs/TiO<sub>2</sub>NPs en los protistas.** (A) Se observan NPs en el interior del protozoo ciliado *Tetrahymena pyriformis*; (B) Análisis EDS que demuestra la presencia de titanio, pero no de plata. Modificado de Zou (2014).

Las AgNPs tienen efecto antifúngico, contra levaduras y hongos filamentosos, pero las CMI varían mucho en la literatura. Las pruebas para evaluar la actividad inhibitoria de las AgNPs se han realizado en hongos de diferentes géneros (Artunduaga Bonilla et al. 1933; Dar et al. 2013; Ogar et al. 2015; Pulit et al. 2013; Gutarowska et al. 2012; Kasproicz et al. 2010; Gopinath & Velusamy 2013; Kim et al. 2012), pero los estudios más exhaustivos se han realizado principalmente en el género *Candida*.

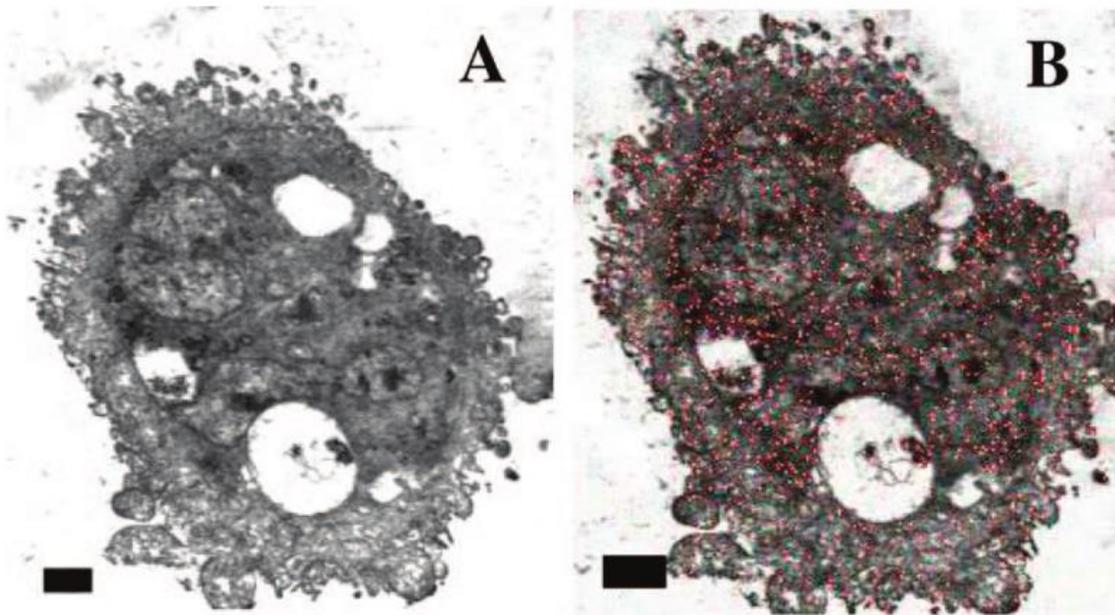
Se ha reportado que las AgNPs alteran la fisiología fúngica debido a que inducen la producción de especies reactivas de oxígeno (Hwang et al. 2012). También se ha observado que perturban la estructura celular, pues afectan la morfología de la célula, a la pared celular; se pueden bioacumular y alteran a la estructura de las biopelículas (Lara et al. 2015; Vazquez-Muñoz et al. 2014) (Figura 8).



**Figura 8: Las AgNPs se bioacumulan en las células fúngicas.** Las micrografías muestran la presencia de AgNPs en el exterior de la célula (A) y en el interior (B). El análisis de composición elemental demuestra la presencia de plata. Modificado de Vazquez-Muñoz (2014)

La toxicidad de las AgNPs en células animales y humanas, incluyendo células cancerígenas, ha sido ampliamente estudiada. La interpretación de la toxicidad de las AgNPs varía mucho en la literatura, dependiendo del tipo de estudio y de los valores de la Dosis Letal ( $DL_{100}$ ) (Wijnhoven et al. 2009; Panyala et al. 2008). Además de los efectos en el crecimiento, se ha evaluado el efecto de las AgNPs en la fisiología celular y en su ultraestructura.

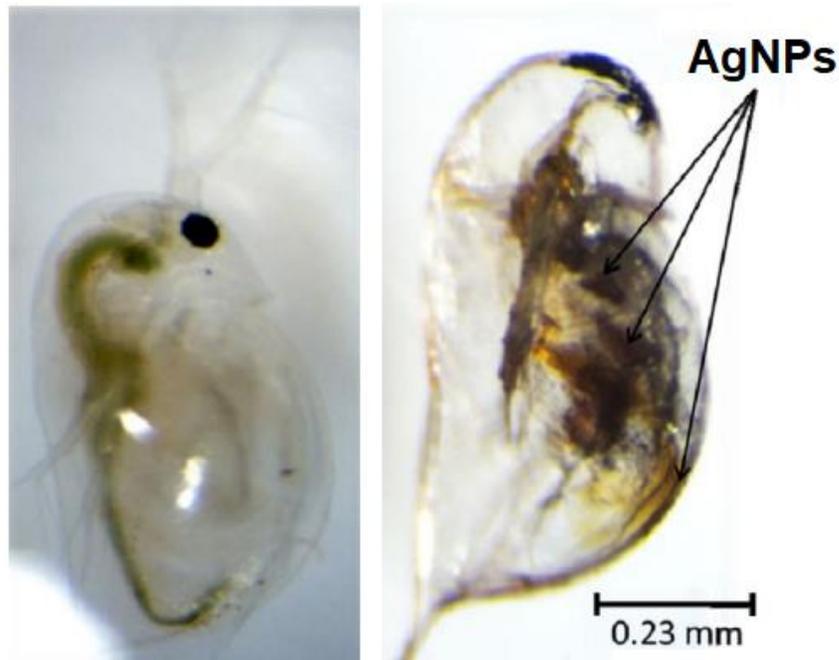
En el caso de los estudios fisiológicos los reportes son inclusive contradictorios, particularmente en lo relativo a su geno- y citotoxicidad, la respuesta de estrés oxidativo, del sistema inmune o hasta inflamatoria (Carrola et al. 2013; Piao et al. 2011; Romoser et al. 2012; Hackenberg et al. 2011; Kawata et al. 2009; Lu et al. 2010; Böhmert et al. 2012; Kim et al. 2011; Ahamed 2011; Daniel et al. 2010; Zhang et al. 2006; Greulich et al. 2011; Martínez-Gutierrez et al. 2012; Ghosh et al. 2012). Se ha demostrado que pueden dañar a la estructura celular y que se pueden bioacumular, tanto en células como en tejidos (AshaRani et al. 2009) (Figura 9).



**Figura 9: Efecto de las AgNPs en células humanas.** (A) Imágenes STEM de células de glioma U251 tratadas con AgNPs. (B) Imagen superpuesta de las células tratadas con AgNPs y el mapa de composición elemental (EDS). Modificado de AshaRani (2009).

En modelos animales se han hecho estudios más detallados para evaluar la toxicidad de las AgNPs, así como su efecto en la fisiología y en estructura. Destacan los trabajos en nematodos (Ahn et al. 2014; Roh

et al. 2009; Meyer et al. 2010), el crustáceo *Daphnia* (Blinova et al. 2013; Cupi et al. 2015; Seitz et al. 2015; Poynton et al. 2012) (Figura 10) y en modelos murinos (Liu et al. 2013; Kalmantaeva et al. 2014; Daniel et al. 2010; Yingying Xu et al. 2013; Morones-Ramirez et al. 2013), entre otros.



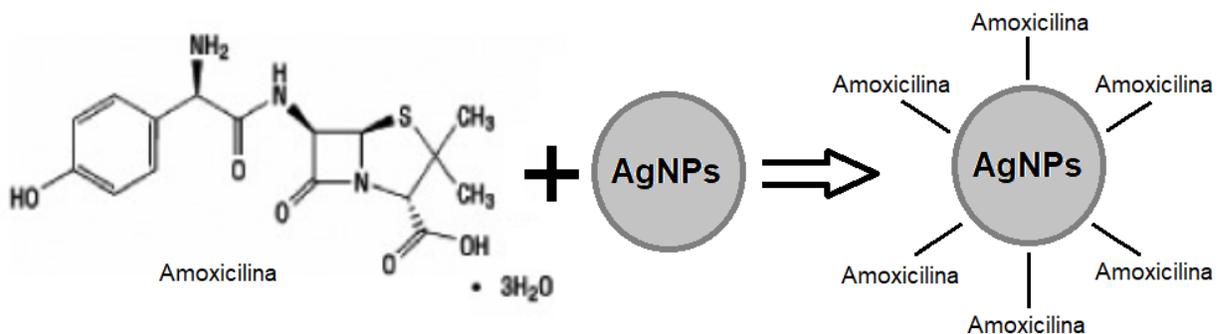
**Figura 10: Bioacumulación de las AgNPs en *Daphnia*.** Las AgNPs pueden ser tóxicas para *Daphnia* y se bioacumulan en diferentes partes del cuerpo.

La bibliografía revela que las AgNPs actúan en todos los sistemas biológicos, tanto en organismos vivos como en virus y biomoléculas. La información reportada muestra que la interpretación de la toxicidad de las AgNPs varía mucho entre los distintos trabajos, e incluso llegan a ser contradictorios. Se entiende que la toxicidad depende principalmente de las características del nanomaterial y, de manera secundaria, de la complejidad del sistema biológico. Aun así, no hay tendencias claras que muestren una relación entre la toxicidad de las AgNPs y la complejidad del sistema biológico. Son pocos trabajos los que han evaluado la toxicidad relativa y han mostrado que no hay una correlación aparente entre toxicidad y complejidad (Greulich et al. 2012; You et al. 2011). Por tal motivo es importante evaluar, de manera comparativa, la toxicidad de las AgNPs en todos estos sistemas.

### 1.2.3 Las AgNPs modifican la actividad antimicrobiana de los antibióticos convencionales

Se ha reportado que las AgNPs, en tratamientos combinados con antibióticos, pueden modificar la actividad antimicrobiana de éstos. El efecto sobre la actividad se ha reportado tanto en agentes antibacterianos como antifúngicos (Shahverdi et al. 2007; Vazquez-Muñoz et al. 2014; Li et al. 2005; De Souza et al. 2006; Fayaz et al. 2010). La actividad antimicrobiana puede mejorar (efecto aditivo o de sinergia), mantenerse igual (efecto indiferente) o disminuir (efecto antagónico). Los trabajos publicados han mostrado diferencias en cuanto al efecto de los tratamientos combinados, inclusive para las mismas combinaciones, tal como AgNPs-amoxicilina (De Souza et al. 2006; Jyoti et al. 2016).

Un hecho relevante es que no se han elucidado –de manera experimental- los posibles mecanismos que rigen la actividad de los tratamientos combinados AgNPs-antibióticos. Algunos trabajos de investigación han sugerido, de manera teórica, que el efecto en la actividad antimicrobiana se debe a la formación de un complejo entre las AgNPs y los antibióticos (Li et al. 2005; Fayaz et al. 2010). De acuerdo con esta hipótesis, los antibióticos se unen químicamente a los AgNPs, lo que aumenta su actividad antimicrobiana (Figura 11), pero no hay evidencia experimental que sustente dicha propuesta.

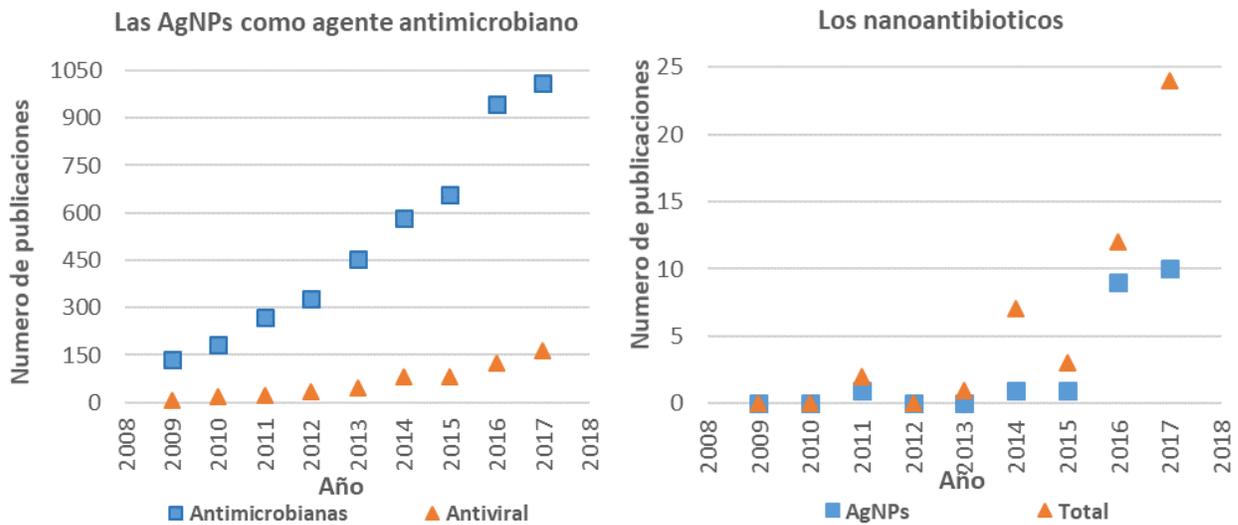


**Figura 11: Enlace entre AgNPs y amoxicilina.** Interacción química –hipotética entre las AgNPs y la amoxicilina, mediada por los grupos hidroxilo y amida. Modificado de Li (2005).

### 1.2.4 Falta de estandarización de los protocolos antimicrobianos

Los trabajos de investigación que evalúan a las AgNPs como agentes antimicrobianos –los nanoantibióticos- se han incrementado en los últimos años (Figura 12). Se han evaluado AgNPs de diferentes características en distintos sistemas biológicos, pero los resultados no son consistentes. Este

problema no es exclusivo para las AgNPs, y ha sido abordado en diferentes publicaciones, tales como las cartas editoriales de la revista *Nature* (Nature Editorial 2012; Nature Editorial 2011). Además de la falta de caracterización de los nanomateriales, también se ha resaltado la importancia de considerar las condiciones de cultivo, debido a que pueden alterar las características de los nanomateriales.



**Figura 12: Número de artículos de investigación sobre las AgNPs como antimicrobianos.** (izquierda) publicaciones/año sobre las AgNPs como agente antimicrobiano y antiviral; (derecha) publicaciones/año bajo el concepto explícito de nanoantibióticos, tanto de plata como de otros elementos. Datos obtenidos de la plataforma *ScienceDirect*<sup>®</sup> (Elsevier), <http://www.sciencedirect.com>, para el intervalo 2009-2017 (acceso: agosto de 2017)

Se ha observado que para las pruebas antimicrobianas con AgNPs se usan diferentes condiciones de cultivo. Hay variaciones en parámetros tales como el tamaño del inóculo inicial, temperatura y tiempo de incubación, medios líquidos y sólidos y tipos de medio usado. Entre éstos, los estudios se han hecho tanto en medios mínimos como medios ricos en nutrientes (MacCuspie 2011), pero no se han encontrado tendencias.

También se ha estudiado el efecto de los componentes del medio de cultivo en la estabilidad y actividad de las AgNPs (Kittler et al. 2010; Römer et al. 2013; McShan et al. 2014). Se ha encontrado que los carbohidratos y las proteínas interactúan con la plata y con las AgNPs (Ruparelia et al. 2008; Kittler et al. 2010; Gupta et al. 1999; Silver 2003; Alarcon et al. 2013; Zou et al. 2016; Mikhlin et al. 2014; Iram et al. 2014; Mohan et al. 2014); éstas últimas pueden formar estructuras tales como el complejo “proteínas corona” (Shannahan et al. 2013; Alarcon et al. 2013), lo que modifica las propiedades de las AgNPs.

Además, un exceso de proteínas puede modificar toxicidad de las AgNPs en cultivos celulares (Greulich et al. 2012; Ravindran et al. 2010). Otras condiciones, como el pH, también afecta a las AgNPs (Qu et al. 2010; Goswami et al. 2015). Por tal motivo es fundamental evaluar el efecto de las condiciones del entorno en la estabilidad de las AgNPs y determinar si los cambios en las condiciones de cultivo alteran su actividad y cómo.

### **1.3 Justificación**

Debido a las aplicaciones presentes –y potenciales- de las AgNPs, es fundamental estudiar su efecto en los sistemas biológicos (SB) de distinto grado de complejidad. Actualmente la información relativa a la actividad biológica de las AgNPs es muy variada, e incluso, contradictoria, por lo que no se han podido establecer tendencias relativas a su toxicidad. En este sentido, este trabajo busca determinar si hay una relación entre la toxicidad de las AgNPs y la complejidad de los SB, abarcando todos los niveles de organización, desde virus hasta células -procariotas y eucariotas-, tanto de manera experimental, como teórica. Se evalúa la actividad de las mismas AgNPs en virus, bacterias, protistas, hongos y células animales, incluyendo células humanas.

Parte del problema sobre las variaciones sobre la toxicidad de las AgNPs en los artículos de investigación publicados, radica en la falta de una estandarización en las pruebas antimicrobianas. Las diferentes condiciones de cultivo podrían influir en la actividad de las AgNPs, conduciendo a discrepancias al momento de interpretar los datos. Un parámetro fundamental es el medio de cultivo, pues no sólo influye en el comportamiento general de las células, sino que sus componentes podrían influir en la estabilidad y actividad de las AgNPs. En este contexto, el presente trabajo evaluó el rol del medio de cultivo en la estabilidad y actividad de las AgNPs en diferentes condiciones de cultivo, con la finalidad de proponer una estandarización de los protocolos antimicrobianos.

Otro reto importante recae en los tratamientos combinados de las AgNPs-antibióticos. Por un lado, algunos resultados han sido contradictorios (efectos contrarios para la misma combinación), y por otro, no se ha entendido todavía los mecanismos que determinan la influencia de la mezcla AgNPs-antibióticos en la actividad antimicrobiana. Entender los mecanismos de sinergia es crucial para generar tratamientos más eficaces. Por lo tanto, este trabajo también busca determinar qué factores pudieran influir en la

actividad de los tratamientos combinados, con la finalidad de entender los posibles mecanismos involucrados.

Los puntos anteriores se relacionan en el contexto del rol de las AgNPs como nanoantibióticos. Debido a su aplicación en la clínica y en la veterinaria, es trascendental estudiar el efecto de las AgNPs en distintos SB, en condiciones estandarizadas, particularmente en bacterias y hongos, considerando los factores del entorno que influyen en su actividad. Finalmente, esto lleva a la búsqueda del mecanismo de acción antimicrobiana de los tratamientos combinados AgNPs y antibióticos, para generar mejores tratamientos.

## 1.4 Hipótesis

- La toxicidad de las AgNPs podría ser independiente de la complejidad estructural y fisiológica de los sistemas biológicos, *in vitro*, a nivel celular.
- La actividad antimicrobiana de las AgNPs se verá influenciada por el medio de cultivo.
- El mecanismo de sinergia de los tratamientos combinados AgNPs-antibióticos dependerá tanto del blanco de acción de los antibióticos, como de la posible influencia del efecto de las AgNPs en la célula.

## 1.5 Objetivos

### 1.5.1 *Objetivos generales*

- Evaluar comparativamente la actividad de las AgNPs en microorganismos de diferentes grupos taxonómicos.
- Elucidar el mecanismo de sinergia en los tratamientos combinados de AgNPs-antibióticos
- Determinar la influencia de los medios de cultivo sobre la actividad antimicrobiana de las AgNPs.

### 1.5.2 *Objetivos particulares*

- Caracterizar las AgNPs y los antibióticos, pre- y post-tratamientos.
- Determinar la actividad antimicrobiana AgNPs en bacterias y hongos de interés microbiológico y clínico
- Evaluar el efecto de las AgNPs en la fisiología microbiana, particularmente en cuanto al estrés oxidativo y el efecto en el potencial de membrana.
- Establecer el efecto y distribución de las AgNPs en la estructura celular.
- Contrastar el efecto de las AgNPs con los antibióticos tradicionales; de manera independiente y en tratamientos combinados.
- Determinar el rol del medio de cultivo en la estabilidad y actividad de las AgNPs.

## Capítulo 2. Materiales y Método

---

### 2.1 Materiales

#### 2.1.1 Cepas microbianas y condiciones de cultivo

Cepas bacterianas: Gram negativas: *Escherichia coli*, no patógena (cepas DH5 $\alpha$  y MG1665), *Salmonella enterica* serovar Tiphymurium, patógena (ATCC SC14028); Gram positivas, *Staphylococcus aureus*, patógena (aislado clínico) y *Bacillus subtilis*, no patógena; obtenidas del cepario del Departamento de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (CNYN-UNAM). Las bacterias se cultivaron en el medio de cultivo Muller-Hinton (MH) en caldo y placa (1.5% de agar). Adicionalmente se utilizó una cepa de *S. aureus* (ATCC 49230), del cepario de la *University of Texas, San Antonio* (UTSA). Se cultivó en el medio Tryptic Soy Broth (TSB). Para los experimentos, se considera que las condiciones estándar de cultivo son: crecimiento en medio líquido MH por 24 horas, a 37°C, a 180 rpm. Para experimentos adicionales, *E. coli* se cultivó, a condiciones estándar, en los siguientes medios: M9; Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, Luria-Bertani (LB), Caldo nutritivo (NB), TSB y Extracto de levadura-Peptona-Dextrosa (YPD). La composición y especificaciones de cada medio se describen en el apéndice 1.

Cepas fúngicas: Las cepas de *Candida albicans* (ATCC SC5614), *Candida glabrata* (ATCC 2001), *Fusarium oxysporum* raza III (aislado ambiental) se obtuvieron del cepario del laboratorio del Departamento de Microbiología, de la División de Biología Experimental y Aplicada, del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE). Los hongos se cultivaron en los siguientes medios: Medio YPD, en caldo y placa (2% de agar); Sabouraud Dextrose (SD) en caldo y placa (2% de agar); Medio RPMI 1640 y Medio Potato dextrose agar (PDa). Para los experimentos, se considera que las condiciones estándar de cultivo son: 24 h (o 48 h para RPMI), a 37°C, a 180 rpm.

#### 2.1.2 Nanopartículas de plata (AgNPs)

Las AgNPs se obtuvieron de la compañía Vector Vita Ltd<sup>®</sup> (Rusia). El stock de las AgNPs se tiene una concentración inicial de 12,000  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de plata metálica. Las AgNPs están funcionalizadas con el polímero polivinilpirrolidona (PVP). Se preparó una solución stock de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), en

agua desionizada estéril, a una concentración inicial de plata de 12,000  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . El  $\text{AgNO}_3$  se usó como solución de referencia. Las AgNPs y el  $\text{AgNO}_3$  se diluyeron en agua desionizada o en medio de cultivo estéril –según el experimento a realizar-, en un intervalo de concentraciones finales de 0.001 a 1000  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

### 2.1.3 Antibióticos comerciales

Se utilizaron agentes antimicrobianos comerciales (antibacterianos y antifúngicos); éstos se enlistan a continuación y se describen en la Tabla 1: Ampicilina (Duchefa Biochemie®); Cloranfenicol, Kanamicina, Biapenem, Aztreonam, Anfotericina B, Fluconazol, Caspofungina (Sigma-Aldrich®). Para las pruebas antimicrobianas, los antibióticos se diluyeron en medio de cultivo estéril, en un intervalo de concentraciones de 0.001 to 256  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Los criterios de selección de los antibióticos se basaron en su familia y modo de acción. En el apéndice 2 se describen las características más relevantes de cada agente antibiótico.

**Tabla 1: Agentes antimicrobianos.** Antibacterianos y antifúngicos, clasificados por familia, y su mecanismo de acción.

<b>Agentes antibacterianos</b>		
<b>Nombre</b>	<b>familia</b>	<b>Mecanismo</b>
Cloranfenicol	Fenicol	Inhibe la síntesis proteica, se une a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. Su actividad es intracelular.
Kanamicina	Aminoglucósido	Afecta a la subunidad 30S de los ribosomas bacterianos, provocando errores de traducción. Su actividad es intracelular.
Ampicilina	Betalactámico (Aminopenicilina)	Se une e inactiva las proteínas-de-anclaje-de-penicilinas ( <i>penicillin-binding proteins</i> , PBP) localizadas en la membrana interna de la pared celular bacteriana. Su actividad es extracelular.
Biapenem	Betalactámico (carbapenem)	
Aztreonam	monobactámico	
<b>Agentes antifúngicos</b>		
<b>Nombre</b>	<b>familia</b>	<b>Mecanismo</b>
Anfotericina B	Macrólido poliénico	Se une a los esteroides de la membrana celular, lo que deteriora la integridad estructural de ésta. Su actividad es extracelular.
Fluconazol	Azol	Inhibe la síntesis fúngica de esteroides. Su actividad es intracelular.
Caspofungina	Equinocandina	inhibe la síntesis de $\beta$ (1,3)-D- glucanos. Su actividad es intracelular.

### 2.1.4 Fluoróforos y otros reactivos

**Fluoróforos:** DAPI (dilatacto de 4',6-diamidina-2'-fenilindol), DiOC<sub>6</sub> (yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina) y DCF (diacetato de 2,7-diclorodihidrofluorescina). Los reactivos se diluyeron ya sea en agua desionizada o en dimetilsulfóxido (DMSO), según las recomendaciones del fabricante. En la Tabla 2 se describen las características relevantes para el presente trabajo. Se utilizó el protonóforo carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP) de Sigma-Aldrich, cómo agente para despolarizar la membrana celular.

**Tabla 2. Fluoróforos.** Para evaluar en la fisiología microbiana, se emplearon distintos fluoróforos. En la Tabla se describen sus aplicaciones y en qué longitudes de onda son observados.

Fluoróforo	Uso	$\lambda_{exc}^*$	$\lambda_{ems}^*$
DioC <sub>6</sub>	Cambios de potencial en la membrana de la mitocondria. Estrés oxidativo	482	504
DCF	Detección de Especies reactivas de oxígeno Determina el grado de estrés oxidativo	495	529
DAPI	Tinción de contraste para núcleo y cromosomas, se une a la unión de A-T del ADN	358	461

$\lambda_{exc}$  señala la longitud de onda a la que se excitan los fluoróforos, mientras que  $\lambda_{ems}$  a que longitud de onda emiten la máxima intensidad de fluorescencia

## 2.2 Caracterización de los tratamientos

Los tratamientos –AgNPs, AgNO<sub>3</sub> y antibióticos- se caracterizaron mediante distintas técnicas. Los análisis ópticos consistieron en espectrofotometría UV-Vis para determinar perfiles de absorbancia y el plasmón superficial de las AgNPs, y espectroscopía infrarroja (FT-IR) para analizar los perfiles químicos y sus posibles cambios. Mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) se determinó el diámetro hidrodinámico y el potencial Z. Finalmente, por microscopía electrónica de transmisión (TEM) se analizó la morfología y distribución de tamaños de las AgNPs, mientras que por espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX) se determinó la composición elemental.

### 2.2.1 Espectrofotometría Uv-Vis

Se utilizó espectrofotometría UV-Vis para obtener el perfil de absorbancia de AgNPs y AgNO<sub>3</sub>, expuestos a distintas condiciones. Éstos se diluyeron en agua desionizada estéril, a una concentración de 10 µg ml<sup>-1</sup> de plata. El perfil de absorbancia se midió en un espectrofotómetro Multiskan Go (Thermo Scientific®), en un intervalo de λ= 250 a 700 nm.

Para evaluar el efecto del medio de cultivo y sus componentes en la estabilidad de las AgNPs, éstas se expusieron a las siguientes condiciones –en una concentración de 50 µg ml<sup>-1</sup>: agua desionizada estéril, con y sin nutrientes; agua desionizada a diferentes niveles de pH; y distintos medios de cultivo (Tabla 3). La solución de peptona al 1,75% corresponde al estándar para caldo MH. El valor de pH estándar para la mayoría de los medios de cultivo bacterianos es 7.2. Las muestras se midieron en dos tiempos: tiempo cero –al momento de la preparación-, y tiempo final –incubadas por 24 h, a 37°C, 180 rpm. Las muestras se analizaron sin y con centrifugación; ésta fue a 10,000 rpm por 35 minutos. Todas las soluciones fueron esterilizadas.

**Tabla 3. Estabilidad de las AgNPs bajo distintas condiciones.** Se determinó el efecto de las condiciones del medio de cultivo y del pH en la estabilidad química de las AgNPs.

Condición		Descripción
Agua desionizada	control	H <sub>2</sub> O di, estéril, pura
	Nutrientes	Peptona al 0.58%, 1.16%, 1.75%, 2, 2.63% y 5.24%
		Dextrosa al 2%
pH	6.2±0.2, 7.2±0.2 y 8.2±0.2	
Medios de cultivo*		M9, RPMI, LB, NB, MH, YPD y TSB

\* Las características de los medios de cultivo y su composición se describen en el apéndice 1.

### 2.2.2 Espectroscopía FT-IR

Se realizó un análisis de espectroscopía infrarroja con la finalidad de evaluar si hay interacción química al mezclar AgNPs con otras moléculas –antibióticos o peptona (Bacto-peptona, DIFCO), en agua desionizada estéril. En la mezcla de AgNPs con peptona, las concentraciones fueron de 50 y 17.5 µg ml<sup>-1</sup>, de AgNPs y peptona, respectivamente. En la mezcla de AgNPs-antibióticos, todos los componentes estuvieron en una

concentración de 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Los antibióticos utilizados fueron cloranfenicol, kanamicina, ampicilina, biapenam y aztreonam.

Los tratamientos –tanto separados como mezclados- se incubaron por 24 h a 37 °C, en agitación constante a 180 rpm. Posteriormente se liofilizaron y se pulverizaron con KBr anhidro (pre-calentado a 600 °C), para formar un *pellet* uniforme. Finalmente, se evaluó su perfil de transmitancia en infrarrojo, en un espectrómetro FT-IR Nicolet 6700 (Thermo Scientific®), en un intervalo de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ .

### 2.2.3 Espectroscopía ICP-OES

Se determinó la concentración final de plata en los diferentes medios de cultivo, mediante espectrofotometría de emisión óptica, con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES). Las AgNPs se diluyeron en diferentes medios de cultivo –RPMI, MH y YPD-, en una concentración de 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Las muestras se incubaron por 24 horas, a 37°C, 180 rpm. Los medios RPMI, MH y YPD se cultivaron sin y con microorganismos: *E. coli* para RPMI y MH, y *C. albicans* para YPD. El efecto del medio se midió en dos tiempos: tiempo cero –al momento de preparar la muestra- y tiempo final –a las 24 horas de incubación. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 35 minutos; se tomó un mililitro del sobrenadante y se diluyó en 9 ml de agua desionizada. El análisis se realizó en un espectrofotómetro Vista MPX Simultaneous ICP-OES (Varian Inc.).

### 2.2.3 Análisis de dispersión de la luz dinámica (DLS)

Se determinó el diámetro hidrodinámico y el potencial Z de las AgNPs en agua desionizada, y en medios de cultivo. Los medios de cultivo se filtraron con un filtro de nitrocelulosa de 0.2  $\mu\text{m}$ , y posteriormente se esterilizaron nuevamente. En una celda (Malvern) se colocaron 1.2 mL de cada muestra –con AgNPs y sin AgNPs- y se midieron en un Zetasizer Nano-Zs (Malvern, EUA), a 25 °C. La celda se enjuagó con agua desionizada entre cada muestra.

#### 2.2.4 Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)

La morfología y tamaño de las AgNPs se evaluó mediante microscopía electrónica de transmisión. Se colocó una gota de la solución con AgNPs en una rejilla de cobre recubierta de Lacey-carbon y se dejó secar. Se obtuvieron imágenes de las AgNPs en alto aumento, en un STEM Jeol JEM 2100, en modo TEM, con una corriente de 200 KeV.

#### 2.2.5 Análisis de composición elemental (EDX)

Para determinar la naturaleza química de las AgNPs se realizó un análisis de EDX. Este análisis se realizó de manera complementaria al análisis del TEM, en un STEM Jeol JEM 2100, en modo STEM-HAADF –*High Angle Annular Dark Field*-, con una corriente de 200 KeV.

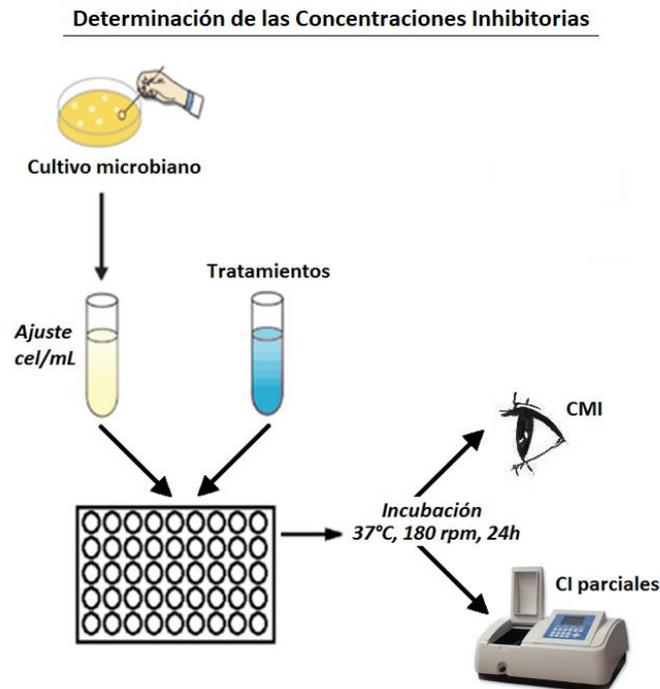
### 2.3 Determinación del efecto de los tratamientos en el crecimiento, fisiología y estructura de los microorganismos

Se evaluó el efecto de los tratamientos (AgNPs, AgNO<sub>3</sub> y antibióticos) en el crecimiento de bacterias y hongos. Se establecieron las concentraciones inhibitorias –mínimas y parciales- de cada tratamiento. Se determinó el efecto de los tratamientos combinados –AgNPs y antibióticos- en bacterias y hongos. Finalmente, se evaluó la actividad de las AgNPs en la fisiología y en la ultraestructura microbiana.

#### 2.3.1 Determinación de las concentraciones inhibitorias en bacterias y hongos

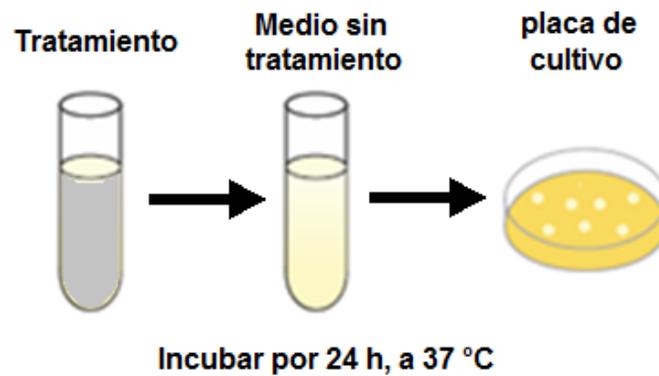
Se estableció –y se comparó- la capacidad antibacteriana de los tratamientos –AgNPs, AgNO<sub>3</sub> y antibióticos-, mediante los protocolos del *Clinical Laboratory Standard Institute*, con algunas modificaciones. Se utilizó el protocolo M07-A9 (CLSI 2012) para las cepas bacterianas y el M27-A3 (Cantón et al. 2007), para las cepas fúngicas. En la Figura 13 se representa un esquema del método empleado. La CMI se determinó de manera visual y mediante espectrofotometría UV-Vis. Las concentraciones

inhibitorias parciales se determinaron mediante espectrofotometría UV-Vis, a  $\lambda=600$  nm y  $\lambda=530$  nm, para bacterias y hongos, respectivamente. Los antibióticos usados en los experimentos se describieron en el apartado 2.1.3.



**Figura 13. Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias.** Variante de la técnica de microdiluciones para determinar la CMI de los agentes antimicrobianos

Se determinó si el efecto de las AgNPs es microbicida o microbiostático. El efecto es microbiostático si los microorganismos –expuestos a las CMI de los tratamientos- pueden recuperar el crecimiento después de re-inocularse en medio libre de tratamiento, en condiciones estándar; mientras que es microbicida en caso contrario (Figura 14). La concentración mínima bactericida (CMB) se estableció como la concentración mínima del tratamiento en la cual no se observa crecimiento microbiano después de reinocularse en medio sin tratamiento.

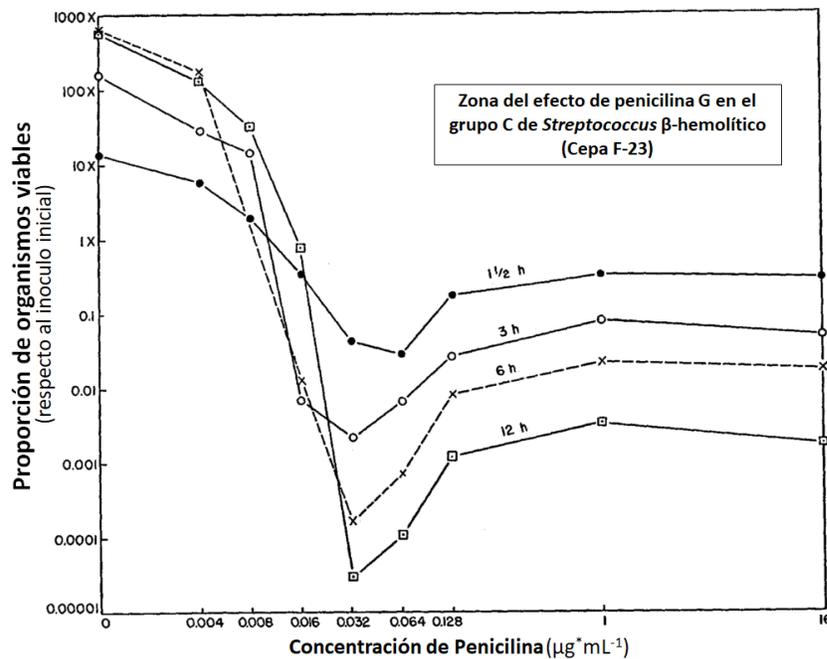


**Figura 14. Determinación del tipo de efecto antimicrobiano.** Método de re-inóculos en medios sin tratamiento, para determinar si el efecto es microbiostático o microbicida

También se observó si había efecto Eagle –llamado también efecto paradoja- (Eagle & Musselman 1948; Kondo et al. 2001). Este fenómeno se presenta cuando se manifiesta un incremento en el crecimiento microbiano, al aumentar las concentraciones del tratamiento, después de observar actividad antimicrobiana (Figura 15). Las bacterias se expusieron a los tratamientos en concentraciones de 1 a 1000  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para las AgNPs y de 16 a 128  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para los antibióticos. No hay efecto paradoja si no se observa un incremento en el crecimiento microbiano al ser expuesto a concentraciones altas de los tratamientos.

### 2.3.2 Efecto en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Se evaluó el efecto de las AgNPs en la producción de ROS. *E. coli*, se ajustó a condiciones de cultivo y se expuso a concentraciones sub-letales de las AgNPs ( $6 \mu\text{g ml}^{-1}$ ),  $\text{AgNO}_3$  ( $3 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) y los antibióticos. se incubó por 1 hora y posteriormente se le agregó el fluoróforo diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ) [ $10 \mu\text{M}$ ], diluido en DMSO y se dejó reposar por 5 minutos, a temperatura ambiente, protegido de la luz. Posteriormente se midió por fluorimetría, la longitud de onda de excitación de la  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  fue en el intervalo de 492-495 nm y la de emisión en el de 517-527 nm.



**Figura 15. Efecto paradójico.** Se observa que el crecimiento microbiano aumenta –paradójicamente– al incrementar las concentraciones del antibiótico. Modificado de Eagle *et al* (1948).

### 2.3.3 Meta-análisis: Toxicidad de las AgNPs en bacterias y hongos

Un meta-análisis es un conjunto de métodos orientados a contrastar y combinar los resultados de diferentes estudios. Básicamente consiste en una revisión sistemática de varios estudios, evaluada matemáticamente, para: identificar patrones, fuentes de desacuerdo entre los resultados y otras relaciones interesantes (Giménez 2012)

Para el presente trabajo se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva, con la finalidad de encontrar patrones relativos al rol de las AgNPs como nanoantibióticos, en sistemas biológicos de distinto grado de complejidad, *in vitro*, a nivel celular. El análisis incluyó a bacterias, protistas, hongos, líneas células animales y líneas de células humanas cancerígenas; así como a los virus.

Los criterios de selección de los artículos consideraron la caracterización de las AgNPs, la descripción de las cepas y las pruebas antimicrobianas. Para las AgNPs se seleccionaron a las publicaciones que incluyen datos de morfología, recubrimiento, síntesis, entre otros. Estas características se consideraron para establecer una relación con su toxicidad. Para las pruebas antimicrobianas se consideraron las cepas, el

método de las pruebas antimicrobianas, medio de cultivo y tiempo de exposición. Se analizaron los parámetros más frecuentes y se buscó establecer su influencia en la actividad de las AgNPs (Tabla 4).

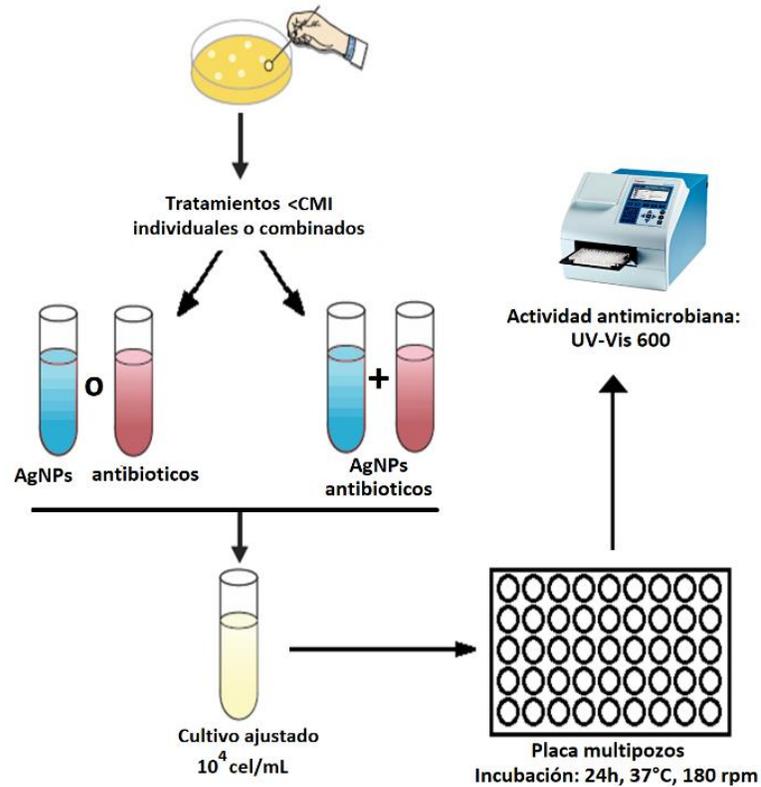
Se revisaron y contrastaron 250 artículos de investigación –periodo del 2000 al 2017- y de 15 de revisión –del 2011 al 2017. Los datos obtenidos se analizaron con la finalidad de encontrar tendencias relativas a la actividad de las AgNPs en los sistemas biológicos. Éste meta-análisis se orientó en la toxicidad relativa de las AgNPs, así como su efecto en la estructura y fisiología de las AgNPs.

**Tabla 4. Criterios de selección de publicaciones.** Las publicaciones científicas usadas en el meta-análisis debían de describir parámetros relevantes

<b>Nanomaterial</b>	<b>Pruebas de toxicidad</b>
Tamaño y Forma	Cepa
Estado de aglomeración	Medio de cultivo
Composición química	Condiciones de incubación
Agente estabilizante/ funcionalizante	Criterio para establecer la letalidad
Método de síntesis	Valor de la CE <sub>100</sub>

#### *2.3.4 Efecto de los tratamientos combinados (AgNPs + antibióticos) en el crecimiento microbiano*

Se evaluó si la combinación de AgNPs y antibióticos modifica su actividad antimicrobiana. Los microorganismos –bacterias y hongos- se expusieron a concentraciones sub-letales de AgNPs, antibióticos y la combinación entre estos. Los microorganismos expuestos a los tratamientos se inocularon placas multipozos y se incubaron a condiciones estándar (Figura 16). El efecto inhibitorio de los tratamientos en el crecimiento se evaluó mediante espectrofotometría UV-Vis, en un espectrofotómetro Multiskan Go (Thermo Scientific®), a  $\lambda=600$  nm y  $\lambda=530$  nm, para bacterias y hongos, respectivamente.



**Figura 16. Tratamientos combinados.** Evaluación del efecto antimicrobiano de los tratamientos combinados de AgNPs y antibióticos comerciales.

### 2.3.5 Efecto de las AgNPs en el potencial de la membrana celular

Se evaluó el efecto de las AgNPs y del  $\text{AgNO}_3$  en el potencial de membrana, acorde al protocolo descrito por Novo (Novo et al. 2000). *E. coli* se cultivó a condiciones estándar y se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  en un buffer de fosfatos (PBS) filtrado. Las células de *E. coli* ajustadas, en PBS, se colocaron en distintitos tubos y los tratamientos consistieron en concentraciones sub-letales de AgNPs o  $\text{AgNO}_3$ . Como control de despolarización de la membrana, *E. coli* se expuso al protonóforo CCCP ( $12.5 \mu\text{M}$ ).

Las células se tiñeron con el Fluoróforo DiOC6 ( $9 \mu\text{M}$ ) y se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos. Después se analizaron por citometría de flujo (Attune, Thermo Scientific), con un haz de luz a  $\lambda=488 \text{ nm}$ . La fluorescencia se colectó en los canales rojo y verde, y la despolarización se calculó con base en el cociente del valor del canal rojo sobre el verde. La dispersión frontal, la dispersión lateral y la fluorescencia se colectaron mediante la amplificación logarítmica de la señal.

### 2.3.6 Efecto en la ultraestructura celular

#### Preparación de las muestras para el análisis ultraestructura microbiana

Se prepararon los tratamientos a partir de soluciones stock de AgNPs y del  $\text{AgNO}_3$ , para una concentración final de plata de 3 y 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , para bacterias y hongos, respectivamente. Se preparó también un control sin tratamientos de cada cepa. Todos los tratamientos se incubaron en condiciones estándar para cada tipo de microorganismo. El tiempo de exposición a los tratamientos fue de 6 horas, con una concentración de plata (AgNPs y  $\text{AgNO}_3$ ) de 6  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Adicionalmente, la cepa de *S. aureus II* (ATCC 49230) también se observó por TEM. Se utilizó un cultivo de 24 horas de crecimiento, diluido 1:10 en medio de cultivo STB, y se cultivó y evaluó bajo las mismas condiciones que las otras cepas.

Las muestras se sometieron a un proceso de inclusión en resina para ser observadas en el TEM. Primero, las células microbianas se fijaron en glutaraldehído al 2% y se post-fijaron en tetraóxido de osmio al 1%. Posteriormente se deshidrataron en una serie de concentraciones ascendentes de etanol (desde 25% hasta el 100%) y se lavaron con óxido de propileno. Finalmente se embebieron en resina epóxica LX-112. *E. coli* DH5 $\alpha$  se deshidrató en una serie de concentraciones ascendentes de etanol, pero no se lavó con óxido de propileno; además, se embebió en resina epóxica spurr. Todas las muestras se cortaron en láminas de 100 nm de grosor, en un ultramicrotomo Reichert Ultracut S (Leica), y se colocaron en rejillas de cobre de 300 mesh, con y sin lacey-carbon.

#### Análisis del efecto las AgNPs en la ultraestructura microbiana

Las micrografías en TEM de las AgNPs se observaron en bajo y alto aumento, con una potencia de 120 KeV. Se analizaron las muestras control, las tratadas con AgNPs y con  $\text{AgNO}_3$ , tanto de bacterias como de hongos. Los análisis de STEM, campo oscuro y de composición elemental (EDX) se realizaron en un HITACHI STEM 5500. Se observaron las muestras en bajo aumento, en modo de campo claro y HAADF, con una potencia de 30 KeV. Se analizaron las muestras expuestas a los tratamientos con plata. Los análisis puntuales de EDS y de la estructura de las NPs, post –tratamiento, se realizaron en un microscopio de resolución atómica JEOL ARM 200F. Se analizaron las muestras expuestas a los tratamientos con plata.

## 2.4 Influencia del medio de cultivo en la actividad antimicrobiana de las AgNPs

Se evaluó el efecto de los medios de cultivo y sus componentes –peptona, dextrosa y variaciones de pH-, sobre la actividad antimicrobiana de los compuestos de plata - AgNO<sub>3</sub> y AgNPs. La actividad se determinó mediante la CMI de los tratamientos en la bacteria *E. coli* y en la levadura *C. albicans*, en diferentes medios de cultivo estándar y con modificaciones: variaciones de peptona/dextrosa y pH.

### 2.4.1 Determinación del efecto de los medios de cultivo y sus componentes en el crecimiento de *E. coli*

*E. coli* se cultivó en los medios y condiciones descritas en el apartado 2.1.1 (pág. 25). Se evaluó el efecto del medio de cultivo y sus componentes –concentración de peptona/dextrosa y valores de pH- en el crecimiento de *E. coli* sin ningún tratamiento (Tabla 5). El crecimiento se determinó por espectrofotometría UV-Vis, en una longitud de onda de 600 nm.

Adicionalmente, se realizó una curva de crecimiento. El crecimiento bacteriano –en medio MH suplementado con peptona- se midió cada 30 min, durante cuatro horas, mediante espectrofotometría UV-Vis, a una longitud de onda de 600 nm.

**Tabla 5. Crecimiento de *E. coli* bajo distintas condiciones.** Se determinó el efecto de las condiciones del medio de cultivo y del pH en el crecimiento de *E. coli*.

Medio MH	Nutrientes	Peptona: 0.58%, 1.16%, 1.75%, 2.63% y 5.24%
		Dextrosa: 1 y 2%
	pH	6.2±0.2, 7.2±0.2 y 8.2±0.2
Medios de cultivo*		M9, RPMI, LB, NB, MH, YPD y TSB

\* Las características de los medios de cultivo y su se describen en el apéndice 1.

#### 2.4.2 Determinación del efecto de los componentes de los medios de cultivo y los medios de cultivo sobre la actividad de las AgNPs

Se determinó el efecto antimicrobiano de las AgNPs en los diferentes medios de cultivo y sus componentes –peptona/dextrosa y niveles de pH. *E. coli* se cultivó en condiciones estándar, en las condiciones descritas en el punto 2.1.1 en una placa multipozos, en los diferentes medios de cultivo -M9, RPMI, LB, NB, MH, YPD y TSB- y se expusieron a las AgNPs. Adicionalmente, *E. coli* se cultivó en medio MH modificado, bajo las condiciones señaladas en la Tabla 5. Las concentraciones de AgNPs estuvieron dentro del rango de los 0.1 a los 45  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . El crecimiento se determinó por espectrofotometría UV-Vis, en una longitud de onda de 600 nm.

#### 2.4.3 Efecto del medio de cultivo en actividad antimicrobiana de la Kanamicina

El antibiótico Kanamicina (km) (Sigma-Aldrich®, EE.UU.) se utilizó para determinar si los cambios en la actividad antimicrobiana se restringían sólo a las AgNPs. La CMI de la km se determinó en MH modificado –suplementación de peptona/dextrosa y variación del pH. La km se aplicó en un intervalo de concentraciones de 0.001 a 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Se evaluó la actividad antimicrobiana en el MH estándar y modificado, bajo las mismas condiciones descritas, para el medio MH, en la Tabla 5.

#### 2.4.4 Meta-análisis: actividad antimicrobiana de las AgNPs en diferentes los medios de cultivo

Se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva para elucidar la relación entre la actividad antimicrobiana de las AgNPs (CMI) y los medios de cultivo. El criterio de selección de los trabajos se limitó a los siguientes puntos: que las cepas evaluadas fueran de *E. coli* y *C. albicans*; que fueran AgNPs (independientemente de sus características), que se incluyera el valor de la CMI (cultivos en medio líquido) y que se describiera el medio de cultivo.

Para cada medio de cultivo se estableció un rango de concentraciones inhibitorias (CI) y se determinó el intervalo más frecuente de dichas concentraciones, con la finalidad de establecer su influencia en la actividad de las AgNPs. Los medios de cultivo se organizaron acorde a su complejidad (con base en su

composición, apéndice 1). Los datos experimentales se contrastaron con los obtenidos en el meta-análisis. Se revisaron y contrastaron 35 artículos de investigación –periodo del 2000 al 2017.

## Capítulo 3. Resultados y Discusión

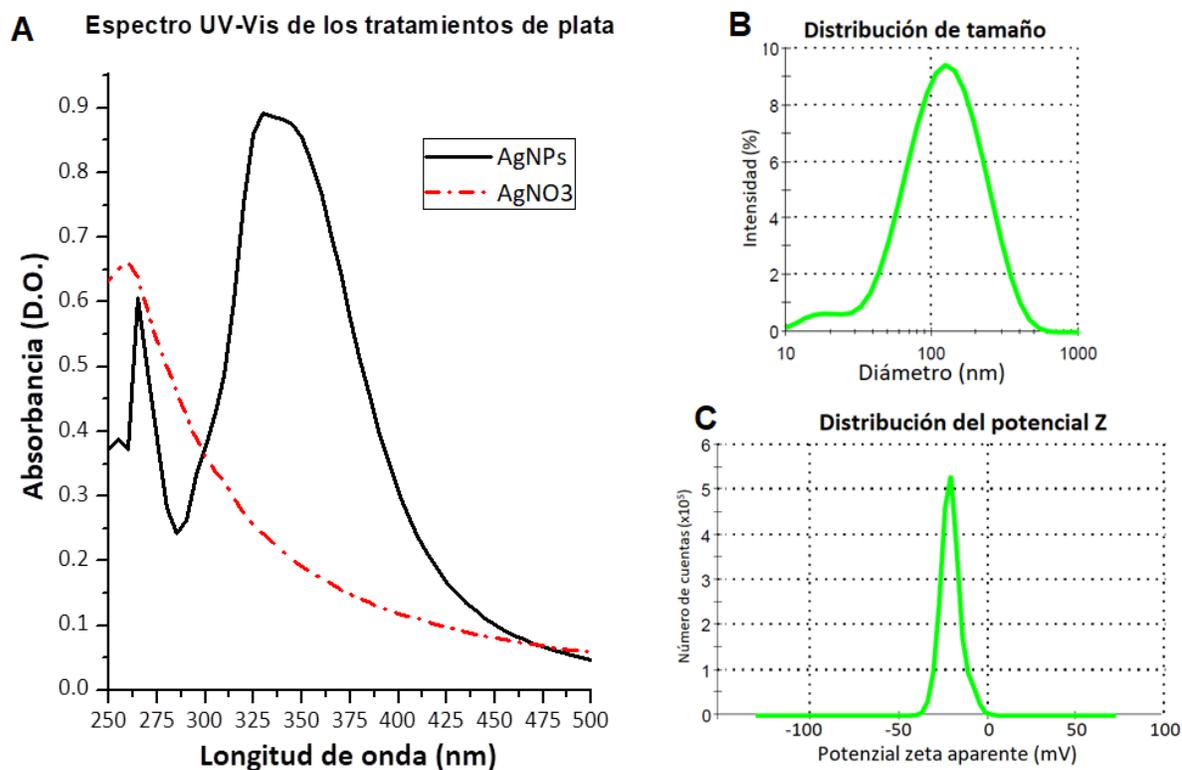
---

### 3.1 Análisis comparativo del efecto de las AgNPs en organismos de distinto grado de complejidad biológica

Las AgNPs se caracterizaron –pretratamiento- mediante técnicas espectrofotométricas y por microscopía electrónica de transmisión. Se determinó las concentraciones inhibitorias de las AgNPs en bacterias y hongos y se compararon los resultados con otros sistemas biológicos. Los resultados se contrastaron con las tendencias encontradas a partir del meta-análisis de la literatura.

#### *3.1.1 Caracterización de las AgNPs por técnicas espectrofotométricas*

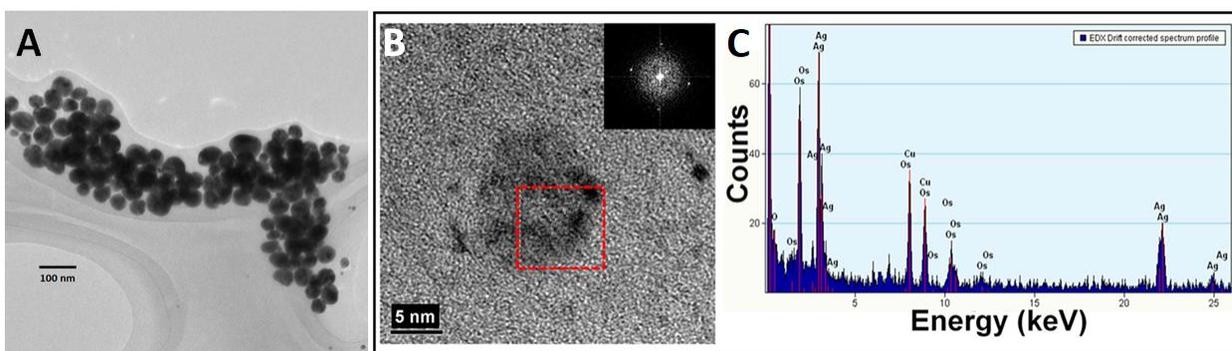
Se determinó el espectro de absorción de las AgNPs por medio de espectrofotometría UV-Vis. El espectro de absorbancia mostró el plasmón superficial típico de las AgNPs esféricas, con un pico máximo en los 420 nm (Figura 17a). El pico de absorbancia es amplio, lo que evidencia una vasta distribución de tamaños. Asimismo, el espectro de absorción UV-Vis del  $\text{AgNO}_3$  muestra el perfil típico de la plata iónica (Oves et al. 2013), con un pico de absorbancia en los 260 nm. El análisis DLS mostró que las AgNPs tienen un diámetro hidrodinámico de 92 nm (Figura 17b), mientras que su potencial Z tiene un valor de -14.1 mV (Figura 17c), por lo que tienden a ser inestables. Las moléculas de PVP le proporcionan estabilidad a las AgNPs, mediante repulsión estérica (El Badawy et al. 2012).



**Figura 17. Caracterización espectrofotométrica de las AgNPs.** Espectros UV-Vis de las AgNPs y el AgNO<sub>3</sub> (a). El análisis por DLS muestra que las AgNPs tienen potencial Z de -14.10 mV (b) y un diámetro hidrodinámico de 91.98 nm

### 3.1.2 Análisis por microscopía electrónica: TEM y EDX

Las AgNPs son esferoides en su mayoría, con un diámetro de  $35 \pm 15$  nm (Figura 18a), aunque en los stocks de Argovit C es posible encontrar AgNPs de 1 a 95 nm (Juarez-Moreno et al. 2016). En un trabajo previo (Vazquez-Muñoz et al. 2014), se reportó el análisis de composición elemental (EDX), que confirmó que la plata es, efectivamente, el componente principal de las nanopartículas evaluadas (Figura 18b).



**Figura 18. Caracterización de las AgNPs mediante microscopía electrónica.** Morfología de las AgNPs (a); la imagen en la parte superior izquierda –en (b)- corresponde al patrón de difracción, que confirma la estructura cristalina de las AgNPs, mientras que el recuadro rojo indica el área en dónde se realizó el análisis de composición elemental (c); modificado de Vazquez-Muñoz et al (2014).

### 3.1.3 Concentraciones mínimas inhibitorias de las AgNPs y el $\text{AgNO}_3$

Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias de las AgNPs y del  $\text{AgNO}_3$  para bacterias y hongos (Tabla 6). Las CMI fue de  $12 \mu\text{g ml}^{-1}$  para las bacterias, a pesar de sus diferencias fisiológicas y estructurales. *E. coli* es una bacteria Gram-negativa no patógena, mientras que *S. aureus* es una Gram-positiva patógena. La CMI en los hongos fue de  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  para *F. oxysporum* y de  $45 \mu\text{g ml}^{-1}$  para *C. albicans*, ambos en medio de cultivo YPD. También entre estos organismos hay grandes diferencias: *F. oxysporum* es un hongo micelial, fitopatógeno; mientras que *C. albicans* es una levadura dimórfica, patógena en mamíferos, incluyendo el hombre. A pesar de las diferencias biológicas entre las células de las bacterias y los hongos, las CMI se encontraron dentro del mismo orden de magnitud. En el caso de los hongos, se seleccionó el medio de cultivo YPD debido a que es un medio rico, equivalente al medio de cultivo MH que se usó para las bacterias.

**Tabla 6. Actividad antimicrobiana de las AgNPs.** Concentraciones Mínimas Inhibitorias de las AgNPs en bacterias y en hongos, *in vitro*.

Taxa	Cepa	CMI ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )
Bacteria	<i>E. coli</i>	CMI = 12
	<i>S. aureus</i>	CMI = 12
Fungi	<i>C. albicans</i>	CMI = 45
	<i>F. oxysporum</i>	CMI = 20

En colaboración con otros grupos de investigación, se realizó un análisis comparativo para contrastar el efecto inhibitorio de las AgNPs en otros sistemas biológicos (SB) de distinto grado de complejidad, *in vitro*, a escala celular, en medios de cultivo líquidos. Estos sistemas biológicos poseen características estructurales y fisiológicas muy distintas. Los modelos de estudio incluyeron virus, células procariotas (bacterias) y células eucariotas (protistas, hongos y células animales). Es importante resaltar que se utilizaron las mismas AgNPs –Argovit C- para determinar el efecto tóxico en todos los SB evaluados.

Se emplearon los protocolos típicos de cultivo para cada modelo biológico. El inóculo inicial fue similar para los distintos SB, aunque hay diferencias en cada sistema de cultivo (medios de cultivo, tiempo de incubación, atmósfera –con y sin CO<sub>2</sub>-, entre otros). Para contrastar la efectividad inhibitoria de las AgNPs en los diferentes sistemas biológicos, en éste apartado se usará el término Concentración Letal Mínima (CL<sub>min</sub>), definido como la concentración a la que ya no es evidente el crecimiento de un sistema biológico. La CL<sub>min</sub> se considerará equivalente a la Unidades Formadoras de Placas (UFP) en virus, a la CMI en microorganismos y a la Dosis Letal (DL<sub>100</sub>) en células animales.

Las UFP del virus RVFV se redujeron un 98% a una concentración de 12 µg ml<sup>-1</sup> de plata (en las AgNPs). Las CMI para las bacterias *E. coli* (Gram negativa) y *S. aureus* (Gram positiva) también fue de 12 µg ml<sup>-1</sup> de plata. Por otra parte, en la microalga *Rhodomonas* sp., la CL<sub>min</sub> fue de 4 µg ml<sup>-1</sup> de plata. En el caso de los hongos, la CMI en la levadura *C. albicans* fue de 45 µg ml<sup>-1</sup> de plata, mientras que para el hongo filamentoso *F. oxysporum*, fue de 20 µg ml<sup>-1</sup>. Finalmente, la CL<sub>min</sub> en todas las células animales y células de cáncer evaluadas, fue de 10 a 12 µg ml<sup>-1</sup> de plata. Casi todos los SB se inhibieron a una concentración de plata dentro del mismo orden de magnitud, 10<sup>1</sup> µg ml<sup>-1</sup>. En la Tabla 7 se muestran las CL<sub>min</sub> en los SB evaluados.

**Tabla 7. Concentraciones inhibitorias de las AgNPs.** Concentraciones letales mínimas en los sistemas biológicos de distinto grado de complejidad, *in vitro*, a nivel celular.

Taxa	Cepa	CL <sub>min</sub> (µg ml <sup>-1</sup> )*
Virus	Virus de la fiebre del Valle del Nilo (RVFV)	12 (CE <sub>98</sub> )
Protista	<i>Rhodomonas</i> sp. (microalga)	4
Bacteria	<i>E. coli</i> (Gram negativa)	12
	<i>S. aureus</i> (Gram positiva)	12
Fungi	<i>C. albicans</i> (levadura)	45
	<i>F. oxysporum</i> (filamentoso)	20
Líneas celulares animales	Vero (mono verde)	7.5 (CLE <sub>90</sub> )
	Dendríticas (murinas)	10
Líneas celulares de cáncer humano	HeLa	10
	MDA-MB-231	10

\* CL<sub>min</sub> = Concentración Letal mínima.

Se considera que la toxicidad de los nanomateriales podría depender de la complejidad de los Sistemas Biológicos (Chen et al. 2013; Panáček et al. 2009). Incluso se sugiere que la toxicidad de las AgNPs varía incluso en organismos del mismo grupo taxonómico, se contrastaron los resultados con las tendencias encontradas en la literatura. Pero nuestros resultados experimentales muestran que no hay una correlación entre la toxicidad de las AgNPs y la complejidad del Sistemas Biológicos –usando las mismas AgNPs. Todos los sistemas biológicos se inhibieron a una concentración similar de plata, independientemente de las características estructurales y fisiológicas de cada organismo.

#### 3.1.4 Meta-análisis: relación entre la toxicidad de las AgNPs y la complejidad de los Sistemas Biológicos.

El meta-análisis se orientó en dos aspectos: las características más frecuentes de las AgNPs, y su toxicidad relativa en los SB de distinto grado de complejidad. El meta-análisis mostró que muchos artículos de investigación original presentan una caracterización del nanomaterial deficiente –o carecen de ella en algunos casos. Además, algunos no mencionan las concentraciones inhibitorias usadas de las AgNPs, sólo se reporta que se observa una actividad antimicrobiana.

La publicación de caracterizaciones incompletas dificulta las comparaciones de la actividad de las AgNPs con tratamientos convencionales o con otros nanoantibióticos. Este problema en la caracterización ya ha sido expuesto por otros autores, e inclusive hay propuestas de cuáles son los datos mínimos que deberían de reportarse, tales como: distribución de tamaño y forma; estado de aglomeración; estructura cristalina; porosidad; composición química y carga superficiales (Nature Editorial 2012; Oberdörster et al. 2005). Por otro lado, la descripción de las pruebas antimicrobianas también presenta algunas deficiencias, pues no todos puntualizan las cepas o las condiciones de cultivo. Para el meta-análisis sólo se usaron publicaciones que tuvieran una caracterización del nanomaterial y que describieran las técnicas antimicrobianas y las CMI (Tabla 8).

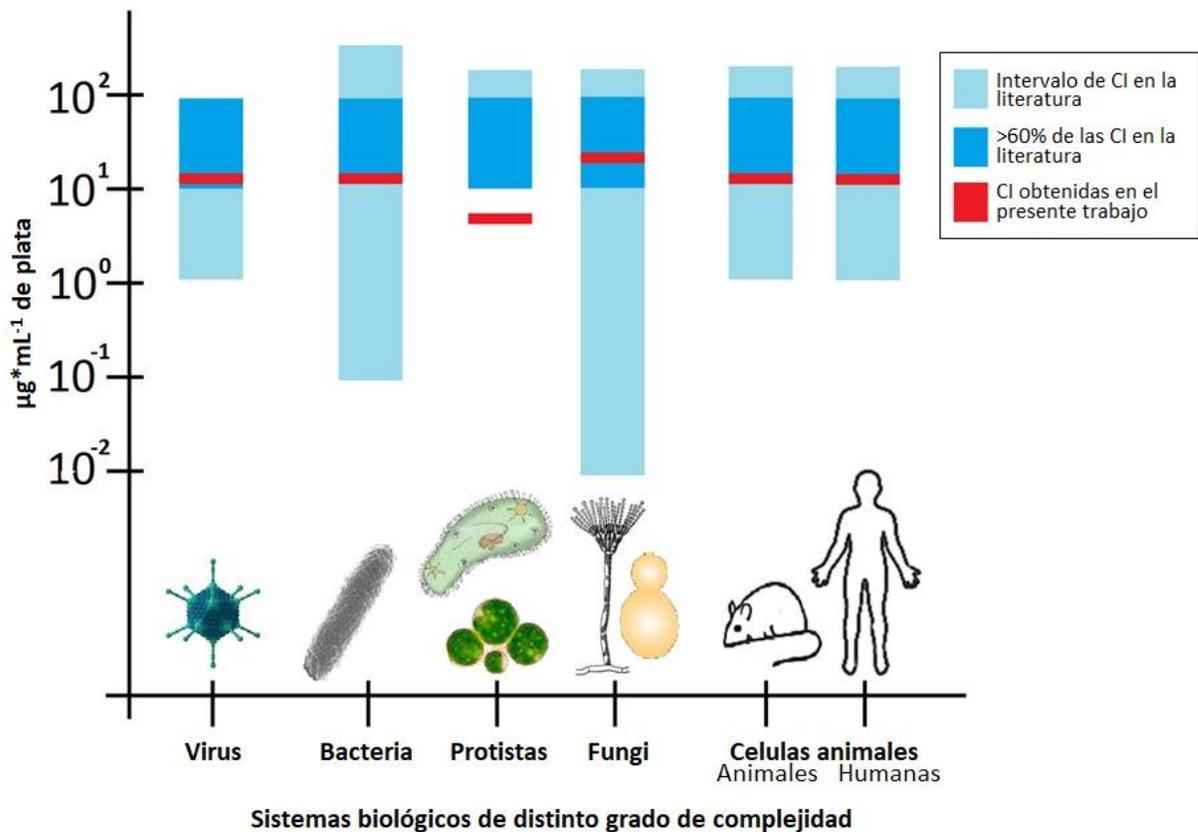
A partir del meta-análisis se observaron datos relativos a las características de las AgNPs (Tabla 8). La forma y tamaño más comunes de las AgNPs son esferoides de 10 a 30 nm (> 60%), aunque la distribución de formas incluye pirámides, octaedros, etc., en un intervalo global de tamaños desde 1.1 hasta 230 nm. Los agentes estabilizantes más comunes son el PVP, el PVA y el Citrato de sodio. Los métodos de síntesis química son tan numerosos como los de síntesis verde –biosíntesis. El meta-análisis mostró que el intervalo de las  $CL_{min}$  va de  $10^{-2}$  a  $10^2 \mu\text{g ml}^{-1}$  de plata y que no hay relación aparente entre la toxicidad de las AgNPs y la complejidad de los sistemas biológicos (Tabla 8).

**Tabla 8. Características de las AgNPs e intervalo de su actividad en los SB.** Las AgNPs reportadas en la literatura tienen diferentes características en diferentes parámetros: forma y tamaño, agente funcionalizante y concentración letal mínima.

Taxa	Morfología	Agente funcionalizante	CL <sub>min</sub>	Referencias
<b>Virus 11</b>	1.1 – 80 nm poliformes, esféricas	Carbón, PVP, BSA, polisacáridos, PVA o “desnudas”	10 <sup>0</sup> -10 <sup>2</sup>	(Xiang et al. 2011; Trefry & Wooley 2012; Rogers et al. 2008; Speshock et al. 2010; You et al. 2011; Chen et al. 2013; Elechiguerra et al. 2005; Lu et al. 2008; Trefry & Wooley 2013; Gaikwad et al. 2013; Orłowski et al. 2014)
<b>Bacteria 45</b>	1.1 – 230 nm Cubicas, Esféricas, Triangulares, Irregulares	Matriz de carbón, CS, SDS, matriz agar-agar, PVP, PVA, PEG, HEC, surfactantes gemini, quitosano o “desnudas”	10 <sup>1</sup> -10 <sup>2</sup>	(Li et al. 2005; Morones et al. 2005; De Souza et al. 2006; Lok et al. 2006; Shahverdi et al. 2007; Martínez-Castanon et al. 2008; Ruparelia et al. 2008; Kora et al. 2009; Fayaz et al. 2010; Dimkpa et al. 2011; Ansari et al. 2011; Mirzajani et al. 2011; Brandt et al. 2012; Du et al. 2012; Guzman et al. 2012; Martínez-Gutiérrez et al. 2012; Gutarowska et al. 2012; Vargas-Reus et al. 2012; Radzig et al. 2013; Tamboli & Lee 2013; Gao et al. 2013; Khurana et al. 2013; Suchomel et al. 2015; Agnihotri et al. 2014; Shankar et al. 2014; Negm et al. 2014; Goswami et al. 2015; Hoskote Anand & Mandal 2015; Eugenio et al. 2016; Ramalingam et al. 2016; Hanh et al. 2016; Palanisamy et al. 2014; Alizadeh et al. 2014; S. Ghosh et al. 2010; W.-R. R. Li et al. 2010; Martínez-Gutiérrez et al. 2010; You et al. 2011; Greulich et al. 2012; Jain et al. 2009; Elbeshehy et al. 2015; Sonar et al. 2017; Chang et al. 2017; Zarrini et al. 2017; Večeřová et al. 2017)
<b>Protistas 4</b>	7.7 – 50 nm esféricas,	PEG, PVP, SDS, alcanos o “desnudas”	10 <sup>1</sup> -10 <sup>2</sup>	(Allahverdiyev et al. 2011; Taylor et al. 2016; Kvittek et al. 2009; Oukarroum et al. 2012)
<b>Fungi 28</b>	5 – 100 nm esféricas	PVP, PEG, SDS, matriz agar-agar, NH <sub>3</sub> , PVA, HEC o “desnudas”	10 <sup>2</sup> -10 <sup>2</sup>	(Monteiro et al. 2011; Noorbakhsh et al. 2011; Monteiro et al. 2013; Gopinath & Velusamy 2013; Pulit-Prociak et al. 2014; Ishida et al. 2014; Silva et al. 2014; De Souza et al. 2006; Panáček et al. 2009; S. Ghosh et al. 2010; Martínez-Gutiérrez et al. 2010; Brandt et al. 2012; Kim et al. 2012; Suchomel et al. 2015; Gutarowska et al. 2012; Vazquez-Muñoz et al. 2014; Choi et al. 2008; Chamakura et al. 2010; Xia et al. 2014; Ogar et al. 2015; Kumar & Poornachandra 2015; Elbeshehy et al. 2015; Kaur & Thakur n.d.; Xu et al. n.d.; Soni & Prakash 2015; Pourseyedi & Khatami 2015; Wypij et al. 2017; Jogee et al. 2017)
<b>LC animales 7</b>	5 – 150 nm esféricas	CS, SDS, polisacáridos, PVA o “desnudas”	10 <sup>0</sup> -10 <sup>2</sup>	(Park et al. 2010; Mittal et al. 2014; Ali et al. 2016; Speshock et al. 2010; Xiang et al. 2011; Allahverdiyev et al. 2011; Arora et al. 2008)
<b>LC humanas 7</b>	1.12 – 90 nm poliformes, esféricas	Carbón, PVP, BSA, PEG, SDS, matriz agar-agar o “desnudas”	10 <sup>0</sup> -10 <sup>2</sup>	(Panáček et al. 2009; S. Ghosh et al. 2010; Martínez-Gutiérrez et al. 2010; Chen et al. 2013; Elechiguerra et al. 2005; Greulich et al. 2012; Martínez-Gutiérrez et al. 2012)

LC= líneas celulares; CS= Citrato de Sodio; PVP = polivinilpirrolidona; BSA = albúmina sérica bovina; PVA = alcohol polivinílico; SDS = dodecilsulfato sódico; PEG = polietilenglicol; HEC = hidroxietil celulosa; NH<sub>3</sub> = amoníaco; “desnudas”: AgNPs sin agentes funcionalizantes.

El meta-análisis muestra que la complejidad del sistema biológico, *in vitro*, a nivel celular, no influye en la toxicidad de las AgNPs. Independientemente de la complejidad de los SB, en la mayoría de los trabajos ( $\geq 60\%$ ) la  $CL_{\min}$  se encuentra alrededor de  $10^1 \mu\text{g ml}^{-1}$  de plata. Nuestros resultados – $CL$  en el orden de  $10^1 \mu\text{g ml}^{-1}$ – se contrastaron con los datos obtenidos del meta-análisis. Los valores experimentales coinciden con la tendencia revelada en la literatura ( $CL_{\min} =$  de  $10^1 \mu\text{g ml}^{-1}$  de plata). En la Figura 19 se muestra dicha relación, de manera gráfica.



**Figura 19: Concentraciones mínimas inhibitorias de las AgNPs en los distintos Sistemas Biológicos.** Intervalo de las concentraciones inhibitorias de AgNPs reportadas en la literatura (barras azul claro), para organismos de diferentes niveles de complejidad biológica. La mayoría de los estudios (cerca del 64%) informan una concentración inhibitoria de  $10^1 \mu\text{g ml}^{-1}$  de AgNPs (barras azul oscuro). El otro 36% se encuentra en el intervalo de  $10^{-2}$  a  $10^2 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Las líneas rojas muestran el rango de concentración encontrado en nuestro estudio, utilizando el mismo nanomaterial (PVP-AgNPs) en todos los sistemas biológicos probados.

El hecho de que tanto células como virus sean inhibidos por las AgNPs, implica que las AgNPs podrían carecer de mecanismos de acción específicos. Con base en la literatura, se infiere que las AgNPs afectan

estructuras fundamentales para todos los sistemas biológicos, tales como proteínas y material genético. Esto se puede atribuir a que todas las especies de plata ejercen cierto grado de toxicidad en los SB (Chernousova & Epple 2013; Liao et al. 1997; Zhao & Stevens 1998). Asimismo, se ha reportado que la forma y el tamaño de las AgNPs altera su toxicidad; y aunque hay una influencia clara, la actividad antimicrobiana no se altera en más de 1 orden de magnitud (Pal et al. 2007; Agnihotri et al. 2014).

En células –tanto procariotas como eucariotas-, las AgNPs interactúan con proteínas de membrana, ácidos nucleicos y enzimas (Yuan et al. 2017; Mukherjee et al. 2012; Nymark et al. 2013; Hackenberg et al. 2011; W.-R. R. Li et al. 2010). Además, incrementan la permeabilidad de la membrana y generan perturbaciones en la pared celular (Chairuangkitti et al., 2012, Hwang, Lee, Hwang, Kim y Lee, 2012; McShan, Ray, y Yu, 2014; Oukarroum et al., 2012). En el caso de los virus, se ha demostrado que las AgNPs bloquean receptores proteínicos, alterando su capacidad de unirse a las células (Elechiguerra et al. 2005) y la morfología de la cápside (Borrego et al. 2016). Por otro lado, los sistemas unicelulares podrían ser más sensibles a los efectos tóxicos de las AgNPs. Así, la toxicidad si podría ser muy diferente en sistemas biológicos más complejos, como los organismos superiores. En este caso, los animales y las plantas toleran mejor la toxicidad de la plata, sobre todo si lo comparamos con otros sistemas, como microorganismos y virus (Bogdanchikova et al. 2016).

Este trabajo sustenta la necesidad de estandarizar protocolos para evaluar el efecto tóxico de las AgNPs, debido a que la falta de protocolos comunes dificulta la comparación entre las diferentes AgNPs. Además, aunque posiblemente la complejidad del SB no influya en la  $CL_{min}$ , la toxicidad de las AgNPs podría ser modificada por otros factores, tales como las condiciones y medios de cultivo o la concentración del inóculo inicial (Jaime-Acuña et al. 2016).

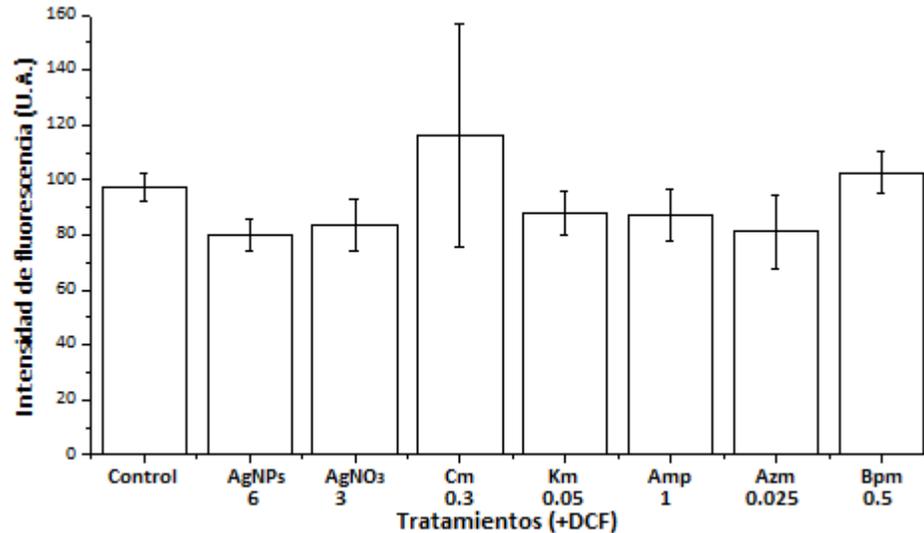
### *3.1.5 Efecto antimicrobiano y efecto paradoja*

Las AgNPs un efecto microbicida en bacterias y hongos. Las concentraciones microbicidas corresponden con las concentraciones mínimas inhibitorias para ambos taxa. En la literatura la mayoría de los trabajos de investigación que evalúan el efecto antimicrobiano de las AgNPs señalan que éstas presentan una actividad microbicida, aunque la CMB –o la CMF- no siempre coincide con la CMI.

No se observó el efecto paradoja en las concentraciones de AgNPs evaluadas. El crecimiento microbiano disminuyó de manera proporcional al incremento de la concentración de plata y no hubo crecimiento en concentraciones superiores a las CMI. Hasta donde sabemos, no se han reportado estudios dirigidos para evaluar el efecto paradoja en AgNPs, pero ya se ha descrito este comportamiento de manera indirecta (Kumar-Krishnan et al. 2015). Analizar el efecto paradoja debería ser parte de la caracterización antimicrobiana, particularmente en aplicaciones que requieren una gran cantidad de nanomateriales o cuando las AgNPs no son tan estables.

### 3.1.6 Efecto de las AgNPs en el estrés oxidativo

El fluoroforo  $H_2DCFDA$  es desesterificado intracelularmente, convirtiéndose DFC al oxidarse. La intensidad de la fluorescencia es proporcional a la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS). En concentraciones sub-letales, las AgNPs ejercen un estrés oxidativo similar al del  $AgNO_3$  y a los antibióticos convencionales.



**Figura 20: Efecto de los tratamientos antimicrobianos en el estrés oxidativo en *E. coli*.** Las AgNPs, el  $AgNO_3$  y los antibióticos generan estrés oxidativo en *E. coli*, tras 1 hora de exposición, en concentraciones sub-letales. Los números debajo de los tratamientos indican la concentración, en  $\mu g\ ml^{-1}$ .

## 3.2 Efecto en la estructura celular

Las AgNPs y al  $-\text{AgNO}_3-$  pueden alterar la estructura celular de bacterias como en hongos. Asimismo, las AgNPs se bioacumulan en las células, tanto en el interior como en el exterior y, además, se pueden biosintetizar en el medio intracelular.

### 3.2.1 Efecto de las AgNPs en la morfología de *F. oxysporum*

La microscopía óptica de campo claro evidenció que las AgNPs alteran el crecimiento y morfología de *F. oxysporum*. Se expuso a *F. oxysporum* a diferentes concentraciones de AgNPs, y se observó una morfología aberrante – forma y tamaño de las hifas- conforme se incrementó la concentración de las AgNPs (Figura 21). Este efecto se observó también de manera macroscópica, debido a que el tamaño de la colonia fue inversamente proporcional a la concentración de AgNPs en el medio.

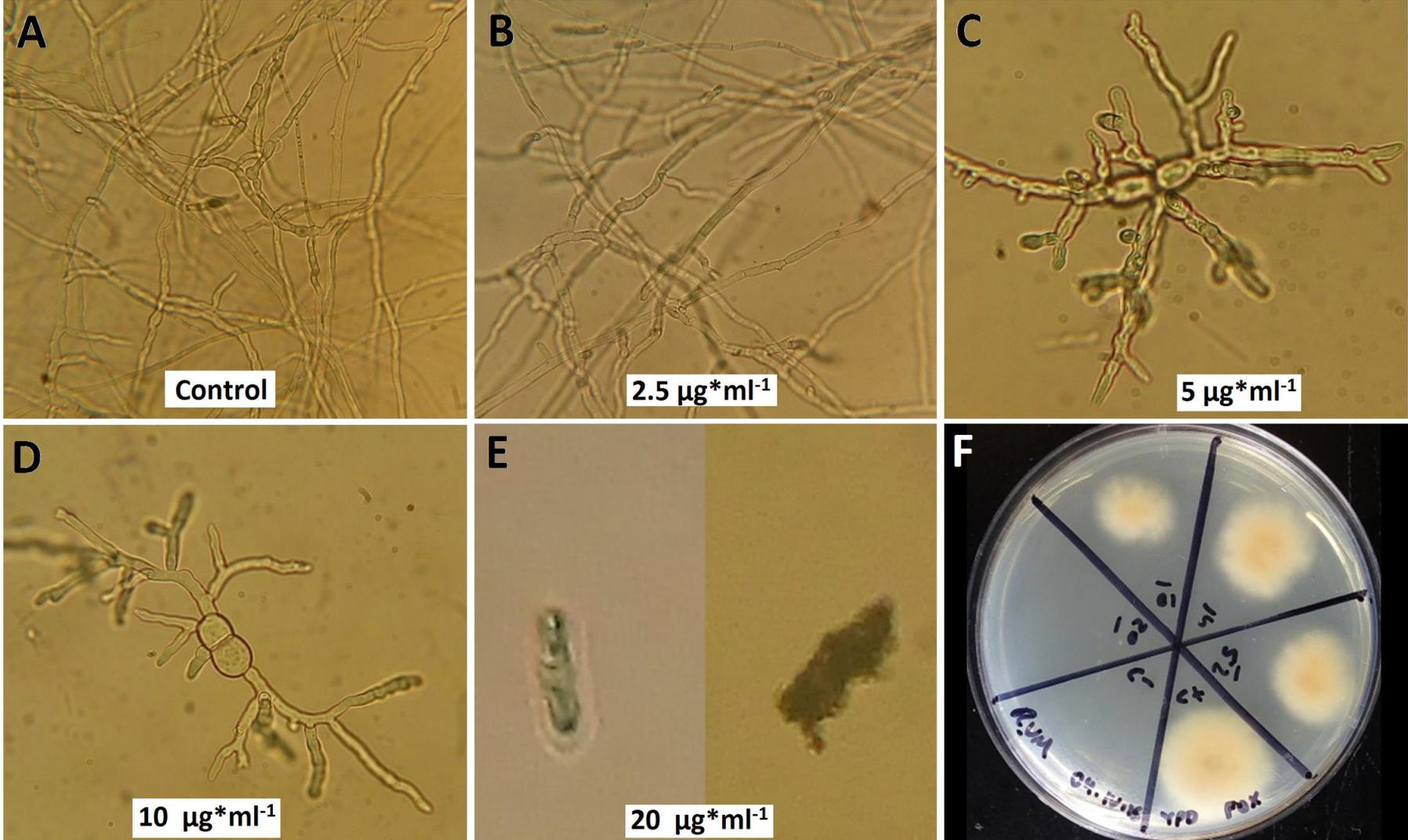
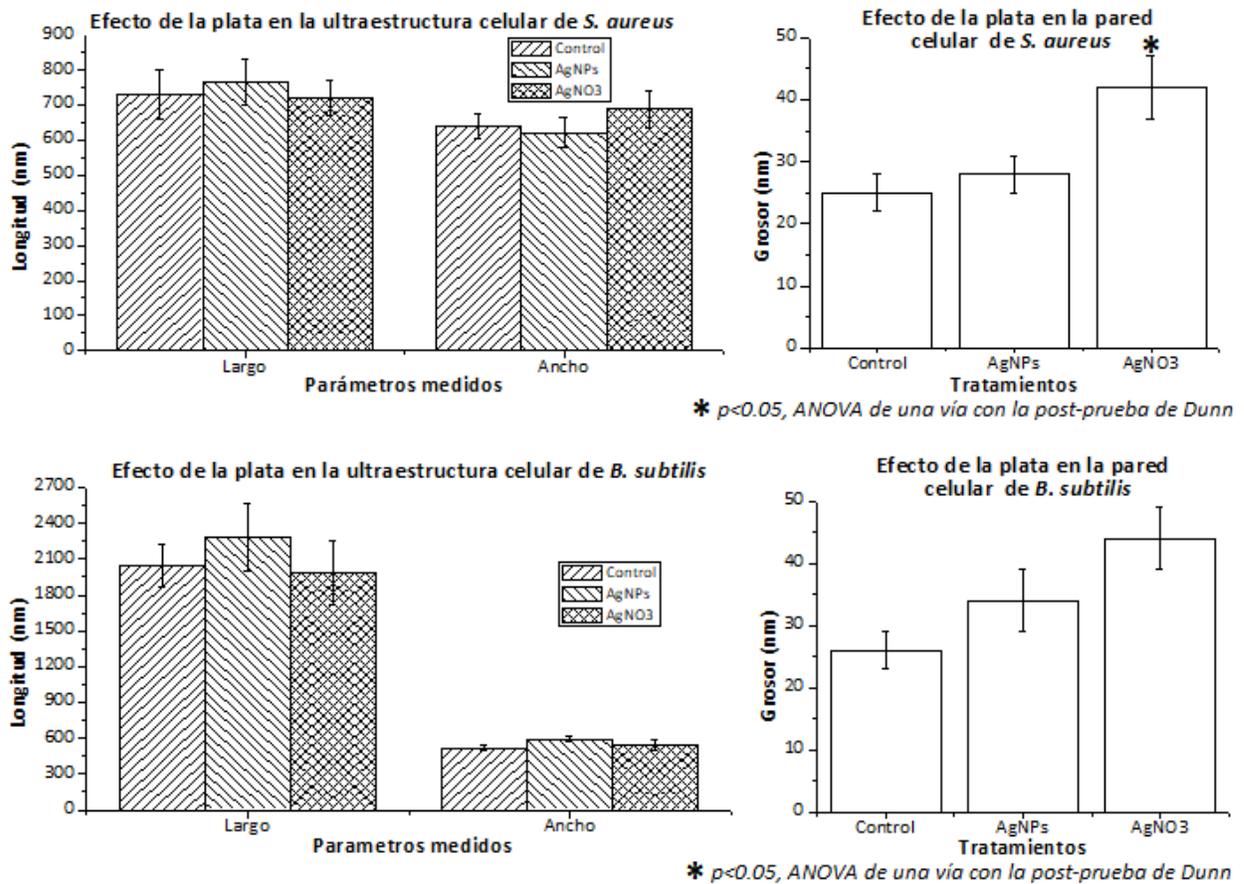


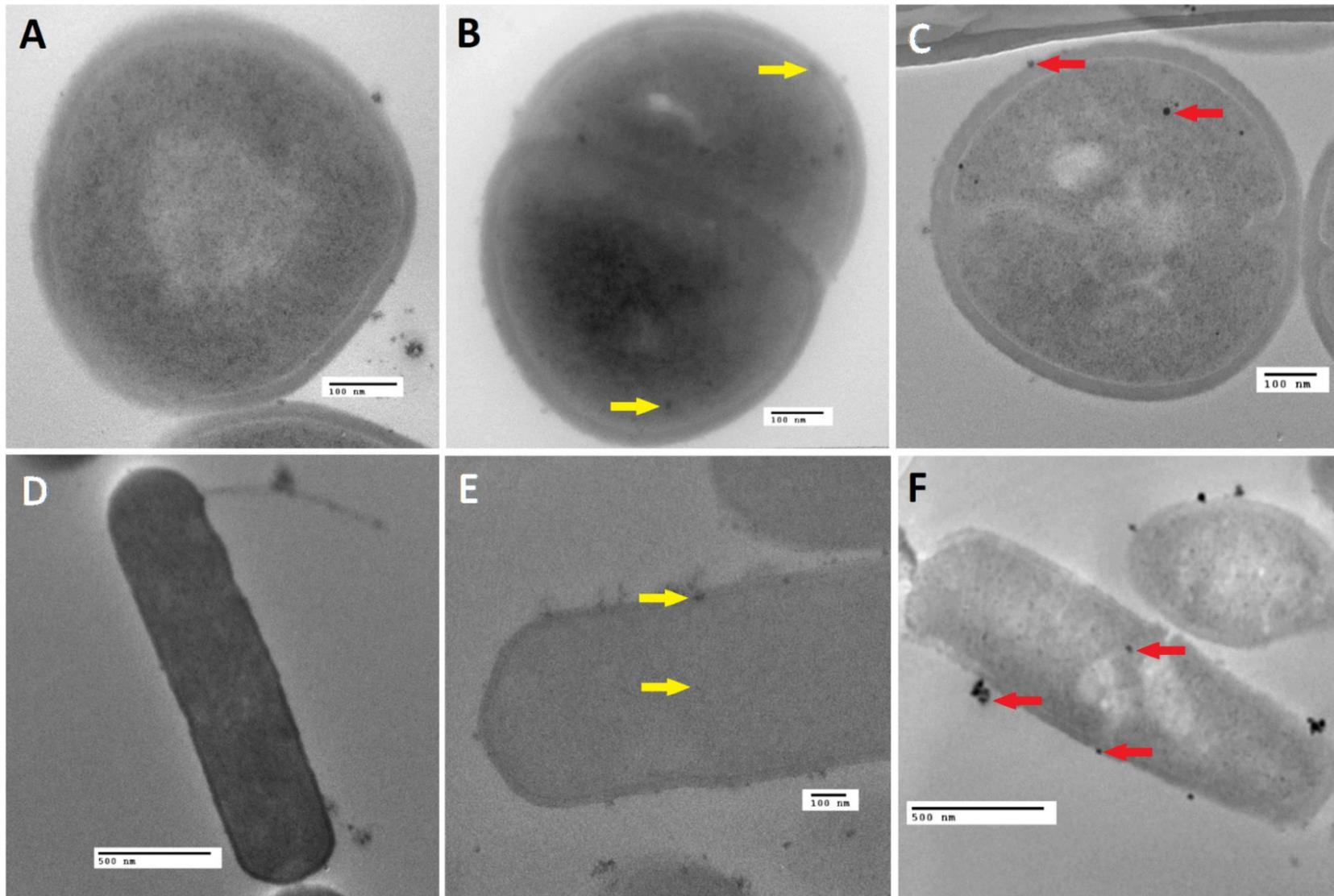
Figura 21: Efecto de las AgNPs en la estructura de *F. oxysporum*. Se observa el efecto de las AgNPs en la forma de *F. oxysporum* (A-E) y en la expansión micelial (F). En E se observan las esporas sin germinar.

### 3.2.2 Efecto de las AgNPs en la ultraestructura celular de bacterias y hongos

La plata altera la ultraestructura celular, tanto en bacterias como en hongos. Las imágenes por medio de microscopía electrónica de transmisión revelaron perturbaciones en la pared celular. En el caso de bacterias, el grosor de la pared celular mostró diferencias estadísticas en *S. aureus* tratada con  $\text{AgNO}_3$ , pero no con tratadas con AgNPs; mientras que en *B. subtilis* no se observaron diferencias significativas en los tratamientos, respecto al control (Figura 22). Hasta donde sabemos, no se ha evaluado cómo las AgNPs afectan el grosor de la pared celular en bacterias. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en las dimensiones de la célula –a lo largo y ancho- entre los grupos control y las células tratadas –con AgNPs y  $\text{AgNO}_3$ –, respecto al control (Figura 22). Las micrografías electrónicas muestran una morfología irregular en las células tratadas con  $\text{AgNO}_3$ , y en menor grado en las bacterias tratadas con AgNPs (Figura 23). El análisis de composición elemental (EDX) mostro la presencia de plata en las muestras tratadas, pero no en los controles.

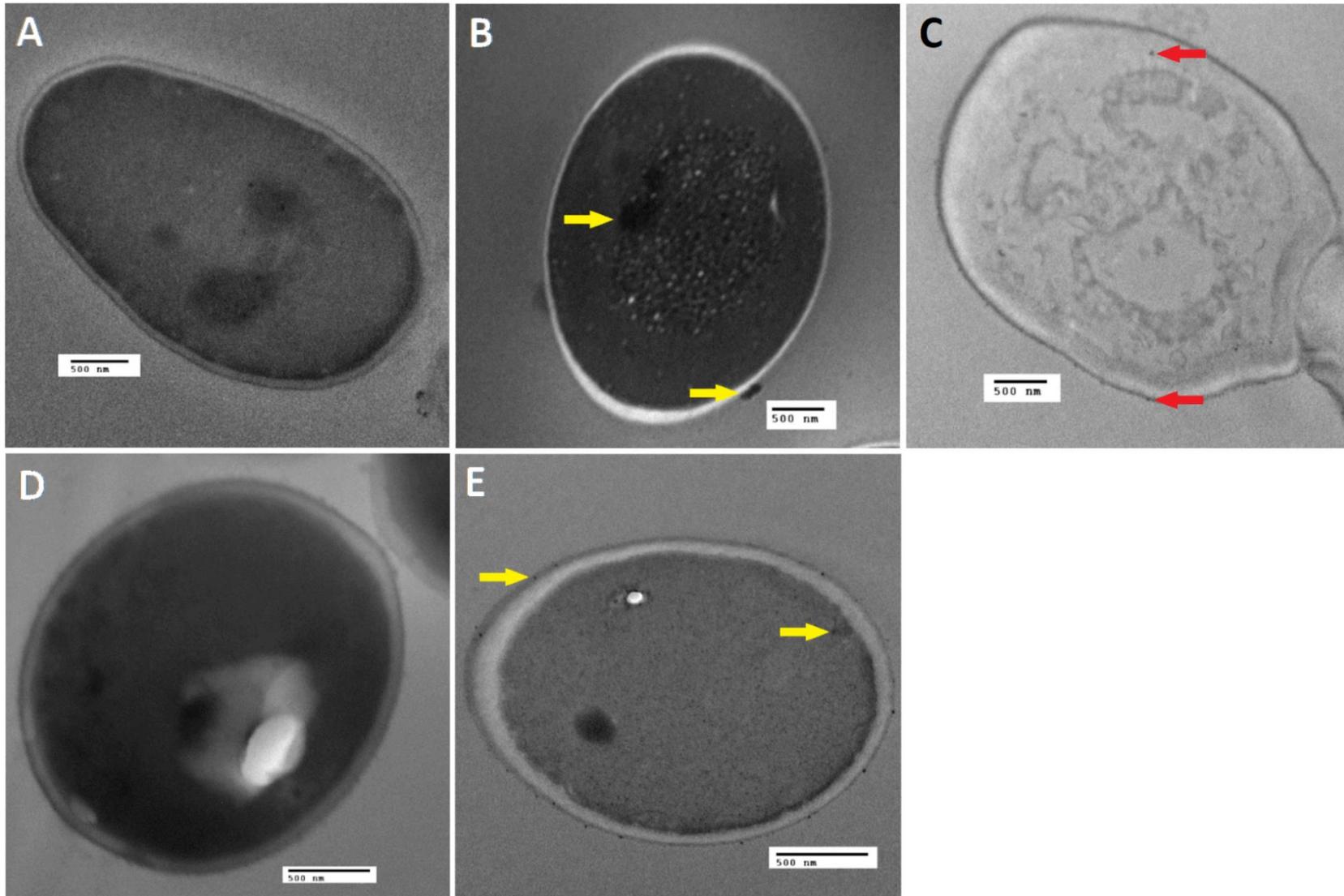


**Figura 22: Efecto de los tratamientos de plata en la ultraestructura celular bacteriana. *S. aureus* (arriba) y *B. subtilis* (abajo).** No hay diferencias significativas en el tamaño entre las células control y las tratadas, tanto en *S. aureus* como en *B. subtilis*. En cuanto al grosor de la pared celular, en *S. aureus*, los tratamientos no los afectaron significativamente, aunque en *B. subtilis* si hubo diferencias significativas en las células tratadas con  $\text{AgNO}_3$ .



**Figura 23: Efecto de los tratamientos de plata en las células bacterianas.** *S. aureus* (arriba) y *B. subtilis* (abajo). Se observan las células sin tratamiento (A y D) y las células tratadas con AgNPs (B y E) y con  $\text{AgNO}_3$  (C y F). En A y D, las partículas que se observan son de osmio, acorde al análisis EDX, en B, C, E y F son de plata.

En el caso de *Candida*, las micrografías electrónicas muestran que la morfología irregular en las células tratadas con AgNPs, pero en menor grado con las tratadas con AgNO<sub>3</sub> (Figura 24). El efecto de las AgNPs en la ultraestructura de *C. albicans* ya se había reportado en un trabajo previo (Vazquez-Muñoz et al, 2014), pero ahora se extiende al AgNO<sub>3</sub> y también se evalúa el efecto de las AgNPs en *C. glabrata*.

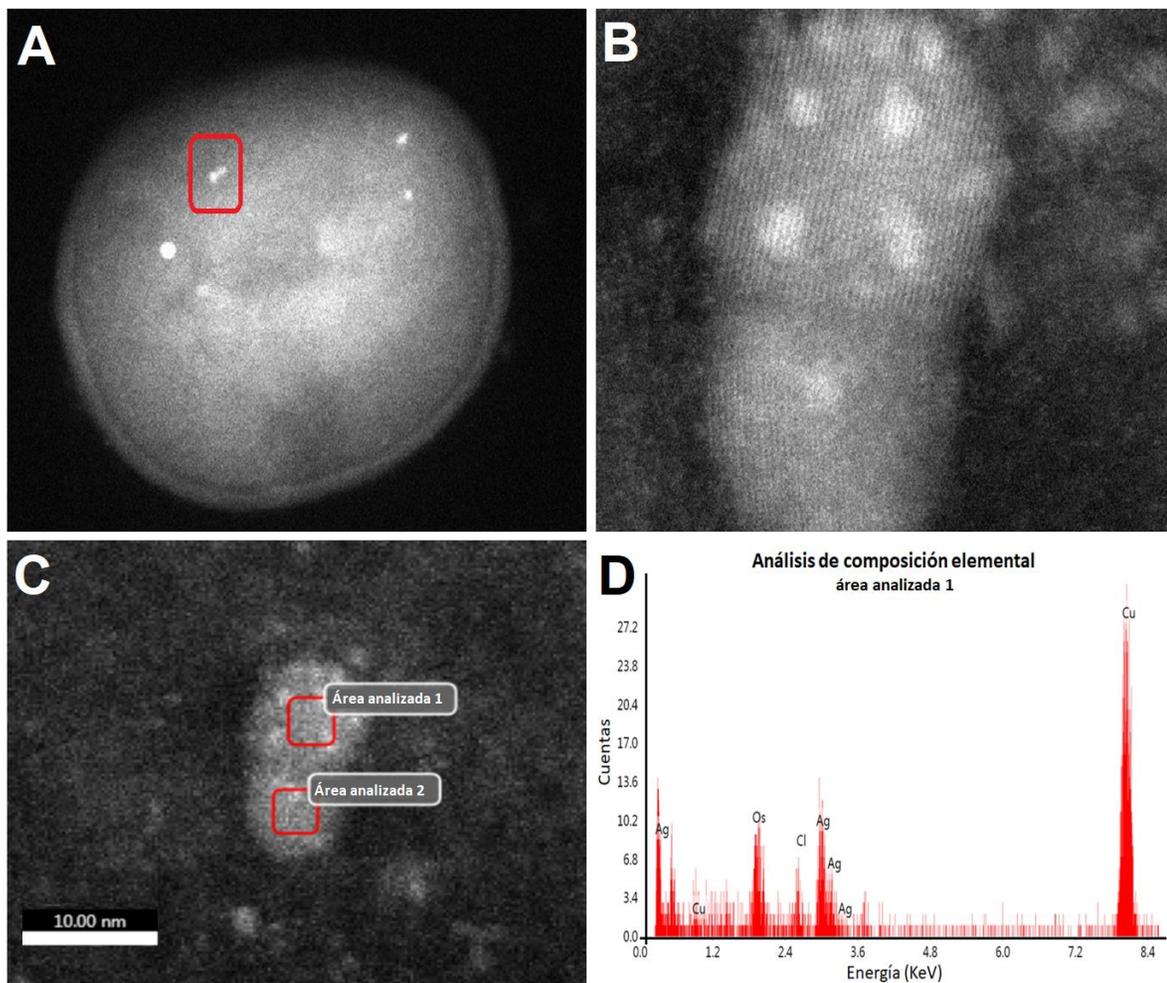


**Figura 24: Efecto de los tratamientos de plata en las células fúngicas.** *C. albicans* (arriba) y *C. glabrata* (abajo). Se observan las células sin tratamiento (A y D) y las células tratadas con AgNPs (B y E) y con AgNO<sub>3</sub> (C). En A y D, las partículas que se observan son de osmio, acorde al análisis EDX, en B, C y E son de plata.

### 3.2.3 Las AgNPs se biosintetizan en el interior de las células

En las cepas microbianas –bacterias y hongos- tratadas con  $\text{AgNO}_3$  se observó la formación de AgNPs en el interior de las células. El análisis de composición elemental confirmó la presencia de plata en las células tratadas con  $\text{AgNO}_3$ . Las imágenes de alto aumento en el TEM mostraron una estructura cristalina en las AgNPs. Un análisis de composición elemental demostró que las nanopartículas observadas contienen plata en su composición (Figura 25).

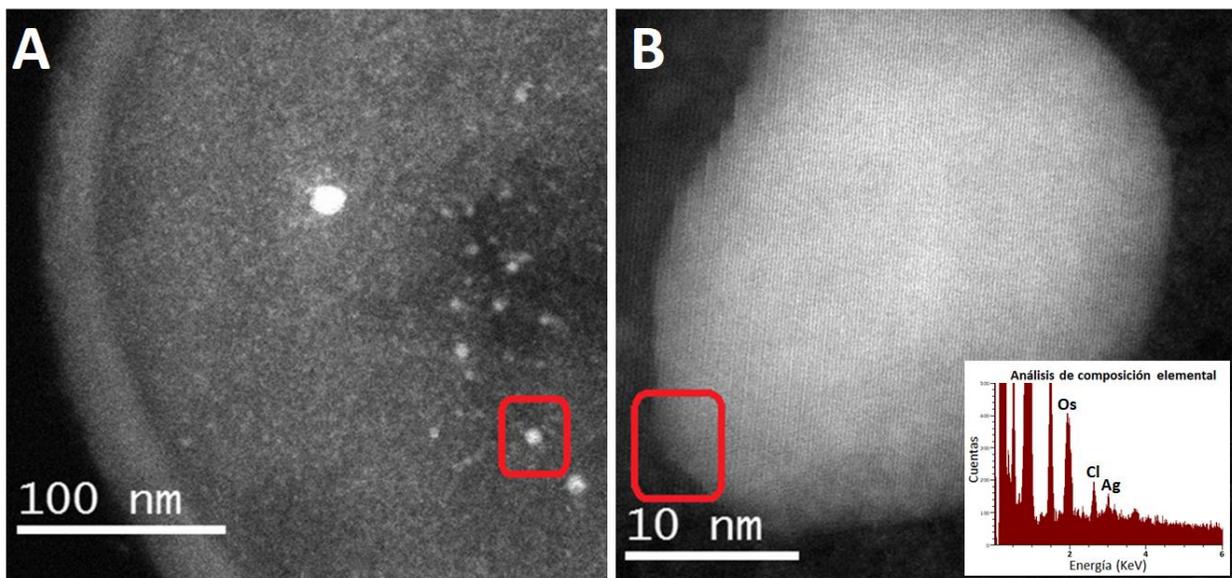
La formación de AgNPs en el interior de las células era algo esperado, debido a la gran cantidad de publicaciones que reportan el uso de extractos celulares microbianos para la síntesis de AgNPs (Li et al. 2012; Narayanan & Sakthivel 2010). Además, el citoplasma contiene diferentes agentes reductores –carbohidratos y proteínas- que, además de favorecer la reducción de la plata iónica en plata metálica, podrían servir como agentes estabilizantes, como el caso de las proteínas corona.



**Figura 25: Bioacumulación de las AgNPs en bacterias.** Se observa la presencia de AgNPs en el interior de las células bacterianas (A); un acercamiento a las AgNPs revela su estructura cristalina (B) y el análisis EDS confirma la presencia de plata (C y D).

### 3.2.4 Las AgNPs se bioacumulan en las células

Las AgNPs se aglomeran en el exterior de las células, lo que podría facilitar su función como reservorios de plata iónica. Además, las AgNPs se bioacumulan en el interior de las células microbianas. El análisis de composición elemental confirmó la presencia de plata en las células tratadas (Figura 26). Esto ya se ha reportado en otros trabajos (Vazquez-Muñoz et al. 2014; Lara et al. 2015) y podría ser un comportamiento generalizado de las AgNPs. Aunque no todas las AgNPs puedan entrar directamente en la célula, debido a su tamaño, los iones  $\text{Ag}^+$  liberados si se internalizan, y estos pueden formar nuevas AgNPs en el interior de las células, tal y como se observó en los tratamientos con  $\text{AgNO}_3$ . Asimismo, las micrografías electrónicas de alto aumento –en el TEM- mostraron una estructura cristalina en las AgNPs. Estas son de diferentes formas y tamaños.



**Figura 26: Biosíntesis de AgNPs en el interior de las bacterias.** En las células de *S. aureus* tratadas con  $\text{AgNO}_3$  se encontró la presencia de AgNPs (a). La imagen (b) es un aumento del recuadro en (a). Se observaron planos cristalográficos en las nanopartículas analizadas y se realizó un análisis de composición elemental para verificar la presencia de plata.

### 3.3 Efecto del medio de cultivo en la actividad antimicrobiana de las AgNPs

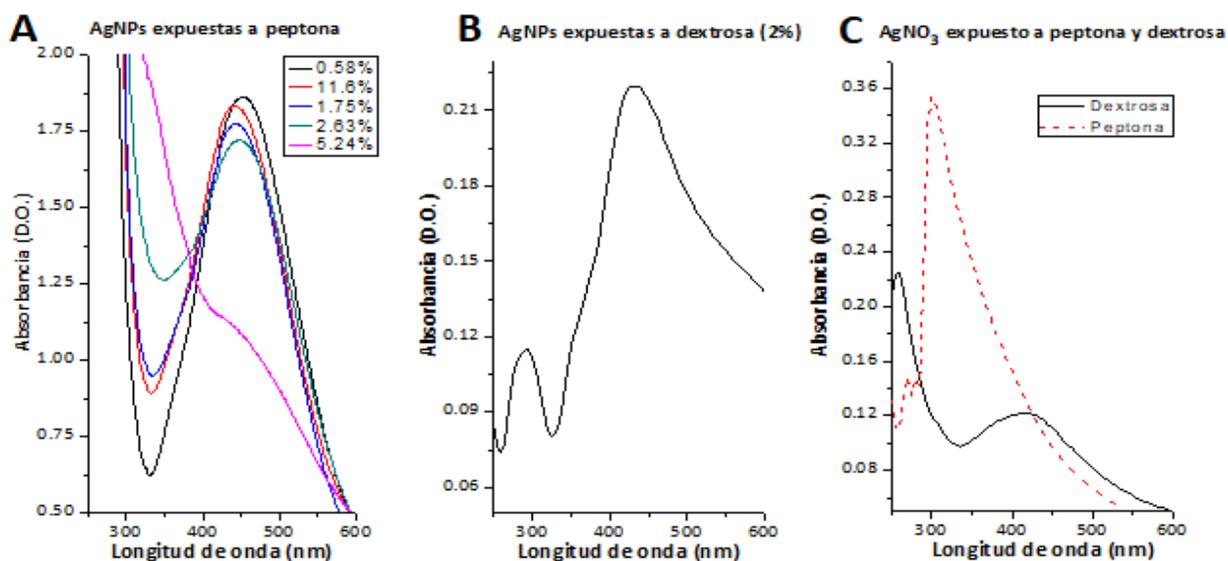
Se evaluó el efecto del medio de cultivo en la estabilidad química de las AgNPs. Las AgNPs tuvieron diferentes respuestas en los distintos de medios. El plasmón superficial de las AgNPs –evaluado por espectrofotometría UV-Vis- presentó diferencias. El diámetro hidrodinámico de las AgNPs y el potencial zeta –analizados por DLS- también variaron. La espectroscopía ICP-OES mostró que la concentración de plata también varía conforme el medio de cultivo. Asimismo, E. coli presentó crecimiento diferenciado, según el medio de cultivo usado, bajo las mismas condiciones. Además, las CMI de las AgNPs también variaron, bajo las mismas condiciones de incubación.

#### *3.3.1 Efecto de los componentes del medio de cultivo en las AgNPs: caracterización espectrofotométrica*

##### Determinación del plasmón superficial mediante espectrofotometría UV-Vis

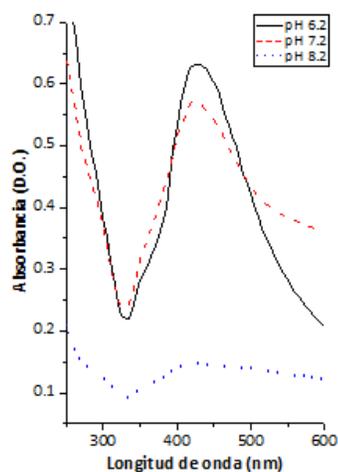
En la mayoría de las soluciones de peptona con AgNPs, éstas mostraron espectros de absorción similares a los del control ( $H_2O + AgNPs$ ), exhibiendo el plasmón superficial característico de los AgNPs. Por el contrario, las AgNPs en la solución con la mayor concentración de peptona (5.24%) no mostraron el perfil típico (Figura 27a). Por su parte, el  $AgNO_3$  expuesto a una solución de peptona al 2% no mostró cambios importantes (Figura 27c).

Las AgNPs en disoluciones de dextrosa mostraron el perfil espectral típico (Figura 27b). Por otro lado, el  $AgNO_3$  expuesto a una solución de dextrosa al 2% no mostró su perfil típico, sino que presentó el perfil de AgNPs (Figura 27c). La dextrosa no tiene efectos aparentes en las AgNPs, pero debido a que es un agente reductor, podría estar reduciendo químicamente al ion  $Ag^+$ , lo que llevaría a las síntesis de AgNPs.



**Figura 27. Espectros de absorción de compuestos de plata en soluciones de peptona y dextrosa.** Los espectros de absorción de las AgNPs ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) expuestos a soluciones con distinta concentración de peptona (A) y dextrosa (B) y los espectros de absorción del  $\text{AgNO}_3$  ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) expuestos a soluciones de peptona y dextrosa (C)

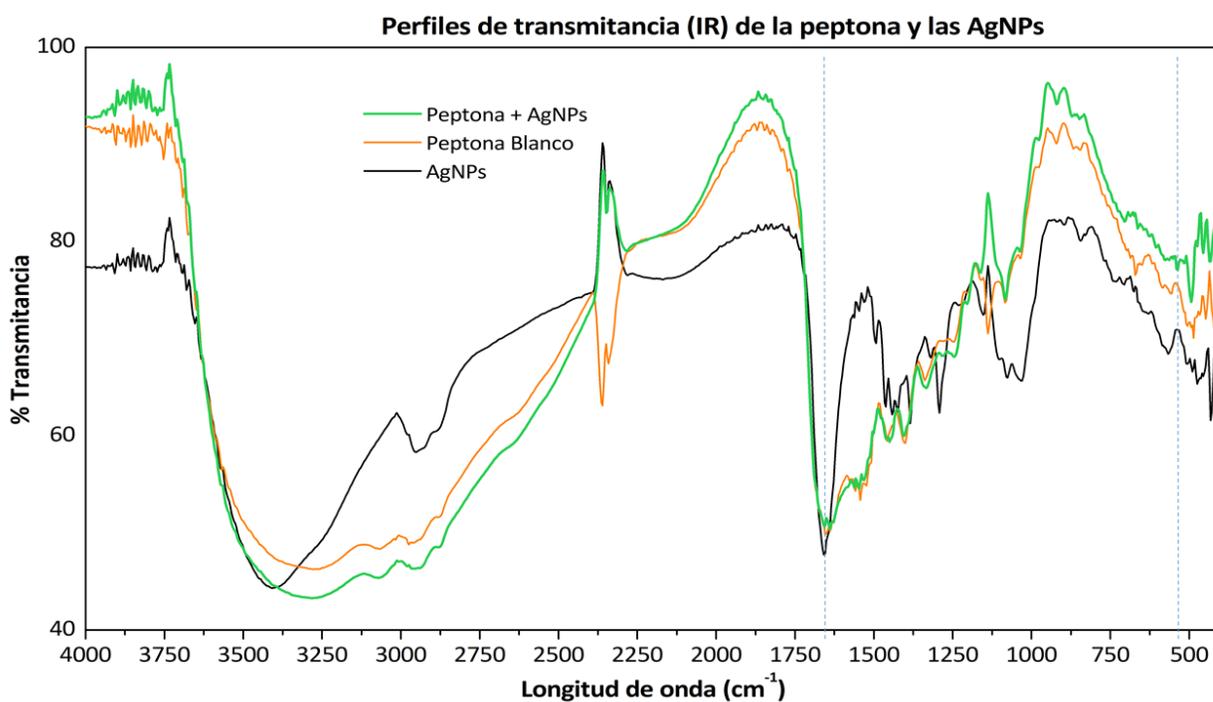
Las modificaciones del pH afectaron la estabilidad de las AgNPs. En el pH básico, las AgNPs no mostraron su perfil de absorbancia típico, mientras que en pH ácido si se observó dicho perfil (Figura 28), por lo que las AgNPs son más estable en el pH ácido evaluado. En la literatura ya se ha reportado el efecto del pH en la estabilidad de las AgNPs –mediante espectrofotometría UV-Vis o DLS–, pero sus resultados no se pueden comparar con este trabajo, debido a que las AgNPs se expusieron a diferentes condiciones, algunas simultáneas –pH, fuerza iónica, Uv-Vis, entre otros– (Yuan et al. 2013; Badawy et al. 2010).



**Figura 28. Espectros de absorción de AgNPs en H<sub>2</sub>O en distintos pH.** Las AgNPs ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) se expusieron a soluciones de H<sub>2</sub>O ajustada a pH  $6.2 \pm 0.2$ ,  $7.2 \pm 0.2$  y  $8.2 \pm 0.2$

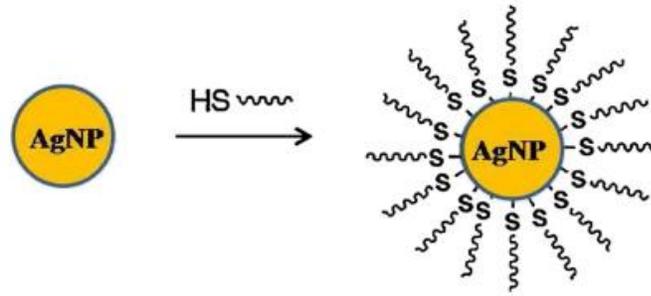
### Espectroscopía FT-IR de AgNPs expuestas a diferentes concentraciones de peptona

Los AgNPs y la peptona podrían interactuar químicamente. El perfil de transmitancia –obtenido por espectroscopía infrarroja (FT-IR)- de la mezcla AgNPs-peptona mostró algunas diferencias con respecto a los perfiles de estos compuestos por separado (Figura 29). Las diferencias se encontraron en las bandas de  $1650\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a las vibraciones de estiramiento en los enlaces C=C y en la región de los  $540\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a los enlaces S-S (Sadler Research Laboratories. & Simons 1978). Aunque es necesario hacer caracterizaciones adicionales, estas diferencias podrían atribuirse a interacciones químicas entre la plata y algunos componentes de la peptona.



**Figura 29. Espectro de transmitancia de la combinación AgNPs-peptona.** Análisis FT-IR de las AgNPs y peptona, combinados y por separado (arriba).

La plata forma enlaces químicos con los grupos tiol encontrados en los residuos de cisteína en las proteínas (Ravindran et al. 2013) (Figura 30). Dicha interacción podría afectar la actividad antimicrobiana de las AgNPs, reduciendo su toxicidad en los sistemas biológicos.



**Figura 30. Interacción química de la plata con el grupo tiol.** Esquema que representa el enlace químico entre las AgNPs y el azufre de los grupos tiol (Ravindran et al. 2013).

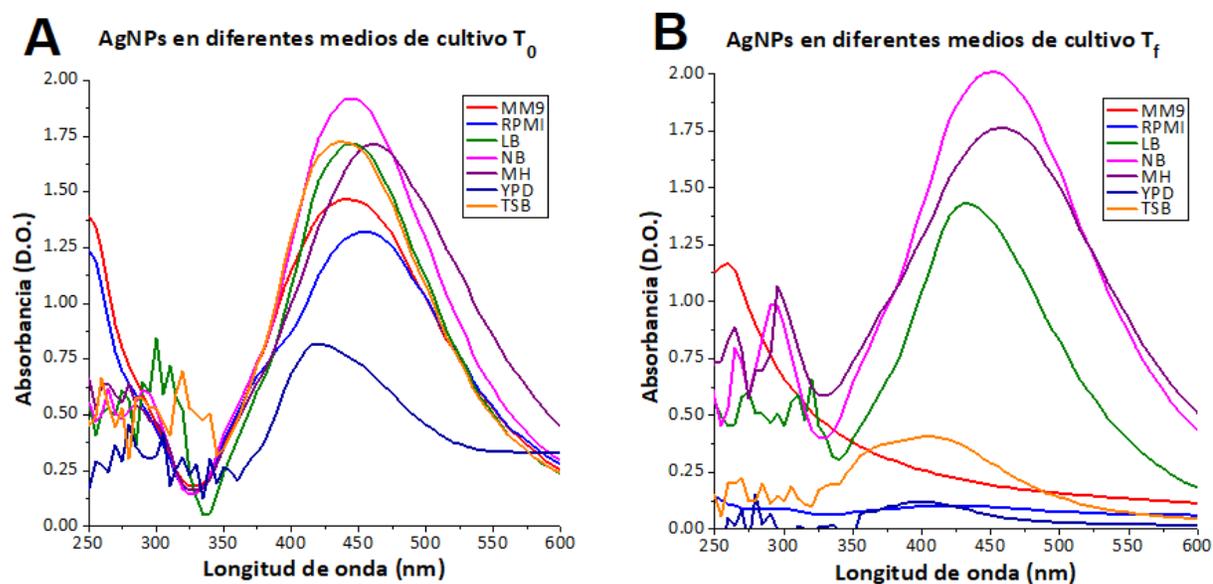
### 3.3.2 Efecto del medio de cultivo en las AgNPs: caracterización espectrofotométrica

En el presente trabajo, la complejidad del medio se define con base en su composición (apéndice 1). Los medios de cultivo, organizados por su complejidad, se enlistan en el siguiente orden: M9, RPMI, LB, NB, MH, YPD Y TSB.

#### Espectrofotometría UV-Vis de las AgNPs expuestas a los distintos medios de cultivo.

Algunos medios de cultivo modificaron el espectro de absorbancia de las AgNPs. En el tiempo cero, el plasmón superficial de las AgNPs fue el esperado, aunque en el medio YPD su altura fue menor. Por otro lado, en el tiempo final, el plasmón superficial esperado sólo se observó en los medios M9, LB y MH; mientras que en YPD fue mucho menor. En otros medios el espectro de absorbancia no presentó el perfil esperado para las AgNPs (Figura 31).

Los cambios en el plasmón superficial de las AgNPs podrían ser evidencia de una modificación en la morfología y tamaño de las AgNPs. Estos cambios podrían atribuirse a los distintos componentes de los medios de cultivo. El plasmón superficial depende de diversos factores, tales como el tamaño y forma de la partícula, así como la composición del medio circundante (Cruz & Rodríguez 2012). Esto último podría explicar el por qué observamos cambios en el perfil de absorbancia de las AgNPs en los distintos medios de cultivo, bajo las mismas condiciones de manejo y medición de los nanomateriales.



**Figura 31. Perfiles de absorbancia de las AgNPs en distintos medios de cultivo.** Se observan los espectros de las AgNPs en diferentes medios de cultivo, en el tiempo cero –inicial- (A) y en el tiempo final (B). Las gráficas por separado están en el apéndice

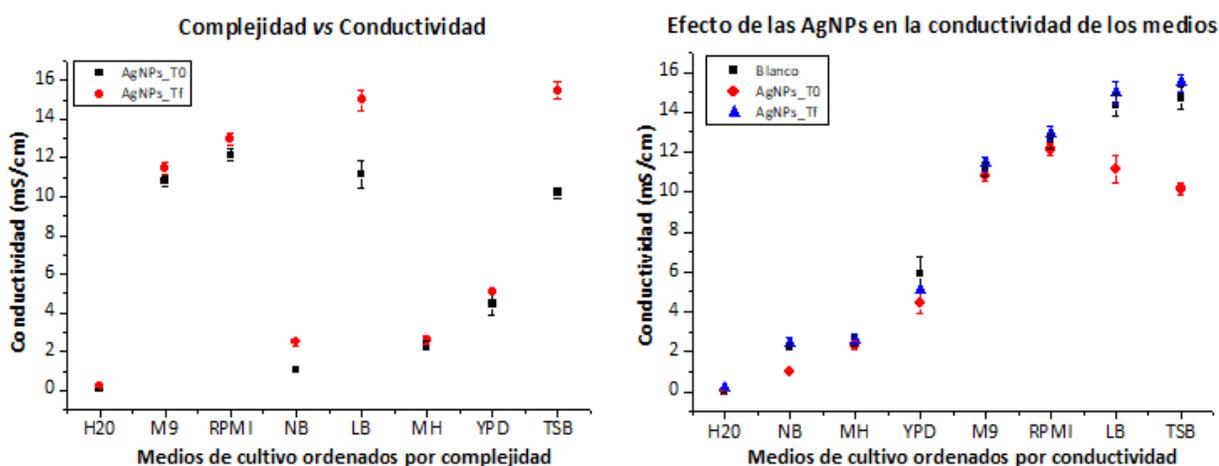
#### Conductividad eléctrica y espectroscopía de dispersión de luz dinámica en diferentes medios

Se evaluó la conductividad en los diferentes medios de cultivo, con y sin AgNPs (Tabla 9). Se observó que la conductividad del medio es independiente de su complejidad (Figura 32a). El orden de los medios con base en su complejidad es distinto de su categorización con base en su conductividad. Asimismo, la presencia de AgNPs, en los tiempos iniciales ( $t_0$ ) y finales ( $t_f$ ), no modifica la conductividad en la mayoría de los medios de cultivo (Figura 32b). Sólo en los medios LB y TSB –ambos en el  $t_0$ - se observó una diferencia en la conductividad.

**Tabla 9. Diferencia en la conductividad en los diferentes medios de cultivo.** La conductividad de los medios con nanopartículas de plata mostró un incremento en los tiempos finales.

	Conductividad (mS/cm)		
	$t_0$ *	$t_f$ **	$\Delta$ ***
H2O	0.06	0.18	+0.12
M9	10.80	11.43	+0.63
RPMI	12.13	12.97	+0.83
NB	1.03	2.48	+1.44
LB	11.17	14.97	+3.80
MH	2.34	2.62	+0.28
YPD	4.47	5.10	+0.64
TSB	10.15	15.47	+5.32

\* $t_0$  = tiempo inicial; \*\* $t_f$  = tiempo final; \*\*\* $\Delta$  = diferencia en los valores entre  $t_0$  y  $t_f$ .



**Figura 32. Conductividad en los medios de cultivo.** La conductividad de los medios de cultivo es independiente de su complejidad (izquierda). El efecto de las AgNPs ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) en la conductividad fue diferente en cada medio de cultivo (derecha). En la gráfica de la izquierda los medios están ordenados acorde a su complejidad (composición), mientras que en la gráfica de la derecha está ordenada acorde a la conductividad de los medios de cultivo sin AgNPs.

El tamaño y estabilidad de las AgNPs varió según el medio de cultivo, tanto en los tiempos iniciales como en los tiempos finales. Los valores del potencial Z de las AgNPs estuvieron en el intervalo de los  $-8.16 \text{ mV}$  a los  $-16.9 \text{ mV}$  en el tiempo inicial, con un valor de  $-14.1$  para las AgNPs en el  $\text{H}_2\text{O}_d$ . En el tiempo final, los

valores estuvieron en el intervalo de los -10.79 a los 24.4 mV, con un valor de -20.5 para el H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. El valor absoluto de potencial Z de las AgNPs tiende a aumentar en los tiempos finales, con respecto a los valores de cada medio en los tiempos iniciales (Tabla 10). El signo del potencial zeta señala la carga neta de la AgNPs –negativas en el caso de Argovit-, mientras que el valor numérico su estabilidad. Acorde a los valores obtenidos, las AgNPs tendieron a ser más estables en los tiempos finales.

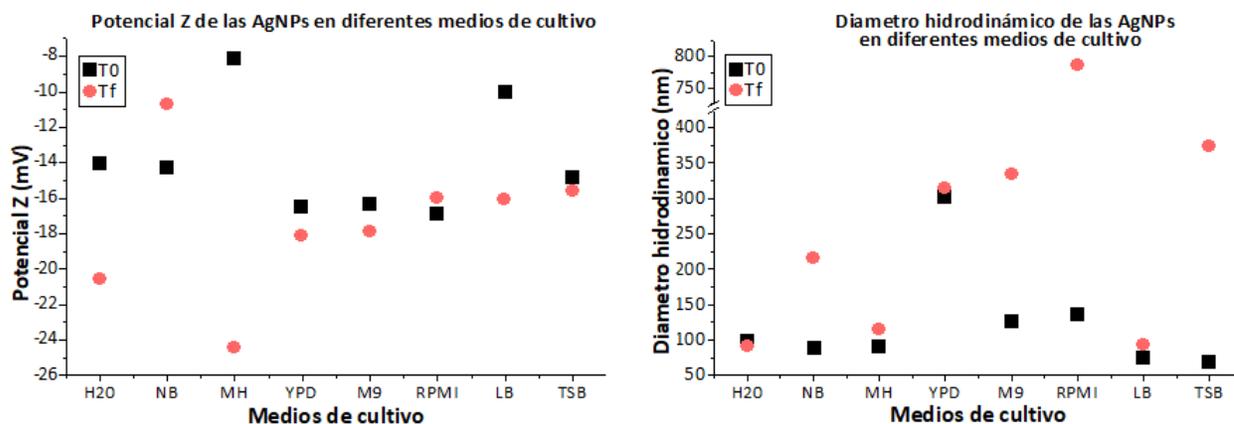
El diámetro de las AgNPs se encontró en el intervalo de los 67.37 a los 136.2 nm en el tiempo inicial; el diámetro en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> fue de 95.31 nm. En el tiempo final, el diámetro estuvo en intervalo de los 90.05 a los 784 nm; en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, el diámetro fue 92.15 nm. En el tiempo inicial, las AgNPs en los medios YPD, M9 y RPMI, mostraron un diámetro mayor al promedio–122 nm-, mientras que en la mayoría de los medios el tamaño fue a los 100 nm. El diámetro de las AgNPs tendió a crecer en los tiempos finales, éste incremento fue distinto en cada medio de cultivo (Tabla 10). Ya se ha reportado el efecto del pH en el potencial zeta y en el diámetro hidrodinámico de las AgNPs (Badawy et al. 2010; Zhou et al. 2016), pero no se había evaluado el efecto de los medios de cultivo –en las AgNPs- en estos parámetros. Por otro lado, ya se ha evaluado el efecto de los medios de cultivo en el AgNO<sub>3</sub> y en su actividad antimicrobiana (Zhang et al. 2014).

**Tabla 10. Análisis DLS de las AgNPs en los diferentes medios de cultivo.** Las AgNPs tendieron a ser más estables y de mayor tamaño en los tiempos finales.

	Potencial Z			Diámetro Hidrodinámico		
	t <sub>0</sub> *	t <sub>f</sub> **	Δ ***	t <sub>0</sub> *	t <sub>f</sub> **	Δ ***
<b>H2O</b>	-14.10	-20.50	-6.40	95.31	92.15	-3.16
<b>NB</b>	-14.30	-10.80	+3.50	87.83	215.1	+127.27
<b>MH</b>	-8.16	-24.40	-16.24	89.81	113.60	+23.79
<b>YPD</b>	-16.40	-18.10	-1.70	299.6	314.00	+14.40
<b>M9</b>	-16.50	-17.90	-1.40	124.5	332.40	+207.90
<b>RPMI</b>	-16.90	-16.00	+0.9	136.2	784.20	648.00
<b>LB</b>	-9.98	-16.00	-6.02	77.67	90.05	12.38
<b>TSB</b>	-14.80	-15.60	-0.80	67.37	373.50	306.13

\*t<sub>0</sub> = tiempo inicial; \*\*t<sub>f</sub> = tiempo final; \*\*\*Δ = diferencia en los valores entre t<sub>0</sub> y t<sub>f</sub>.

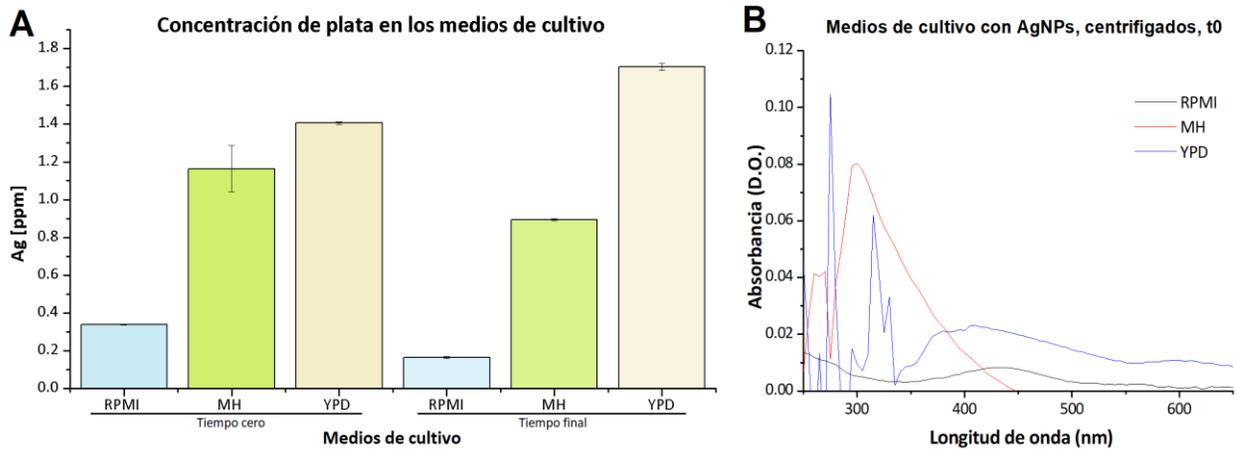
Tanto en los tiempos finales como iniciales, no se observa una relación entre la complejidad del medio y el diámetro hidrodinámico o la estabilidad de las AgNPs (Figura 33). Tampoco se encontró una relación – en tiempos finales o iniciales- entre la conductividad y el diámetro hidrodinámico o la estabilidad de las AgNPs. Aun así, hay una aparente tendencia a que el diámetro hidrodinámico de las AgNPs aumente con la conductividad del medio, pero el coeficiente de correlación del diámetro hidrodinámico es muy bajo ( $R^2 = 0.1835$ ), como se muestra en la Figura 33.



**Figura 33. Potencial Z vs diámetro hidrodinámico de las AgNPs en los medios de cultivo.** No hay una relación aparente entre la complejidad del medio y la estabilidad de las AgNPs (izquierda) o el diámetro hidrodinámico (derecha); tanto en el tiempo inicial como en el tiempo final.

#### Cuantificación de plata –iónica y en cúmulos- en medios de cultivo estándar

La liberación de iones de plata es diferente en los medios de cultivo RPMI, MH y YPD (la composición de los medios de cultivo se describe en el apéndice 1). El análisis de espectroscopía ICP-OES mostró una concentración diferente de plata en los medios de cultivo centrifugados, tanto en los tiempos iniciales (t0) como en los tiempos finales (tf) (Figura 34a). La concentración inicial fue de  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ . El medio RPMI tuvo la concentración de plata más baja,  $0.025 \mu\text{g ml}^{-1}$ , mientras que YPD tuvo la mayor concentración  $1.7 \mu\text{g ml}^{-1}$ . El espectro UV-vis de los medios centrifugados mostró una presencia –mínima, acorde a la densidad óptica-, de AgNPs y cúmulos  $\text{Ag}_n^{\delta+}$  (280-380 nm) (Pestryakov & Davydov 1995; Bogdanchikova et al. 1994) en los medios de cultivo después de la centrifugación (Figura 34b).



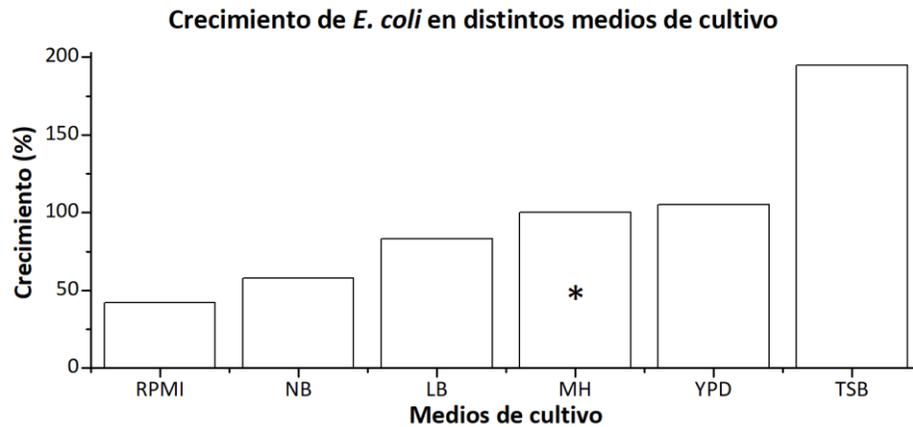
**Figura 34. Concentraciones de plata en los diferentes medios de cultivo.** Se observa una diferencia en el contenido de plata (ppm) en los diferentes medios de cultivo, por ICP-OES (A), en los tiempos iniciales y finales. El perfil UV-Vis muestra que la presencia de las AgNPs, post-centrifugación, es mínima en los diferentes medios de cultivo (B), en los tiempos iniciales.

Los medios de cultivo afectan la liberación de plata en las AgNPs, lo que podría ayudar a complementar la explicación sobre la influencia de los medios de cultivo en la capacidad antimicrobiana de las AgNPs. El análisis ICP-OES mostró que la concentración de plata en los medios –a las 24 h de incubación-, fue similar en los medios con y sin microorganismos (no se muestran los datos). Esto fue contrario a lo esperado, pues tanto la presencia de los microorganismos, como su efecto en el medio de cultivo –liberación de metabolitos, consumo de biomoléculas, cambios de pH, entre otros-, deberían de modificar la concentración de plata disponible, pero dicho efecto no fue observado.

### 3.3.3 Efecto de los medios de cultivo sobre el crecimiento microbiano

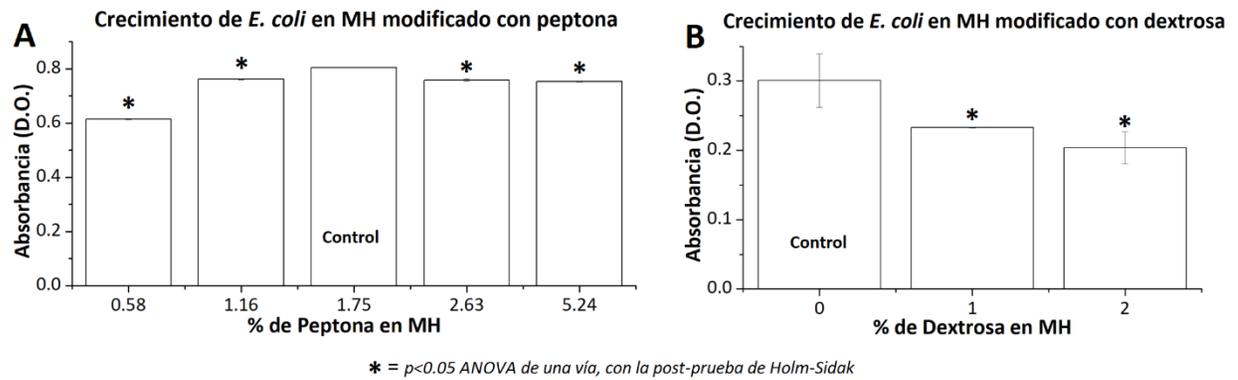
El crecimiento de *E. coli* fue diferente en cada medio de cultivo. La densidad de células se incrementó acorde a la complejidad del medio de cultivo (Figura 35). El menor crecimiento se presentó en RPMI, mientras que el mayor crecimiento se presentó en el medio TSB. Es importante considerar esta diferencia –en el crecimiento de *E. coli*- al momento de realizar y/o comparar pruebas para evaluar a las AgNPs y otras sustancias con propiedades antimicrobianas.

Es fundamental trabajar en condiciones estandarizadas, con la finalidad de minimizar los factores que pueden alterar no sólo a las AgNPs –como se demostró en apartados anteriores- sino también al crecimiento o metabolismo microbiano –como se observó en estos resultados. Como ejemplo, el CLSI recomienda el medio MH, debido a su estabilidad y la factibilidad para replicar los resultados (CLSI 2015).



**Figura 35. Crecimiento relativo de *E. coli* en distintos medios.** Porcentaje relativo de crecimiento –tomando al MH (\*) como 100 %- en diferentes medios de cultivo, ordenados acorde a la complejidad de sus componentes.

El crecimiento de *E. coli* en MH suplementado –tanto con peptona como con dextrosa- mostró algunas diferencias con respecto al control (Figura 36). El crecimiento óptimo se presentó en las versiones estándar de los medios: MH con 17.5 % de peptona y MH sin dextrosa añadida. La complejidad de medio -dada por sus componentes- influye en el crecimiento bacteriano, tal y como se observa en los medios RPMI, MH y TSB, por ejemplo (Figura 35). Las diferencias en el crecimiento microbiano son estadísticamente significativas en los medios modificados, pero en todos los casos fue menor al crecimiento del medio sin modificar (control).



**Figura 36. Crecimiento de *E. coli* en medio MH suplementado.** Crecimiento en medio MH modificado, con diferentes concentraciones de peptona (A) y dextrosa (B).

### 3.3.4 Efecto de los medios de cultivo en la actividad antimicrobiana de las AgNPs

#### Efecto de la modificación de los medios de cultivo en la capacidad antimicrobiana de las AgNPs

La concentración de peptona y dextrosa tiene un efecto directo en la actividad antimicrobiana de las AgNPs. Conforme aumenta la concentración de peptona o dextrosa en el medio, se requiere una mayor cantidad de AgNPs para inhibir el crecimiento microbiano (Tabla 11). En la variante del medio con menor contenido de peptona (0.58%), la CMI de las AgNPs fue  $\leq 7.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  (69.5 nM). Por otro lado, en la variante que contiene el mayor contenido de peptona (5.24%), la CMI de las AgNPs fue de  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  (185.5 nM). Para *C. albicans*, las modificaciones de peptona tuvieron un menor efecto sobre la actividad antimicrobiana de los AgNPs. Aun así, el valor de la CMI aumentó junto con el incremento de la concentración de peptona; de  $45 \mu\text{g ml}^{-1}$  (417.5 nM) a  $>50 \mu\text{g ml}^{-1}$  (463.5 nM).

**Tabla 11. Efecto de la suplementación del medio en la CMI de las AgNPs.** Suplementación con peptona y dextrosa en los medios MH y YPD, para evaluar su efecto en la actividad antimicrobiana de las AgNPs.

<i>E. coli</i> en medio MH				<i>C. albicans</i> en medio YPD	
Peptona		Dextrosa		Peptona	
(%)	CMI*	(%)	CMI*	(%)	CMI*
0.58	≤7.5 (69.5 nM)	0	15	7	45
1.16	12.5 (115.9 nM)	1	>20	20	50
1.75	15 (139.1 nM)	2	>20	30	>50
2.63	17.5 (162.2 nM)	N/A	N/A	N/A	N/A
5.24	20 (185.4 nM)	N/A	N/A	N/A	N/A

\*La CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) está en  $\mu\text{g ml}^{-1}$

La suplementación –del medio MH con peptona- también afectó a la capacidad antimicrobiana del antibiótico kanamicina (km). La CMI del antibiótico fue de  $0.25 \mu\text{g ml}^{-1}$  (0.5 nM) cuando el medio tiene 0.58% de peptona, y de  $2 \mu\text{g ml}^{-1}$  (4.1 nM) cuando tiene 5.34% (Tabla 12). El efecto –en la capacidad antimicrobiana- de la suplementación del medio fue mucho mayor en la km que en las AgNPs. En éstas, la CMI pasó de 69.5 nM a 185.5 nM –un incremento de casi tres veces la concentración original- (tabla 11), mientras que con la Km la diferencia fue de casi ocho veces, bajo las mismas condiciones (tabla 12).

**Tabla 12. Actividad de la Km en medio de cultivo suplementado.** Suplementación con peptona en el medio MH, para evaluar su efecto en la actividad antimicrobiana de la Km.

<i>E. coli</i> en medio MH	
Peptona (%)	CMI ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )
0.58	0.25 (0.52 nM)
1.16	0.5 (1.03 nM)
1.75	0.5 (1.03 nM)
2.63	1 (2.06 nM)
5.24	2 (4.12 nM)

El incremento de la CMI de las AgNPs y de la km muestra una tendencia diferente a la del crecimiento de *E. coli* en los medios de cultivo suplementados con peptona (Figura 36). En los medios sin tratamientos el crecimiento óptimo fue en la versión estándar de MH (1.75 % de peptona), y el menor en los extremos (menor y mayor concentraciones de peptona). En los medios con AgNPs o Km, el crecimiento incrementó proporcionalmente al aumento en la concentración de peptona.

Estos resultados muestran que algunos componentes del medio de cultivo –tales como la peptona o la dextrosa-, impactan en la actividad antimicrobiana de los tratamientos. El efecto podría deberse ya sea por el incremento en la capacidad de la célula bacteria para resistir a dichos agentes, o por la interacción directa entre los componentes del medio y los tratamientos, lo que incide en la capacidad antimicrobiana de éstos. En el caso de la kanamicina, la suplementación de peptona afectó su actividad antimicrobiana (se incrementó la CMI ocho veces), aunque en las AgNPs la influencia fue menor (un incremento de la CMI de casi tres veces). En otros medios de cultivo –modificados- se observó el mismo fenómeno, la CMI de las AgNPs incrementó de manera proporcional al contenido de peptona.

#### Efecto del pH en la actividad antimicrobiana de las AgNPs en bacterias

Las variaciones de pH en el medio MH mostraron poco efecto sobre la actividad antimicrobiana de las AgNPs. La actividad antimicrobiana de las AgNPs muestra un ligero incremento a pH básico ( $\text{pH}=8.5\pm 0.2$ ), contrario a la actividad en el medio con un pH más ácido ( $\text{pH}=6.5\pm 0.2$ ). La CMI en el medio MH-básico fue de  $7.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ , mientras que en el pH ácido fue de  $12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ , estas variaciones están cercanas al rango de variación de la CMI en condiciones estándar ( $10$  a  $12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), por lo que se considera que la influencia del pH es mínima, en el intervalo de los valores analizados. Los resultados respecto a la influencia del pH en la actividad antibacteriana de las AgNPs ya se han estudiado en otros trabajos, en otros intervalos y bajo distintas condiciones. Se ha observado que el pH básico propicia la liberación de plata iónica, lo que influye en su actividad (Fabrega et al. 2009).

### Efecto del medio de cultivo en la actividad antimicrobiana de las AgNPs

En *E. coli*, se evaluó el efecto en los medios RPMI, NB, LB, MH, YPD y TSB; mientras que para *C. albicans* se evaluó en RPMI, SD y YPD. Las CMI de las AgNPs en *E. coli* y en *C. albicans* son diferentes en cada medio de cultivo –bajo las mismas condiciones de incubación. En *E. coli*, las CMI variaron de 0.25 a 15  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de plata; mientras que en *C. albicans* estuvieron entre 0.5 y 45  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de plata (Tabla 13). En bacterias y hongos, las CMI varían hasta en dos órdenes de magnitud, de  $10^{-1}$  a  $10^1$  de  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de plata. El valor de las CMI tiende a incrementar conforme aumenta la complejidad del medio de cultivo. A pesar de que el medio de cultivo –sin tratamiento- influye en el crecimiento microbiano, la suplementación del medio no influye en la densidad de células, a las 24 h de incubación.

**Tabla 13. Efecto del medio en la CMI de las AgNPs.** Determinación de las CMI de las AgNPs en diferentes medios de cultivo.

<i>E. coli</i>		<i>C. albicans</i>	
Medio	CMI*	Medio	CMI*
RPMI	0.5	RPMI	0.5
NB	2.5	SD	3
LB	1	YPD	45
MH	12	N/A	N/A
YPD	15	N/A	N/A
TSB	15	N/A	N/A

\*La CMI está en  $\mu\text{g ml}^{-1}$

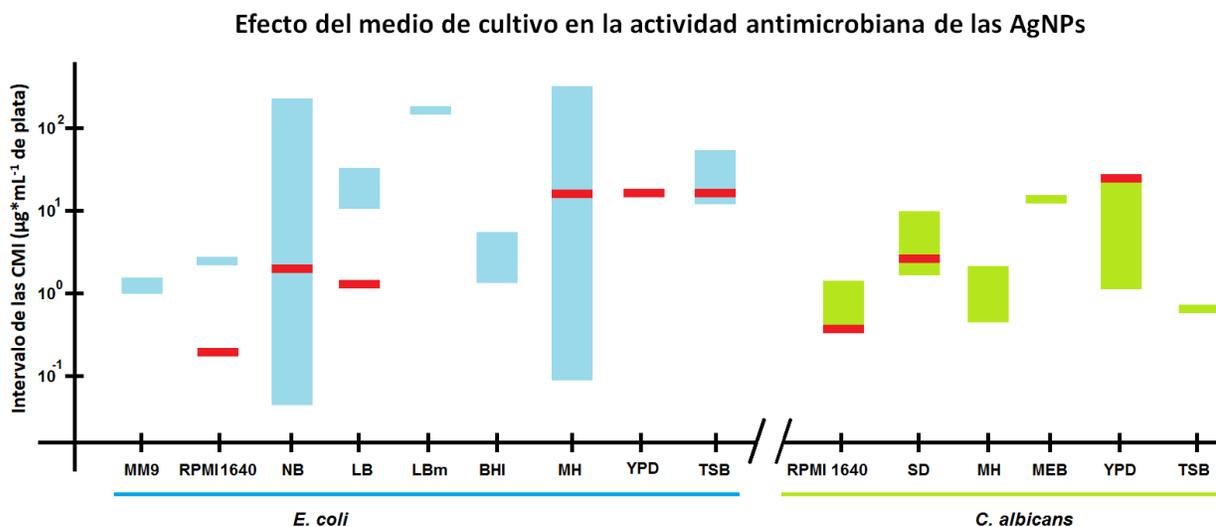
Es fundamental considerar la influencia del medio de cultivo en la actividad antimicrobiana de las AgNPs –como nanoantibióticos. En los reportes de investigación original se señala el uso de diferentes medios de cultivo (Li et al. 2005; M. Ghosh et al. 2010; Radzig et al. 2013), sin considerar –aparentemente- su efecto en el crecimiento bacteriano. Según el medio de cultivo usado, las AgNPs pueden presentar diferentes valores –puntuales o en intervalos-, debido al efecto del medio de cultivo (Tabla 14). Por tanto, la potencia antimicrobiana no puede ser comparada de manera adecuada, debido a que no se comparan bajo condiciones estandarizadas.

**Tabla 14. CMI de las AgNPs para *E. coli* y *C. albicans* en diferentes medios de cultivo.** Las AgNPs presentan diferentes valores –e intervalos de valores- según el medio de cultivo usado.

Cepa	Medio de cultivo	Tratamiento ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )		Referencias
		MIC	Intervalo	
<i>E. coli</i>	M9	1	$10^0$	(Lok et al. 2007)
	RPMI 1640	20	$10^1$	(Greulich et al. 2012)
	NB	0.1 - 180	$10^{-1}$ - $10^2$	(Ruparelia et al. 2008; Radzig et al. 2013; Agnihotri et al. 2014)
	LB	25 - 40	$10^1$	(Li et al. 2005; Morones et al. 2005)
	LB_mod*	125	$10^2$	(Du et al. 2012)
	BHI*	1.7 - 6	$10^0$	(Martinez-Gutierrez et al. 2010; Martínez-Gutierrez et al. 2012; Tamboli & Lee 2013)
	MH	0.8 - 50	$10^{-1}$ - $10^1$	(Martinez-Castanon et al. 2008; W.-R. R. Li et al. 2010; Negm et al. 2014; Suchomel et al. 2015; Hoskote Anand & Mandal 2015; Panáček et al. 2016)
	TSB	11.25 - 88	$10^1$	(Gutarowska et al. 2012; Brandt et al. 2012)
<i>C. albicans</i>	RPMI 1640*	0.8 - 1.6	$10^{-1}$ - $10^0$	(Monteiro et al. 2011)
	SD	1.68 - 6.2	$10^0$	(Martinez-Gutierrez et al. 2010; Ishida et al. 2014)
	MH	0.4 - 2.5	$10^{-1}$ - $10^0$	(Panáček et al. 2009; Suchomel et al. 2015)
	MEB	11.25	$10^0$	(Gutarowska et al. 2012)
	YPD	2 - 42	$10^0$ - $10^1$	(Hwang et al. 2012; Vazquez-Muñoz et al. 2014)
	TSB	0.88	$10^{-1}$	(Brandt et al. 2012)

\* LB\_mod= LB modificado (0.25% triptona, 0.125% extracto de levadura, sin NaCl); BHI= Infusión de corazón-cerebro, TSB= Caldo tripteína-soya; MEB= Caldo de extracto de malta.

Los resultados experimentales concuerdan con lo reportado en la literatura: las CMI en *E. coli* y *C. albicans* presentan diferentes intervalos de valores, según el medio de cultivo usado, entre otros parámetros – inóculo inicial, tiempo de cultivo, etc. Es clara la influencia del medio de cultivo en la actividad antimicrobiana de las AgNPs, tanto en bacterias como en hongos. La CMI de las AgNPs se relaciona directamente con la complejidad del medio de cultivo (Figura 37). Es fundamental considerar el medio de cultivo en las pruebas antimicrobianas debido a que influye directamente en su actividad.



**Figura 37. Actividad antimicrobiana de las AgNPs en distintos medios.** Las CMI de las AgNPs podrían depender de la complejidad del medio de cultivo. Las barras de color azul y verde (*E. coli* y *C. albicans*, respectivamente) muestran el intervalo de valores de la CMI (en  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de plata) reportados en la literatura, mientras que las líneas rojas representan nuestros valores experimentales de las CMI.

### 3.4 Mecanismos de acción de la combinación de las AgNPs y antibióticos

Se encontró un incremento en la actividad antimicrobiana en tratamientos combinados de AgNPs con algunos antibióticos –kanamicina y cloranfenicol. Por otro lado, en otras combinaciones –con antibióticos  $\beta$ -lactámicos se observó efecto de indiferencia. No se observó efecto antagónico en ninguna combinación.

#### 3.4.1 CMI de AgNPs y antibióticos

Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias de los antibióticos para bacterias y hongos. Cada cepa microbiana mostró un perfil distinto de susceptibilidad a los antibióticos. En el caso de las bacterias, la CMI se encontró en el rango de 0.05 a 32  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; dependiendo del antibiótico y la cepa. La CMI de las AgNPs estuvo entre 10 y 12  $\mu\text{g ml}^{-1}$  en todas las cepas; mientras que para el  $\text{AgNO}_3$  fue de 6 a 7  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Las CMI de las AgNPs y del  $\text{AgNO}_3$  fueron similares en todas las especies bacterianas, independientemente de su perfil de resistencia a los antibióticos comerciales (Tabla 15). En algunos trabajos se ha reportado que la plata iónica es más tóxica que las AgNPs (Pradhan et al. 2011; Ivask et al. 2014).

Se ha señalado que las CMI de las AgNPs son diferentes según la cepa microbianas evaluadas (Shrivastava et al. 2007; Yoon et al. 2007; Ruparelia et al. 2008), pero en el presente trabajo no se observaron tales diferencias, la CMI fue prácticamente la misma para las cuatro especies.

**Tabla 15. CMI de los tratamientos antimicrobianos en bacterias.** Determinación de las CMI de las AgNPs, el AgNO<sub>3</sub> y los antibióticos en bacterias Gram positivas y Gram negativas, tanto patógenas como no patógenas.

Especies bacterianas	AgNPs	AgNO <sub>3</sub>	Cm	Km	Amp	Bpm	Azm
<i>E. coli</i>	10	6	0.75	0.1	2	0.05	1
<i>S. Typhimurium</i>	10	7	1	0.25	0.5	0.05	0.05
<i>S. aureus</i>	12	7	0.1	32	0.5	0.05	0.05
<i>B. subtilis</i>	11	7	16	0.25	0.1	0.25	32

Cm= cloranfenicol; Km=kanamicina; Amp= ampicilina; Bpm= biapenem, Azm= Aztreonam

En el caso de los hongos, las CMI de los agentes antifúngicos varió de 0.1 a >40 µg ml<sup>-1</sup>. Por otro lado, en el caso de las AgNPs, las CMI variaron de 0.1 a 1 µg ml<sup>-1</sup> y de 0.1 a 0.5 µg ml<sup>-1</sup> para el AgNO<sub>3</sub> (Tabla 16). Se observó una diferencia de 1 orden de magnitud en el efecto de las AgNPs entre las cepas. En general, *Fusarium* fue más sensible que *Candida* a los tratamientos con plata. Los compuestos de plata ejercieron su efecto independientemente del perfil de resistencia de los microorganismos. Al igual que con las bacterias, se ha señalado en la literatura que en los hongos hay diferencias en la toxicidad de las AgNPs y la plata iónica (Panáček et al. 2009)

**Tabla 16. CMI de los tratamientos antimicrobianos en hongos.** Determinación de las CMI de AgNPs, AgNO<sub>3</sub> y antibióticos en hongos levaduriformes y miceliales.

Especies fúngicas	AgNPs	AgNO <sub>3</sub>	Flu*	Csp*	ApB*
<i>C. albicans</i>	1	0.5	1	10	10
<i>C. glabrata</i>	0.5	0.5	10	1	10
<i>F. oxysporum</i>	0.1	0.1	>40	0.1	40

Flu= Fluconazol; Csp= caspofungina; ApB=Anfotericina B

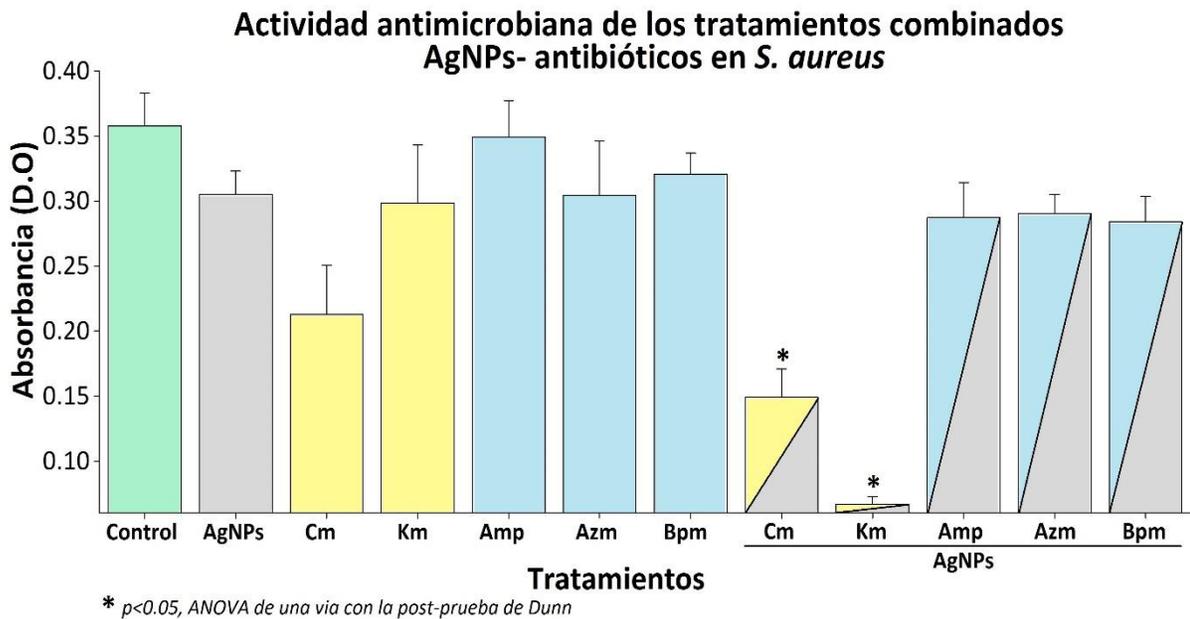
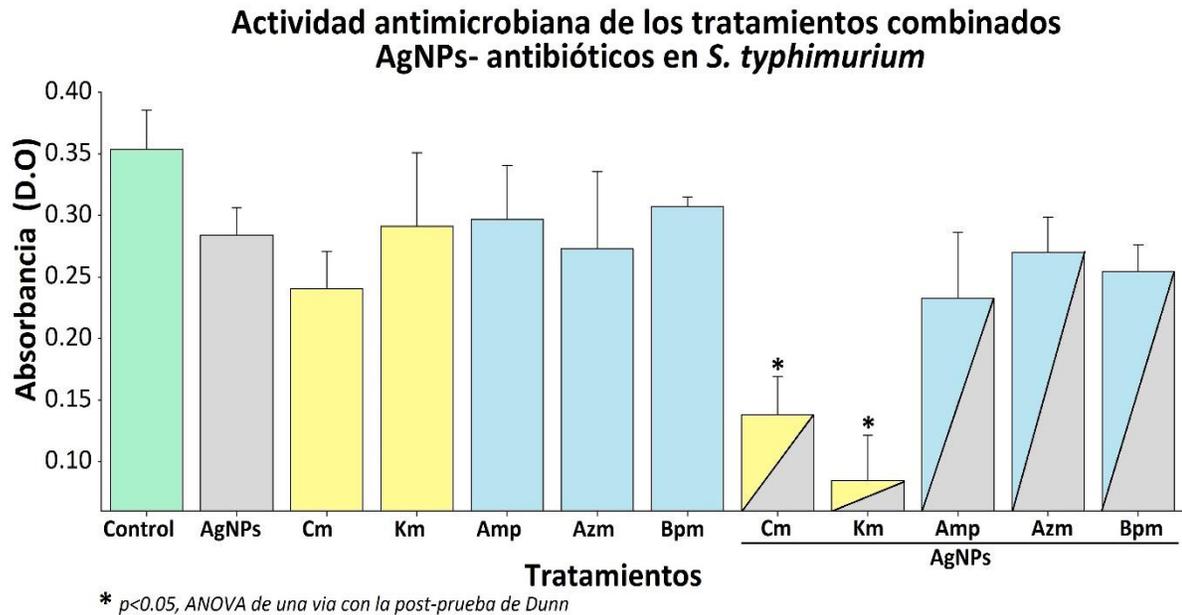
Según los criterios de las guías M100-S17 (NCCLS 2007) y M45-P (Hindler n.d.), *E. coli* y *S. Typhimurium* fueron sensibles a todos los antibióticos; *S. aureus* mostró sensibilidad contra cloranfenicol, biapenem y aztreonam, pero fue resistente a ampicilina y a kanamicina; finalmente, *B. subtilis* fue resistente al cloranfenicol y sensible a la ampicilina, pero no hay criterios para establecer su susceptibilidad contra el resto de los antibióticos.

Asimismo, acorde al protocolo M27-A3 del CLSI (John H. & Mahmoud A. 2008), *C. albicans* fue sensible al Fluconazol, pero resistente a la caspofungina; mientras que *C. glabrata* fue sensible tanto a fluconazol como a caspofungina. Si se comparan las CMI de la anfotericina B –en ambas especies de *Candida*- con los valores de las cepas de referencia del CLSI, ambas tendrían un perfil de resistencia contra este antifúngico. Finalmente, *F. oxysporum* fue resistente tanto a la anfotericina B como al fluconazol, pero no hay estándar para definir su sensibilidad contra la caspofungina.

#### 3.4.2 Efecto en la actividad en tratamientos combinados de AgNPs con antibióticos

La inhibición parcial en el crecimiento microbiano –expuesto a concentraciones sub-letales de los tratamientos- se determinó mediante espectrofotometría. Algunos tratamientos combinados de AgNPs con antibióticos mostraron un incremento en su actividad antimicrobiana con respecto a los tratamientos por separados. Esta actividad aumentada sólo se presentó en las combinaciones AgNPs/kanamicina y AgNPs/cloranfenicol, en todas las cepas. Dependiendo del efecto observado, se puede considerar el efecto como aditivo o sinérgico. No se observó efecto sinérgico en los tratamientos combinados de AgNPs con los antibióticos lactámicos: ampicilina, biapenem y aztreonam (Fig. 38).

El efecto de las nanopartículas de plata en conjunto con agentes antibacterianos ha sido reportado en varios trabajos, a veces con interpretación contraria para las mismas combinaciones (De Souza et al. 2006; Shahverdi et al. 2007; Morones-Ramirez et al. 2013; Bharadwaj et al. 2003; Smekalova et al. 2016; Jyoti et al. 2016; Gokul Raj et al. 2012). En el presente trabajo se evaluó el efecto en tratamientos combinados de antibióticos –de diferentes familias y blancos de acción-, con la finalidad de entender por qué se observa un efecto en su actividad en algunos casos y porque que no en otros. Esto con la meta de elucidar los mecanismos de acción involucrados. Se observó que el incrementó en la actividad antimicrobiana se presentó sólo en los antibióticos que se internalizan en la célula



**Figura 38. Efecto en la actividad antimicrobiana en tratamientos combinados AgNPs-antibióticos.** Se evaluó –por espectrofotometría– el efecto de los tratamientos, en concentraciones sub-letales, en el crecimiento bacteriano. Hay un efecto sinérgico entre las AgNPs y algunos antibióticos. La sinergia se observó con kanamicina (Km) y cloranfenicol (Cm) en todas las cepas, excepto en *B. subtilis*. No hay sinergia con los antibióticos lactámicos en ninguna cepa.

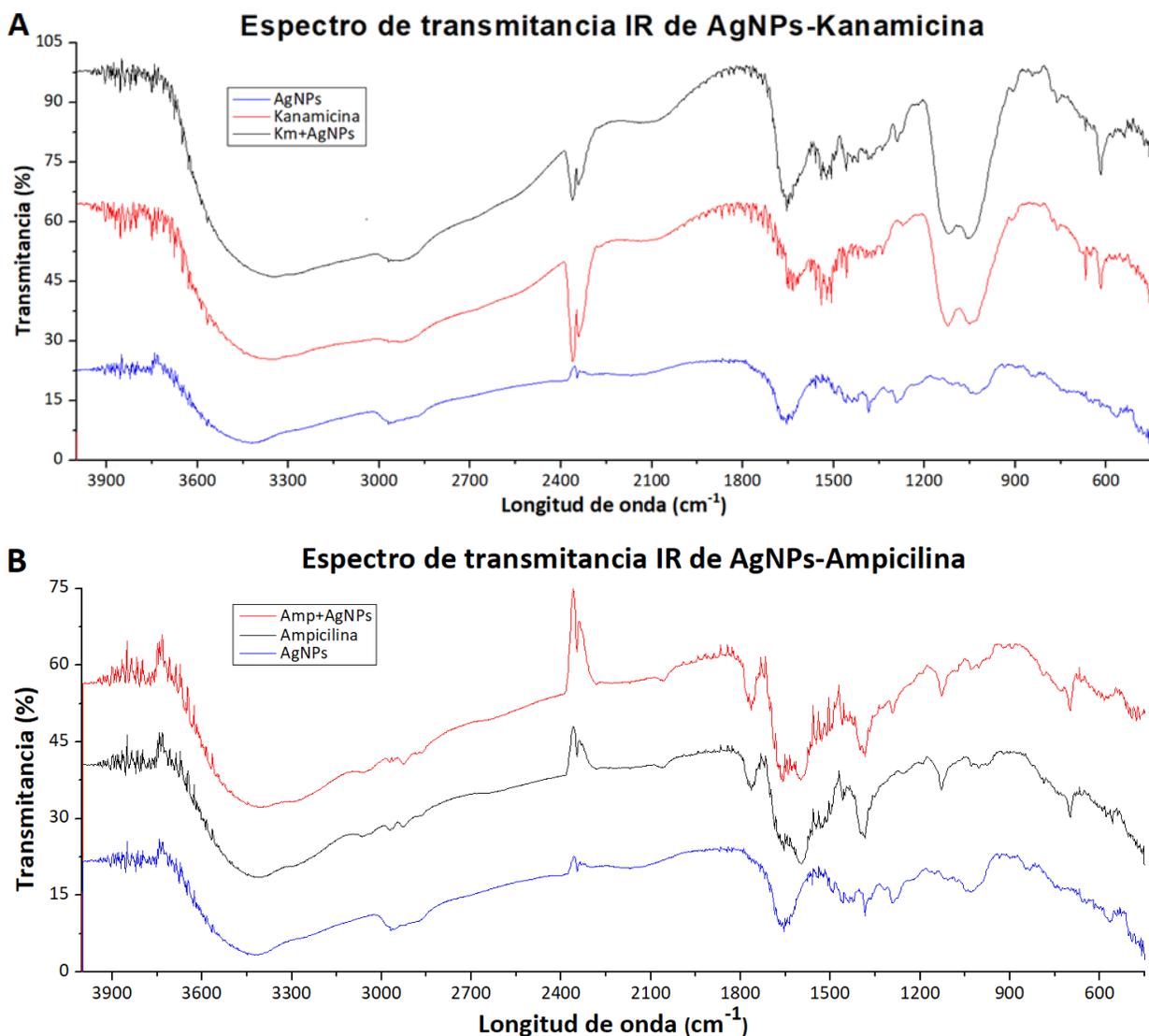
Durante la revisión bibliográfica fue evidente que los efectos aditivos a menudo se confunden con efectos sinérgicos, lo que conduce a un malentendido de los mecanismos sinérgicos. Asimismo, también se observó que algunos reportes señalan que hay efecto sinergia, cuando este efecto no es visible o se

presentan errores de interpretación de la actividad de los tratamientos combinados (Shahverdi et al. 2007; Li et al. 2005; Fayaz et al. 2010). En este tipo de estudios es importante distinguir entre efecto sinérgico, antagonista, aditivo y de indiferencia, tal y como ya ha sido planteado por otros autores (Bollenbach 2015; Smolkova et al. 2015). El estudio de Smolkova (2015) propone un método cuantitativo para distinguir cada uno de los efectos, con base en la cantidad de los agentes antimicrobianos usados.

Por otro lado, en el presente estudio se considera la actividad de los tratamientos combinados con respecto a ambos tratamientos por separado (AgNPs y antibióticos). Así, efecto sinérgico se definió como la inhibición –estadísticamente significativas- en el crecimiento microbiano, con respecto a los tratamientos por separado. Asimismo, se definió el efecto como indiferente, si la inhibición en el crecimiento de los tratamientos combinados era estadísticamente similar a uno de los tratamientos por separado. En el presente trabajo no se encontró un efecto antagónico en los tratamientos combinados –debido al crecimiento microbiano significativamente mayor a los tratamientos por separado.

#### *3.4.3 Análisis por espectroscopía FT-IR*

Se obtuvo el perfil de transmitancia de las AgNPs y los antibióticos –por separado y combinados. En el espectro de transmitancia de los tratamientos combinados no se observaron señales diferentes de las presentes en los perfiles –individuales- de las AgNPs o de los respectivos antibióticos. Así, el análisis de FT-IR señala que no hay una interacción química detectable entre las AgNPs y los antibióticos –en los tratamientos combinados- (Figuras 39a y 39b). Por otro lado, se sugiere complementar este trabajo por técnicas adicionales, tales como espectroscopía RAMAN o por resonancia magnética. Esto permitiría predecir si se presentan otros tipos de interacciones no observables mediante la espectroscopía IR.

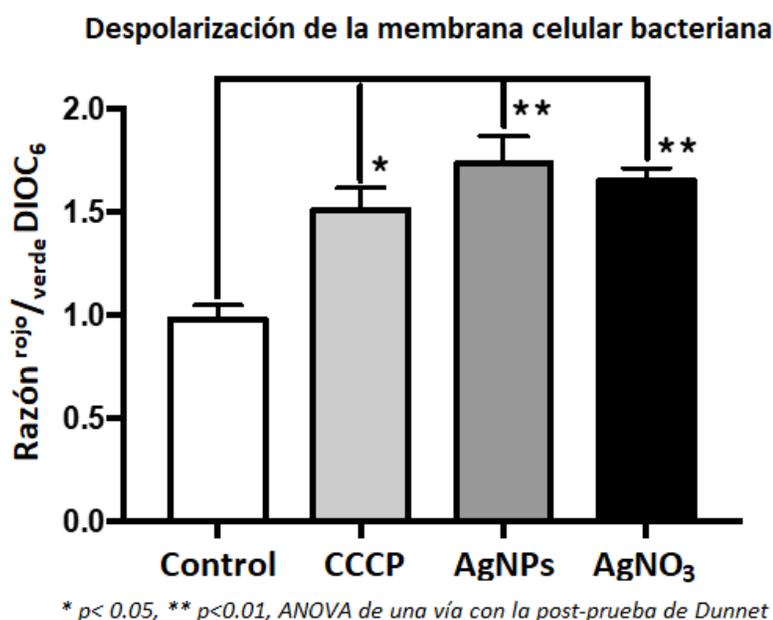


**Figura 39. Análisis por espectroscopía FT-IR de los tratamientos combinados.** Espectros de transmitancia de la kanamicina (a) y de la ampicilina (b) No hay diferencia entre los espectros de AgNPs-antibióticos con respecto a los AgNPs o antibióticos por separado.

Hasta donde sabemos, es la primera vez que se da una aproximación experimental para abordar la interacción entre las AgNPs y los antibióticos. Se ha propuesto, hipotéticamente, que las AgNPs interactúan químicamente con los grupos funcionales de los antibióticos, lo que modifica su actividad. Así, se sugiere que el efecto sinérgico se debe a la formación de un complejo AgNPs-antibiótico (Li et al. 2005; Fayaz et al. 2010) (Figura 11, página 10). Este trabajo muestra que no hay evidencia de dicha interacción química, por lo que el efecto de la sinergia se debe a otros factores.

### 3.4.4 Las AgNPs despolarizan la membrana celular

La plata (AgNPs o AgNO<sub>3</sub>) despolariza a la membrana celular bacteriana en concentraciones sub-letales (Figura 40). El análisis mostró diferencias estadísticamente significativas con los tratamientos de plata, acorde a la razón entre la emisión fluorescente rojo/verde del fluoróforo DiOC<sub>6</sub>. Se ha reportado que la despolarización de la membrana celular induce a un incremento en la permeabilidad de la célula (Nair et al. 2015; Lok et al. 2006; Ramalingam et al. 2016), lo que podría facilitar el ingreso de diferentes moléculas.



**Figura 40.** Efecto de la plata en la polarización de la membrana celular de *E. coli*. Los compuestos de plata despolarizan la membrana celular, en concentraciones sub-letales.

### 4.4.5 Propuesta de mecanismo de acción de los tratamientos combinados AgNPs-antibióticos

Con base en los datos experimentales, proponemos que el efecto sinérgico se debe al mecanismo de acción de los antibióticos, como consecuencia del efecto de las AgNPs en la célula bacteriana. La evidencia experimental no sustenta que el efecto se deba a la interacción química entre las AgNPs y los antibióticos, como se ha propuesto en otros trabajos.

Las AgNPs despolarizan la membrana celular; la despolarización de la membrana celular se asocia al aumento de la permeabilidad celular. Además, algunos artículos de investigación original han reportado que las AgNPs incrementan la permeabilidad celular (Morones et al. 2005; W.-R. R. Li et al. 2010) y desestabilizan a la membrana celular (Lok et al. 2006).

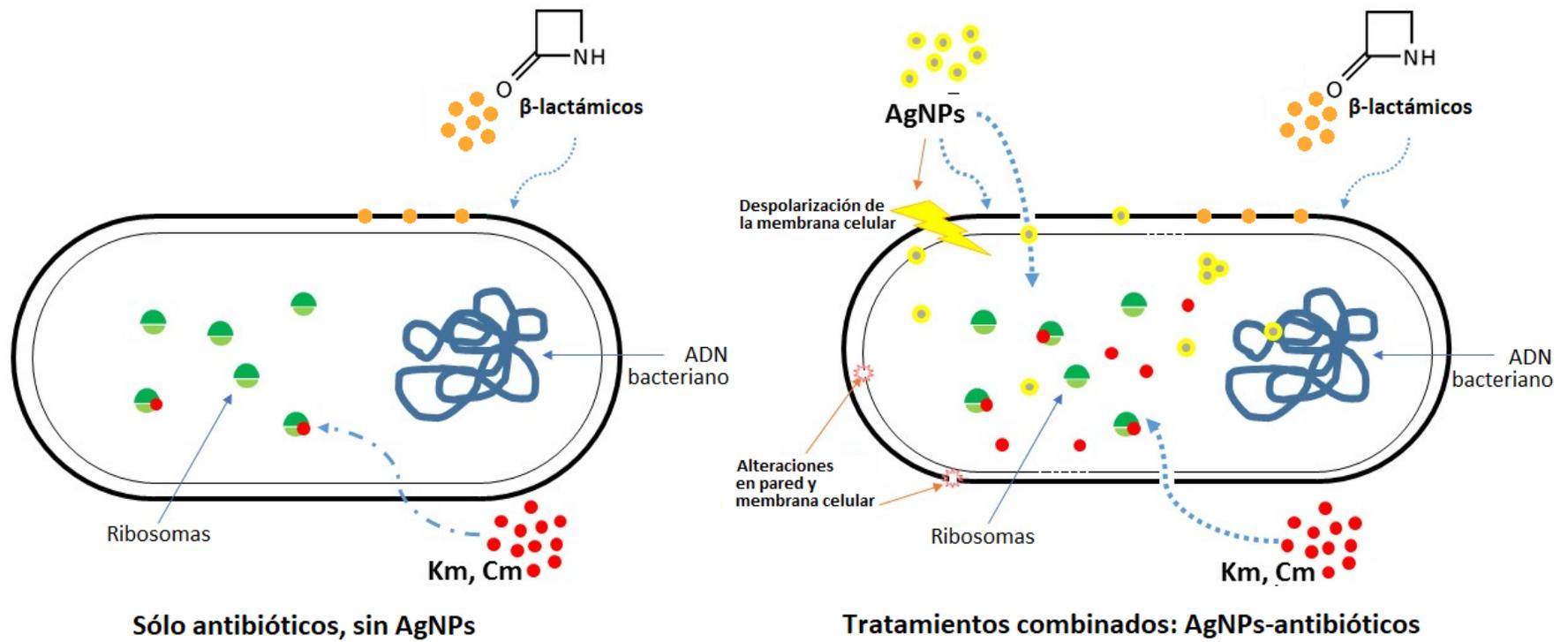
Asimismo, las micrografías del TEM muestran que las AgNPs perturban a la pared celular, este efecto ha sido descrito en otros trabajos, tanto para bacterias (Romero-Urbina et al. 2015; Ramalingam et al. 2016), como para hongos (Vazquez-Muñoz et al. 2014; Lara et al. 2015). Las alteraciones en la ultraestructura podrían incrementar la internalización de sustancias, tales como antibióticos, en la célula.

La kanamicina y el cloranfenicol mostraron un efecto sinérgico cuando se combinaron con AgNPs. Estos antibióticos ejercen su efecto en el interior de la célula, pues su blanco es el ribosoma bacteriano (Wishart et al. 2006). Proponemos que su actividad antimicrobiana es aumentada, debido a que obtienen una internalización facilitada en la célula, mediada por las AgNPs. Esta internalización podría deberse a que las AgNPs desestabilizan tanto a la membrana plasmática como a la pared celular.

Por otro lado, los antibióticos lactámicos –ampicilina, aztreonam y biapenem- no mostraron sinergia con las AgNPs, su interacción fue del tipo indiferencia. Estos antibióticos afectan la integridad de la pared celular bacteriana; por lo que se sugiere que su efecto no es potenciado –por las AgNPs-, debido a que su efecto no depende de su internalización en la célula.

Por tanto, se propone que el mecanismo de sinergia depende principalmente de mecanismo de acción de los antibióticos, mediada por los efectos de las AgNPs en la estructura celular. En los antibióticos cuyo blanco se encuentre en el interior de la célula, se debería de presentar el mecanismo de sinergia. En la Figura 41 se muestra un esquema del mecanismo propuesto, en relación con la interacción de los antibióticos con la célula bacteriana, en presencia o ausencia de AgNPs.

## Mecanismos de interacción en tratamientos combinados



**Figura 41. Propuesta del mecanismo de acción en tratamientos combinados de AgNPs-antibióticos.** Sitio de acción los antibióticos β-lactámicos (pared celular) y de la kanamicina y el cloranfenicol (ribosoma bacteriano) (*izquierda*). Las AgNPs alteran la pared y la membrana celular, facilitando el ingreso intracelular de los antibióticos –kanamicina y cloranfenicol-, lo que potencia su actividad antibacteriana

## Capítulo 4. Conclusiones

---

Tanto el meta-análisis como el trabajo experimental sobre el efecto de las AgNPs en organismos de distinto grado de complejidad biológica, permitieron contrastar los efectos generales de las AgNPs en una mayor escala. Hasta dónde sabemos, éste es el primer estudio experimental que el mismo nanomaterial en una diversidad tan amplia de sistemas biológicos, desde virus hasta células humanas, *in vitro*, a nivel celular.

Se descubrió que la toxicidad de las AgNPs es independiente de la complejidad del sistema biológico, *in vitro*, a nivel celular. La mayoría de las Concentraciones Inhibitorias de las AgNPs estuvieron alrededor de  $10^1 \mu\text{g ml}^{-1}$  de plata. Las AgNPs presentan una actividad no específica en contra de los sistemas biológicos, y afecta a la membrana celular, las proteínas y material genético. Hasta donde sabemos es la primera vez que se describe, experimentalmente, que la toxicidad relativa de las AgNPs en representantes de casi todos los sistemas biológicos. Ésta tendencia es sustentada por un meta-análisis, que lleva a la misma conclusión.

Además, se reveló que el medio de cultivo influye directamente en las propiedades de las AgNPs y su actividad antimicrobiana. La actividad de las AgNPs puede variar hasta en 3 órdenes de magnitud, en función del medio de cultivo empleado, usando las mismas AgNPs y cepa bacteriana. Hasta donde sabemos, es la primera vez que se realiza un estudio específico sobre el efecto del medio de cultivo en las AgNPs.

Se propone que el efecto en la actividad de los tratamientos combinados de AgNPs y antibióticos depende de la ubicación del blanco de éstos últimos –mecanismos de acción–, como consecuencia de la actividad de las AgNPs en la célula. Con base en la revisión bibliográfica, aparentemente no se había descrito antes el mecanismo de sinergia mediante evidencia experimental, desde una perspectiva que evaluara la interacción AgNPs-antibióticos-célula.

A partir del conocimiento generado por el presente trabajo, se propone que los siguiente: 1) Para fines de evaluar la toxicidad clínica y ambiental de un nanomaterial, como parte de las pruebas hay que considerar su actividad en sistemas biológicos de distinto grado de complejidad biológica; 2) Se debe trabajar con métodos estandarizados, que permitan analizar el efecto de diferentes nanomateriales, de manera comparativa; 3) Es necesario investigar más acerca de la interacción antibióticas-AgNPs-células, con la finalidad entender mejor el mecanismos de sinergia.

## Literatura citada

---

- Agnihotri, S., Mukherji, S.S.S. & Mukherji, S.S.S., 2014. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Advances*, 4(8), p.3974. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3RA44507K> [Accessed January 18, 2017].
- Ahamed, M., 2011. Toxic response of nickel nanoparticles in human lung epithelial A549 cells. *Toxicology in Vitro*, 25(4), pp.930–936. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2011.02.015>.
- Ahn, J.-M. et al., 2014. Comparative toxicity of silver nanoparticles on oxidative stress and DNA damage in the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere*, 108, pp.343–52. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653514001696>.
- Alarcon, E.I. et al., 2013. Human serum albumin as protecting agent of silver nanoparticles: Role of the protein conformation and amine groups in the nanoparticle stabilization. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(1).
- Alcocer-Cuarón, C., Rivera, A.L. & Castaño, V.M., 2014. Hierarchical structure of biological systems: a bioengineering approach. *Bioengineered*, 5(2), pp.73–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24145961> [Accessed September 18, 2017].
- Ali, H.R.K., MS, M. & SA, S., 2016. In Vitro Study for Comparing the Cytotoxicity of Silver and Gold Nanospheres on Raw 264.7 Murine Macrophage Cell Line. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, 2016. Available at: [http://www.omicsgroup.org/journals/pharmaceutical-regulatory-affairs-open-access-abstract.php?abstract\\_id=69126](http://www.omicsgroup.org/journals/pharmaceutical-regulatory-affairs-open-access-abstract.php?abstract_id=69126) [Accessed March 29, 2016].
- Alizadeh, H., Salouti, M. & Shapouri, R., 2014. Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles on Intramacrophage *Brucella abortus* 544. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(3). Available at: [http://www.ijmicrobiol.com/?page=article&article\\_id=9039](http://www.ijmicrobiol.com/?page=article&article_id=9039).
- Allahverdiyev, A.M. et al., 2011. Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. *International journal of nanomedicine*, 6, pp.2705–2714.
- Andersson, D.I. & Hughes, D., 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology*. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro2319> [Accessed April 19, 2017].
- Ansari, M. a. et al., 2011. Evaluation of antibacterial activity of silver nanoparticles against MSSA and MRSA on isolates from skin infections. *Biology and Medicine*, 3(2 SPECIALISSUE), pp.141–146.
- Arora, S. et al., 2008. Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicology Letters*, 179(2), pp.93–100. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427408001197> [Accessed January 31, 2017].
- Artunduaga Bonilla, J.J. et al., 1933. In vitro antifungal activity of silver nanoparticles against fluconazole-resistant *Candida* species. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31.

- Arzenšek, D., 2010. *Dynamic light scattering and application to proteins in solutions*, Available at: [http://mafija.fmf.uni-lj.si/seminar/files/2009\\_2010/Dynamic\\_light\\_scattering\\_and\\_application\\_to\\_proteins\\_in\\_solutions.pdf](http://mafija.fmf.uni-lj.si/seminar/files/2009_2010/Dynamic_light_scattering_and_application_to_proteins_in_solutions.pdf) [Accessed September 14, 2017].
- AshaRani, P. V et al., 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*, 3(2), pp.279–290. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19236062>.
- Badawy, A.M. El et al., 2010. Impact of Environmental Conditions (pH, Ionic Strength, and Electrolyte Type) on the Surface Charge and Aggregation of Silver Nanoparticles Suspensions. *Environmental Science & Technology*, 44(4), pp.1260–1266. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es902240k> [Accessed February 2, 2017].
- El Badawy, A.M. et al., 2012. The impact of stabilization mechanism on the aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Science of the Total Environment*, 429, pp.325–331. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.03.041>.
- Barreto, M.L., Teixeira, M.G. & Carmo, E.H., 2006. Infectious diseases epidemiology. *Journal of epidemiology and community health*, 60(3), pp.192–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16476746> [Accessed September 18, 2017].
- Beer, C. et al., 2012. Toxicity of silver nanoparticles-Nanoparticle or silver ion? *Toxicology Letters*, 208(3), pp.286–292. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.11.002>.
- Bharadwaj, R. et al., 2003. AN IN VITRO STUDY TO EVALUATE THE SYNERGISTIC ACTIVITY OF NORFLOXACIN AND METRONIDAZOLE. *Indian Journal of Pharmacology*, 35, pp.220–226.
- Bianco, C. et al., 2014. Silver percutaneous absorption after exposure to silver nanoparticles: A comparison study of three human skin graft samples used for clinical applications. *Burns*, 40(7), pp.1390–1396. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305417914000631>.
- Blinova, I. et al., 2013. Toxicity of two types of silver nanoparticles to aquatic crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(5), pp.3456–3463.
- Bogdanchikova, N. et al., 2016. Silver nanoparticles composition for treatment of distemper in dogs. *International Journal of Nanotechnology*, 13(1/2/3), p.227. Available at: <http://www.inderscience.com/link.php?id=74536>.
- Bogdanchikova, N.E. et al., 1994. Stabilization of silver clusters in zeolite matrices. In Elsevier, pp. 1067–1074. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167299108636435> [Accessed October 3, 2017].
- Böhmert, L. et al., 2012. Cytotoxicity of peptide-coated silver nanoparticles on the human intestinal cell line Caco-2. *Archives of Toxicology*, 86(7), pp.1107–1115.
- Bollenbach, T., 2015. Antimicrobial interactions: mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution. *Current opinion in microbiology*, 27, pp.1–9. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527415000594> [Accessed June 14, 2015].

- Borrego, B. et al., 2016. Potential application of silver nanoparticles to control the infectivity of Rift Valley fever virus in vitro and in vivo. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 12(5), pp.0–3. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963416000927> [Accessed March 29, 2016].
- Brandt, O. et al., 2012. Nanoscale silver possesses broad-spectrum antimicrobial activities and exhibits fewer toxicological side effects than silver sulfadiazine. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8(4), pp.478–488. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2011.07.005>.
- Cantón, E., Martín, E. & Espinel-ingroff, A., 2007. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). *Revista Iberoamericana de Micología*, 15, p.1.
- Cao, H. et al., 2013. Electron storage mediated dark antibacterial action of bound silver nanoparticles: Smaller is not always better. *Acta Biomaterialia*, 9(2), pp.5100–5110. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.10.017>.
- Carrola, J. et al., 2013. Metabolic response of human keratinocytes to silver nanoparticles: A metabolomics study. *Toxicology Letters*, 221(2013), pp.S242–S243. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427413007984>.
- CDC, 2015. Antibiotic/Antimicrobial Resistance. Available at: [https://www.cdc.gov/drugresistance/cdc\\_role.html](https://www.cdc.gov/drugresistance/cdc_role.html) [Accessed August 24, 2017].
- CDC, 2013. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013 | Antibiotic/Antimicrobial Resistance | CDC. Available at: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/index.html> [Accessed June 24, 2015].
- CDC, 2016. Glossary of Terms Related to Antibiotic Resistance. *National Antimicrobial Resistance Monitoring System*. Available at: <https://www.cdc.gov/narms/resources/glossary.html> [Accessed September 14, 2017].
- Chamakura, K. et al., 2010. Comparison of bactericidal activities of silver nanoparticles with common chemical disinfectants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84, pp.88–96.
- Chang, T.Y. et al., 2017. Trimethyl chitosan-capped silver nanoparticles with positive surface charge: Their catalytic activity and antibacterial spectrum including multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 155, pp.61–70. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776517301820> [Accessed September 5, 2017].
- ChEBI, 2017. Silver nanoparticles. *Chemical Entities of Biological Interest, European Molecular Biology Laboratory*. Available at: <http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=50826> [Accessed September 14, 2017].
- Chen, N. et al., 2013. Inhibitory effects of silver nanoparticles against adenovirus type 3 in vitro. *Journal of Virological Methods*, 193(2), pp.470–477. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.07.020>.

- Cheng, G. et al., 2016. Antimicrobial Drugs in Fighting against Antimicrobial Resistance. *Frontiers in Microbiology*, 7. Available at: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00470/abstract> [Accessed November 9, 2016].
- Chernousova, S. & Epple, M., 2013. Silver as Antibacterial Agent: Ion, Nanoparticle, and Metal. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(6), pp.1636–1653. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.201205923> [Accessed December 1, 2016].
- Choi, O. et al., 2008. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth.
- CLSI, 2012. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*,
- CLSI, 2015. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standards -Tenth Edition. CLSI Document M07-A10* 10th ed. Jean B. Patel, ed., Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute. Available at: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07/> [Accessed March 10, 2017].
- Cohen, M.L., 1997. Epidemiological factors influencing the emergence of antimicrobial resistance. *Ciba Foundation symposium*, 207, pp.223–31–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9189644> [Accessed October 9, 2015].
- Cohen, N.R., Lobritz, M.A. & Collins, J.J., 2013. Microbial persistence and the road to drug resistance. *Cell host & microbe*, 13(6), pp.632–42. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3695397&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 15, 2015].
- Cruz, D.A. & Rodríguez, M.C., 2012. Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: Una relación profunda. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 3(2), pp.67–78. Available at: <http://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3962777.pdf> <http://dialnet.unirioja.es/servlet/extart?codigo=3962777>.
- Cupi, D., Hartmann, N.B. & Baun, A., 2015. The influence of natural organic matter and aging on suspension stability in guideline toxicity testing of silver, zinc oxide, and titanium dioxide nanoparticles with *Daphnia magna*. *Environmental toxicology and chemistry*, 34(3), pp.497–506. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25546145> [Accessed April 12, 2017].
- Daniel, S.C.G.K. et al., 2010. Toxicity and immunological activity of silver nanoparticles. *Applied Clay Science*, 48(4), pp.547–551. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2010.03.001>.
- Dar, M.A., Ingle, A. & Rai, M., 2013. Enhanced antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cryphonectria* sp. evaluated singly and in combination with antibiotics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 9(1), pp.105–110. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2012.04.007>.
- Dimkpa, C.O. et al., 2011. Interaction of silver nanoparticles with an environmentally beneficial bacterium, *Pseudomonas chlororaphis*. *Journal of Hazardous Materials*, 188(1–3), pp.428–435. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.01.118>.

- Dorobantu, L.S. et al., 2015. Toxicity of silver nanoparticles against bacteria, yeast, and algae. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(4).
- Drugsite Trust, 2017. Drugs.com. *Medical Dictionary*. Available at: <https://www.drugs.com/> [Accessed September 14, 2017].
- Du, H. et al., 2012. Systems-level analysis of Escherichia coli response to silver nanoparticles: The roles of anaerobic respiration in microbial resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 424(4), pp.657–662. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.06.134>.
- Duffus, J., Templeton, D.M. & Schwenk, M., 2017. *Comprehensive Glossary of Terms Used in Toxicology*, Cambridge: Royal Society of Chemistry. Available at: <http://ebook.rsc.org/?DOI=10.1039/9781782623724> [Accessed September 14, 2017].
- Eagle, H. & Musselman, A.D., 1948. The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. *The Journal of experimental medicine*, 88(1), pp.99–131. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2135799&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 10, 2015].
- Elbeshehy, E.K.F., Elazzazy, A.M. & Aggelis, G., 2015. Silver nanoparticles synthesis mediated by new isolates of Bacillus spp., nanoparticle characterization and their activity against Bean Yellow Mosaic Virus and human pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAY). Available at: [http://www.frontiersin.org/Antimicrobials%2C\\_Resistance\\_and\\_Chemotherapy/10.3389/fmicb.2015.00453/abstract](http://www.frontiersin.org/Antimicrobials%2C_Resistance_and_Chemotherapy/10.3389/fmicb.2015.00453/abstract) [Accessed November 9, 2016].
- Elechiguerra, J.L.J. et al., 2005. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *Journal of nanobiotechnology*, 3, p.6. Available at: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1477-3155-3-6.pdf> [Accessed June 27, 2015].
- Eugenio, M. et al., 2016. Yeast-derived biosynthesis of silver/silver chloride nanoparticles and their antiproliferative activity against bacteria. *RSC Adv.*, 6(12), pp.9893–9904. Available at: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/ra/c5ra22727e> [Accessed March 29, 2016].
- Fabrega, J. et al., 2009. Silver Nanoparticle Impact on Bacterial Growth: Effect of pH, Concentration, and Organic Matter. *Environmental Science & Technology*, 43(19), pp.7285–7290. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es803259g> [Accessed February 2, 2017].
- Fayaz, A.M. et al., 2010. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(1), pp.103–109. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2009.04.006> [Accessed April 19, 2017].
- Fonkwo, P.N., 2008. Pricing infectious disease. The economic and health implications of infectious diseases. *EMBO reports*, 9 Suppl 1, pp.S13–S17.
- Gaikwad, S. et al., 2013. Antiviral activity of mycosynthesized silver nanoparticles against herpes simplex virus and human parainfluenza virus type 3. *International Journal of Nanomedicine*, 8, pp.4303–4314. Available at: <http://www.dovepress.com/permissions.php> [Accessed August 9, 2016].

- Gao, M. et al., 2013. Controlled synthesis of Ag nanoparticles with different morphologies and their antibacterial properties. *Materials Science and Engineering C*, 33(1), pp.397–404. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.09.005>.
- Ghosh, M. et al., 2012. In vitro and in vivo genotoxicity of silver nanoparticles. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 749(1–2), pp.60–69. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2012.08.007>.
- Ghosh, M., Bandyopadhyay, M. & Mukherjee, A., 2010. Genotoxicity of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles at two trophic levels: Plant and human lymphocytes. *Chemosphere*, 81(10), pp.1253–1262. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.022>.
- Ghosh, S. et al., 2010. Antimicrobial activity of highly stable silver nanoparticles embedded in agar-agar matrix as a thin film. *Carbohydrate Research*, 345(15), pp.2220–2227.
- Giménez, A., 2012. ¿Qué es un meta-análisis? y ¿cómo leerlo? *Biomedicina*, 1(7), pp.12–27. Available at: <http://www.um.edu.uy/docs/metaanalisis.pdf> [Accessed July 21, 2017].
- Gokul Raj, K., Kumaresan, S. & Pandi, M., 2012. Biosynthesis of silver nanoparticle activity against bacterial strain, cephalixin antibiotic synergistic activity. *INT J CURR SCI*, 4, pp.1–7. Available at: [http://www.currentsciencejournal.info/issuespdf/1\\_Vivek\\_paper.pdf](http://www.currentsciencejournal.info/issuespdf/1_Vivek_paper.pdf) [Accessed April 19, 2017].
- Gopinath, V. & Velusamy, P., 2013. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Bacillus* sp. GP-23 and evaluation of their antifungal activity towards *Fusarium oxysporum*. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 106, pp.170–174. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2012.12.087>.
- Goswami, S.R. et al., 2015. Role of biogenic silver nanoparticles in disruption of cell–cell adhesion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilm. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 26, pp.73–80. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1226086X14005711> [Accessed June 26, 2015].
- Greulich, C. et al., 2011. Cell type-specific responses of peripheral blood mononuclear cells to silver nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 7(9), pp.3505–3514. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2011.05.030>.
- Greulich, C. et al., 2012. The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cells occurs in the same concentration range. *RSC Advances*, 2(17), p.6981.
- Gupta, a et al., 1999. Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nature medicine*, 5(2), pp.183–188.
- Gutarowska, B. et al., 2012. Analysis of the sensitivity of microorganisms contaminating museums and archives to silver nanoparticles. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 68, pp.7–17. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.12.002>.
- Guzman, M., Dille, J. & Godet, S., 2012. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8(1), pp.37–45. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2011.05.007>.

- Hackenberg, S. et al., 2011. Silver nanoparticles: Evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicology Letters*, 201(1), pp.27–33. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.12.001>.
- Hanh, T.T. et al., 2016. Preparation of silver nanoparticles fabrics against multidrug-resistant bacteria. *Radiation Physics and Chemistry*, 121, pp.87–92. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969806X15301523> [Accessed February 3, 2016].
- Hindler, J. a, Detecting / Reporting Resistance in Fastidious Bacteria CLSI M45-A2 Guideline.
- Hoskote Anand, K.K. & Mandal, B.K., 2015. Activity study of biogenic spherical silver nanoparticles towards microbes and oxidants. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 135, pp.639–645. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142514010804>.
- Huh, A.J. & Kwon, Y.J., 2011. “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*, 156(2), pp.128–145. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.002>.
- Hwang, I.S. et al., 2012. Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals. *FEBS Journal*, 279(7), pp.1327–1338.
- Iram, F. et al., 2014. Glucoxylation-mediated green synthesis of gold and silver nanoparticles and their phytotoxicity study. *Carbohydrate Polymers*, 104, pp.29–33.
- Ishida, K. et al., 2014. Silver nanoparticle production by the fungus *Fusarium oxysporum*: Nanoparticle characterisation and analysis of antifungal activity against pathogenic yeasts. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(2), pp.220–228.
- Ivask, A. et al., 2014. Toxicity mechanisms in *Escherichia coli* vary for silver nanoparticles and differ from ionic silver. *ACS Nano*, 8(1), pp.374–386. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nn4044047> [Accessed November 21, 2016].
- Jaime-Acuña, O.E. et al., 2016. Synthesis and Complete Antimicrobial Characterization of CEObACTER, an Ag-Based Nanocomposite A. Almeida, ed. *PLOS ONE*, 11(11), p.e0166205. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0166205>.
- Jain, J. et al., 2009. Silver Nanoparticles in Therapeutics: Development of an Antimicrobial Gel Formulation for Topical Use. *Molecular Pharmaceutics*, 6(5), pp.1388–1401. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/mp900056g> [Accessed June 14, 2016].
- Jogee, P.S., Ingle, A.P. & Rai, M., 2017. Isolation and identification of toxigenic fungi from infected peanuts and efficacy of silver nanoparticles against them. *Food Control*, 71, pp.143–151. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713516303437> [Accessed September 5, 2017].
- John H., R. & Mahmoud A., G., 2008. *M27-A3: Reference Method for Broth Dilution AST of Yeasts* 3rd ed. CLSI, ed., AstraZeneca; Case Western Reserve University.
- Jones, R. & Pfaller, M., 1998. Bacterial resistance: a worldwide problem. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889398000376> [Accessed June 27, 2015].

- Juarez-Moreno, K. et al., 2016. Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines. *Human & experimental toxicology*, p.960327116675206. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27815378> [Accessed November 17, 2016].
- Jyoti, K., Baunthiyal, M. & Singh, A., 2016. Characterization of silver nanoparticles synthesized using *Urtica dioica* Linn. leaves and their synergistic effects with antibiotics. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(3), pp.217–227. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687850715001132> [Accessed April 19, 2017].
- Kalmantaeva, O. V. et al., 2014. Silver-nanoparticle exposure on immune system of mice depending on the route of administration. *Nanotechnologies in Russia*, 9(9–10), pp.571–576. Available at: <http://link.springer.com/10.1134/S1995078014050061>.
- Kasprowicz, M.J., Kozioł, M. & Gorczyca, A., 2010. The effect of silver nanoparticles on phytopathogenic spores of *Fusarium culmorum*. *Canadian journal of microbiology*, 56(3), pp.247–253.
- Kaur, J. & Tikoo, K., 2013. Evaluating cell specific cytotoxicity of differentially charged silver nanoparticles. *Food and Chemical Toxicology*, 51(1), pp.1–14. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.044>.
- Kaur, P. & Thakur, R., An In Vitro Study of The Antifungal Activity of Silver/Chitosan Nanoformulations Against Important Seed Borne Pathogens. Available at: [https://www.academia.edu/15077263/An\\_in\\_vitro\\_study\\_of\\_the\\_antifungal\\_activity\\_of\\_silver\\_chi\\_tosan\\_nanoformulations\\_against\\_important\\_seed\\_borne\\_pathogens?auto=download](https://www.academia.edu/15077263/An_in_vitro_study_of_the_antifungal_activity_of_silver_chi_tosan_nanoformulations_against_important_seed_borne_pathogens?auto=download) [Accessed September 5, 2017].
- Kawata, K., Osawa, M. & Okabe, S., 2009. In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environmental science & ...*
- Khurana, C. et al., 2013. Antibacterial activity of silver: The role of hydrodynamic particle size at nanoscale. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 3(1226), pp.3361–3368.
- Kim, H.R. et al., 2011. Genotoxic effects of silver nanoparticles stimulated by oxidative stress in human normal bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 726(2), pp.129–135. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.08.008>.
- Kim, S.W. et al., 2012. Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. *Mycobiology*, 40(1), pp.53–58.
- Kittler, S. et al., 2010. The influence of proteins on the dispersability and cell-biological activity of silver nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*, 20(3), p.512. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=B914875B> [Accessed February 2, 2017].
- Klasen, H.J., 2000. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns*, 26(2), pp.131–138.

- Kondo, N. et al., 2001. Eagle-type methicillin resistance: new phenotype of high methicillin resistance under mec regulator gene control. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(3), pp.815–24. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=90380&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 10, 2015].
- Kora, A.J., Manjusha, R. & Arunachalam, J., 2009. Superior bactericidal activity of SDS capped silver nanoparticles: Synthesis and characterization. *Materials Science and Engineering C*, 29(7), pp.2104–2109. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2009.04.010>.
- Kraemer, M.U.G. et al., 2016. Progress and Challenges in Infectious Disease Cartography. Available at: [http://ac.els-cdn.com/S147149221500207X/1-s2.0-S147149221500207X-main.pdf?\\_tid=c62b9dca-8875-11e7-a661-00000aab0f6c&acdnat=1503542687\\_9819dadd05a6b0d1ec8ef59d1cec57ba](http://ac.els-cdn.com/S147149221500207X/1-s2.0-S147149221500207X-main.pdf?_tid=c62b9dca-8875-11e7-a661-00000aab0f6c&acdnat=1503542687_9819dadd05a6b0d1ec8ef59d1cec57ba) [Accessed August 23, 2017].
- Kumar-Krishnan, S. et al., 2015. Chitosan/silver nanocomposites: Synergistic antibacterial action of silver nanoparticles and silver ions. *European Polymer Journal*, 67, pp.242–251. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305715002104>.
- Kumar, C.G. & Poornachandra, Y., 2015. Biodirected synthesis of Miconazole-conjugated bacterial silver nanoparticles and their application as antifungal agents and drug delivery vehicles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 125, pp.110–119. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776514006481>.
- Kvitek, L. et al., 2009. Initial Study on the Toxicity of Silver Nanoparticles (NPs) against *Paramecium caudatum*. *The journal of physical chemistry. C*, 113, pp.4296–4300.
- Lafferty, K.D. & Mordecai, E.A., 2016. The rise and fall of infectious disease in a warmer world. *F1000Research*, 5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27610227> [Accessed August 23, 2017].
- Lara, H. et al., 2010. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, pp.615–621. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-009-0211-3>.
- Lara, H.H. et al., 2015. Effect of silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilms: an ultrastructural study. *Journal of nanobiotechnology*, 13, p.91. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4678641&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lara, H.H., Ayala-Nuñez, N. V, et al., 2010. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *Journal of nanobiotechnology*, 8, p.1.
- Lara, H.H., Ixtepan-Turrent, L., et al., 2010. PVP-coated silver nanoparticles block the transmission of cell-free and cell-associated HIV-1 in human cervical culture. *Journal of nanobiotechnology*, 8(1), p.15. Available at: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/8/1/15> [Accessed August 8, 2016].
- Lara, H.H. et al., 2011. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *Journal of nanobiotechnology*, 9(1), p.30. Available at: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/9/1/30>.

- Li, G. et al., 2012. Fungus-mediated green synthesis of silver nanoparticles using *aspergillus terreus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(1), pp.466–476.
- Li, P. et al., 2005. Synergistic antibacterial effects of  $\beta$ -lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(9), pp.1912–1917.
- Li, W.-R. et al., 2010. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), pp.1115–1122. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-009-2159-5> [Accessed January 18, 2017].
- Li, W.-R.R. et al., 2010. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), pp.1115–1122. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00253-009-2159-5> [Accessed February 4, 2016].
- Liau, S.Y. et al., 1997. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Letters in applied microbiology*, 25(4), pp.279–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9351278> [Accessed June 26, 2015].
- Liu, P., Huang, Z. & Gu, N., 2013. Exposure to silver nanoparticles does not affect cognitive outcome or hippocampal neurogenesis in adult mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 87, pp.124–130. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.10.014>.
- Lok, C.-N.C. et al., 2007. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12(4), pp.527–534. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00775-007-0208-z> [Accessed June 27, 2015].
- Lok, C.-N.N. et al., 2006. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *Journal of proteome research*, 5(4), pp.916–924. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33645764133&partnerID=tZOtx3y1> [Accessed March 4, 2015].
- Lu, L. et al., 2008. Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. *Antiviral Therapy*, 13, pp.253–262. Available at: <http://www.intmedpress.com/serveFile.cfm?sUID=2ce12343-37fa-4d09-92f7-46056137a8e3> [Accessed August 8, 2016].
- Lu, W. et al., 2010. Effect of surface coating on the toxicity of silver nanomaterials on human skin keratinocytes. *Chemical Physics Letters*, 487(1–3), pp.92–96. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2010.01.027>.
- MacCuspie, R.I., 2011. Colloidal stability of silver nanoparticles in biologically relevant conditions. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(7), pp.2893–2908.
- Malvern Instruments, 2011. *Dynamic Light Scattering common terms defined*, Available at: [www.malvern.com/contact](http://www.malvern.com/contact) [Accessed September 14, 2017].
- Martinez-Castanon, G. a. et al., 2008. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(8), pp.1343–1348.
- Martinez-Gutierrez, F. et al., 2010. Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(5), pp.681–688. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2010.02.001>.

- Martínez-Gutierrez, F. et al., 2012. Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8(3), pp.328–336. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2011.06.014>.
- Matny, O.N., 2015. Fusarium Head Blight and Crown Rot on Wheat & Barley: Losses and Health Risks. *Advances in Plants & Agriculture Research*, 2(1). Available at: [https://www.researchgate.net/profile/Oadi\\_Matny/publication/273449591\\_Fusarium\\_Head\\_Blight\\_and\\_Crown\\_Rot\\_on\\_Wheat\\_Barley\\_Losses\\_and\\_Health\\_Risks/links/5501ee670cf24cee39fb1511.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Oadi_Matny/publication/273449591_Fusarium_Head_Blight_and_Crown_Rot_on_Wheat_Barley_Losses_and_Health_Risks/links/5501ee670cf24cee39fb1511.pdf) [Accessed August 24, 2017].
- McShan, D., Ray, P.C. & Yu, H., 2014. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(1), pp.116–127. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.010>.
- Meyer, J.N. et al., 2010. Intracellular uptake and associated toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. *Aquatic Toxicology*, 100(2), pp.140–150. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.07.016>.
- Mikhlin, Y.L. et al., 2014. Oxidation of Ag nanoparticles in aqueous media: Effect of particle size and capping. *Applied Surface Science*, 297, pp.75–83. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.01.081>.
- Mirzajani, F. et al., 2011. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Research in Microbiology*, 162(5), pp.542–549. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2011.04.009>.
- Mittal, A.K. et al., 2014. Biosynthesis of silver nanoparticles: Elucidation of prospective mechanism and therapeutic potential. *Journal of Colloid and Interface Science*, 415, pp.39–47. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2013.10.018>.
- Mohan, S. et al., 2014. Completely green synthesis of dextrose reduced silver nanoparticles, its antimicrobial and sensing properties. *Carbohydrate Polymers*, 106, pp.469–474.
- Monteiro, D.R. et al., 2011. Silver colloidal nanoparticles: antifungal effect against adhered cells and biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Biofouling*, 27(7), pp.711–719.
- Monteiro, D.R. et al., 2013. Silver colloidal nanoparticles: Effect on matrix composition and structure of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 114(4), pp.1175–1183.
- Moreno-Garrido, I., Pérez, S. & Blasco, J., 2015. Toxicity of silver and gold nanoparticles on marine microalgae. *Marine Environmental Research*, 111, pp.60–73.
- Morones-Ramirez, J.R. et al., 2013. Silver enhances antibiotic activity against gram-negative bacteria. *Science translational medicine*, 5(190), pp.1–11. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3771099&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Morones, J.R. et al., 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotech*, 2346(16), pp.2346–2353.

- Mukherjee, S.G. et al., 2012. Comparative in vitro cytotoxicity study of silver nanoparticle on two mammalian cell lines. *Toxicology in Vitro*, 26(2), pp.238–251. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2011.12.004>.
- Nair, D.R. et al., 2015. Characterization of a novel small molecule that potentiates  $\beta$ -lactam activity against gram-positive and gram-negative pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(4), pp.1876–1885.
- Narayanan, K.B. & Sakthivel, N., 2010. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 156(1–2), pp.1–13. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2010.02.001>.
- Nasrollahi, A., Pourshamsian, K. & Mansourkiaee, P., 2011. Antifungal Activity of Silver Nanoparticles on some fungi. *Int.J.Nano.Dim*, 1(3), pp.233–239. Available at: [http://www.ijnd.ir/article\\_3542\\_97a8b7c3b3744844d2b2949d81c9cb7b.pdf](http://www.ijnd.ir/article_3542_97a8b7c3b3744844d2b2949d81c9cb7b.pdf) [Accessed May 29, 2017].
- Nature Editorial, 2012. Join the dialogue. *Nature nanotechnology*, 7(9), p.545. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2012.150> [Accessed January 18, 2016].
- Nature Editorial, 2011. The dose makes the poison. *Nature nanotechnology*, 6(6), p.329. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2011.87> [Accessed January 18, 2016].
- Navarro, E. et al., 2008. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science and Technology*, 42(23), pp.8959–8964.
- NCCLS, 2007. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S17*,
- Negm, N.A. et al., 2014. Synthesis and evaluation of silver nanoparticles loaded with Gemini surfactants: Surface and antimicrobial activity. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, pp.6–13. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2014.09.006>.
- NIH-NIAID, 2009. *Understanding Microbes in Sickness and in Health*, [Bethesda, Md.] : National Institutes of Health, National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Available at: <http://www.niaid.nih.gov/topics/microbes/documents/microbesbook.pdf>.
- Noorbakhsh, F., Rezaie, S. & Shahverdi, A.R., 2011. Antifungal Effects of Silver Nanoparticle alone and with Combination of Antifungal Drug on Dermatophyte Pathogen *Trichophyton Rubrum*. *2011 International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics.*, 5, pp.364–367.
- Notermans, S., Zwietering, M.H. & Mead, G.C., 1994. The HACCP concept: identification of potentially hazardous micro-organisms. *Food Microbiology*, 11(3), pp.203–214. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002084710240> [Accessed October 9, 2015].
- Novo, D.J. et al., 2000. Multiparameter Flow Cytometric Analysis of Antibiotic Effects on Membrane Potential, Membrane Permeability, and Bacterial Counts of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*. *Multiparameter Flow Cytometric Analysis of Antibiotic Effects on Membrane Po.*, 44(4), pp.827–834.

- Novotny, L. & Hecht, B., 2006. Surface plasmons. In *Principles of Nano-Optics*. Cambridge: Cambridge University Press. Available at: [https://www.photonics.ethz.ch/fileadmin/user\\_upload/Courses/NanoOptics/plasmonss.pdf](https://www.photonics.ethz.ch/fileadmin/user_upload/Courses/NanoOptics/plasmonss.pdf) [Accessed September 18, 2017].
- Nymark, P. et al., 2013. Genotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells. *Toxicology*, 313(1), pp.38–48. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2012.09.014>.
- Oberdörster, G. et al., 2005. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology*, 2(1), p.8. Available at: <https://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1743-8977-2-8?site=particleandfibretoxicology.biomedcentral.com> [Accessed August 3, 2017].
- Ogar, A., Tylko, G. & Turnau, K., 2015. Antifungal properties of silver nanoparticles against indoor mould growth. *Science of The Total Environment*, 521, pp.305–314.
- Orlowski, P. et al., 2014. Tannic acid modified silver nanoparticles show antiviral activity in herpes simplex virus type 2 infection N. M. Sawtell, ed. *PLoS ONE*, 9(8), p.e104113. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0104113> [Accessed October 10, 2016].
- Oukarroum, A. et al., 2012. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78, pp.80–85.
- Oves, M. et al., 2013. Antibacterial and Cytotoxic Efficacy of Extracellular Silver Nanoparticles Biofabricated from Chromium Reducing Novel OS4 Strain of *Stenotrophomonas maltophilia* V. Bansal, ed. *PLoS ONE*, 8(3), p.e59140. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0059140> [Accessed August 4, 2017].
- Pal, S., Tak, Y.K. & Song, J.M., 2007. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), pp.1712–1720. Available at: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.02218-06> [Accessed January 18, 2017].
- Palanisamy, N. et al., 2014. Antibiofilm properties of chemically synthesized silver nanoparticles found against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Nanobiotechnology*, 12(1), p.2. Available at: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/12/1/2>.
- Panáček, A. et al., 2009. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials*, 30(31), pp.6333–6340.
- Panáček, A. et al., 2016. Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant Enterobacteriaceae. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 142, pp.392–399. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776516301515> [Accessed March 14, 2016].
- Panyala, N.R., Peña-Méndez, E.M. & Havel, J., 2008. Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health? *Journal of Applied Biomedicine*, 6(3), pp.117–129. Available at: <http://www.kolumber.com/silver.pdf>.
- Park, E.J. et al., 2010. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicology in Vitro*, 24(3), pp.872–878. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2009.12.001>.

- Pestryakov, A.N. & Davydov, A.A., 1995. Study of supported silver states by the method of electron spectroscopy of diffuse reflectance. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 74(3), pp.195–199. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0368204895023712> [Accessed October 3, 2017].
- Piao, M.J. et al., 2011. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology Letters*, 201(1), pp.92–100. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.12.010>.
- Pourseyedi, S. & Khatami, M., 2015. Phoenix dactylifera (date palm) pit aqueous extract mediated novel route for synthesis high stable silver nanoparticles with high antifungal and antibacterial activity. *IET Nanobiotechnology*, 9(4), pp.184–190. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26224347> [Accessed September 5, 2017].
- Poynton, H.C. et al., 2012. Toxicogenomic Responses of Nanotoxicity in *Daphnia magna* Exposed to Silver Nitrate and Coated Silver Nanoparticles. *Environmental Science & Technology*, 46(11), pp.6288–6296. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es3001618> [Accessed June 14, 2016].
- Pradhan, A. et al., 2011. Can Metal Nanoparticles Be a Threat to Microbial Decomposers of Plant Litter in Streams? *Microbial Ecology*, 62(1), pp.58–68.
- Pulit-Prociak, J., Stokłosa, K. & Banach, M., 2014. Nanosilver products and toxicity. *Environmental Chemistry Letters*, 13(1), pp.59–68. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10311-014-0490-2>.
- Pulit, J. et al., 2013. Nanosilver against fungi. Silver nanoparticles as an effective biocidal factor. *Acta Biochimica Polonica*, 60(4), pp.795–798.
- Qu, F. et al., 2010. Effects of pH and temperature on antibacterial activity of silver nanoparticles. In *2010 3rd International Conference on Biomedical Engineering and Informatics*. IEEE, pp. 2033–2037. Available at: <http://ieeexplore.ieee.org/document/5639483/> [Accessed February 2, 2017].
- Radzig, M. a. et al., 2013. Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, pp.300–306. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.039>.
- Ramalingam, B., Parandhaman, T. & Das, S.K., 2016. Antibacterial Effects of Biosynthesized Silver Nanoparticles on Surface Ultrastructure and Nanomechanical Properties of Gram-Negative Bacteria viz. *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS applied materials & interfaces*, 8(7), pp.4963–76. Available at: <http://dx.doi.org/10.1021/acsami.6b00161> [Accessed March 29, 2016].
- Ravindran, A. et al., 2010. Studies on interaction of colloidal Ag nanoparticles with Bovine Serum Albumin (BSA). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(1), pp.32–37.
- Ravindran, A., Chandran, P. & Khan, S.S., 2013. Biofunctionalized silver nanoparticles: Advances and prospects. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 105, pp.342–352. Available at: [http://ac.els-cdn.com/S0927776512004316/1-s2.0-S0927776512004316-main.pdf?\\_tid=3c616e32-7bbc-11e7-a2c1-00000aacb360&acdnat=1502143585\\_88aee056ba8e1c4a5818641cb638ae34](http://ac.els-cdn.com/S0927776512004316/1-s2.0-S0927776512004316-main.pdf?_tid=3c616e32-7bbc-11e7-a2c1-00000aacb360&acdnat=1502143585_88aee056ba8e1c4a5818641cb638ae34) [Accessed August 7, 2017].

- Reidy, B. et al., 2013. Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications. *Materials*, 6(6), pp.2295–2350. Available at: <http://www.mdpi.com/1996-1944/6/6/2295/> [Accessed December 1, 2016].
- Rizzello, L. et al., 2014. Nanosilver-based antibacterial drugs and devices: Mechanisms, methodological drawbacks, and guidelines. *Chem. Soc. Rev.*, 43(5), pp.1501–1518. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3CS60218D> [Accessed December 1, 2016].
- Rogers, J. V. et al., 2008. A preliminary assessment of silver nanoparticle inhibition of monkeypox virus plaque formation. *Nanoscale Research Letters*, 3(4), pp.129–133.
- Roh, J. et al., 2009. Ecotoxicity of Silver Nanoparticles on the Soil Nematode *Caenorhabditis elegans* Using Functional Ecotoxicogenomics Ecotoxicity of Silver Nanoparticles on the Soil Nematode *Caenorhabditis elegans* Using Functional Ecotoxicogenomics.
- Römer, I. et al., 2013. The critical importance of defined media conditions in *Daphnia magna* nanotoxicity studies. *Toxicology Letters*, 223(1), pp.103–108. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427413013076> [Accessed February 2, 2017].
- Romero-Urbina, D.G. et al., 2015. Ultrastructural changes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* induced by positively charged silver nanoparticles. *Beilstein journal of nanotechnology*, 6, pp.2396–405. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26734530> [Accessed July 12, 2017].
- Romoser, A. a. et al., 2012. Distinct immunomodulatory effects of a panel of nanomaterials in human dermal fibroblasts. *Toxicology Letters*, 210(3), pp.293–301. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.01.022>.
- Ruparelia, J.P. et al., 2008. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 4(3), pp.707–716.
- Sadtler Research Laboratories. & Simons, W.W., 1978. *The Sadtler handbook of infrared spectra*, Sadtler Research Laboratories.
- Sands, P., Mundaca-Shah, C. & Dzau, V.J., 2016. The Neglected Dimension of Global Security — A Framework for Countering Infectious-Disease Crises. , 13. Available at: <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMSr1600236> [Accessed August 23, 2017].
- Dos Santos, C.A. et al., 2014. Silver nanoparticles: Therapeutical uses, toxicity, and safety issues. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(7), pp.1931–1944. Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/jps.24001>.
- Schröfel, A. et al., 2014. Applications of biosynthesized metallic nanoparticles - A review. *Acta Biomaterialia*, 10(10), pp.4023–4042.
- Seitz, F. et al., 2015. Effects of silver nanoparticle properties, media pH and dissolved organic matter on toxicity to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 111, pp.263–270. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651314004576>.

- Shahverdi, A.A.R. et al., 2007. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3(2), pp.168–171. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963407000469> [Accessed June 27, 2015].
- Shankar, S. et al., 2014. Effect of reducing agent concentrations and temperature on characteristics and antimicrobial activity of silver nanoparticles. *Materials Letters*, 137, pp.160–163. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167577X14015687>.
- Shannahan, J.H. et al., 2013. Silver Nanoparticle Protein Corona Composition in Cell Culture Media G. E. Woloschak, ed. *PLoS ONE*, 8(9), p.e74001. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0074001> [Accessed February 2, 2017].
- Shrivastava, S., Bera, T. & Roy, A., 2007. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. .... Available at: <http://iopscience.iop.org/0957-4484/18/22/225103> [Accessed June 27, 2015].
- Silva, E. et al., 2014. PVP-coated silver nanoparticles showing antifungal improved activity against dermatophytes. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(11). Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11051-014-2726-2>.
- Silver, S., 2003. Bacterial silver resistance: Molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2–3), pp.341–353.
- Singh, A.K. (Ashok K. (Materials scientist), 2015. *Engineered nanoparticles: structure, properties and mechanisms of toxicity*, Elsevier.
- Singh, R. et al., 2015. Bacteriogenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(11), pp.4579–4593. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00253-015-6622-1> [Accessed March 31, 2017].
- Smekalova, M. et al., 2016. Enhanced antibacterial effect of antibiotics in combination with silver nanoparticles against animal pathogens. *Veterinary Journal*, 209, pp.174–179. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.10.032>.
- Smith, K.F. et al., 2014. Global rise in human infectious disease outbreaks. *Journal of The Royal Society Interface*, 11(101). Available at: <http://rsif.royalsocietypublishing.org/content/11/101/20140950#aHR0cDovL3JzaWYucm95YWxzbn2NpZXR5cHVibGlzaGluZy5vcmcvY29udGVudC9yb3lpbnRlcmZhY2UvMTEvMTAxLzlwMTQwOTUwLmZ1bGwucGRmQEBAMA==> [Accessed August 23, 2017].
- Smith, R. & Coast, J., 2013. The true cost of antimicrobial resistance. *BMJ*, 346(mar11 3), pp.f1493–f1493. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23479660> [Accessed November 25, 2016].
- Smolkova, B. et al., 2015. Nanoparticles in food. Epigenetic changes induced by nanomaterials and possible impact on health. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 77, pp.64–73. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691514005262> [Accessed October 8, 2015].

- Sonar, H. et al., 2017. Mycosynthesized Silver Nanoparticles as Potent Growth Inhibitory Agents Against Selected Waterborne Human Pathogens. *CLEAN - Soil, Air, Water*, 45(4), p.1600247. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/clen.201600247> [Accessed September 5, 2017].
- Sondi, I. & Salopek-Sondi, B., 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of colloid and interface science*, 275(1), pp.177–82. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979704001638> [Accessed June 27, 2015].
- Soni, N. & Prakash, S., 2015. Antimicrobial and mosquitocidal activity of microbial synthesized silver nanoparticles. *Parasitology Research*, 114(3), pp.1023–1030. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00436-014-4268-z> [Accessed September 5, 2017].
- De Souza, a., Mehta, D. & Leavitt, R.W., 2006. Bactericidal activity of combinations of Silver-Water Dispersion™ with 19 antibiotics against seven microbial strains. *Current Science*, 91(7), pp.926–929.
- Speshock, J.L. et al., 2010. Interaction of silver nanoparticles with Tacaribe virus. *Journal of nanobiotechnology*, 8, p.19.
- Srey, S., Jahid, I.K. & Ha, S.-D., 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31(2), pp.572–585. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512006536> [Accessed July 21, 2014].
- Suchomel, P. et al., 2015. Comparative Study of Antimicrobial Activity of AgBr and Ag Nanoparticles (NPs). *Plos One*, 10(3), p.e0119202. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0119202>.
- Suh, W.H. et al., 2009. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Progress in Neurobiology*, 87(3), pp.133–170.
- Sun, R.W.-Y. et al., 2005. Silver nanoparticles fabricated in Hepes buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV<sup>-1</sup> infected cells. *Chemical Communications*, 37(40), p.5059. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b510984a> [Accessed August 9, 2016].
- Suresh, S., 2013. Semiconductor Nanomaterials, Methods and Applications: A Review. *Nanoscience and Nanotechnology*, 3(3), pp.62–74. Available at: When the size of semiconductor materials is reduced to nanoscale, their physical and chemical properties change drastically, resulting in unique properties due to their large surface area or quantum size effect. Currently, semiconductor nanomaterials and.
- Sweet, M.J., Chessher, A. & Singleton, I., 2012. Review: Metal-Based Nanoparticles; Size, Function, and Areas for Advancement in Applied Microbiology. In *Advances in Applied Microbiology*. pp. 113–142. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123943811000052>.
- Tamboli, D.P. & Lee, D.S., 2013. Mechanistic antimicrobial approach of extracellularly synthesized silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 260, pp.878–884. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.06.003>.
- Taubes, G., 2008. The Bacteria Fight Back. *Science*, 321(July).
- Tauxe, R. V et al., 2010. Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections. *International journal of food microbiology*, 139 Suppl, pp.S16-28. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160509005364> [Accessed August 31, 2015].

- Taylor, C. et al., 2016. Toxic interactions of different silver forms with freshwater green algae and cyanobacteria and their effects on mechanistic endpoints and the production of extracellular polymeric substances. *Environ. Sci.: Nano*, 3(2), pp.396–408. Available at: <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleHTML/2016/EN/C5EN00183H> [Accessed January 4, 2016].
- Theuretzbacher, U., 2012. Accelerating resistance, inadequate antibacterial drug pipelines and international responses. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39(4), pp.295–299. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857912000143> [Accessed January 18, 2017].
- Trefry, J.C. & Wooley, D.P., 2012. Rapid assessment of antiviral activity and cytotoxicity of silver nanoparticles using a novel application of the tetrazolium-based colorimetric assay. *Journal of Virological Methods*, 183(1), pp.19–24. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.03.014>.
- Trefry, J.C. & Wooley, D.P., 2013. Silver nanoparticles inhibit vaccinia virus infection by preventing viral entry through a macropinocytosis-dependent mechanism. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 9(9), pp.1624–1635. Available at: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=1550-7033&volume=9&issue=9&spage=1624> [Accessed August 10, 2016].
- Vance, M.E. et al., 2015. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6(1), pp.1769–1780.
- Vargas-Reus, M. a. et al., 2012. Antimicrobial activity of nanoparticulate metal oxides against peri-implantitis pathogens. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(2), pp.135–139. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.04.012>.
- Vazquez-Muñoz, R., Avalos-Borja, M. & Castro-Longoria, E., 2014. Ultrastructural Analysis of *Candida albicans* When Exposed to Silver Nanoparticles. *PLoS ONE*, 9(10), p.e108876. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0108876>.
- Večeřová, R., Panáček, A. & Kolář, M., 2017. Effect of silver nanoparticles on anaerobic bacteria. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, 23(1), pp.17–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28467592> [Accessed September 5, 2017].
- Wei, D. et al., 2009. The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Carbohydrate Research*, 344(17), pp.2375–2382. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621509004194> [Accessed January 18, 2017].
- WHO, 2017a. The top 10 causes of death. *WHO*. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> [Accessed August 23, 2017].
- WHO, 2017b. *World Health Statistics 2017: Monitoring health for the SDGs*, World Health Organization. Available at: [http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/2017/en/](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2017/en/) [Accessed August 23, 2017].
- Wijnhoven, S.W.P. et al., 2009. Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology*, 3(2), pp.109–138. Available at: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/17435390902725914>.

- Wishart, D.S. et al., 2006. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic acids research*, 34(Database issue), pp.D668-72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16381955> [Accessed November 23, 2016].
- Wu, F., 2007. Measuring the economic impacts of Fusarium toxins in animal feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 137, pp.363–374. Available at: [http://ac.els-cdn.com/S0377840107002246/1-s2.0-S0377840107002246-main.pdf?\\_tid=6c83a290-88f2-1e7-ace3-00000aab0f6b&acdnat=1503596224\\_cf0b56c0c11737d4cf2dbbd228320a8a](http://ac.els-cdn.com/S0377840107002246/1-s2.0-S0377840107002246-main.pdf?_tid=6c83a290-88f2-1e7-ace3-00000aab0f6b&acdnat=1503596224_cf0b56c0c11737d4cf2dbbd228320a8a) [Accessed August 24, 2017].
- Wypij, M. et al., 2017. Silver nanoparticles from *Pilimelia columellifera* subsp. *pallida* SL19 strain demonstrated antifungal activity against fungi causing superficial mycoses. *Journal of Basic Microbiology*, 57(9), pp.793–800. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jobm.201700121> [Accessed September 5, 2017].
- Xia, Z.K. et al., 2014. The antifungal effect of silver nanoparticles on *Trichosporon asahii*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, pp.1–7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2014.04.013>.
- Xiang, D. et al., 2011. Inhibitory effects of silver nanoparticles on H1N1 influenza A virus in vitro. *Journal of virological methods*, 178(1–2), pp.137–42. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093411003788> [Accessed March 28, 2016].
- Xu, Y. et al., 2013. Evaluation of the adjuvant effect of silver nanoparticles both in vitro and in vivo. *Toxicology letters*, 219(1), pp.42–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23454833>.
- Xu, Y. et al., In Vitro Antifungal Activity of Silver Nanoparticles Against Ocular Pathogenic Filamentous Fungi. Available at: <http://online.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/jop.2012.0155> [Accessed September 5, 2017].
- Xu, Y. et al., 2013. In vitro antifungal activity of silver nanoparticles against ocular pathogenic filamentous fungi. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 29(2), pp.270–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23410063>.
- Yoon, K.-Y. et al., 2007. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *The Science of the total environment*, 373(2–3), pp.572–5. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969706008837> [Accessed December 8, 2015].
- You, J., Zhang, Y. & Hu, Z., 2011. Bacteria and bacteriophage inactivation by silver and zinc oxide nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), pp.161–167. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.02.023>.
- Yuan, Y.-G., Peng, Q.-L. & Gurunathan, S., 2017. Effects of Silver Nanoparticles on Multiple Drug-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from Mastitis-Infected Goats: An Alternative Approach for Antimicrobial Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), p.569. Available at: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/3/569> [Accessed March 13, 2017].

- Yuan, Z. et al., 2013. Reaction of silver nanoparticles in the disinfection process. *Chemosphere*, 93(4), pp.619–625. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653513008424> [Accessed June 26, 2015].
- Zach, L. et al., 2012. Systems and governance in food import safety: A U.S. perspective. *Food Control*, 27(1), pp.153–162. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512001326> [Accessed June 10, 2015].
- Zarrini, G. et al., 2017. Vancomycin Capped with Silver Nanoparticles as an Antibacterial Agent against Multi-Drug Resistance Bacteria. *Adv Pharm Bull*, 7. Available at: <http://apb.tbzmed.ac.ir> [Accessed September 5, 2017].
- Zhang, S. et al., 2014. Effects of broth composition and light condition on antimicrobial susceptibility testing of ionic silver. *Journal of Microbiological Methods*, 105, pp.42–46. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701214001948>.
- Zhang, W., Qiao, X. & Chen, J., 2006. Synthesis and characterization of silver nanoparticles in AOT microemulsion system. *Chemical Physics*, 330(3), pp.495–500.
- Zhao, G. & Stevens, S.E., 1998. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. *BioMetals*, 11(1), pp.27–32.
- Zhou, W. et al., 2016. Effects of pH, Electrolyte, Humic Acid, and Light Exposure on the Long-Term Fate of Silver Nanoparticles. *Environmental Science & Technology*, 50(22), pp.12214–12224. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.est.6b03237> [Accessed February 2, 2017].
- Zou, X. et al., 2016. The different response mechanisms of *Wolffia globosa*: Light-induced silver nanoparticle toxicity. *Aquatic Toxicology*, 176, pp.97–105. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.04.019>.
- Zou, X., Shi, J. & Zhang, H., 2014. Coexistence of silver and titanium dioxide nanoparticles: Enhancing or reducing environmental risks? *Aquatic Toxicology*, 154, pp.168–175. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.05.020>.

## APÉNDICES

### Apéndice 1: Medios de cultivo

Tabla 17. Medios de cultivo. Descripción de los medios de cultivo y su composición

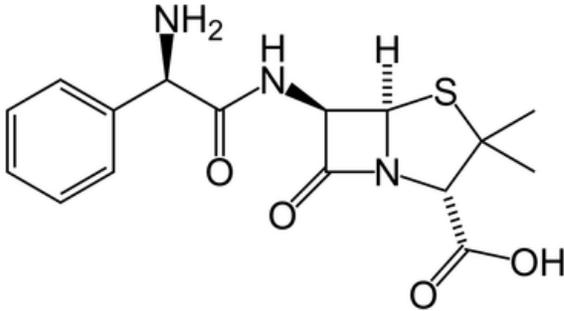
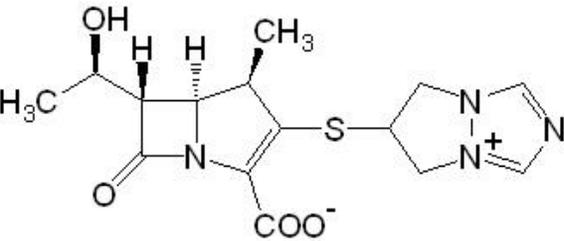
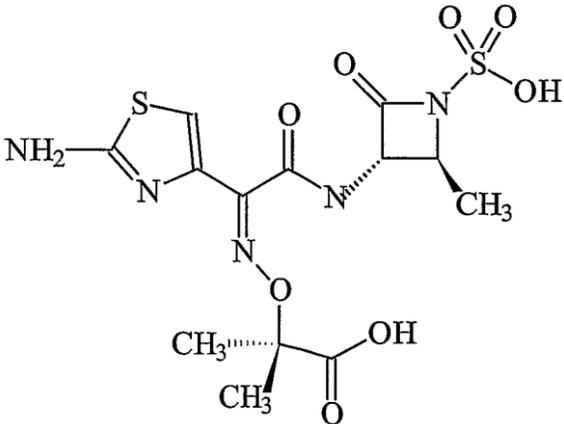
Medio	Composición		pH
	Nutriente	%	
<b>M9.</b> Minimal 9	Sales M9	20%	7.2±0.2
	- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	- NaCl	- NH <sub>4</sub> Cl	
	MgSO <sub>4</sub>	0.2	
	Glucosa	2.0	
	CaCl <sub>2</sub>	0.1	
<b>RPMI 1640.</b> R4130  Roswell Park Memorial Institute	Sales inorgánicas		7.2±0.2
	- Nitrato de calcio • 4H <sub>2</sub> O	0.01	
	- Sulfato de magnesio (anhidro)	0.004884	
	- Cloruro de potasio	0.04	
	- Cloruro de sodio	0.6	
	- Fosfato de sodio dibásico (anhidro)	0.08	
	Aminoácidos		
	- L-Arginina	0.02	
	- L-Asparagina (anhidro)	0.005	
	- Ácido L-aspártico	0.002	
	- L-Cistina • 2HCl	0.00652	
	- Ácido L-Glutámico	0.002	
	- L-Glutamina	0.03	
	- Glicina	0.001	
	- L-Histidina	0.0015	
	- Hidroxi-L-Prolina	0.002	
	- L-Isoleucina	0.005	
	- L-Leucina	0.005	
	- L-Lisina • HCl	0.004	
	- L-Metionina	0.0015	
	- L-Fenilalanina	0.0015	
	- L-Prolina	0.002	
	- L-Serina	0.003	
	- L-Treonina	0.002	
	- L-Triptófano	0.0005	
	- L-Tirosina • 2Na • 2H <sub>2</sub> O	0.002883	
	- L-Valina	0.002	
	Vitaminas		
	- D-Biotina	0.00002	
	- Cloruro de colina	0.0003	
	- Ácido fólico	0.0001	
	- mio-Inositol	0.0035	
	- Niacinamida	0.0001	
	- Ácido p-Aminobenzoico	0.0001	
	- Ácido D-Pantoténico (hemi-calcio)	0.000025	
	- Pyridoxina • HCl	0.0001	
	- Riboflavina	0.00002	
- Tiamina • HCl	0.0001		
- Vitamina B12	0.0000005		
Otros			
- D-Glucosa	0.2		
- Glutación (reducida)	0.0001		
- HEPES	0.596		
- Fenol Red • Na	0.00053		

**Tabla 17 (CONTINUACIÓN). Efecto de la suplementación del medio en la CMI de las AgNPs.** Suplementación con peptona y dextrosa en los medios MH y YPD, para evaluar su efecto en la actividad antimicrobiana de las AgNPs.

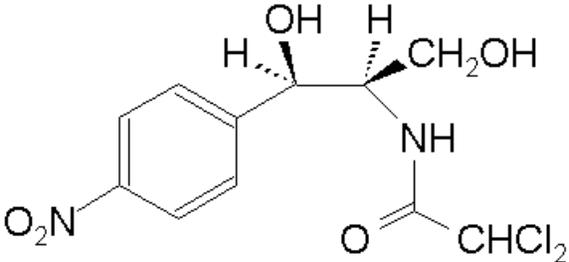
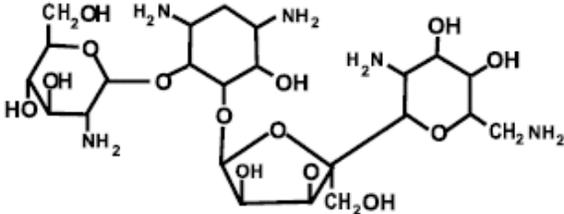
<b>NB.</b> Nutrient broth	Peptona Extracto de Res	5.0 3.0	7.4±0.2
<b>LB.</b> Luria-Bertani	Bacto Triptona Extracto de Levadura NaCl	1.0 0.5 1.0	7.5±0.2
<b>SD</b> Sabouraud Dextrose	Peptona  Dextrosa	1  2	5.6±0.2
<b>PDa</b> Potato dextrose agar	Dextrosa Almidón de papa Agar	2 0.4 1.5	5.6±0.2
<b>MH.</b> Muller-Hinton	Extracto de Carne Peptona Almidón	0.30% 1.75% 0.15%	7.3±0.2
<b>YPD.</b> Yeast extract, Peptone, Dextrose	Peptona Extracto de Levadura Dextrosa	2.0 1.0 2.0	6.5±0.2
<b>TSB.</b> Tryptic Soy Broth	Peptona Caseína K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Glucosa NaCl Peptona de Soya	1.70% 0.25% 0.25% 0.50% 0.30%	7.3±0.2

## Apéndice 2: Agentes antimicrobianos

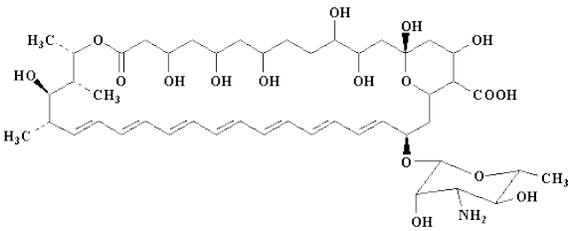
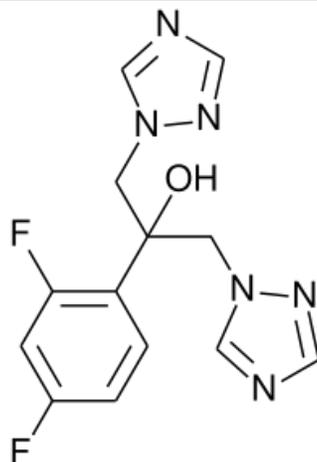
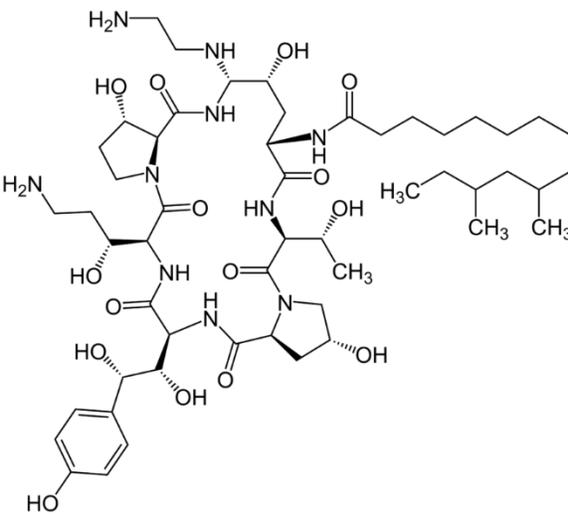
Tabla 18. Agentes antibacterianos. Descripción del modo de acción de los antibióticos y su estructura química.

Familia / Antibiótico	Modo de acción	Estructura
Betalactámico (Aminopenicilina)/  Ampicilina		 <p>The structure shows the ampicillin molecule, which consists of a penicillin nucleus (a fused beta-lactam and thiazolidine ring system) with a phenylglycine side chain and a methyl group on the thiazolidine ring.</p>
Betalactámico (carbapenem)/  Biapenem	<p>Se une e inactiva las proteínas-de-anclaje-de-penicilinas (<i>penicillin-binding proteins</i>, PBP) localizadas en la membrana interna de la pared celular bacteriana. Su actividad es extracelular.</p>	 <p>The structure shows the biapenem molecule, featuring a carbapenem nucleus (a fused beta-lactam and dihydropyridinone ring system) with a methyl group, a hydroxyl group, and a carboxylate group, and a side chain containing a sulfur atom linked to a piperazine ring.</p>
Monobactámico/  Aztreonam		 <p>The structure shows the aztreonam molecule, which is a monobactam. It features a beta-lactam ring with a methyl group and a sulfonamide group, and a side chain containing a thiazolidine ring and a carboxylic acid group.</p>

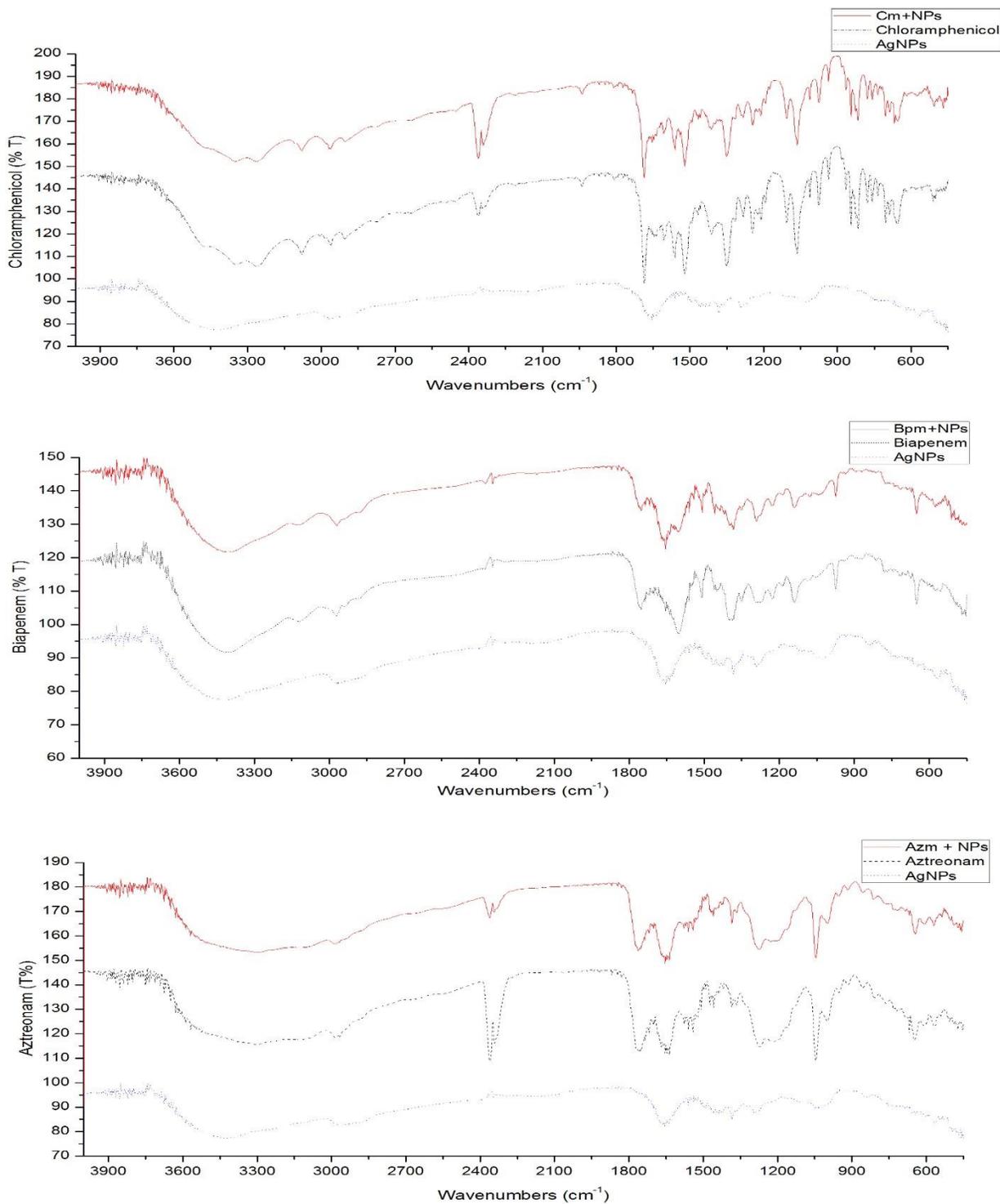
**Tabla 18 (CONTINUACIÓN). Agentes antibacterianos.** Descripción del modo de acción de los antibióticos y su estructura química

Familia / Antibiótico	Modo de acción	Estructura
Fenicol / Cloranfenicol	Inhibe la síntesis proteica, se une a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. Su actividad es intracelular.	 <p>The structure shows a central carbon atom bonded to a hydroxyl group (OH) with a dashed bond, a hydrogen atom (H) with a wedged bond, a 4-nitrophenyl ring (a benzene ring with a nitro group, O<sub>2</sub>N, at the para position), and a dichloroacetamido group (-NH-C(=O)-CHCl<sub>2</sub>).</p>
Aminoglucósido / Kanamicina	Afecta a la subunidad 30S de los ribosomas bacterianos, provocando errores de traducción. Su actividad es intracelular.	 <p>The structure is a complex aminoglycoside consisting of three linked sugar rings: a 2-deoxystreptamine core, a 2-deoxy-L-xylorhamnose ring, and a 2-deoxy-L-galactosamine ring. Each ring has various hydroxyl (OH) and amino (NH<sub>2</sub>) groups attached.</p>

**Tabla 19. Agentes antifúngicos.** Descripción del modo de acción de los antibióticos y su estructura química.

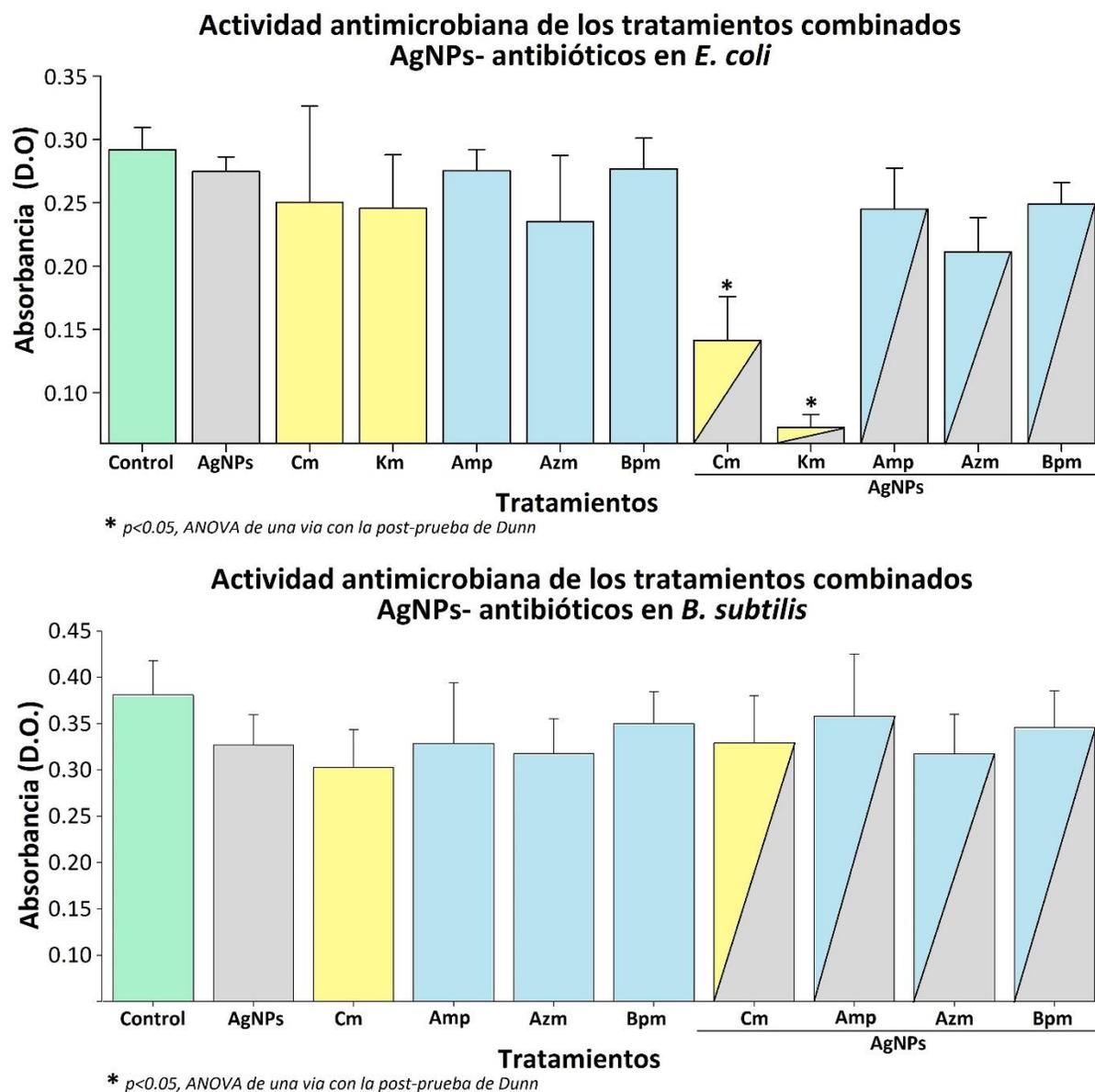
Familia / Antibiótico	Modo de acción	Estructura
<p>Macrólido poliénico / Anfotericina B</p>	<p>Se une a los esteroides de la membrana celular, lo que deteriora la integridad estructural de ésta. Su actividad es extracelular.</p>	
<p>Azol / Fluconazol</p>	<p>Inhibe la síntesis fúngica de esteroides. Su actividad es intracelular.</p>	
<p>Equinocandina / Caspofungina</p>	<p>inhibe la síntesis de <math>\beta</math> (1,3)-D-glucanos. Su actividad es intracelular.</p>	

### Apéndice 3: Caracterización FT-IT de los tratamientos combinados



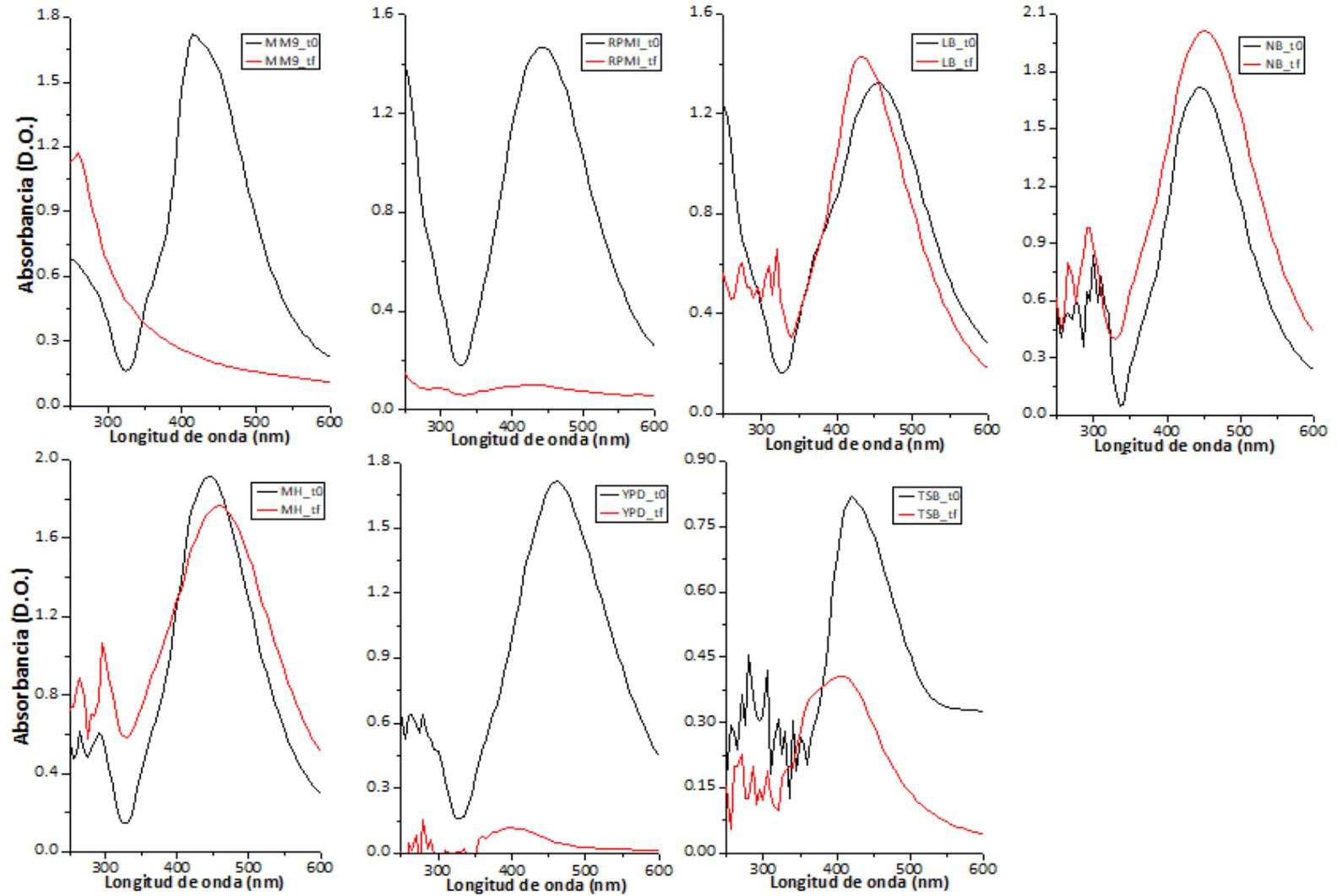
**Figura 42. Análisis por espectroscopía FT-IR de los tratamientos combinados (Apéndice).** No hay diferencia entre los espectros de AgNPs-antibióticos con respecto a los AgNPs o antibióticos por separado.

## Apéndice 4: Efecto de los tratamientos combinados en la actividad antimicrobiana



**Figura 43. Efecto en la actividad antimicrobiana en tratamientos combinados AgNPs-antibióticos (Apéndice).** La sinergia se observó con kanamicina (Km) y cloranfenicol (Cm) en todas las cepas, excepto en *B. subtilis*. No hay sinergia con los antibióticos lactámicos en ninguna cepa.

### Apéndice 5: Perfiles de absorbanza de las AgNPs en distintos medios de cultivo



**Figura 44.** Perfiles de absorbanza de las AgNPs en los medios de cultivo, en tiempos finales e iniciales. Las AgNPs mostraron diferentes perfiles de absorbanza, en los tiempos iniciales (línea negra) y finales (línea roja), en cada medio de cultivo.