

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C.).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de lo Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

CICESE@ 2022. Todos los derechos reservados

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



**Maestría en Ciencias
en Nanociencias**

**Nanoestructuras de óxido de cobre (CuO) biofuncionalizadas
con anticuerpos para una actividad antibacteriana dirigida a
Gram positivas o Gram negativas**

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

Presenta:

Jorge Alejandro Ontiveros Robles

Ensenada, Baja California, México
2022

Tesis defendida por
Jorge Alejandro Ontiveros Robles

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Andrey Simakov
Codirector de tesis

Dra. Francisca Villanueva Flores
Codirectora de tesis

Dr. Rafael Vázquez Duhalt

Dra. Eunice Vargas Viveros

Dra. Brenda Jeanneth Acosta Ruelas

Dr. Serguei Miridonov Elakov



Dr. José Manuel Romo Herrera
Coordinador del Posgrado en Nanociencias

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Jorge Alejandro Ontiveros Robles** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

Nanoestructuras de óxido de cobre (CuO) biofuncionalizadas con anticuerpos para una actividad antibacteriana dirigida a Gram positivas o Gram negativas

Resumen aprobado por:

Dr. Andrey Simakov
Codirector de tesis

Dra. Francisca Villanueva Flores
Codirectora de tesis

Recientemente se ha propuesto el uso de nanopartículas de óxidos metálicos como una alternativa para combatir la resistencia bacteriana a los antibióticos (RA). En la presente investigación se evalúa la actividad antibacteriana de nanopartículas de óxido de cobre (CuONP) y nanoesferas de óxido de cobre (@CuONE) frente a bacterias *Bacillus subtilis* (Gram positivas) y *Escherichia coli* (Gram negativas). El incremento en su eficacia como agente bactericida al funcionalizarlas con anticuerpos biospecíficos fue asimismo analizado. Las @CuONE se sintetizaron por la técnica de rocío pirolítico, mientras que las CuONP se obtuvieron comercialmente. El patrón de difracción de rayos X (DRX) tanto para las @CuONE como para las CuONP mostró la presencia de los planos (002) y (111) correspondientes al CuO con fase cristalina monoclinica. Mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) se confirmó la morfología esférica hueca de las @CuONE, con un diámetro promedio de 133 ± 54 nm, que es ligeramente superior al de las CuONP de 123 ± 68 nm. Los ensayos por dispersión dinámica de luz (DLS) arrojaron que, en solución el diámetro hidrodinámico promedio de las @CuONE fue de 197 ± 85 nm, con un potencial zeta de -18 ± 3.5 mV; mientras que para las CuONP se obtuvieron valores de 242 ± 96 nm y $-12 \pm 4,0$ mV, respectivamente. Por otro lado, las CuONP exhibieron una concentración mínima inhibitoria (MIC) para *E. coli* de 1.25 mg/mL y para *B. subtilis* de 2.30 mg/mL. A su vez, las @CuONE mostraron una actividad antibacteriana con MIC para *E. coli* y *B. subtilis* de 800 µg/mL. Mediante citometría de flujo se evaluó el efecto de nuestros nanomateriales en cultivos mixtos de *E. coli* y *B. subtilis*. Nuestros datos mostraron que las CuONP funcionalizadas con anticuerpos específicos para Gram negativa disminuyeron la viabilidad bacteriana en un 35% y 16% para *E. coli* y *B. subtilis*, respectivamente. En general, nuestros resultados demostraron que las @CuONE tienen un efecto antibacteriano mayor que las CuONP y la selectividad mejora significativamente al biofuncionalizarlas con anticuerpos específicos. Por lo tanto, estos sistemas poseen una alta eficiencia y potencial para combatir bacterias patógenas, pudiendo ser aplicados, por ejemplo, en la industria alimentaria.

Palabras clave: Nanoestructuras de óxido de cobre, nanopartículas de óxido de cobre, nanoesferas de óxido de cobre, actividad antibacteriana

Abstract of the thesis presented by **Jorge Alejandro Ontiveros Robles** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanosciences.

Copper oxide (CuO) nanostructures biofunctionalized with antibodies for Gram-positive or Gram-negative targeted antibacterial activity

Abstract approved by:

Dr. Andrey Simakov
Codirector de tesis

Dra. Francisca Villanueva Flores
Codirectora de tesis

Metal oxide nanoparticles have recently been proposed as an alternative to combat bacterial antibiotic resistance (AR). In this research, the antibacterial activity of copper oxide nanoparticles (CuONP) and copper oxide nanospheres (@CuONE) against *Bacillus subtilis* (Gram-positive) and *Escherichia coli* (Gram-negative) bacteria was evaluated. The increase in their efficacy as a bactericidal agent by functionalizing them with biospecific antibodies is likewise analyzed. The pyrolytic spray technique was used to synthesize the @CuONE, while in case of CuONP were used commercial ones. The XRD pattern both for the @CuONE and for the CuONP showed the presence of the (002) and (111) planes corresponding to CuO with a monoclinic crystalline phase with comparable crystallinity. Transmission electron microscopy (TEM) confirmed the hollow spherical morphology of @CuONE, with an average external diameter of 133 ± 54 nm which is a slightly higher than that for CuONP (123 ± 68 nm). In contrast, dynamic light scattering (DLS) assays showed that, in aqueous solution, the mean hydrodynamic diameter of @CuONE was 197 ± 85 nm, with a zeta potential of -18 ± 3.5 mV, while CuONP was characterized with values of 242 ± 96 nm and -12 ± 4.0 mV, respectively. CuONP exhibited a minimum inhibitory concentration (MIC) for *E. coli* of 1.25 mg/mL and *B. subtilis* of 2.30 mg/mL. The @CuONE showed an antibacterial activity with MIC for *E. coli* and *B. subtilis* of 800 $\mu\text{g/mL}$. The evaluation in mixed cultures showed that CuONP functionalized with Gram-negative specific antibodies decreased the bacterial viability of 35% of *E. coli* compared to the control, while only 16% for *B. subtilis*. Therefore, the results show that as @CuONE has a higher antibacterial effect than CuONP, Gram-negative bacteria tended to be more susceptible, and the cytometry data suggest that bioconjugation with antibodies increases and controls the antibacterial activity. Therefore, these systems manifested a high efficiency to combat pathogenic bacteria, and may be applied, for example, in the food industry.

Keywords: Copper oxide nanostructures, copper oxide nanoparticles, copper oxide nanospheres, antibacterial activity

Dedicatoria

A Dios, por permitirme estar en este mundo.

A mi madre Elsa Cecilia, por su incondicionalidad y apoyo en cada etapa de mi vida.

A mis amigas, Daniela y Francisca por estar siempre pendiente de mí, sus atenciones y procurar que avanzara con este proyecto.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de posgrado que me brindó para poder dedicarme de tiempo completo a la realización de la maestría. También al proyecto DGAPA PAPIIT 206920.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNYN-UNAM) por permitirme ser parte de su comunidad estudiantil, brindarme sus instalaciones y recursos para poder llevar a cabo esta investigación.

A la Dra. Francisca Villanueva Flores por cada hora que dedico a enseñarme e instruirme, tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias por cada una de sus revisiones y gracias por su amistad.

Al Dr. Andrey por aceptarme como su estudiante, abrirme las puertas de su laboratorio, procurarme y brindarme su apoyo cada vez que lo necesite.

Al Dr. Rafael por abrirme las puertas de Bionano, creer en mí e invertir sus recursos en este proyecto, guiarme y procurarme en la realización de esta investigación.

A mi comité de tesis, la Dra. Eunice Vargas Viveros, Dra. Brenda Jeanneth Acosta Ruelas y Dr. Serguei Miridonov Elakov; por su tiempo y sus valiosas aportaciones durante los avances y revisión de tesis.

A la Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno por brindarme su tiempo y conocimiento en el uso de citometría de flujo. A la Dra. Eunice por medir las muestras en DRX. Sin su ayuda este trabajo no estaría completo.

A mi amiga Daniela Molina Estrada por regalarme su amistad, compañía y tiempo. Por estar siempre pendiente de mí. Por cada comida que me compartió. Por insistirme en utilizar la bicicleta. Por sacarme de mi zona de confort y por hacer más alegre mi estancia en Ensenada. La mejor compañía y el regalo más grande que me dio el posgrado.

A mis amigos del NanotoxLab, Elizabeth Mavil, Salma López, William por brindarme su apoyo, conocimiento, ayuda y tiempo. También a la Dra. Karla por permitirme formar parte de su grupo y por invitarme a sus reuniones.

A mis amigos, Pedro Gama, Jordan Molina y Elizabeth por darme su amistad, consejos, motivación y tiempo.

A mis compañeros y jefes de bionano, Dr. Rubén cadena, Anaid Meza, Itandehui, Dra. Ana y Dra. Kanchan por sus consejos, darme apoyo en el laboratorio y las atenciones brindadas.

A mi familia, mi mamá, mi hermana Daniela Ontiveros, mis abuelos y mis tíos por preocuparse por mí, por cuidarme y procurarme. A mis amigos, José Velázquez (Chucho), Antonio Luna y Kevin Reséndiz por su apoyo.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas	x
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	3
1.1.1 Nanomateriales (NM).....	3
1.1.2 Actividad antibacteriana de las nanopartículas	6
1.1.3 Actividad antibacteriana de las nanopartículas de óxidos metálicos	8
1.1.3.1 Composición Química.....	9
1.1.3.2 Tamaño de partícula	10
1.1.3.3 Morfología.....	10
1.1.4 Actividad antibacteriana de las nanopartículas de óxidos metálicos	11
1.1.5 Resistencia a los antibióticos (RA).....	14
1.1.6 Bacterias.....	16
1.1.6.1 Componentes de la EC bacteriana	16
1.2 Objetivos.....	18
1.2.1 Objetivo general.....	18
1.2.2 Objetivos específicos.....	18
Capítulo 2. Metodología	20
2.1 Síntesis de las nanoesferas de óxido de cobre (@CuO)	20
2.1.1 Caracterización por difracción de rayos X (DRX).....	21
2.1.2 Espectroscopía UV-Vis.....	21
2.2 Modificación química de la superficie de las CuONP	22
2.2.1 Funcionalización de las CuONP	22
2.2.2 Bioconjugación de las CuONP-NH ₂	23
2.2.3 Caracterización por dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial zeta	24
2.4 Evaluación del efecto antibacteriano	24

2.4.1 Determinación de la CMI	25
2.4.2 Determinación de la CMB	26
2.4.3 Determinación del porcentaje de inhibición.....	26
2.4.4 Determinación de la IC ₅₀	26
2.4.5 Análisis por citometría de flujo	26
2.5 Análisis estadístico.....	27
Capítulo 3. Resultados y discusión.....	28
3.1 Caracterización fisicoquímica	28
3.1.1 Caracterización por DRX.....	29
3.1.2 Caracterización por UV-Vis.....	30
3.1.3 Caracterización por TEM	31
3.1.4 Caracterización por DLS	33
3.1.5 Caracterización por potencial zeta.....	34
3.2 Evaluación del efecto antibacteriano de las CuONP y CuONP-AcGram ⁺ y CuONP-AcGram ⁻	36
3.3 Evaluación de la actividad antibacteriana selectiva por citometría de flujo	39
Capítulo 4. Conclusiones	41
Literatura citada	42
Anexos	53

Lista de figuras

Figura	Página
1. Características principales de los sistemas nanométricos.....	4
2. Clasificación de nanomateriales	5
3. Actividad antibacteriana de las NP y iones metálicos.	8
4. Micrografía electrónica de transmisión (TEM) de bacterias tratadas con CuONP	12
5. Mecanismos de unión entre las CuONP y las membranas celulares bacterianas	14
6. Esquema de los diferentes mecanismos de la RA en bacterias.....	15
7. Estructura de la EC para las bacterias Gram negativas y Gram positivas	16
8. Esquema general del equipo de rocío pirolítico usado para la síntesis de nanoesferas	20
9. Esquema del proceso de funcionalización y bioconjugación de las CuONP	22
10. Metodología de funcionalización de las CuONP.....	23
11. Caracterización fisicoquímica de las nanoestructuras de CuO y @CuO	28
12. Caracterización por UV-Vis de las CuONP.....	31
13. Caracterización por TEM de las CuONP y @CuONE.....	32
14. Caracterización por TEM de las CuONP-Ac ⁺ y CuONP-Ac ⁻	33
15. Evaluación de la actividad antibacteriana de las CuONP.....	36
16. Evaluación de la viabilidad bacteriana de las CuONP bioconjugadas.....	38
17. Análisis por citometría de flujo de la actividad antibacteriana selectiva.	40
18. Evaluación de la actividad antibacteriana de las @CuONE	53

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Actividad antibacteriana de las CuONP derivadas de diversas condiciones de síntesis contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	11
2. Concentraciones CMI, CMB y IC ₅₀	39

Capítulo 1. Introducción

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) se define como la capacidad de algunos microorganismos (bacterias, virus, hongos o parásitos) para sobrevivir o proliferar en presencia de aquellos agentes hacia los que eran inicialmente sensibles (Dadgostar, 2019). La RAM es un grave problema de salud pública. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que, en el 2019, 700 mil personas murieron a causa de la RAM, de las cuales 230 mil se atribuyen exclusivamente a casos de tuberculosis multirresistente. Se prevé que para el año 2050, la cifra de muertes debido a la RAM ascienda a 10 millones de pacientes por año, posicionándose como la principal causa de mortalidad a nivel mundial (World Health Organization (WHO), 2019).

La RAM resulta de la adaptación natural de los microbios al medio ambiente (Fletcher, 2015). En la actualidad se ha potenciado con el uso excesivo e inadecuado de los antibióticos debido a la automedicación, y sobreuso en hospitales, mercado agrícola y acuícola (Manyi-Loh et al., 2018). La resistencia a antibióticos (RA) es frecuente que aparezca en ambientes clínicos donde es común el uso de antibióticos en un entorno donde coexisten múltiples especies de patógenos (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2019).

Asimismo, la aparición de bacterias resistentes ha provocado que algunos fármacos queden en desuso suponiendo la aparición de enfermedades graves y un incremento en los costos de atención médica (WHO, 2020). En Estados Unidos, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) reporta que cada año se registran 2.8 millones de personas infectadas por bacterias con RA, lo que resulta en al menos 35 mil fallecimientos que a su vez representan pérdidas económicas cercanas a los \$20 mil millones de dólares solo en gastos médicos adicionales (CDC, 2019).

A pesar del serio problema de la RA, para las farmacéuticas el desarrollo de nuevos antibióticos es una inversión económicamente poco rentable debido a la dificultad para obtener la aprobación por parte de las entidades reguladoras. El uso de antibióticos durante periodos cortos de tiempo, no aseguran un retorno razonable de la inversión en comparación a los medicamentos para tratar afecciones crónicas (Mckenna, 2015; Taylor, 2015). Como alternativas a los antibióticos se han propuesto diferentes moléculas tales como anticuerpos, probióticos, péptidos antimicrobianos, lisinas de fagos, entre otros (Ghosh et al., 2019). Sin embargo, a pesar de las claras ventajas sobre los antibióticos, estas estrategias están limitadas principalmente por su alto costo de producción, impidiendo su uso y aplicación como medicamento en

toda la población (Ríos et al., 2016). Aún frente a los presentes esfuerzos, el camino hacia una solución definitiva que proporcione acceso generalizado y a bajo costo no es clara, por lo que áreas de estudio emergentes como la nanotecnología se presentan como una opción prometedora.

La nanotecnología presenta novedosas alternativas para combatir la RA. Recientemente se ha reportado la síntesis, caracterización y aplicación de nanomateriales (NM) con actividad antibacteriana eficaz frente a un amplio espectro de bacterias. Entre los NM antibacterianos más eficaces se destacan las nanopartículas (NP) a base de metales nobles y óxidos metálicos (OM), como la plata (Ag), el óxido de zinc (ZnO) (Xie et al., 2011) y el óxido de cobre (CuO) (Azam, 2012). Su efecto antibacteriano se atribuye principalmente a la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la liberación de iones metálicos (Ag^+ , Zn^{2+} y Cu^{2+}), que son capaces de afectar componentes celulares importantes, como la pared celular, proteínas y ADN.

En específico, las nanopartículas de óxido de cobre (CuONP), debido a sus propiedades antibacterianas han ganado la atención en aplicaciones como recubrimiento en piezas dentales y agente biocida de amplio espectro tanto para Bacterias Gram positivas como Gram negativas, incluidas patógenas como *Klebsiella pneumoniae* (Naseer et al., 2021), *Staphylococcus aureus*, y *Vibrio anguillarum* (Nabila and Kannabiran, 2018). Su actividad antibacteriana en gran medida se atribuye a la liberación de iones Cu^{2+} que a través de reacciones tipo Fenton que inducen la producción de ROS (OH^- y O_2^-), capaces de generar estrés oxidativo (Hsueh et al., 2017). Las CuONP poseen una alta área superficial y excelente estabilidad física y química, lo que las plantea como una buena plataforma de funcionalización con otras moléculas orgánicas o biológicas para ampliar aún más sus propiedades. Asimismo, es uno de los agentes antibacteriales más estudiados, después de los metales nobles (Verma and Kumar, 2019).

Recientemente se ha reportado el uso de nanopartículas en conjunto con anticuerpos como un método para la detección específica y administración de nanosistemas bactericidas selectivos (Yeh et al., 2020). Por ejemplo, Wan et al. (2016) desarrollaron un inmunobiosensor basado en nanopartículas de oro (AuNP) bioconjugado con anticuerpos anti-*Escherichia coli* O157:H7. El biosensor fue capaz de detectar bacterias con un límite de detección de 100 células/mL. Además, no presentó cambios significativos (menos del 3%) cuando se evaluó con bacterias, *E. coli* DH5 α , *E. coli* K12 y *Staphylococcus aureus*, confirmando la especificidad selectiva (Wan et al., 2016).

Por otro lado, Ivanova et al. (2020) desarrollaron nanocápsulas (NC) de zeína bioconjugada con anticuerpos específicos hacia *Staphylococcus aureus*. Las NC estaban cargadas de orégano altamente

antibacteriano y se confirmó su acción específica utilizando un cultivo mixto de *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Para las NC sin anticuerpos se determinó una reducción logarítmica de hasta 1.9 y 1.3 para *S. aureus* y *P. aeruginosa*, respectivamente. Por el contrario, las NC con anticuerpos indujeron una reducción logarítmica de hasta 3 para *S. aureus*, mientras que para *P. aeruginosa* fue menor a 0.5. De esta manera, se ha demostrado que los nanosistemas dirigidos se unen por especificidad a la bacteria diana, mejorando con ello significativamente la actividad bactericida *in vitro* (Le et al., 2021).

Por consiguiente, el objetivo del presente trabajo es utilizar CuONP bioconjugadas con anticuerpos y nanoesferas huecas de óxido de cobre (@CuO) como posibles agentes antibacterianos contra un modelo de bacterias Gram positivas (*Escherichia coli*) y Gram negativas (*Bacillus subtilis*). Nuestra propuesta combina un material abundante con la propiedad de especificidad de un sistema biológico y evaluar su potencial como posible agente antimicrobiano de alta selectividad que además no genere resistencia.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Nanomateriales (NM)

Los NM se definen como materiales en los que al menos una de sus dimensiones está en la nanoescala comprendida entre 1 y 100 nm (Baig et al., 2021). En este intervalo de tamaño los materiales presentan propiedades fisicoquímicas únicas en comparación con su contraparte en la macroescala debido al aumento de la relación superficie/volumen y el confinamiento cuántico (National Nanotechnology Coordination Office (NNCO), 2022). En materiales macroscópicos, la mayoría de los átomos que lo componen están en el interior, por lo que las propiedades de los materiales están determinadas por éstos, mientras que en la nanoescala el material es lo suficientemente pequeño como para que la fracción de átomos sobre la superficie no sea despreciable (**Figura 1A**). Por ejemplo, en el caso de una nanopartícula de oro (AuNP) con estructura cubica centrada en las caras (FCC, por sus siglas en inglés), a medida que la partícula disminuye de diámetro de 100 nm a 5 nm, el porcentaje de átomos superficiales aumenta de 1.0% a 19.7% (Bastus et al., 2012). Por otro lado, al decrecer el tamaño de los materiales los niveles de energía de los electrones pasan de un estado continuo a uno discreto (**Figura 1B**), lo que hace que los NM posean electrones de mayor energía en comparación a los materiales. Dicho efecto determina las

propiedades térmicas, mecánicas y químicas del nanomaterial. Por ejemplo, en puntos cuánticos y semiconductores (Ramalingam et al., 2020).

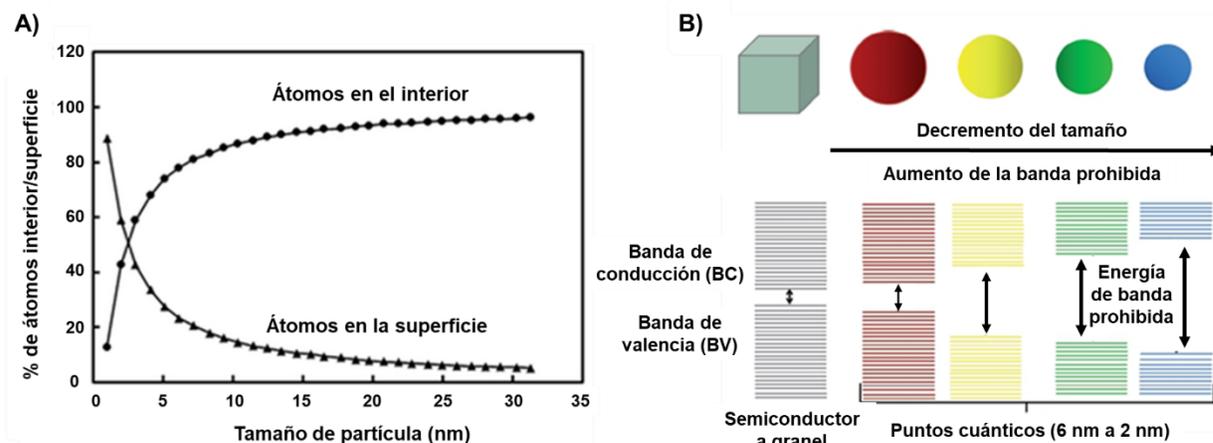


Figura 1. Características principales de los sistemas nanométricos: A) Relación de átomos de superficie, Modificado de Cambier, 2006. B) Diagrama esquemático que muestra la estructura de bandas de energía en material en la macroescala y nanoestructuras cuánticas. Modificado de Ramalingam et al., 2020.

Es posible clasificar los NM de diversas maneras, siendo dos de las formas más comunes con base en su composición química y dimensión (**Figura 2**) (Kumar and Ray, 2018). Esta última a su vez puede dividirse en cuatro clases como: NM de cero dimensiones (0D), una dimensión (1D), dos dimensiones (2D) y tres dimensiones (3D). Los NM de 0D tienen todas sus dimensiones en la nanoescala e incluyen nanopartículas (NP) con diferentes formas, nanocúmulos, puntos cuánticos y fullerenos. Los NM en 1D tienen dos dimensiones en la nanoescala e incluye nanotubos de carbono (NTC), nanocables, nanofibras, entre otros más. Los NM en 2D solo tienen una dimensión en la nanoescala por lo que incluyen películas delgadas, nanoplacas, hojas de grafeno y recubrimientos. Por último, los NM de 3D tienen todas sus dimensiones por encima de los 100 nm, pero se construyen utilizando nanoestructuras de 0D, 1D y 2D. Algunos ejemplos son, el grafito, diamante, policristales y composites (Saleh, 2020).

La disminución del tamaño de los materiales hasta la nanoescala conduce a cambios en sus propiedades fisicoquímicas (como el aumento de la cristalinidad, la reactividad química, el área de superficie y la conductividad eléctrica), lo que permite explorar nuevas aplicaciones (Khan et al., 2019). De hecho, en las últimas décadas debido al auge de la nanotecnología, la investigación y aplicación de NM se ha extendido enormemente a diversas industrias y sectores. Por ejemplo, en el sector energético, las nanopartículas de óxido de titanio (TiO_2NP) se emplean como fotoánodos en celdas fotovoltaicas debido a su enorme área de superficie, gran banda prohibida (3.3 eV) y su estructura porosa (Krishnapriya et al., 2021). En la

remediación de aguas residuales, se han empleado NP basadas en OM (óxido de zinc, óxido de cerio, óxido de hierro) debido a alta reactividad química de superficie, capacidad para oxidar, precipitar, reducir y adsorber compuestos contaminantes (Aragaw et al., 2021).

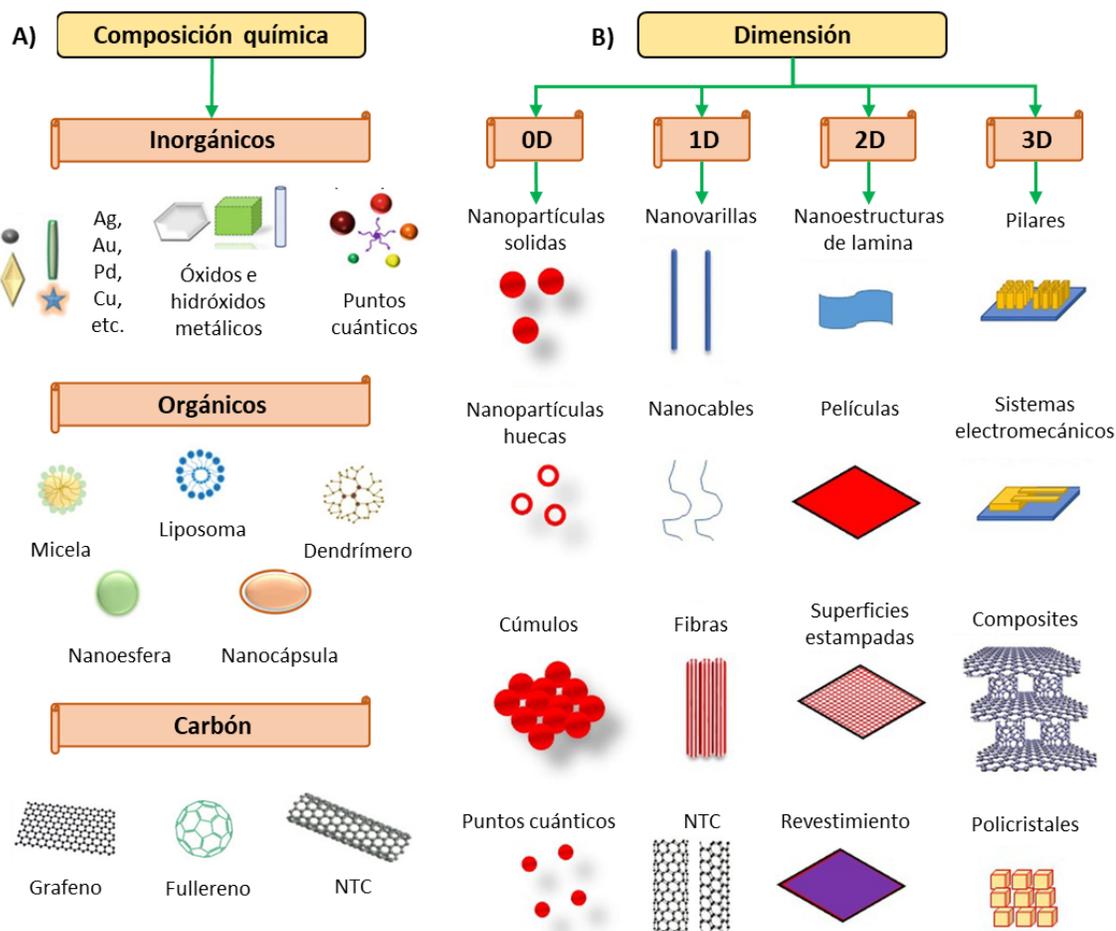


Figura 2. Clasificación de nanomateriales con base en: A) Composición química, como inorgánicos, orgánicos y base de carbono. B) Dimensión, como 0D, 1D, 2D, 3D. Modificado de Kumar and Ray, 2018 y Saleh, 2020.

En la industria electrónica, los puntos cuánticos de cadmio se han estudiado como diodo emisor de luz (led) en pantallas de televisiones debido a su banda de emisión estrecha, longitud de emisión sintonizable y alta pureza de color (Ryowa et al., 2020). En el sector agrícola, los NM basados en hidroxiapatita, quitosano, zeolitas, magnetita, entre otros se han utilizado como fertilizantes para la liberación lenta y suministro específico de nutrientes, aumentando con ello la productividad del cultivo y calidad del suelo (Al-Mamun et al., 2021).

En el sector salud, las AuNP se han reconocido como un material funcional en la terapia contra el cáncer (como transportadores de fármacos, agentes fototérmicos y agentes de contraste en bioimágenes) debido

a que exhiben una resonancia de superficie de plasmón localizada, cuentan con una excelente biocompatibilidad y capacidad de modificar su superficie por medio de grupos amina y tiol (Vines et al., 2019). También las AgNP se utilizan en medicina en el tratamiento de herida diabética, cicatrización de heridas, terapia contra el cáncer y combate contra infecciones bacterianas debido a su actividad antibacteriana, antiinflamatoria y anticancerígena (Skóra et al., 2021; F. Wang et al., 2022).

Es notable la amplia variedad de aplicaciones de los NM, en particular, las destinadas al sector salud son de interés público ya que se presentan como una posible respuesta a los diversos padecimientos y problemáticas que aquejan a la sociedad. Dentro de los NM, las NP han sobresalido como agentes de detección, diagnóstico, terapia y control frente a enfermedades como, el cáncer, la diabetes, las enfermedades de transmisión sexual (ETS) y las infecciones bacterianas con resistencia a múltiples fármacos (Baetke et al., 2015; Elmer et al., 2018; Singh et al., 2017).

1.1.2 Actividad antibacteriana de las nanopartículas

En la actualidad, se ha reportado ampliamente que las NP basadas en metales nobles y OM cuentan con excelentes propiedades antibacterianas, efectivas contra un amplio espectro de microorganismos (Kadiyala et al., 2018; Ye et al., 2022). Por lo que, en diversos estudios se reconoce su capacidad de aplicación como, recubrimiento bioactivo en dispositivos implantables con efecto antibacteriano a largo plazo (Basova et al., 2021), sistema de administración de antibióticos (Kotrange et al., 2021) y sistema de detección bacteriana específica para generar diagnósticos rápidos (Peng and Chen, 2019). Recientemente las NP han surgido como una opción prometedora para resolver la crisis de la RA (Lee et al., 2019).

Es particularmente destacable como los antibióticos convencionales poseen rutas específicas de acción antibacteriana (inhibición de la síntesis de la pared celular, la síntesis de proteínas y replicación del ADN). Sin embargo, las bacterias pueden desarrollar RA para cualquiera de estos modos de acción, por medio de la modificación de la pared celular y los ribosomas, la expresión de enzimas que modifiquen o degraden antibióticos y la expresión de bombas de expulsión (Wang et al., 2017). Mientras que las NP actúan por medio de diversos mecanismos simultáneamente, diferentes a las rutas de los antibióticos, disminuyendo con ello la probabilidad de que las bacterias generen resistencia y a la vez aumenta el éxito de generar muerte bacteriana. Por lo tanto, es de gran interés el estudio y comprensión de los mecanismos antibacterianos de las NP (Shaikh et al., 2019).

A pesar de que la actividad antibacteriana de las NP metálicas y OM es bien conocida, los mecanismos por los cuales se lleva a cabo no están elucidados del todo. Aunque, se le atribuye principalmente a la liberación de iones metálicos, generación de ROS, daño físico a la pared o membrana celular y la penetración de la envoltura celular (EC) bacteriana (Ogunsona et al., 2020).

En la **Figura 3** se describen a detalle las rutas de acción antibacteriana de las NP: 1) las NP liberan iones metálicos. 2) Las NP y/o los iones metálicos liberados entran en contacto directo con la pared celular o la membrana celular externa de la bacteria, la interacción se lleva a cabo por medio de atracción electrostática y fuerzas de Van der Waals. 3)

Las NP y/o iones metálicos penetran al interior de la bacteriana y se acumulan a lo largo de las vías metabólicas. 4) Ocurre la formación de ROS extracelulares e intracelulares por medio de reacción de Fenton; 5) se acumulan altas concentraciones de iones metálicos en la pared celular y ROS en la membrana plasmática, provocando cambios en la permeabilidad de la membrana que puede ocasionar lisis bacteriana. 6) Las NP y iones metálicos intracelulares pueden interferir con componentes básicos de la bacteria, provocando desequilibrios electrolíticos, inhibición de la actividad catalítica de enzimas, desactivación de proteínas. 7) Alteraciones en el ADN. Cabe destacar que la actividad antibacteriana de las NP es el resultado complejo de estos mecanismos, que ocurren simultáneamente. Por lo tanto, es difícil delimitar sus contribuciones individuales en un sistema biológico complejo (Godoy-Gallardo et al., 2021).

Tradicionalmente las AgNP han sido uno de los NM más atractivos en aplicaciones médicas debido a que exhiben una alta actividad antibacteriana en concentraciones que no son citotóxicas para algunas células humanas (Kvitek et al., 2011; Senthil et al., 2017).

También, se ha probado su eficacia contra bacterias resistentes a múltiples fármacos, como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) una de las causas más comunes de infecciones adquiridas en hospitales (Wang et al., 2021). También, pueden mejorar enormemente la actividad de los antibióticos convencionales incluso contra bacterias multirresistentes a través de efectos sinérgicos (Mba and Nweze, 2021).

De igual manera, las NP basadas en OM como, el óxido de plata (Ag_2O), el óxido de titanio (TiO_2), el óxido de cobre (CuO) y el óxido de zinc (ZnO) han ganado relevancia por su actividad antibacteriana de amplio espectro, además, de su mayor durabilidad y estabilidad (física y química) en comparación con los antibióticos tradicionales (Stanić and Tanasković, 2020).

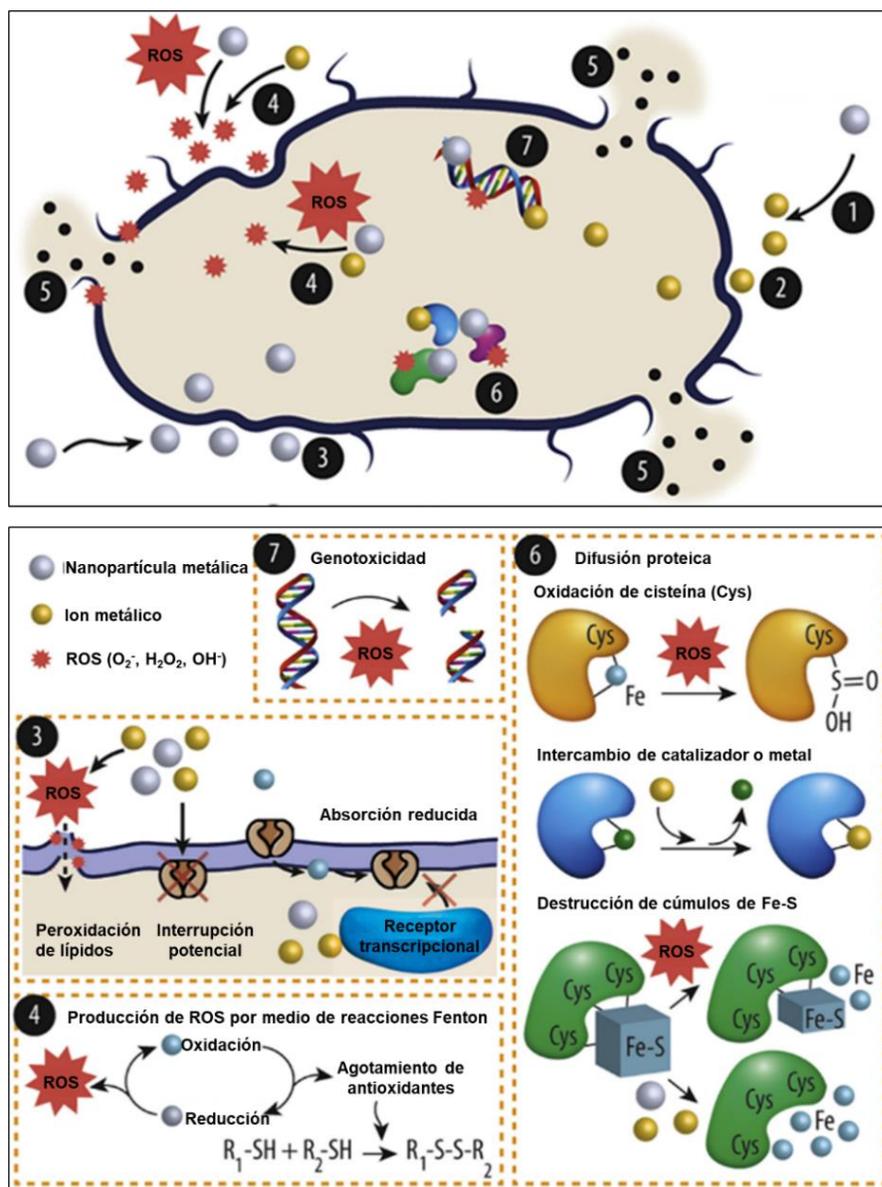


Figura 3. Actividad antibacteriana de las NP e iones metálicos. Del (1-7) se detallan las posibles rutas de acción. 1) las NP liberan iones metálicos; 2) las NP e iones metálicos interactúan con la pared celular; 3) las NP e iones metálicos penetran la pared celular; 4) se producen ROS; 5) los iones y ROS cambian la permeabilidad de la membrana; 6) las NP e iones afectan la funcionalidad de biomoléculas importantes y 7) incluida el ADN. Modificado de Godoy-Gallardo, 2021.

1.1.3 Actividad antibacteriana de las nanopartículas de óxidos metálicos

Las nanopartículas de óxidos metálicos (OMNP) son compuestos sólidos cristalinos formados a partir de la unión de iones metálicos (cationes) y oxígeno (como anión) con estado de oxidación de -2 (Abd Samad et al., 2020). El efecto biocida de las OMNP se atribuye a mecanismos como el estrés oxidante, la

peroxidación de lípidos, la lisis de la membrana celular y la prótesis. En general, la actividad antibacteriana de los OMNP depende de factores como: la composición química, tamaño de partícula, forma, agregación, solubilidad, fase cristalina, cristalinidad, concentración, condiciones experimentales, tipo y número de bacterias (Stanić and Tanasković, 2020). A continuación, se describe el estado del arte de las propiedades fisicoquímicas de las OMNP y cómo éstas determinan su actividad bactericida.

1.1.3.1 Composición Química

En los OM la diferencia en la composición química está dada por el tipo de ion metálico presente. Algunos iones son de vital importancia (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , entre otros) para procesos metabólicos de las bacterias mientras que otros son potencialmente tóxicos (Ag^+ y Hg^{2+}). La actividad antibacteriana del ion metálico está relacionada con su capacidad de interactuar con los componentes celulares de la bacteria, la afinidad de unión a biomoléculas (proteínas, enzimas, ADN, entre otros) y la generación de ROS por medio de reacciones tipo Fenton entre el ion metálico y H_2O_2 endógeno (Kessler et al., 2022; S. T. Khan and Al-Khedhairi, 2017).

La interacción entre el ion metálico y los ligandos específicos de las biomoléculas se puede explicar a través de la teoría ácido-base duro-blando. La teoría clasifica a los átomos, iones y compuestos en ácidos y/o bases duras y/o blandas. Explica que los ácidos blandos (Ag^+ , Hg^+ , Hg^{2+} y Cd^{2+}) forman compuestos complejos estables con bases blandas (por ejemplo, R-SH presente en proteínas) y los ácidos duros (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} y Co^{3+}) tienen mayor afinidad por bases duras (R-COO⁻, R-NH₂, R-OH, ROR, OH⁻, NH₃ y H₂O).

También hay iones metálicos (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} y Ni^{2+}) que tienen propiedades intermedias de duros y blandos, lo que permite que formen complejos estables con bases duras (como las aminas primarias, R-NH₂) y blandas (como, tiol), presentes las cadenas de aminoácidos de proteínas y enzimas. Además, la afinidad de iones divalentes por biomoléculas puede ser establecida por la serie Irving-Williams: $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$. Mostrando que el Cu^{2+} tiene la afinidad más fuerte y por lo tanto puede tener el efecto más tóxico (Soldatović, 2021).

1.1.3.2 Tamaño de partícula

La actividad antibacteriana de las OMNP depende en gran medida del tamaño de partícula. Al aumentar la relación área volumen, la superficie de la NP gana importancia en las propiedades fisicoquímicas. Por lo tanto, características superficiales, como el nivel de cristalinidad, el tamaño de cristal, los defectos de la red cristalina o superficiales pueden promover o disminuir la reactividad de la partícula. Por ejemplo, los iones metálicos en la superficie de las OMNP son insaturados coordinados, los cuales actúan como centros activos muy reactivos y pueden liberarse fácilmente al entorno circundante cuando entran en contacto con biomoléculas (Liu et al., 2017; Xu et al., 2021). También, defectos superficiales, como átomos en los bordes y/o esquinas, dan lugar a una superficie granular que puede dañar la envoltura celular bacteriana por contacto físico. Por otro lado, NP de tamaños pequeños (<30 nm) pueden penetrar fácilmente en las células bacterianas y liberar iones metálicos tóxicos al disolverse. Sin embargo, la disminución del tamaño puede conducir a poca estabilidad de la partícula en solución, provocando una mayor agregación, aumentando con ello el tamaño y disminuyendo el efecto antibacteriano (Ren et al., 2020).

1.1.3.3 Morfología

La actividad antibacteriana también se ve afectada por la forma de las OMNP. A pesar de que la composición química es la misma, las diferentes morfologías de NP varían propiedades, como la cristalinidad, la reactividad de superficie, la carga y los defectos de superficie, solubilidad y densidad. (Kaur et al., 2017; Ridolfo et al., 2021). Partículas de un mismo tamaño, pero con diferente forma pueden presentar cambios en el área superficial, así como exponer distintos planos cristalinos superficiales. Esto repercute en la velocidad de disolución de la NP y por lo tanto en su capacidad para liberar iones metálicos, que en altas concentraciones tienen efectos tóxicos sobre las bacterias (Kadiyala et al., 2018). Por ejemplo, Tamimi et al. (2021) evaluaron la capacidad antibacteriana del ZnO con formas de nanopartículas, nanoesferas y nanovarillas frente a *E. coli*. El efecto bactericida de las nanoesferas fue superior al de las otras morfologías (Tamimi et al., 2021).

Por otro lado, la actividad antibacteriana se puede explicar en términos del porcentaje de planos activos en la superficie de las NP. Por ejemplo, para la morfología de varillas, las nanovarillas de ZnO presentan planos en (111) y (100), mientras que las nanoesferas de ZnO tienen principalmente (100). Los planos con alta densidad de átomos (111) exhiben una mayor actividad antibacteriana (Sirelkhathim et al., 2015).

1.1.4 Actividad antibacteriana de las nanopartículas de óxidos metálicos

Dentro de los OMNP, las CuONP están ganando atención como agentes antibacteriales debido a su abundancia, fácil obtención y, en comparación con las AgNP, éstas son más baratas y liberan iones más rápido en el entorno. Además, se pueden producir a partir de métodos de síntesis verde y mezclar fácilmente con diversos componentes orgánicos y biológicos para mejorar sus propiedades fisicoquímicas (Ermini and Voliani, 2021).

Se ha reportado que las CuONP son citotóxicas hacia bacterias Gram positivas y Gram negativas (**Tabla 1**), incluidas bacterias patógenas, como SARM, bacterias formadoras de películas, como *Klebsiella pneumoniae* y bacterias asociadas a enfermedades nosocomiales, como *Enterococcus faecalis* (Agarwala et al., 2014; Ahamed et al., 2014; Naseer et al., 2021).

Tabla 1. Actividad antibacteriana de las CuONP derivadas de diversas condiciones de síntesis contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Precursor usado para la síntesis	Tamaño (nm)	Morfología	Bacterias	Tipo	RA	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	CMB ($\mu\text{g/mL}$)	Referencia
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7	Esférica	<i>E. coli</i>	Gram -	No	3750	7500	(Moniri Javadhesari et al., 2019)
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	14	Esférica	<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram +	No	2500	5000	(Moniri Javadhesari et al., 2019)
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	~30	Esférica	<i>E. coli</i>	Gram -	No	8	19.9	(Meghana et al., 2015)
CuCl_2	50	Cúbica	<i>E. coli K-12</i>	Gram -	No	160	180	(Chatterjee et al., 2014)
Sigma Aldrich	25 – 30	ND	<i>MRSA</i>	Gram +	Meticilina	30	ND	(Agarwala et al., 2014)
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	20 \pm 1.24	Esférica	<i>B. subtilis</i>	Gram +	No	30 \pm 5	45 \pm 3	(Azam, 2012)
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	20 \pm 1.24	Esférica	<i>S. aureus</i>	Gram +	No	25 \pm 4	32 \pm 5	(Azam, 2012)

CMI: concentración mínima inhibitoria, CMB: concentración mínima bactericida.

La actividad antibacteriana de las CuONP puede atribuirse a la interacción directa entre las NP y las bacterias, seguida de la liberación de iones Cu^{2+} causada por la disolución de las de las NP en presencia de un medio acuoso y la inducción de ROS, el mecanismo general se esquematiza en la **Figura 4**. Primero, la agregación de NP en la membrana bacteriana disminuye el potencial electroquímico transmembrana. Luego, las NP lo suficientemente pequeñas y/o los iones Cu^{2+} liberados por las mismas permean la membrana celular. Finalmente, tanto las NP como los iones Cu^{2+} inducen la producción de ROS, provocando cambios letales en las células, alteraciones ADN, proteínas y lípidos (Makvandi et al., 2020; Román et al., 2020).

Guy Appleton et al. (2012) reportaron que la actividad antibacteriana del CuO frente a bacterias *E. coli* y *S. aureus* es dependiente del tamaño. El potencial antibacteriano se evaluó a una temporalidad de 3 h y se reportó, para *S. aureus* una reducción en la viabilidad bacteriana de 97%, 94% y 36% y para *E. coli* una reducción de 99.9%, 98% y 70% frente a CuONP de tamaños de 5, 45 y 900 nm, respectivamente. Estas diferencias en la actividad antibacteriana se atribuyen a la tendencia de las NP de menor tamaño a acumularse en la membrana/pared celular (**Figura 4**) y a la capacidad de generar mayor cantidad de ROS, lo que induce un mayor estrés oxidativo. Además, se detectaron NP dentro del citoplasma, lo que llevó a la hipótesis de que las NP podrían haber entrado como consecuencia de la ruptura de la membrana celular (Appleton et al., 2012).

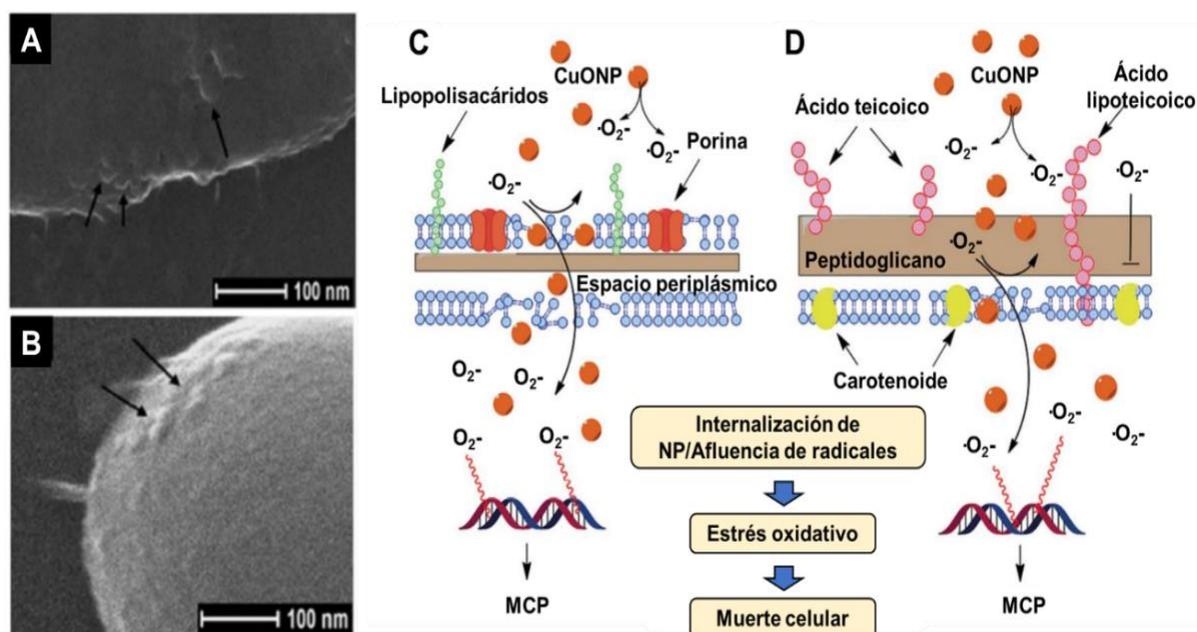


Figura 4. Micrografía electrónica de transmisión (TEM) de bacterias tratadas con CuONP. (A, B) *E. coli* y *S. aureus* tratadas con CuONP de 2 y 30 nm, respectivamente. El mecanismo de interacción de las CuONP frente a la EC bacteria (C) *E. coli* (Gram negativa) y (D) *S. aureus* (Gram positiva). El daño a las bacterias está mediado por los aniones superóxido dañinos formados por las NP de CuO adheridas/internalizadas de la célula. Las bacterias Gram positivas se ven menos afectada por el estrés oxidativo debido a la presencia de mayor cantidad de peptidoglicano y de pigmentos carotenoides en comparación a las Gram negativas. Modificado de Appleton, 2012.

Asimismo, la morfología de las NP está involucrada en el rendimiento antibacteriano. Ananth et al. (2015) estudiaron los efectos tóxicos de NM de CuO con formas granular, alargada (aguja) y placa frente bacterias Gram positivas (*Streptococcus iniae* y *Streptococcus parauberis*) y bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* y *Vibrio anguillarum*). Determinaron que las nanoplacas (100 nm de largo) exhibían una actividad antibacteriana mayor contra todas las bacterias, particularmente *Streptococcus iniae* (CMI 1.6 µg/mL). También las nanoplacas presentaron mayor presencia de iones Cu²⁺. Por lo que el efecto antibacteriano se atribuyó entre el material (dependiente de la morfología), daño relacionado con el estrés oxidativo y la liberación de iones Cu²⁺ (Ananth et al., 2015).

Surapaneni Meghana et al. (2014) evaluaron la actividad antibacteriana de NP de óxidos de cobre, óxido cúprico (CuO) y óxido cuproso (Cu₂O) en *E. coli*. Determinaron que el efecto biocida de ambos óxidos sigue rutas de acción diferentes, específicas y dependientes del tipo de ion metálico liberado. El CuO, libera iones Cu²⁺ que inducen la generación de ROS (OH[•] y O₂⁻), mientras que el Cu₂O libera Cu⁺ que preferentemente interactúan por afinidad con grupos tiol presentes en aminoácidos de las proteínas. Además, aminoácidos intracelulares, como el ácido ascórbico y el glutatión tienden a reducir los iones Cu²⁺ a Cu⁺ para posteriormente quelar estos últimos (Meghana et al., 2015).

Las NP pueden ser funcionalizadas con moléculas orgánicas e inorgánicas para dotarlas de nuevas propiedades para ampliar el rango de aplicaciones. Por ejemplo, Halbus et al. (2019) recubrieron CuONP con ácido 4-hidroxifenilborónico (4-HPBA). Este recubrimiento permitió que las NP antibacterianas formen enlaces covalentes con los grupos diol de glicoproteínas expresados en la pared celular bacteriana (**Figura 5**).

Los ensayos antibacteriales se evaluaron frente a bacterias *Rhodococcus rhodochrous* y *E. coli* a tiempos de 10 min, 1 h y 6 h, empleando CuONP y CuONP recubiertas a diferentes concentraciones (0, 5, 10, 15, 20 y 25 µg/mL). Para *E. coli* se mostró que las CuONP recubiertas tiene un efecto antibacteriano de hasta un 30% más que las CuONP. Mientras que para *Rhodococcus rhodochrous* el efecto fue significativamente mayor para las 6 horas, las CuONP recubiertas mostraron una eficacia antibacteriana de hasta un 40% más que las CuONP. Esto se explica por la fuerte interacción entre el grupo ácido 4-hidroxifenilborónico terminal presente en la superficie de las NP y los carbohidratos en la superficie celular bacteriana (Halbus et al., 2019).

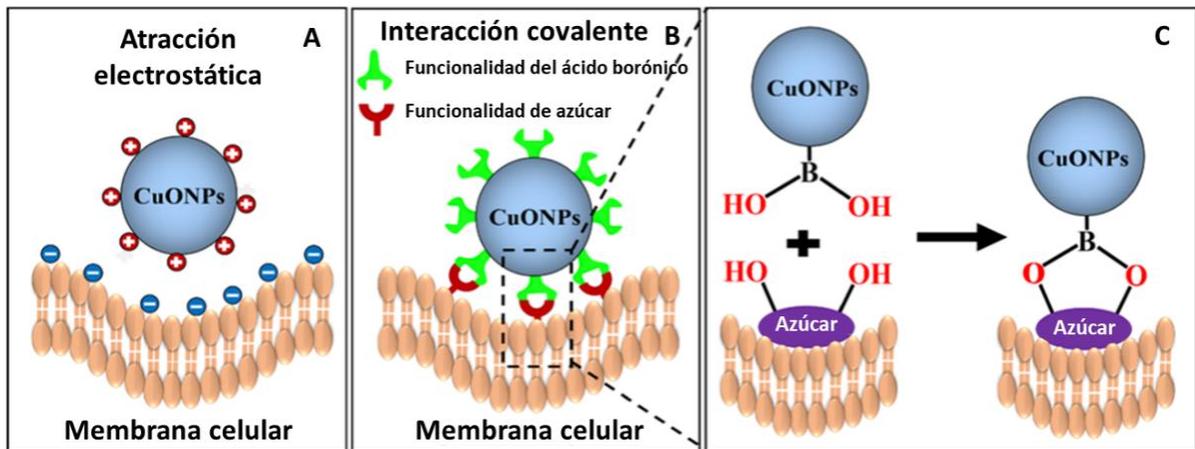


Figura 5. Mecanismos de unión entre las CuONPs y las membranas celulares bacterianas. (A) Atracción electrostática entre las CuONPs y las bacterias. (B) Unión covalente entre las CuONPs recubiertas con ácido borónico y las bacterias. (C) Interacción entre las CuONPs recubiertas con ácido borónico y grupos de azúcar en la superficie de la pared celular bacteriana. Modificado de Halbus et al., 2019.

1.1.5 Resistencia a los antibióticos (RA)

La RA es un subconjunto de la RAM, que se refiere específicamente a la capacidad de las bacterias de resistir los efectos de los antibióticos (Cambridge Infectious Diseases, s.f.). Sin embargo, la rápida adaptación de ciertas bacterias patógenas es un problema recurrente que hasta la fecha no tiene una solución definitiva (CDC, s.f.)

Originalmente la RA es un proceso natural que surge de la interacción entre los microorganismos y su entorno y está intrínsecamente ligada a la adaptación como un camino hacia la supervivencia. Desde una perspectiva evolutiva, las bacterias utilizan dos estrategias de defensa contra los antibióticos, la primera es la expresión de genes asociados con el mecanismo de acción de los antibióticos, la cual se puede subdividir en seis mecanismos diferentes (**Figura 6**).

(A) La modificación del antibiótico por medio de la adición de grupos funcionales tales como acetilo, fosfato o adenilo. (B) La degradación del antibiótico mediante hidrólisis. (C) La expulsión del antibiótico por medio de las bombas de salida. (D) La modificación del objetivo del antibiótico, como la metilación del ribosoma ARNr 23S o del ARNr 16S y la alteración del peptidoglicano (PG). (E) El bloqueo y/o secuestro del antibiótico por parte de proteínas. (F) La generación de objetivos que no son susceptibles al antibiótico (Peterson and Kaur, 2018).

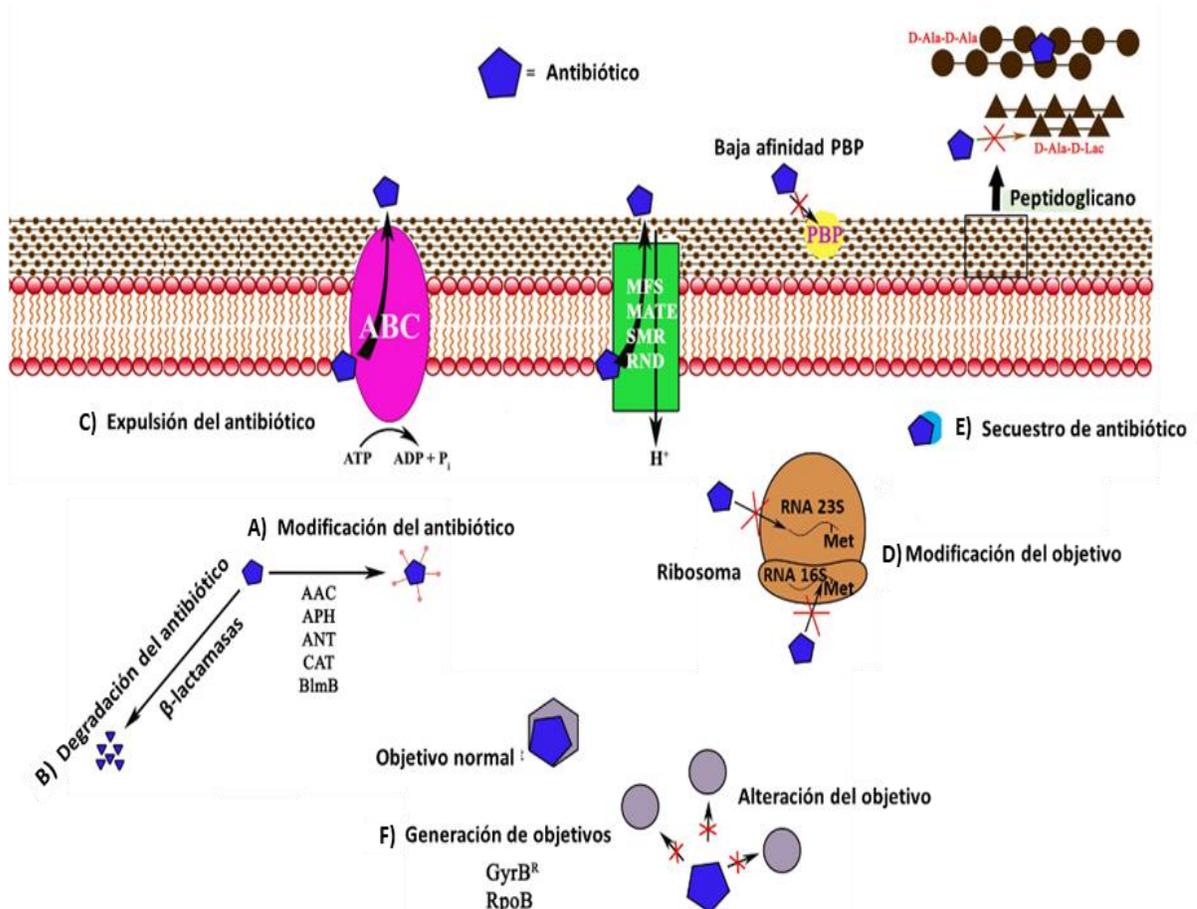


Figura 6. Esquema de los diferentes mecanismos de la RA en bacterias. A) Modificación del antibiótico por parte de las enzimas N-acetiltransferasa (AAC), O-fosfotransferasa (APH) y O-adeniltransferasa (ANT), cloranfenicol acetiltransferasas (CAT) y bleomicina N-acetiltransferasas (BlnB). B) Degradación del antibiótico mediada por las β-lactamasas. C) La expulsión del antibiótico por medio de las bombas ABC o gradientes de protones en bombas de la familia MFS, MATE, SMR y RND. D) La modificación del objetivo del antibiótico. E) El secuestro de antibióticos. F) El desvío del objetivo. Modificado de Peterson & Kaur, 2018.

La segunda estrategia es la adquisición de ADN que codifica para la resistencia a algún antibiótico. Clásicamente esto ocurre a través de tres estrategias principales: (a) La transformación, la cual consiste en la captación de ADN previamente liberado por una bacteria, por ejemplo, a través de la lisis celular. (b) La transducción, que es la transferencia de ADN mediada por un virus que afecta únicamente bacterias (bacteriófago). (c) La conjugación, la transferencia de material genético entre bacterias por medio de contacto directo (Sultan et al., 2018; von Wintersdorff et al., 2016).

1.1.6 Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares procariotas que existen en una gran diversidad de tamaños, hábitat y metabolismo. Las bacterias se pueden dividir en dos grandes grupos con base en la composición de su EC como bacterias Gram negativas o bacterias Gram positivas (**Figura 7**) (Zerbib, 2016).

La EC de las bacterias Gram negativas consta de una pared celular que se encuentra entre dos membranas: una membrana externa (ME) que separa a la bacteria de su entorno y una membrana interna (MI) que interacciona con el citoplasma. Por otro lado, las bacterias Gram positivas carecen de ME, pero cuentan con una pared celular gruesa y una MI. La diversidad de las EC es resultado de como las bacterias han evolucionado y se han adaptado en respuesta a desafíos únicos en diferentes entornos (Pajerski et al., 2019; Silhavy et al., 2010).

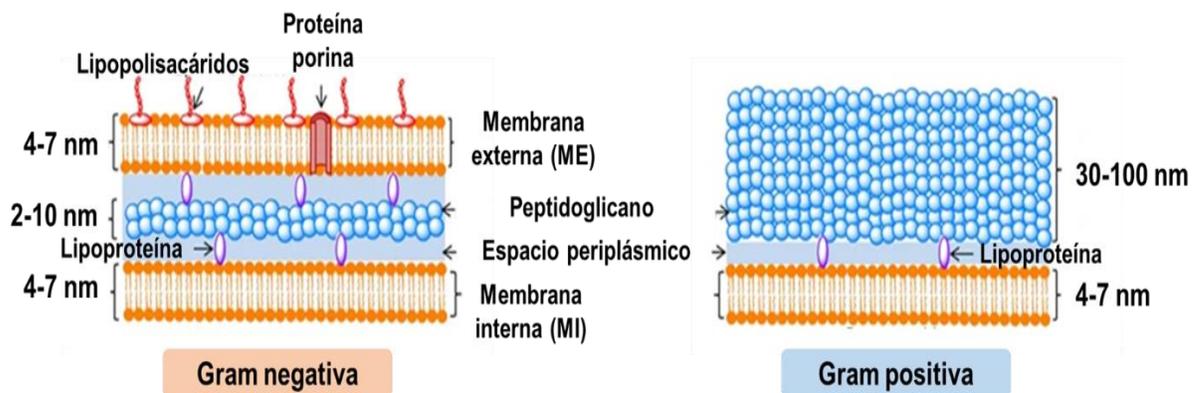


Figura 7. Estructura de la EC para las bacterias Gram negativas y Gram positivas. Las bacterias Gram negativas constan de dos membranas (una externa y otra interna) y una pared celular delgada. Las bacterias Gram positivas constan de una pared celular gruesa y una membrana interna modificada de Berezin et al., 2017.

1.1.6.1 Componentes de la EC bacteriana

La ME de la mayoría de las bacterias Gram negativas está formada por una bicapa lipídica asimétrica con una valva interna compuesta principalmente de fosfolípidos y una valva externa de lipopolisacáridos (LPS). La bicapa lipídica es de naturaleza hidrofóbica lo que impide el paso de grandes moléculas polares por medio de la repulsión electrostática. Además, los LPS están involucrados en funciones importantes como la activación de la respuesta inmunitaria en un huésped infectado y el aumento de permeabilidad contra moléculas hidrófobas pequeñas. En general, la ME tiene como funciones principales servir como una

barrera protectora de primera línea y facilitar la función celular adecuada de la bacteria (Brown et al., 2015).

La pared celular se compone principalmente de PG, una red de polisacáridos construida a partir de la unión alterna de N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetilmurámico (MurNAc) mediante enlaces glucosídicos β -1,4. El PG es un polímero rígido muy resistente cuya principal función es la de proteger a la bacteria de la turgencia interna ocasionada por la de osmolalidad existente entre el citoplasma y el medio extracelular.

También preserva la integridad estructural y determina la forma de la bacteria. Por lo que la inhibición de su biosíntesis o su degradación durante el crecimiento celular da como resultado la lisis celular. Ambos tipos de bacterias cuentan con una pared celular, sin embargo, existen diferencias estructurales claras entre ambas. En las bacterias Gram negativas la pared celular consta de una capa delgada de PG (alrededor de 2 a 10 nm), mientras que en las bacterias Gram positivas es mucho más gruesa (alrededor de 30 a 100 nm) sobre la cual otros polímeros (ácidos teicoicos o polisacáridos) y proteínas se unen covalentemente (Berezin et al., 2017; Brown et al., 2015).

La MI es una bicapa simétrica compuesta por fosfolípidos que confinan al citoplasma, brindan soporte a una amplia variedad de proteínas y mantienen la permeabilidad de la bicapa frente a moléculas hidrofílicas. Las proteínas en la MI abarcan completamente la bicapa y están involucradas en procesos celulares importantes, como el flujo de iones y moléculas; detección ambiental, biosíntesis de lípidos y PG; y en el metabolismo (Paulowski et al., 2020; Ruiz et al., 2008).

Las diferencias estructurales entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas producen una respuesta diferente frente a las propiedades antibacteriales de las OMNP. Diversos estudios muestran que las bacterias Gram positivas tienen una mayor resistencia frente a los efectos tóxicos de las NP en comparación con las bacterias Gram negativas. Esto asociado a la naturaleza de la EC, la capa gruesa de PG brinda mayor protección (Slavin et al., 2017).

Por otro lado, las OMNP liberan iones metálicos que pueden adherirse a la EC bacteriana. Ambos tipos de bacterias tienen una carga superficial negativa por lo que pueden interactuar con iones metálicos cargados positivamente mediante fuerzas electrostáticas. La carga negativa de las bacterias Gram positivas está asociada a la presencia de PG rico en grupos carboxilo y amino, ácidos lipoteicoicos y ácidos teicoicos abundantes en grupos fosfatos mientras que en las Gram negativas se relaciona con el PG, lipopolisacáridos, fosfolípidos y proteínas (Gerba et al., 2015). También, las OMNP generan ROS que

causan estrés oxidativo dentro y en la superficie de la bacteria, lo que en grandes cantidades conduce a la muerte celular (Yu et al., 2020).

Por lo que, conocer la composición de la EC bacteriana, así como el mecanismo de acción de las OMNP es útil para proponer rutas mejoradas de acción antibacterianas. Por ejemplo, el uso de CuONP bioconjugadas con moléculas especializadas con capacidad de unión específica (anticuerpos). La unión selectiva sobre componentes específicos de la EC bacteriana podría potenciar los efectos tóxicos de las NP. Con base en ello se plantean los siguientes objetivos.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antibacteriana de las nanopartículas de óxido de cobre (CuO) biofuncionalizadas con anticuerpos específicos y las nanoesferas de óxidos de cobre (@CuONP) contra bacterias Gram positivas o Gram negativas

1.2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar nanoesferas huecas de óxido de cobre (@CuO) por la técnica de rocío pirolítico.
- Caracterizar las nanoesferas y nanopartículas de óxido de cobre (CuO) por medio de las técnicas analíticas espectroscopía UV-Vis, dispersión de luz dinámica (DLS), Difracción de Rayos-X (DRX) y microscopía electrónica de transmisión (TEM).
- Biofuncionalizar las CuONP con anticuerpos selectivos para bacterias Gram positivas y Gram negativas.

- Evaluar la actividad antibacteriana de las nanoestructuras de CuO mediante concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración mínima bactericida (CMB) y concentración media inhibitoria (IC₅₀).
- Evaluar la citotoxicidad selectiva de las CuONP-Ac⁺ y CuONP-Ac.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Síntesis de las nanoesferas de óxido de cobre (@CuO)

La síntesis de nanoesferas de óxido de cobre (@CuO) se realizó por el método de rocío pirolítico propuesto por Aguirre et al. (2020). Se utilizó un equipo que consta de tres componentes principales: sistema de atomización, el horno reactor y la trampa en frío (**Figura 8**).

El sistema de atomización consta de 4 atomizadores ultrasónicos de 2.4 MHz, encargados de suministrar la solución precursora al reactor en forma de microgotas. El horno reactor consta de 9 zonas de calentamiento que proporcionan las condiciones de síntesis para las nanoesferas. La trampa en frío está formada por matraces, mangueras y hielo que permiten atrapar y condensar la muestra recién expulsada del horno reactor.

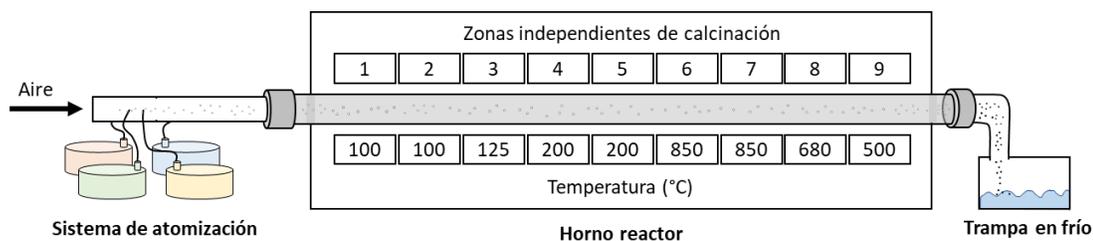


Figura 8. Esquema general del equipo de rocío pirolítico usado para la síntesis de nanoesferas. Consta de un sistema de atomización, un horno reactor y una trampa en frío. El horno reactor está formado por 9 zonas de temperatura: zona 1-3 (100, 100, 125°C) evaporación de agua; zonas 4-6 (200, 200, 850°C) precipitación y formación de estructura; zonas 7-9 (850, 680, 500°C) calcinación y formación de fase final.

Para la síntesis de @CuO se preparó una solución precursora con 153.9 mg de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldich, 61194) y 23.9 mg de glicina (Sigma Aldich, G8898) en 600 mL de agua ultrapura (tipo I) en un vaso de precipitado y se mantuvo en agitación (800 rpm) durante 10 min. Después la solución se colocó en los recipientes atomizadores y aseguro el correcto sellado. Se indujo el flujo de gas de arrastre a una velocidad de 6 L/min y se realizó la atomización de la solución hasta alcanzar el volumen deseado.

Posteriormente, para recolectar la muestra, se realizaron lavados con agua desionizada sobre el horno reactor y la trampa en frío. Después, la muestra se separó centrifugando a 4000 rpm durante 90 min, a

temperatura ambiente en una centrifuga eppendorf modelo 5702. Finalmente, las nanoesferas fueron recuperadas en el pellet y lavadas con etanol (Fermont, PQ06065). Por último, la muestra se secó en un horno a 70°C por 12 h.

2.1.1 Caracterización por difracción de rayos X (DRX)

El análisis de DRX de las CuONP y @CuONE fue realizado en un difractómetro de rayos X BRUKER modelo D2 PHASER, con radiación Cu K α ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$). La medición fue realizada en el intervalo 2θ de 10° a 80°. Se empleó una velocidad de escaneo de 0.02° cada 0.2 s, a temperatura ambiente.

La composición química y la fase cristalina de las muestras se determinó analizando el patrón de difracción de DRX mediante el programa X'Pert Highscore versión 2.1 y se asignó una carta de referencia del Centro Internacional de Datos de Difracción (ICDD, por sus siglas en inglés) de acuerdo con su base de datos.

El tamaño de cristal promedio de las CuONP y @CuONE se determinó a partir de los patrones de XRD mediante la ecuación de Scherrer (ecuación 1). Donde, D_{hkl} es el tamaño de cristal promedio, K es la constante de Scherrer relacionada con la forma y el índice (hkl) de los cristales, λ es la longitud de onda (1.5418 Å) de los rayos X, β es el ancho total a la mitad del pico más intenso y θ es el ángulo de difracción de Bragg. En ausencia de información detallada sobre la forma, $K = 0.9$ es una buena aproximación. El cálculo se llevó a cabo empleando el programa HighScore Plus, tomando en cuenta el ancho del pico más intenso a la altura media (FWHM).

$$D_{hkl} = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (1)$$

2.1.2 Espectroscopía UV-Vis

El análisis de espectroscopia UV-Vis de las CuONP y @CuONE se llevó a cabo en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis. Las mediciones se realizaron en una celda de plástico tomando 10 μL de NP, de una solución de 24 mg/mL, y 950 μL de agua ultrapura (tipo I). Las muestras fueron disueltas en dimetilsulfóxido (DMSO) Sigma Aldrich modelo D8418, se dispersaron por ultrasonido TOPTION modelo TU-1000Y y se midió la absorbancia de 200 a 700 nm en el espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis.

2.2 Modificación química de la superficie de las CuONP

La modificación química de la superficie de las NP es un proceso que tiene como objetivo mejorar y/o agregar propiedades para aumentar el espectro de aplicación, mejorar la estabilidad de dispersión de las NP en medios líquidos o posteriores modificaciones. El procedimiento de modificación de superficie de las CuONP consiste en dos etapas: i) la funcionalización y ii) la bioconjugación (**Figura 9**).

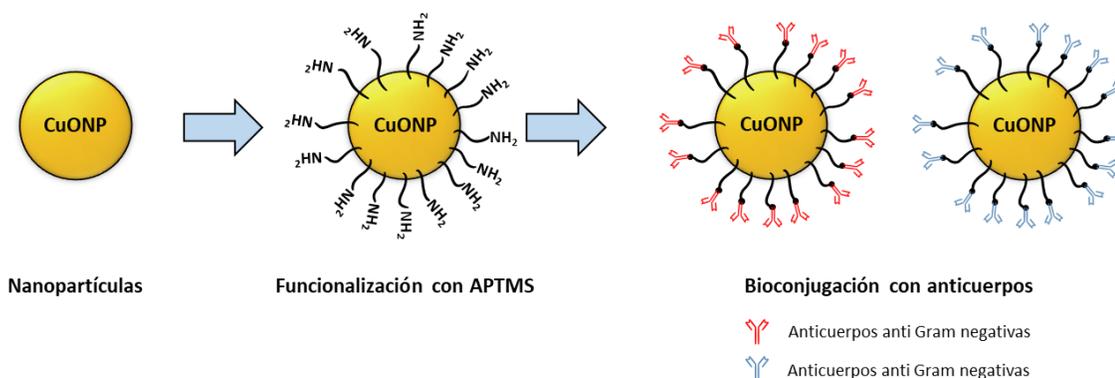


Figura 9. Esquema del proceso de funcionalización y bioconjugación de las CuONP. La funcionalización consiste en incorporar grupos amina sobre la superficie de las NP. La bioconjugación permite formar enlaces covalentes entre los grupos amina y los anticuerpos.

2.2.1 Funcionalización de las CuONP

En un primer paso de modificación superficial e implica el uso de agentes reticuladores que agregan un grupo funcional (R-SH, R-NH₂, R-COOH, etc.), útil para una posterior conjugación con moléculas orgánicas, inorgánicas o biológicas (Sanità et al., 2020). Por ejemplo, el compuesto aminosilano (3-aminopropil) trimetoxisilano (APTMS) se utiliza como agente de acoplamiento silano para la funcionalización de una variedad de NM (Zeng et al., 2013). Permite la modificación de las NP agregando aminas primarias (R-NH₂) sobre la superficie (**Figura 10A**).

Para llevar a cabo la funcionalización de las CuONP (**Figura 10B**), en un matraz se disolvieron 96 mg de CuONP en 19.2 mL de tolueno (Fermont, 06605) y se resuspendieron mediante ultrasonido Fisher Scientific modelo FS20 durante 10 min. Después se agregaron 240 µL de APTMS (Sigma Aldich, 281778) y 144 µL de trietilamina (Sigma Aldich, T0886). La solución se llevó a un volumen de 48 mL con tolueno. El oxígeno fue extraído burbujeando atmosfera de nitrógeno durante 2 min y la mezcla se dejó en agitación a 600 rpm durante 3 h a 18°C. Posteriormente, se centrifugó en una centrifuga Thermo Scientific modelo

Heraeus Multifuge X1R por 10 min a 4500 rpm. Finalmente, se recuperó el pellet, se lavó con etanol tres veces y dejó secando a temperatura ambiente durante 24 h. Las CuONP funcionalizadas se denominaron CuONP-NH₂.

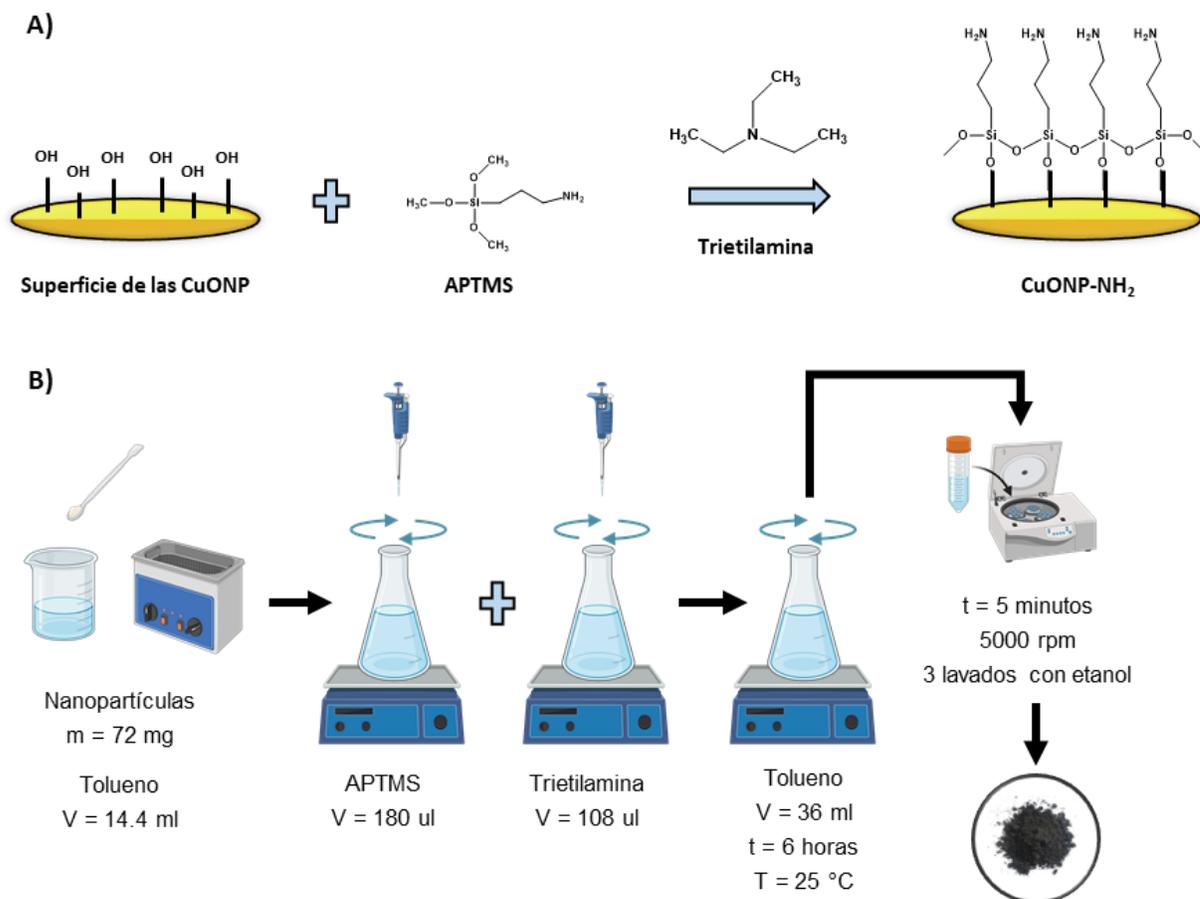


Figura 10. Metodología de funcionalización de las CuONP. A) Estructura química del agente (3-aminopropil) trietoxisilano (APTMS) y esquema de reacción de CuONP modificadas con grupos amino sobre la superficie (CuONP-NH₂). B) Secuencia de pasos de la funcionalización de las CuONP.

2.2.2 Bioconjugación de las CuONP-NH₂

La bioconjugación es un proceso que implica la unión covalente entre un material y una biomolécula (Fernandes et al., 2018). Se emplea para mejorar y/o otorgar nuevas propiedades a los NM, por ejemplo: aumentar la estabilidad, funcionalidad y biocompatibilidad (Jiao et al., 2018). Un método bien establecido es la conjugación EDC/NHS que permite conjugar una amina primaria (R-NH₂) con un grupo carboxílico (R-COOH) para finalmente dar como resultado la formación de un enlace amida (CONH₂) (Dadgostar, 2019). En el presente trabajo, el mecanismo de reacción implica que la carbodiimida N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida hidroclicorato (EDC) acopla N-hidroxisuccinimida (NHS) a grupos carboxilos presentes en

las cadenas de aminoácidos de los anticuerpos, formando un éster de NHS que permite la conjugación con grupos aminos primarias presentes en la superficie de las CuONP-NH₂, a pH fisiológico (7.0 y 7.4).

Para llevar a cabo la bioconjugación entre las CuONP-NH₂ y los anticuerpos, se colocaron 24 mg de CuONP-NH₂ en un tubo de microcentrífuga y se resuspendieron en 1 mL de solución de fosfatos 50 mM de fosfato monofásico (Fermont, 35862) y fosfato dipotásico (Fermont, 35842) a pH de 6.8. La solución se homogeneizó mediante sonicación durante 5 min. Posteriormente, se agregó la solución de anticuerpos anti Gram positivos (Santa Cruz Biotechnology, BDI380: sc-57752) y anti Gram negativos (Novus Biologicals, NBP2-53146) y se mantuvo en agitación durante 3 min. En seguida, se agregaron los activadores de carboxilos EDC/NHS en una concentración final de 10 mM y 20 mM, respectivamente. La solución se mantuvo en agitación durante 2 h a temperatura ambiente. Después, la solución se centrifugó a 6000 rpm durante 5 min. Finalmente, se recuperó el pellet, se lavó con solución de fosfatos y se guardó a una temperatura de 4 °C. Las CuONH₂ bioconjugadas con anticuerpos anti Gram positiva o anti Gram negativa, se denominaron CuONP-Ac⁺, CuONP-Ac⁻, respectivamente.

2.2.3 Caracterización por dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial zeta

El análisis del diámetro hidrodinámico y potencial zeta de CuONP, CuONP-Ac⁺, CuONP-Ac⁻ y @CuONE se llevó a cabo en un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical). Para las CuONP-Ac⁺ y CuONP-Ac⁻ las mediciones se realizaron justo después de la bioconjugación.

2.4 Evaluación del efecto antibacteriano

El efecto antibacteriano de las CuONP, CuONP-Ac⁺, CuONP-Ac⁻ y @CuONE se evaluó frente a las bacterias *E. coli* y *B. subtilis*. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración mínima bactericida (CMB) y concentración media inhibitoria (IC₅₀).

La CMI se define como la concentración más baja de antibiótico o fármaco que es capaz de inhibir por completo el crecimiento visible bacteriano bajo condiciones *in vitro* controladas, mientras que, la CMB es la concentración más baja de agente antibacteriano que es capaz de eliminar hasta el 99.9% de las

bacterias y la IC_{50} se define como la concentración de fármaco requerida para inhibir el crecimiento bacteriano del 50% de la población respecto al crecimiento de un control.

2.4.1 Determinación de la CMI

La determinación de la CMI de CuONP, CuONP-Ac⁺, CuONP-Ac⁻ y @CuONE frente a *E. coli* y *B. subtilis*, puede ser dividida en tres pasos principales: i) inóculo inicial, ii) tratamiento y iii) evaluación.

El inóculo inicial bacteriano se realizó tomando 5 colonias de bacterias (*E. coli* o *B. subtilis*) de una placa de agar y se disolvieron en 10 mL de medio Luria Bertani (LB) para ser incubadas en una incubadora New Brunswick Scientific Series 25 durante 24 h a 37 °C. Después, el inóculo se ajustó a un estándar de McFarland de 0.5 o 1×10^8 unidad formadora de colonias por mililitro (UFC/mL) y se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una densidad bacteriana de 1×10^4 UFC/mL (solución de trabajo).

El experimento se realizó en una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano estéril (Celltreat, 229196). Para el tratamiento se utilizó un volumen de trabajo de 200 μ L por pocillo de los cuales 100 μ L correspondían a la solución de trabajo y los otros 100 μ L a los tratamientos con diferentes concentraciones de NP (50-7000 μ g/mL). Los tratamientos se realizaron a partir de una solución stock con una concentración de 24 mg/mL, para lo cual se pesaron 12 mg de NP y se suspendieron en 500 μ L de agua ultrapura (tipo I). Después, la solución se homogenizó por ultrasonido y resuspendieron por vórtex durante 5 s antes de realizar cada tratamiento. Los blancos se realizaron de manera similar, sustituyendo los 100 μ L de la solución de trabajo por medio LB. Finalmente, la placa fue incubada durante 24 horas a 37°C.

La evaluación de los tratamientos y los blancos se realizó midiendo la absorbancia a 600 nm. Para lo cual, a partir de la placa de microtitulación se tomaron 80 μ L de la superficie por cada pocillo y se traspasaron a una nueva placa, sobre la cual se realizó la medición de densidad óptica (DO). El traspase de volumen es necesario debido a que NM como las CuONP y @CuONE sedimentan y en altas concentraciones tienen a bloquear el paso de la luz provocando resultados erróneos al medir la DO.

2.4.2 Determinación de la CMB

Para determinar la CMB, en una placa de microtitulación con 190 μL de medio Luria-Bertani (LB), se inoculó un volumen de 10 μL de los tratamientos con concentraciones iguales o superiores a la CMI. Posteriormente, la placa fue incubada durante 24 h a 37°C en incubadora. Finalmente, el valor de la CMB se estableció observando el área clara de los pocillos que no muestran crecimiento bacteriano.

2.4.3 Determinación del porcentaje de inhibición

El porcentaje de inhibición bacteriano (ecuación 2) se calculó teniendo en cuenta el 100% (control positivo) de viabilidad a bacterias no expuestas a NP. A cada tratamiento se le restó la contribución del respectivo blanco. El medio LB se estableció como control negativo. Las mediciones se realizaron a 25° C a una longitud de 600 nm en un espectrofotómetro Thermo Fisher Multiskan GO.

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{\text{DO}_{600 \text{ nm}} \text{ de tratamiento} - \text{DO}_{600 \text{ nm}} \text{ blanco}}{\text{DO}_{600 \text{ nm}} \text{ de control positivo}} \times 100 \quad (2)$$

2.4.4 Determinación de la IC₅₀

La IC₅₀ se calculó mediante regresión lineal y métodos no lineales utilizando los programas Microsoft Excel 2016 y GraphPad Prism 8.

2.4.5 Análisis por citometría de flujo

La actividad antibacteriana selectiva de las CuONP-Ac⁺ y CuONP-Ac⁻ se determinó mediante citometría de flujo. Para lo cual, se expuso las concentraciones IC₅₀ de las CuONP bioconjugadas frente a cultivos individuales y mixtos de bacterias *E. coli* y *B. subtilis*.

El análisis Gram se realizó mediante el ensayo LIVE BacLight™ Bacterial Gram Stain Kit (Invitrogen, L7005). El procedimiento general es similar al empleado para determinar la CMI por lo que puede dividirse en tres pasos principales: i) inóculo inicial, ii) tratamiento y ii) evaluación.

Primeramente, se prepararon inóculos de *E. coli* y *B. subtilis* por separado y se diluyeron hasta obtener una densidad bacteriana de 1×10^4 UFC/mL. Posteriormente, en una placa de microtitulación se preparó el cultivo mixto con ambas bacterias. También, se contempló cultivos individuales y sin tratamiento. Enseguida, se realizaron los tratamientos de las CuONP-Ac⁺ y CuONP-Ac⁻ con los valores de la IC₅₀. Después, la placa fue incubada en incubadora durante 8 h a 37°C.

Para la evaluación por citometría, se ajustó la DO de los cultivos individuales sin tratamiento de *E. coli* y *B. subtilis*. Después, se tomaron las soluciones de 2 pocillos por cada muestra a analizar y se vertieron en tubos eppendorf. Los tubos se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 min en una centrifuga Thermo Scientific MicroCL 17R a 18°C. Se retiró el sobrenadante y el pellet se suspendió en 1 mL de tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés), esto mismo se repitió por triplicado.

El PBS se preparó disolviendo 8 g de cloruro de sodio (Fermont, 24902), 0.2 g de cloruro de potasio (Fermont, 24842), 1.44 g fosfato de sodio dibásico (Sigma Aldich, S3264) y 0.24 g de fosfato de potasio monobásico (Fermont, 35862) en 1 L de agua ultrapura (tipo I). Posteriormente, se tomó el volumen de 1 mL de cada tubo eppendorf y se repartieron 250 µL en 4 tubos, mismos que se aforaron a 450 µL. Finalmente, se empleó el kit de tinción Gram (Invitrogen, L7005). Se introdujo 1.5 µL de los colorantes SYTO 9 y yoduro de hexidio. La placa se incubó a 37°C en oscuridad durante 15 min.

2.5 Análisis estadístico

Cada prueba en la presente investigación se realizó al menos por triplicado. Las medias y las desviaciones estándar (error) se calcularon utilizando el programa Microsoft Excel 2016. El análisis ANOVA de dos vías con la posterior prueba Tukey de múltiples comparaciones y el análisis de varianza de dos vías con la posterior prueba de Dunnett se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 8.

Capítulo 3. Resultados y discusión

3.1 Caracterización fisicoquímica

A continuación, se presentan y describen los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica de las CuONP, las @CuONE, las CuONP-AcGram⁺ y las CuONP-AcGram⁻ por parte de las técnicas DRX, UV-Vis, DLS y potencial zeta (**Figura 11**).

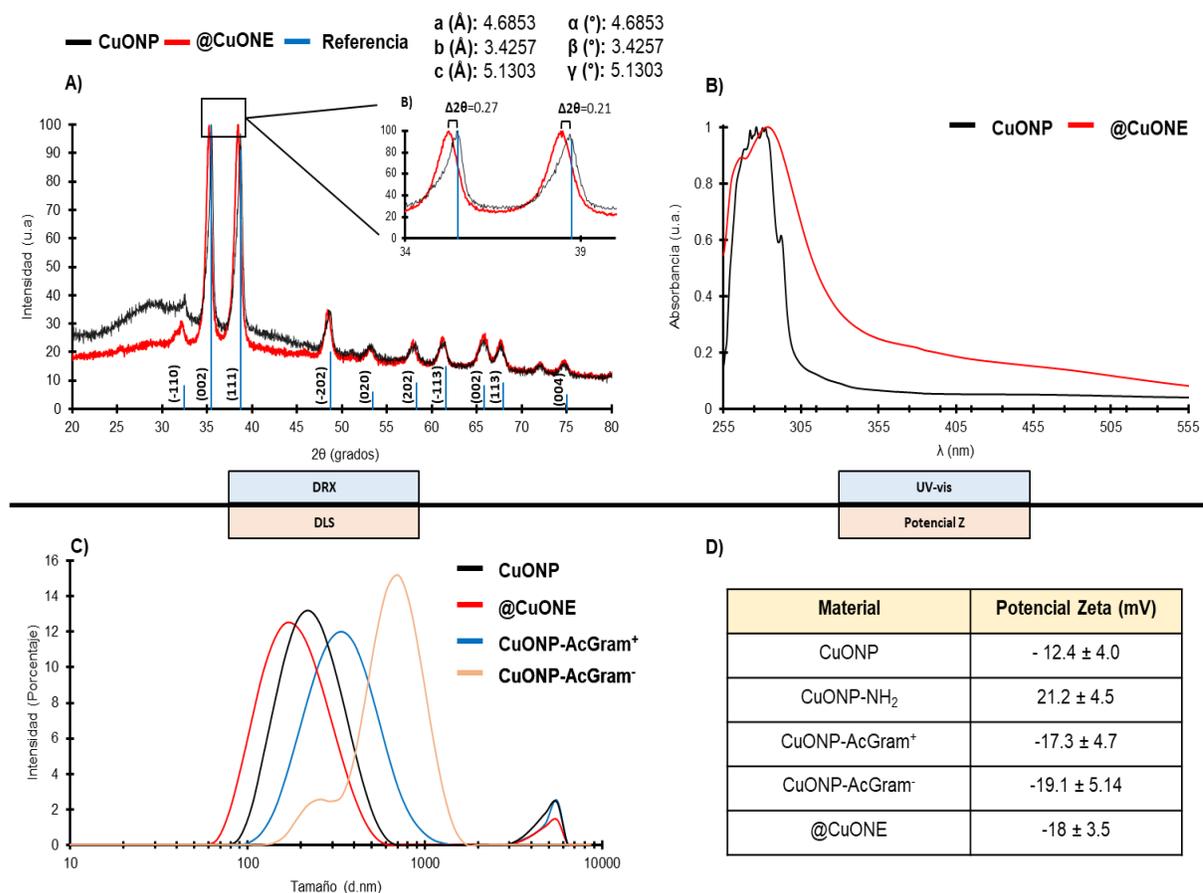


Figura 11. Caracterización fisicoquímica de las nanoestructuras de CuO y @CuO. (A) Caracterización por DRX, las CuONP y las @CuONE están representadas por los difractogramas de color negro y rojo, respectivamente. En la parte inferior se presenta el patrón de difracción de referencia mediante líneas verticales azules y se indican los planos asociados a cada pico. También, en la parte superior se anexan los parámetros de red de la referencia. (B) Caracterización por UV-Vis, las CuONP (negro) y las @CuONE (Rojo). DMSO fue utilizado como disolvente. (C) Caracterización por DLS, las CuONP (negro), las @CuONE (rojo), las CuONP-AcGram⁺ (azul) y las CuONP-AcGram⁻ (durazno). (D) Valores del potencial zeta, las CuONP, las @CuONE, las CuONP-AcGram⁺ y las CuONP-AcGram⁻.

3.1.1 Caracterización por DRX

DRX es una técnica analítica utilizada para la caracterización de materiales cristalinos que proporciona información sobre las estructuras, fases y orientaciones cristalinas preferentes (Bunaciu et al., 2015). La técnica consiste en incidir rayos X a través de una muestra, los rayos X son difractados por las diversas capas atómicas periódicas de la molécula (Epp, 2016). Dependiendo de la orientación de la red cristalina (posición, arreglo y tamaño de los átomos) los rayos X difractados pueden sufrir interferencias constructivas o destructivas. Las interferencias constructivas dan lugar a un patrón de difracción característico, que es específico del material cristalino (Tamiri and Zitrin, 2013). Este efecto físico (interferencias constructivas) es descrito matemáticamente por la ley de Bragg (ecuación 3). Donde θ es el ángulo de incidencia de los rayos X, d es la distancia entre los planos, y λ es la longitud de los rayos X difractados (Pednekar et al., 2017).

$$n\lambda = 2d \sin\theta \quad (3)$$

En un gráfico de patrón de difracción la presencia de picos se debe a la interferencia constructiva de rayos X dispersados en ángulos específicos de cada conjunto de planos de la red cristalina en una muestra. Por lo tanto, un patrón de DRX es la identificación de los arreglos atómicos periódicos en un material. Los resultados de DRX del análisis de CuONP y @CuONE se muestran en la **Figura 11A**. Los patrones de difracción de ambas muestras se analizaron por medio del programa X'Pert Highscore y se determinó una carta cristalográfica de referencia (tarjeta ICDD: 00-045-0937), correspondiente al CuO con fase cristalina monoclinica. Las señales de mayor intensidad de DRX para CuONP se localizan a 32.52°, 35.46°, 38.68°, 48.55°, 53.24°, 58.19°, 61.47°, 65.68°, 67.64° y 74.78°, mientras que para las @CuONE en 32.21°, 35.24°, 38.43°, 48.44°, 53.04°, 57.85°, 61.16°, 65.65°, 67.62° y 74.74°.

Con base en la referencia se puede establecer que dichos picos de intensidad corresponden a los planos cristalinos (h k l): (-110), (002), (111), (-202), (020), (202), (-113), (022), (113) y (004). El espectro de DRX de @CuONE no presenta picos en 29.3°, 42.5°, 73.4° y 77.5° que corresponden a las NP de Cu₂O. Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que se llevó a cabo exitosamente la síntesis de @CuONE. Sin embargo, el patrón de DRX de CuONP muestra una banda ancha entre 22° a 47°. Este tipo de ensanchamientos es característico de muestras con una pequeña cantidad de fase amorfa residual atribuido al proceso de síntesis (Dörner et al., 2019; Velásquez et al., 2004). Finalmente, el tamaño del

crystal se calculó a partir del plano (002) de los espectros XRD. Las CuONP y las @CuONE muestran un tamaño de 13.7 y 12.8 nm respectivamente.

Con base en los resultados se concluye que las @CuONE se sintetizaron correctamente, dado que el patrón de DRX es correspondiente al CuO.

3.1.2 Caracterización por UV-Vis

La espectroscopía UV-Vis se basa en el proceso de absorción de radiación electromagnética por parte de una muestra (átomos o moléculas). Al absorber radiación con longitud de onda entre 200 a 780 nm se producen transiciones electrónicas de un estado fundamental a uno excitado (Torres-Rivero et al., 2021). En semiconductores (como CuO), estos estados se denominan banda de valencia y banda de conducción respectivamente. Las NP tienen propiedades ópticas sensibles al tamaño, la forma, estado de aglomeración e índice de refracción lo que permite que UV-Vis se pueda utilizar para identificar, caracterizar y estudiar NM (Zook et al., 2011). El principio físico de esta técnica se describe por medio de la ley de Lambert-Beer (ecuación 4). Donde se calcula la luz con longitud de onda específica absorbida por la muestra, comparando la radiación incidente (I_0) y la radiación transmitida (I) (Bhanvase and Barai, 2021).

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) \quad (4)$$

En la **Figura 11B** se muestran los espectros de absorción UV-Vis de las nanoestructuras de CuO. Las CuONP y las @CuONE presentan bandas de absorción máximas en 276 y 285 nm, respectivamente. El rango de longitudes de onda de absorbancia para las CuONP varía de 250 a 395 nm (Kiflom Gebremedhn et al., 2019). Estas variaciones están asociadas a la diferencia de tamaño de partícula y la naturaleza de los solventes empleados. Por ejemplo, Horti et al. (2020) estudiaron el efecto de diferentes solventes (etanol, propanol, butanol, pentanol y hexanol) en las CuONP. Determinaron que los bordes de absorción, la absorción máxima, el desplazamiento y ensanchamiento de la banda absorción sufrían cambios debido a la interacción soluto-disolvente (**Figura 12A**) (Horti et al., 2020). También, Dagher et al. (2014) reportaron que los espectros UV-Vis de las CuONP sufrían un corrimiento al azul (**Figura 12B**) al disminuir el tamaño.

Las CuONP sintetizadas mostraron un tamaño promedio de 10.1, 5.0 y 1.2 nm presentaron picos de absorción a aproximadamente 290, 270 y 255 nm para las tres muestras, respectivamente (Dagher et al., 2014). De acuerdo con la literatura, para las CuONP la presencia de bandas en longitudes de onda de 276 y 285 nm puede ser atribuida a la transferencia de carga de ligando a metal ($O^{2-}-Cu^{2+}$), mientras que la presencia de bandas a longitudes más altas está relacionada con la transferencia de carga debido a la transición de orbitales d-d para las especies Cu^{2+} (Nayak et al., 2020; Pestryakov et al., 2004).

Por lo tanto, las bandas de absorción de las nanoestructuras (CuONP y @CuONE) corresponden al CuO. Ambas nanoestructuras tienen bandas absorción máximas muy cercanas entre ellas lo que indica que poseen un tamaño de partícula similar. Por otro lado, el ensanchamiento de la banda de absorción de @CuONE en comparación a las CuONP se atribuye a las diferencias en la morfología.

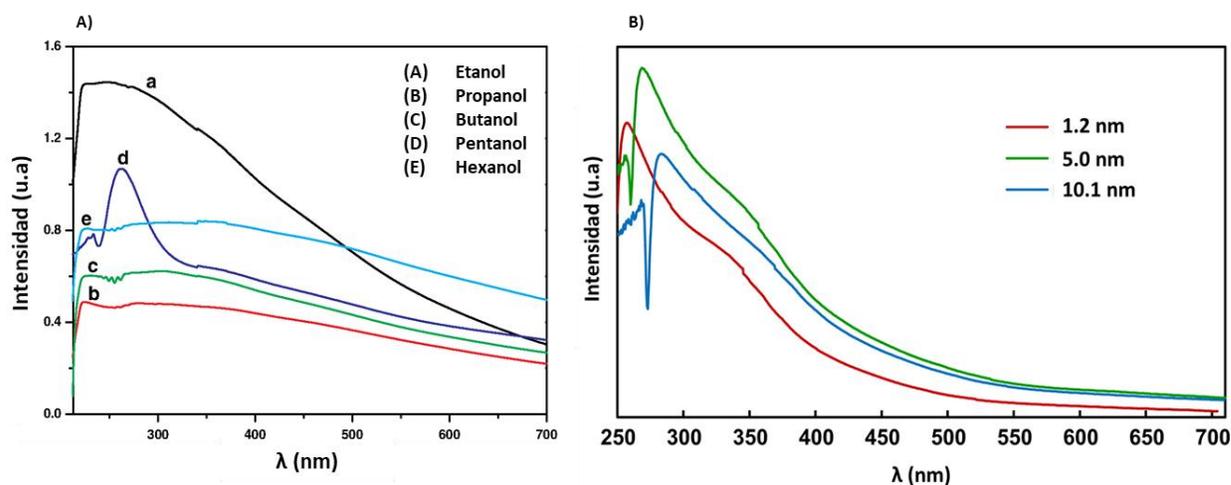


Figura 12. Caracterización por UV-Vis de las CuONP. (A) Efecto de diferentes solventes (A-E). (B) Efecto del tamaño de partícula sobre los espectros de absorción de las CuONP. Modificado de Horti, 2020 y Dagher, 2014.

3.1.3 Caracterización por TEM

TEM es una técnica empleada para adquirir información de la morfología, composición y enlace químico de la muestra (Saka, 2003). El principio de la técnica se basa en incidir un haz de electrones sobre un material, a medida que los electrones penetran la muestra, se provoca la emisión de electrones con diferente nivel de energía. Los electrones emitidos contienen información sobre la topografía, estructura cristalina, entre otras propiedades (Zhao and Liu, 2022).

En la **Figura 13** se muestran las micrografías obtenidas por TEM. Las CuONP muestran un tamaño entre 60 a 120 nm (**Figura 13A**), lo cual es similar con lo reportado por el fabricante. Las NP muestran una

morfología irregular y una distribución heterogénea con formación de aglomerados de gran tamaño (**Figura 13B**). Además, el tamaño promedio de la distribución de tamaños de las CuONP fue de 123 ± 68 nm (**Figura 13C**).

Por otro lado, se confirma la presencia de @CuONE (**Figura 13D**) con morfología esférica hueca. Las @CuONE tienen una distribución de tamaño heterogéneo y tienden a formar aglomerados (**Figura 13E**) al igual que las CuONP. El tamaño promedio de la distribución de tamaños de las nanoesferas fue de 133 ± 54 nm. Tanto las CuONP como @CuONE tienen tamaños de partícula variados, aunque cuentan con un tamaño promedio similar y forman aglomerados debido a que no están tratadas con agentes estabilizadores.

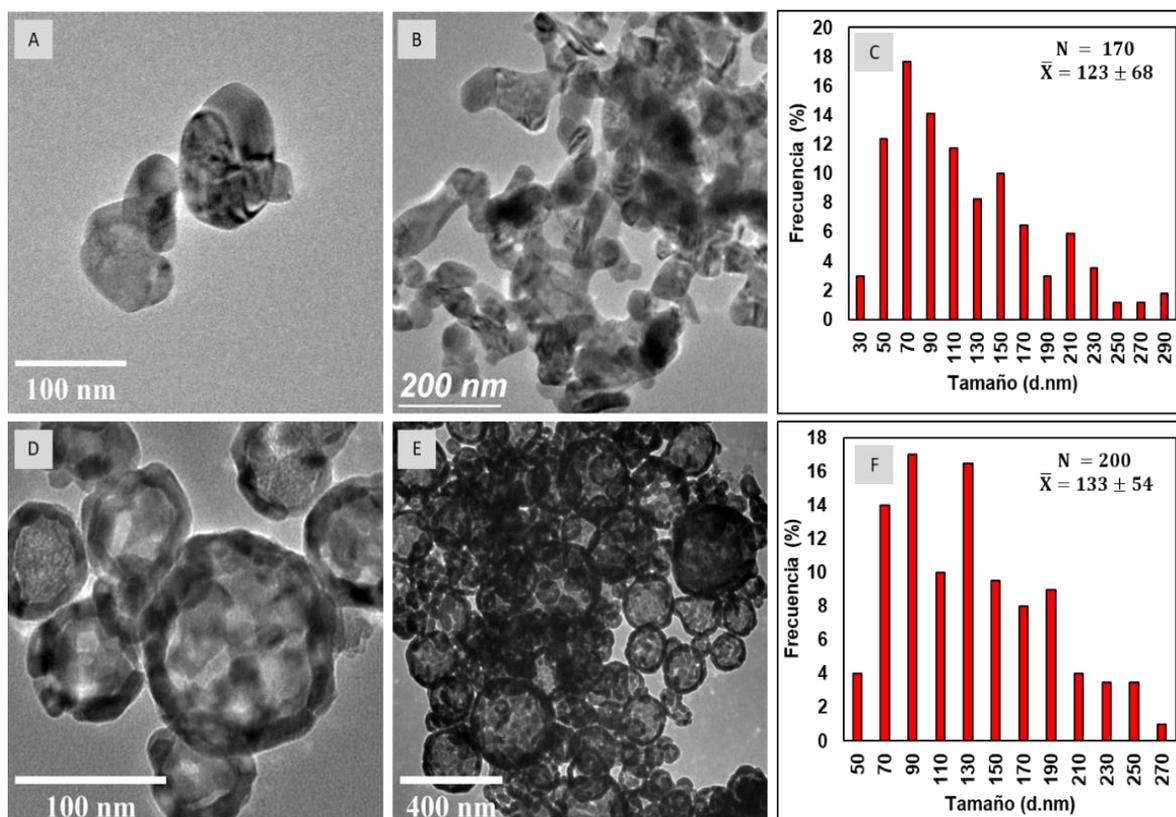


Figura 13. Caracterización por TEM de las CuONP y @CuONE. Micrografías de las CuONP A) aisladas, B) aglomerados y C) distribución de tamaños; @CuONE D) aisladas, E) aglomerados y F) distribución de tamaños.

Las CuONP-Ac⁺ y CuONP-Ac⁻ se observan en la **Figura 13**. Ambos tipos de muestras sufrieron un cambio en su morfología en comparación a las CuONP, atribuidos a los procesos de funcionalización y bioconjugación. Las CuONP-Ac⁺ tendieron a formar aglomerados con forma irregular (**Figura 14A**), mientras que las CuONP-Ac⁻ se observan agregados con morfología alargada (**Figura 14B**). En ambas muestras se observan

pequeñas protuberancias esféricas de alrededor de 10 nm de diámetro, tamaño aproximado de los anticuerpos monoclonales.

Por lo que este resultado proporciona evidencia de la correcta bioconjugación entre las NP y los anticuerpos en solución.

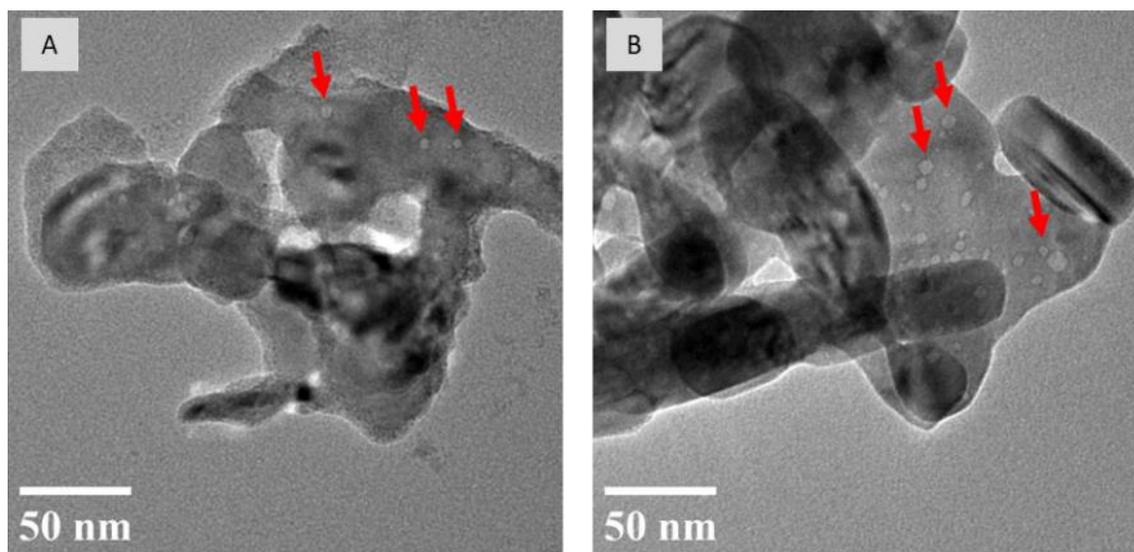


Figura 14. Caracterización por TEM de las CuONP-Ac⁺ y CuONP-Ac⁻. Micrografías de las A) CuONP-Ac⁺ y B) CuONP-Ac⁻. Las flechas en rojo indican partículas esféricas atribuidas a los anticuerpos.

3.1.4 Caracterización por DLS

DLS es una técnica empleada para determinar el tamaño de las NP. La técnica consiste incidir un haz de luz sobre una solución que contiene partículas que se mueven aleatoriamente en un movimiento Browniano (Stetefeld et al., 2016). Este movimiento estocástico conduce a fluctuaciones de las distancias entre las partículas y, por lo tanto, a interferencias constructivas y destructivas de la luz dispersada. Mientras tanto, la cantidad de partículas dentro del volumen de dispersión puede variar con el tiempo. Ambos factores producen una intensidad dispersa fluctuante (Yang and Wang, 2018). El movimiento browniano de partículas individuales se convierte en tamaño de partícula, que se calcula ecuación de Stokes-Einstein (ecuación 5), donde D es el coeficiente de difusión, k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, η es la viscosidad del solvente y R_h es el radio hidrodinámico de la solución de partículas (Raval et al., 2019).

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} \quad (5)$$

En este trabajo se utilizó DLS para determinar la distribución de tamaño obtenida mediante la medición del diámetro hidrodinámico. Para las CuONP y las @CuONE se indica un tamaño promedio de 242 ± 96 y 197 ± 85 nm con índices de polidispersidad de 0.29 y 0.24, respectivamente. Los tamaños de partícula son mayores a los obtenidos mediante TEM, debido a la tendencia de las NP a aglomerarse cuando se encuentran en solución. Para ambas nanoestructuras se tienen una distribución de tamaño va desde los 100 nm a los 5000 nm teniendo una población mínima cerca de los 4800 nm. El rango y diferencia de tamaños se debe a la aglomeración, ya que las nanoestructuras no fueron estabilizadas previamente, aunque el proceso de sonicación como un método de dispersión puede ayudar, no garantiza una homogenización sostenida de las NP.

Las nanoestructuras tienen a precipitar provocando que parte de la muestra sea inaccesible para el láser del equipo y como consecuencia se produzca una medición menos precisa. Estas observaciones son congruentes con Dörner et al., (2019). Por otro lado, las mediciones para CuONP-AcGram⁺ indican un aumento de tamaño a 350 ± 117 nm y las CuONP-AcGram⁻ presentaron dos tamaños de 240 ± 42.34 nm y 707 ± 242.9 nm, para ambas estructuras no se presentaron aglomerados de partículas por arriba de estos tamaños. Las CuONP y las @CuONE tienen tamaños similares y como se podía esperar de la bioconjugación, aumento el tamaño debido los procesos de modificación de superficie empleados.

Con base en los resultados se concluye las CuONP en solución tienen a formar aglomerados, aumentado con ello el diámetro de la partícula. Además, las CuONP bioconjugadas aumentaron en gran medida su tamaño lo que demuestra que el proceso de incorporación de anticuerpos sobre la superficie fue exitoso.

3.1.5 Caracterización por potencial zeta

Potencial zeta se emplea para determinar la magnitud de la repulsión electrostática entre partículas. Esta técnica consiste en aplicar voltaje entre dos electrodos, las partículas se moverán hacia el electrodo con la carga opuesta, a una velocidad proporcional a su valor de potencial zeta. El movimiento de las NP se mide mediante velocimetría láser doppler (LDV). Se utiliza la ecuación de Henry (ecuación 6), donde U es la movilidad electroforética, ϵ es la constante dieléctrica, η es la viscosidad absoluta de cizallamiento cero del medio, $f(\kappa a)$ es la función de Henry y κa es una medida de la relación entre el radio de la partícula y el Debye largo (Clogston and Patri, 2011).

$$U_e = \frac{2\epsilon z f(\kappa a)}{3\eta} \quad (6)$$

El Potencial zeta se determinó para CuONP, las @CuONE, las CuONP-NH₂, las CuONP-AcGram⁺ y las CuONP-AcGram⁻ con el fin de determinar la estabilidad y los cambios superficiales de las nanoestructuras de CuO (**Figura 11D**). Las CuONP y las @CuONE presentan un valor de -12.4 ±4.0 mV y -18 ±3.5, el valor negativo se debe a la estructura cristalina del CuO. En una estructura cristalina monoclinica, el arreglo molecular deja expuestos los oxígenos hacía el exterior. En una solución acuosa con pH neutro, los oxígenos del CuO reaccionan con moléculas de agua, formando grupos hidroxilo (carga negativa) en la superficie de la NP (Anandhavalli et al., 2015; Gupta et al., 2018).

Las CuONP-NH₂ presentan un valor 21.2 ±4.5 mV, aumentado el valor absoluto del potencial y la repulsión electrostática entre las partículas. El cambio de potencial está asociado con los grupos amina (-NH₂) en la superficie de las NP, que al estar en una solución acuosa son protonadas al formar enlaces con el hidrógeno del agua. Lo que resulta que el nitrógeno adquiera cuatro sustituyentes dejando una carga positiva superficial (Chandra et al., 2010). Mientras que para las CuONP bioconjugadas, las CuONP-AcGram⁺ y CuONP-AcGram⁻, presentan valores -17.3 ±4.7 mV y -19.1 ±5.1 mV, respectivamente. Los valores negativos de potencial zeta están asociados a la carga negativa de los anticuerpos.

El valor absoluto del potencial zeta está directamente relacionado con la estabilidad coloidal, en general se acepta que soluciones con valores de ± 10 - 20 mV son relativamente estables (Bhattacharjee, 2016). Aunque potencial zeta nos permitió identificar la estabilidad de las nanoestructuras de CuO y los cambios superficiales debidos a la funcionalización y bioconjugación. Esta técnica no permite establecer claramente la presencia de anticuerpos en la superficie de las CuONP-NH₂. Por lo que, se sugiere caracterizar por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para determinar la presencia de grupos funcionales característicos (-NH₂ y COOH) presentes en los anticuerpos.

Con base en los resultados se concluye que los procesos de funcionalización y bioconjugación fueron exitosos. Debido a que las NP en solución presentan poca estabilidad, estas tienen aumentar su tamaño como muestran las mediciones por DLS.

3.2 Evaluación del efecto antibacteriano de las CuONP y CuONP-AcGram⁺ y CuONP-AcGram⁻

Con el fin de determinar si la bioconjugación de CuONP con anticuerpos favorece la actividad antibacteriana. En el presente trabajo se determinó la CMI, CMB y la IC₅₀ para las CuONP, CuONP-AcGram⁺ y CuONP-AcGram⁻ frente a bacterias Gram positivas (*B. subtilis*) y Gram negativas (*E. coli*). De forma independiente también se evaluaron los parámetros antibacteriales para las @CuONE.

En la **Figura 15**, se muestra la absorbancia relativa de las bacterias *E. coli* y *B. subtilis* expuestas durante 24 h a diferentes concentraciones de CuONP. Se observó un decaimiento de la actividad antibacteriana conforme aumenta la concentración de las NP en ambas cepas bacterianas. La CMI para *E. coli* fue 1250 µg/mL y para *B. subtilis* de 2300 µg/mL. Por otro lado, la CMB para *E. coli* fue de 3500 µg/mL, mientras que para *B. subtilis* mayor a 7000 µg/mL. La diferente respuesta antibacteriana entre ambos tipos de bacterias se atribuye a la naturaleza de la EC bacteriana.

Las bacterias Gram positivas son más resistentes a los efectos de las CuONP probablemente debido a que están protegidas por una pared celular gruesa, concretamente para *B. subtilis* es de ~30 nm (Morales Angeles and Scheffers, 2021). Mientras que las bacterias *E. coli* están protegidas por una membrana externa y una pared celular de ~4 nm (Huang et al., 2008).

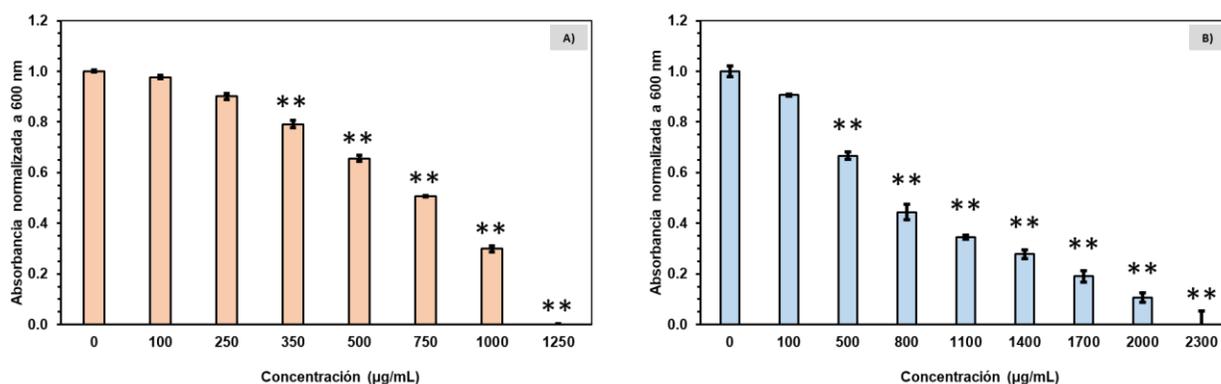


Figura 15. Evaluación de la actividad antibacteriana de las CuONP. Cultivos de (A) *E. coli* y (B) *B. subtilis* se expusieron a CuONP durante 24 h. n=3, **p<0.01.

En general, las bacterias Gram negativas tienden a ser más susceptibles a las CuONP. Este comportamiento es reportado por diversos autores (Kumar et al., 2019; Potbhare et al., 2019; Sonia et al., 2014), quienes

atribuyen este efecto a la afinidad entre la EC bacteriana y los iones Cu^{2+} liberados por las NP. Se ha demostrado que las CuONP pueden acumularse en la membrana y la pared celular bacteriana para posteriormente liberar iones y generan ROS (Ananth et al., 2015).

Las bacterias Gram negativas tienen una ME constituida por lipopolisacáridos, fosfolípidos y proteínas que le confieren la carga negativa por lo que en presencia de iones cargados positivamente se produce una atracción electrostática. Al acumularse Cu^{2+} en altas concentraciones se permea la membrana permitiendo la entrada de iones (Ishida, 2017). Por otro lado, las bacterias Gram positivas están protegidas por una capa de PG cargado negativamente por lo que en contacto con CuONP se produce un efecto similar, aunque menos dañino.

Por otra parte, se ha reportado que los iones Cu^{2+} liberados por las NP inducen la formación de ROS, especialmente hidroxilo y superóxido capaces de generar estrés oxidativo. El mecanismo parte de la dilución de los iones Cu^{2+} en medio acuoso para posteriormente reaccionar con oxígeno molecular y producir especies hidroxilo y superóxido, altamente reactivas. Se sabe que las ROS inducen la peroxidación de lípidos, degradación del ADN y daño a la ME (Bondarenko et al., 2012; Chen et al., 2019; Sarfraz et al., 2020).

Posteriormente se evaluaron diversas concentraciones de las CuONP-AcGram⁺ y CuONP-AcGram⁻ frente a bacterias *B. subtilis* y *E. coli*. La **Figura 16A** muestra el análisis comparativo de las MIC para CuONP y CuONP-AcGram⁻ frente a bacterias *E. coli*. Es notable el mayor efecto antibacteriano de las CuONP-AcGram⁻ con MIC (750 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se constata estadísticamente para las concentraciones entre 100 a 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se evaluó el efecto biocida de las CuONP-AcGram⁺ frente a *E. coli* (**Figura 16B**) y se determinó la nula disminución de la MIC frente a CuONP. Por lo tanto, se corrobora que las CuONP-AcGram⁻ tienen especificidad por las bacterias Gram negativas y a su vez las CuONP-AcGram⁺ no tienen un efecto antibacteriano notable.

Por otro lado, se realizó el análisis comparativo de las CuONP y las CuONP-Ac⁺ frente a *B. subtilis*. En la **Figura 16C** se observa el tratamiento de *B. subtilis* frente a las CuONP y CuONP-Ac⁺. La respuesta indica que las CuONP-Ac⁺ contra bacterias Gram positivas aumentan su actividad antibacteriana en comparación con las CuONP, disminuyendo la MIC de 2300 a 1400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sin embargo, al evaluar el efecto CuONP-Ac⁺ no se observa un efecto antibacteriano estadístico significativo (**Figura 16D**).

Al evaluar *B. subtilis* frente CuONP-Ac⁻ no se observaron cambios en la disminución de la DO. por lo que se observa claramente que no tuvo un efecto.

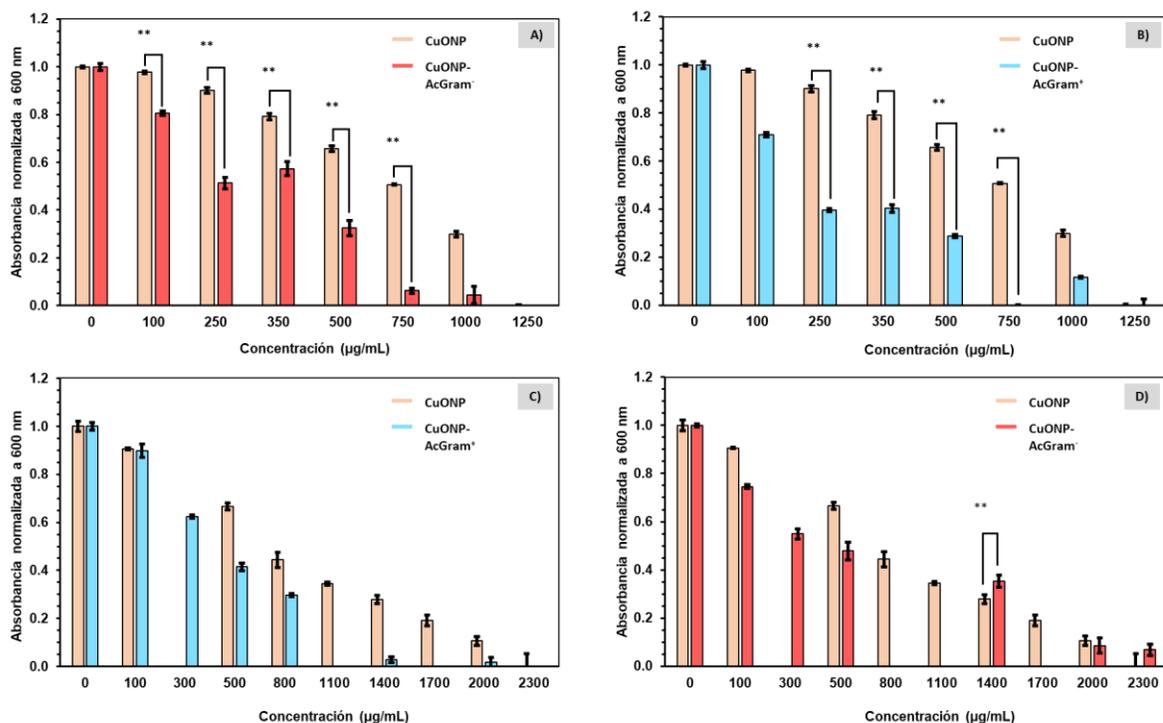


Figura 16. Evaluación de la viabilidad bacteriana de las CuONP bioconjugadas. (A y B) *E. coli* y (C y D) *B. subtilis* se expusieron frente a las CuONP-AcGram⁻ y las CuONP-AcGram⁺ durante 24 h. n=3, **p<0.01.

En la literatura ya se ha reportado que el uso de anticuerpos mejora la actividad antibacteriana de NP, antibióticos o compuestos orgánicos (Al-Sharqi et al., 2020; Ivanova et al., 2020; Le et al., 2021). El recubrimiento de las CuONP con anticuerpos específicos permite a las NP formar enlaces covalentes con la superficie de la bacteriana. Al establecer esta unión, se disminuye la distancia NP-bacteria, lo que permite potenciar el efecto antibacteriana. Cabe destacar que existen factores, como el área superficial activa de la NP, la cantidad de anticuerpos bioconjugados y el porcentaje de anticuerpos activos que pueden influir sobre el efecto bactericida.

Por otro lado, en la **Tabla 2** se muestran las concentraciones IC₅₀ para las diferentes nanoestructuras de CuO. La IC₅₀ de las CuONP para *E. coli* es de 705 µg/mL, mientras que para *B. subtilis* es de 912 µg/mL. De igual manera se observó un comportamiento similar a la obtención de las MIC.

Con base en estos resultados se concluye que las bacterias *E. coli* tienen mayor susceptibilidad a los efectos de las CuONP y las CuONP bioconjugadas. Las CuONP-Ac⁺ y las CuONP-Ac⁻ aumentaron su actividad antibacteriana contra bacterias *B. subtilis* y *E. coli*, en comparación a las CuONP.

Tabla 2. Concentraciones CMI, CMB y IC₅₀. La CMI de las @CuONE se muestra en la sección de anexos.

Material	Bacteria	CMI (μg/mL)	CMB (μg/mL)	IC ₅₀ (μg/mL)	R ²	Método de análisis
CuONP	<i>E. coli</i>	1250	3500	705	0.98	Regresión Lineal
	<i>B. subtilis</i>	2300	ND	912	0.95	
CuONP-AcGram ⁺	<i>E. coli</i>	2300	ND	370	0.82	
	<i>B. subtilis</i>	1400	ND	656	0.85	
CuONP-AcGram ⁻	<i>E. Coli</i>	750	ND	412	0.91	
	<i>B. Subtilis</i>	1250	ND	1047	0.85	
@CuONE	<i>E. coli</i>	800	1250	315	0.94	
	<i>B. subtilis</i>	~ 800	ND	333	0.90	

3.3 Evaluación de la actividad antibacteriana selectiva por citometría de flujo

Esta técnica consiste en medir múltiples características físicas de una sola célula, como el tamaño y la complejidad, simultáneamente mientras la célula fluye en suspensión a través de un dispositivo de medición (Adan et al., 2017).

Su funcionamiento depende de las características de dispersión de la luz de las células bajo investigación, que pueden derivarse de colorantes o anticuerpos monoclonales dirigidos a moléculas extracelulares ubicadas en la superficie o moléculas intracelulares dentro de la célula. Nos permite clasificar las células en poblaciones uniformes (Fernández-Castané et al., 2017; Fröhling and Schlüter, 2015).

La **Figura 17** muestra el análisis de actividad antibacteriana selectiva de las CuONP-Ac⁻ y CuONP-Ac⁺ frente a cultivos mixtos de *E. coli* y *B. subtilis*. Al evaluar los cultivos mixtos con la IC₅₀ de las CuONP-Ac⁻ se aprecia una disminución en la viabilidad bacteriana del 35% de *E. coli* frente al control, mientras que de solo 16% para *B. subtilis*. Por otro lado, al evaluar las IC₅₀ de las CuONP-Ac⁺ en un cultivo mixto, se observa una

disminución de la viabilidad bacteriana del 32% y 69% para *B. subtilis* y *E. coli* respectivamente. Por lo tanto, la biofuncionalización fue un método óptimo para mejorar las propiedades antimicrobianas de las CuONP.

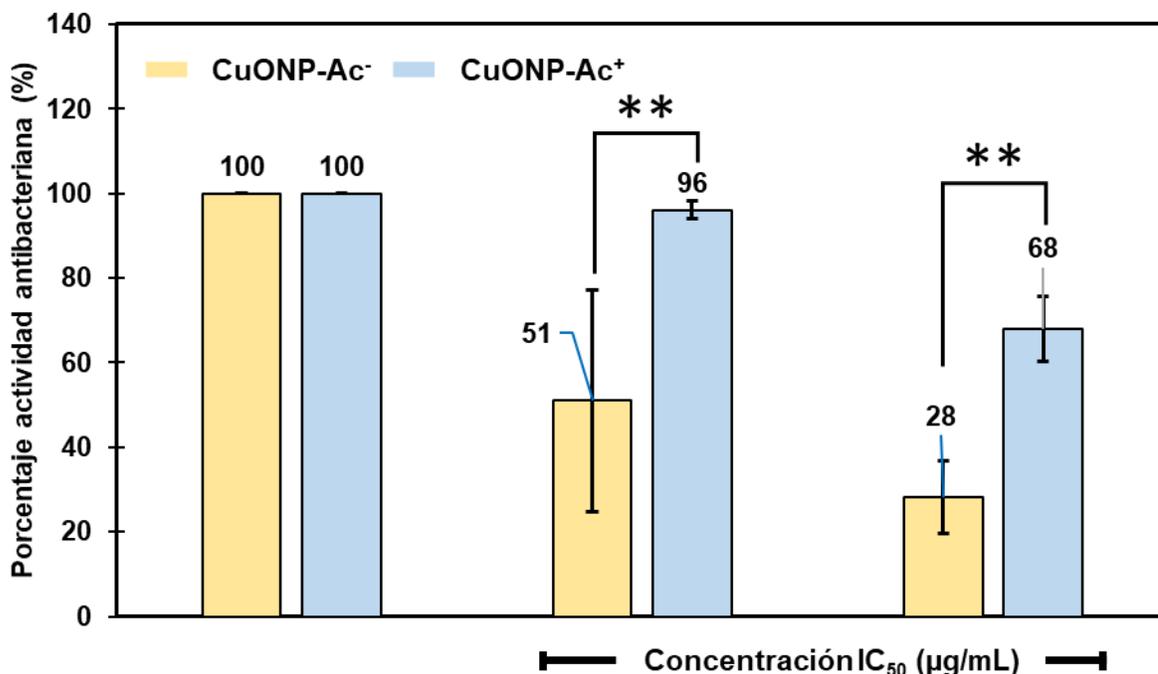


Figura 17. Análisis por citometría de flujo de la actividad antibacteriana selectiva. Las CuONP-Ac⁻ y las CuONP-Ac⁺ se evaluaron frente a cultivos mixtos de *E. coli* y *B. subtilis*, durante 8 horas. n=3, **p<0.01. Se emplearon concentraciones IC₅₀, de CuONP-Ac⁻ frente a *E. coli* 412 µg/mL y de CuONP-Ac⁺ frente a *B. subtilis* 656 µg/mL.

Al determinarse un aumento en la actividad antibacteriana de las CuONP bionconjugadas, se puede establecer que el CuONP al reaccionar con los anticuerpos se genera una interacción selectiva y directa con la bacteria a la cual es afín el anticuerpo, cuando se forma el complejo célula-anticuerpo, la distancia entre ambos sistemas es estrecha, lo que permite que la nanopartícula tenga un efecto directo sobre la bacteria. Principalmente a través de la liberación de iones Cu²⁺ sobre la superficie de la envoltura celular bacteriana.

Los Cu²⁺ sobre la superficie de la bacteria, pueden interaccionar con componentes celulares, generar ROS y/o entrar dentro para continuar la interacción y afectar organelos internos. Por ejemplo, por afinidad puesto a que Cu²⁺ se consideran un ácido/base intermedio y tiene alta afinidad por aminas primas y grupos tiol presentes en las cadenas de aminoácidos de las proteínas y enzimas. Por estos motivos es que las nanopartículas con anticuerpos son selectivas y su capacidad antimicrobiana aumenta.

Capítulo 4. Conclusiones

En este trabajo se obtuvieron @CuONE con forma esférica hueca y con propiedades fisicoquímicas (diámetro externo, cristalinidad, banda de absorción UV-Vis y valor de potencial zeta) comparables a las CuONP comerciales.

La viabilidad de las bacterias *E. coli* y *B. subtilis*, expuestas a las nanoestructuras de CuO, disminuye conforme aumenta la concentración de las NP. De acuerdo con los parámetros antibacterianos (CMI y IC₅₀) las @CuONE tiene un efecto antibacteriano mayor a menores concentraciones que las CuONP, debido a su mayor área superficial expuesta, lo que en solución da lugar a una mayor capacidad de liberar iones Cu²⁺.

Las bacterias Gram negativas fueron más susceptibles que las bacterias Gram positivas a los efectos de las CuONP, por las diferencias estructurales de la EC bacteriana. Las bacterias Gram positivas están fuertemente protegidas por una pared celular gruesa, mientras que para las bacterias Gram negativas la pared es mucho más delgada.

Las CuONP fueron bioconjugados con anticuerpos específicos contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. De acuerdo con la MIC y IC₅₀, las CuONP-Ac⁺ y CuONP-Ac⁻ evaluadas frente a bacterias *E. coli* y *B. subtilis*, mostraron un efecto antibacteriano mayor en comparación a las CuONP. Ya que, los anticuerpos tienen la capacidad de establecer uniones covalentes con la superficie de las bacterias, lo que disminuye la distancia entre las NP y las bacterias. A su vez, esto potencia el efecto de los iones Cu²⁺ y las especies ROS generadas. Por otro lado, en cultivos mixtos, las CuONP bioconjugadas demostraron un efecto antibacterial selectivo notable sobre ambos tipos de bacterias, especialmente en los tratamientos entre CuONP-Ac⁺ y las bacterias *B. subtilis*.

De acuerdo con lo anterior, las CuONP tienen un efecto antibacteriano tanto en bacterias Gram positivas como negativas. La morfología de las NP tiene un efecto significativo sobre la actividad antibacteriana. El uso de anticuerpos específicos es capaz de aumentar la actividad antibacteriana de las NP de manera selectiva sobre bacterias específicas. Por lo tanto, el sistema CuONP-anticuerpo podría ser útil en el combate a la RA.

Literatura citada

- Abd Samad, N. A., Lai, C. W., and Johan, M. R. 2020. Chemical studies of metal oxide powders. In *Metal Oxide Powder Technologies*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-817505-7.00002-6
- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., and Nalbant, A. 2017. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), pp. 163–176. doi: 10.3109/07388551.2015.1128876
- Agarwala, M., Choudhury, B., and Yadav, R. N. S. 2014. Comparative Study of Antibiofilm Activity of Copper Oxide and Iron Oxide Nanoparticles Against Multidrug Resistant Biofilm Forming Uropathogens. *Indian Journal of Microbiology*, 54(3), pp. 365–368. doi: 10.1007/s12088-014-0462-z
- Aguirre, S. B., Vargas, L., Rodriguez, J. R., Estrada, M., Castillon, F., Lopez, M., Simakova, I., and Simakov, A. 2020. One-pot synthesis of uniform hollow nanospheres of Ce–Zr–O mixed oxides by spray pyrolysis. *Microporous and Mesoporous Materials*, 294, pp. 109886. doi: 10.1016/j.micromeso.2019.109886
- Ahamed, M., Alhadlaq, H. A., Khan, M. A. M., Karuppiyah, P., and Al-Dhabi, N. A. 2014. Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activity of Copper Oxide Nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 2014, pp. 1–4. doi: 10.1155/2014/637858
- Al-Mamun, Md. R., Hasan, Md. R., Ahommed, Md. S., Bacchu, Md. S., Ali, Md. R., and Khan, Md. Z. H. 2021. Nanofertilizers towards sustainable agriculture and environment. *Environmental Technology & Innovation*, 23, pp. 101658. doi: 10.1016/j.eti.2021.101658
- Al-Sharqi, A., Apun, K., Vincent, M., Kanakaraju, D., Bilung, L. M., and Sum, M. S. H. 2020. Investigation of the antibacterial activity of Ag-NPs conjugated with a specific antibody against *Staphylococcus aureus* after photoactivation. *Journal of Applied Microbiology*, 128(1), pp. 102–115. doi: 10.1111/jam.14471
- Anandhavalli, N., Mol, B., Manikandan, S., Anusha, N., Ponnusami, V., and Rajan, K. S. 2015. Green Synthesis of Cupric Oxide Nanoparticles Using Water Extract of *Murraya koenigi* and its Photocatalytic Activity. *Asian Journal of Chemistry*, 27(7), pp. 2523–2526. doi: 10.14233/ajchem.2015.17966
- Ananth, A., Dharaneedharan, S., Heo, M.-S., and Mok, Y. S. 2015. Copper oxide nanomaterials: Synthesis, characterization and structure-specific antibacterial performance. *Chemical Engineering Journal*, 262, pp. 179–188. doi: 10.1016/j.cej.2014.09.083
- Applerot, G., Lellouche, J., Lipovsky, A., Nitzan, Y., Lubart, R., Gedanken, A., and Banin, E. 2012. Understanding the Antibacterial Mechanism of CuO Nanoparticles: Revealing the Route of Induced Oxidative Stress. *Small*, 8(21), pp. 3326–3337. doi: 10.1002/smll.201200772
- Aragaw, T. A., Bogale, F. M., and Aragaw, B. A. 2021. Iron-based nanoparticles in wastewater treatment: A review on synthesis methods, applications, and removal mechanisms. *Journal of Saudi Chemical Society*, 25(8), pp. 101280. doi: 10.1016/j.jscs.2021.101280
- Asiaei, S., Smith, B., and Nieva, P. 2015. Enhancing conjugation rate of antibodies to carboxylates: Numerical modeling of conjugation kinetics in microfluidic channels and characterization of chemical over-exposure in conventional protocols by quartz crystal microbalance. *Biomicrofluidics*, 9(6), pp. 064115. doi: 10.1063/1.4937929

- Azam, A. 2012. Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and -negative bacterial strains. *International Journal of Nanomedicine*, pp. 3527. doi: 10.2147/IJN.S29020
- Baetke, S. C., Lammers, T., and Kiessling, F. 2015. Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer. *The British Journal of Radiology*, 88(1054), pp. 20150207. doi: 10.1259/bjr.20150207
- Baig, N., Kammakakam, I., and Falath, W. 2021. Nanomaterials: a review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Materials Advances*, 2(6), pp. 1821–1871. doi: 10.1039/D0MA00807A
- Basova, T. v., Vikulova, E. S., Dorovskikh, S. I., Hassan, A., and Morozova, N. B. 2021. The use of noble metal coatings and nanoparticles for the modification of medical implant materials. *Materials & Design*, 204, pp. 109672. doi: 10.1016/j.matdes.2021.109672
- Berezin, S., Aviv, Y., Aviv, H., Goldberg, E., and Tischler, Y. R. 2017. Replacing a Century Old Technique – Modern Spectroscopy Can Supplant Gram Staining. *Scientific Reports*, 7(1), pp. 3810. doi: 10.1038/s41598-017-02212-2
- Bhanvase, B. and Barai, D. 2021. Stability of nanofluids. In *Nanofluids for Heat and Mass Transfer*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-821955-3.00009-1
- Bhattacharjee, S. 2016. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, pp. 337–351. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017
- Bondarenko, O., Ivask, A., Käkinen, A., and Kahru, A. 2012. Sub-toxic effects of CuO nanoparticles on bacteria: Kinetics, role of Cu ions and possible mechanisms of action. *Environmental Pollution*, 169, pp. 81–89. doi: 10.1016/j.envpol.2012.05.009
- Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R., and Casadevall, A. 2015. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 13(10), pp. 620–630. doi: 10.1038/nrmicro3480
- Bunaciu, A. A., Udriștioiu, E. gabriela, and Aboul-Enein, H. Y. 2015. X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 45(4), pp. 289–299. doi: 10.1080/10408347.2014.949616
- Cambier, F. 2006. Production of catalysts with an inductive atmospheric plasma torch. doi: 10.1016/S0167-2991(06)80913-4
- Cambridge Infectious Diseases. n.d. Antimicrobial Resistance. Retrieved June 21, 2022, from <https://www.infectiousdisease.cam.ac.uk/research/active-research-projects/bacterial-pathogens>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). n.d. About Antibiotic Resistance. Consultado el 21 de junio del 2022 en <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2019, October 8. Antibiotic Resistant Germs in Hospitals: Information for Patients and their Families.
- Chandra, S., Mehta, S., Nigam, S., and Bahadur, D. 2010. Dendritic magnetite nanocarriers for drug delivery applications. *New Journal of Chemistry*, 34(4), pp. 648. doi: 10.1039/b9nj00609e

- Chatterjee, A. K., Chakraborty, R., and Basu, T. 2014. Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles. *Nanotechnology*, 25(13), pp. 135101. doi: 10.1088/0957-4484/25/13/135101
- Chen, Z., Gao, S., Jin, M., Sun, S., Lu, J., Yang, P., Bond, P. L., Yuan, Z., and Guo, J. 2019. Physiological and transcriptomic analyses reveal CuO nanoparticle inhibition of anabolic and catabolic activities of sulfate-reducing bacterium. *Environment International*, 125, pp. 65–74. doi: 10.1016/j.envint.2019.01.058
- Clogston, J. D. and Patri, A. K. 2011. Zeta Potential Measurement. doi: 10.1007/978-1-60327-198-1_6
- Dadgostar, P. 2019. Antimicrobial resistance: implications and costs. In *Infection and Drug Resistance* (Vol. 12). Dove Medical Press Ltd. doi: 10.2147/IDR.S234610
- Dagher, S., Haik, Y., Ayesh, A. I., and Tit, N. 2014. Synthesis and optical properties of colloidal CuO nanoparticles. *Journal of Luminescence*, 151, pp. 149–154. doi: 10.1016/j.jlumin.2014.02.015
- Disease Control and Prevention (CDC). 2019, December. 2019 AR Threats Report.
- Dörner, L., Cancellieri, C., Rheingans, B., Walter, M., Kägi, R., Schmutz, P., Kovalenko, M. v., and Jeurgens, L. P. H. 2019. Cost-effective sol-gel synthesis of porous CuO nanoparticle aggregates with tunable specific surface area. *Scientific Reports*, 9(1), pp. 11758. doi: 10.1038/s41598-019-48020-8
- Elmer, W., Ma, C., and White, J. 2018. Nanoparticles for plant disease management. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 6, pp. 66–70. doi: 10.1016/j.coesh.2018.08.002
- Epp, J. 2016. X-ray diffraction (XRD) techniques for materials characterization. In *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-08-100040-3.00004-3
- Ermini, M. L. and Voliani, V. 2021. Antimicrobial Nano-Agents: The Copper Age. *ACS Nano*, 15(4), pp. 6008–6029. doi: 10.1021/acsnano.0c10756
- Fernandes, C. S. M., Teixeira, G. D. G., Iranzo, O., and Roque, A. C. A. 2018. Engineered Protein Variants for Bioconjugation. In *Biomedical Applications of Functionalized Nanomaterials*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-323-50878-0.00005-7
- Fernández-Castané, A., Li, H., Thomas, O. R. T., and Overton, T. W. 2017. Flow cytometry as a rapid analytical tool to determine physiological responses to changing O₂ and iron concentration by *Magnetospirillum gryphiswaldense* strain MSR-1. *Scientific Reports*, 7(1), pp. 13118. doi: 10.1038/s41598-017-13414-z
- Fletcher, S. 2015. Understanding the contribution of environmental factors in the spread of antimicrobial resistance. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 20(4), pp. 243–252. doi: 10.1007/s12199-015-0468-0
- Fröhling, A. and Schlüter, O. 2015. Flow cytometric evaluation of physico-chemical impact on Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.00939
- Bastus G., N., Casals, E., Ojea, I., Varon, M., and Puentes, V. 2012. The Reactivity of Colloidal Inorganic Nanoparticles. In *The Delivery of Nanoparticles*. InTech. doi: 10.5772/35238

- Gerba, C. P., Pepper, I. L., and Newby, D. T. 2015. Microbial Transport in the Subsurface. In *Environmental Microbiology*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-394626-3.00015-6
- Ghosh, C., Sarkar, P., Issa, R., and Haldar, J. 2019. Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends in Microbiology*, 27(4), pp. 323–338. doi: 10.1016/j.tim.2018.12.010
- Godoy-Gallardo, M., Eckhard, U., Delgado, L. M., de Roo Puente, Y. J. D., Hoyos-Nogués, M., Gil, F. J., and Perez, R. A. 2021. Antibacterial approaches in tissue engineering using metal ions and nanoparticles: From mechanisms to applications. *Bioactive Materials*, 6(12), pp. 4470–4490. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.04.033
- Gupta, D., Meher, S. R., Illyaskutty, N., and Alex, Z. C. 2018. Facile synthesis of Cu₂O and CuO nanoparticles and study of their structural, optical and electronic properties. *Journal of Alloys and Compounds*, 743, pp. 737–745. doi: 10.1016/j.jallcom.2018.01.181
- Halbus, A. F., Horozov, T. S., and Paunov, V. N. 2019. Strongly Enhanced Antibacterial Action of Copper Oxide Nanoparticles with Boronic Acid Surface Functionality. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11(13), pp. 12232–12243. doi: 10.1021/acsami.8b21862
- Horti, N. C., Kamatagi, M. D., Patil, N. R., Sannaikar, M. S., and Inamdar, S. R. 2020. Synthesis and optical properties of copper oxide nanoparticles: effect of solvents. *Journal of Nanophotonics*, 14(04). doi: 10.1117/1.JNP.14.046010
- Hsueh, Y.-H., Tsai, P.-H., and Lin, K.-S. 2017. pH-Dependent Antimicrobial Properties of Copper Oxide Nanoparticles in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), pp. 793. doi: 10.3390/ijms18040793
- Huang, K. C., Mukhopadhyay, R., Wen, B., Gitai, Z., and Wingreen, N. S. 2008. Cell shape and cell-wall organization in Gram-negative bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(49), pp. 19282–19287. doi: 10.1073/pnas.0805309105
- Ishida, Dr. Sci. T. 2017. Bacteriolyses of Bacterial Cell Walls by Cu(II) and Zn(II) Ions Based on Antibacterial Results of Dilution Medium Method and Halo Antibacterial Test. *Journal of Advanced Research in Biotechnology*, 2(2), pp. 1–12. doi: 10.15226/2475-4714/2/2/00120
- Ivanova, K., Ivanova, A., Ramon, E., Hoyo, J., Sanchez-Gomez, S., and Tzanov, T. 2020. Antibody-Enabled Antimicrobial Nanocapsules for Selective Elimination of *Staphylococcus aureus*. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(32), pp. 35918–35927. doi: 10.1021/acsami.0c09364
- Jiao, M., Zhang, P., Meng, J., Li, Y., Liu, C., Luo, X., and Gao, M. 2018. Recent advancements in biocompatible inorganic nanoparticles towards biomedical applications. *Biomaterials Science*, 6(4), pp. 726–745. doi: 10.1039/C7BM01020F
- Kadiyala, U., Kotov, N. A., and VanEpps, J. S. 2018. Antibacterial Metal Oxide Nanoparticles: Challenges in Interpreting the Literature. *Current Pharmaceutical Design*, 24(8), pp. 896–903. doi: 10.2174/1381612824666180219130659
- Kaur, B., Singh, K., and Malik, A. K. 2017. Precursor dependent morphological and photo-catalytic behaviour of CdS nanostructures. *Dyes and Pigments*, 137, pp. 352–359. doi: 10.1016/j.dyepig.2016.10.043

- Kessler, A., Hedberg, J., Blomberg, E., and Odnevall, I. 2022. Reactive Oxygen Species Formed by Metal and Metal Oxide Nanoparticles in Physiological Media—A Review of Reactions of Importance to Nanotoxicity and Proposal for Categorization. *Nanomaterials*, 12(11), pp. 1922. doi: 10.3390/nano12111922
- Khan, I., Saeed, K., and Khan, I. 2019. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), pp. 908–931. doi: 10.1016/j.arabjc.2017.05.011
- Khan, S. T. and Al-Khedhairi, A. A. 2017. Metals and Metal Oxides: Important Nanomaterials With Antimicrobial Activity. In *Antimicrobial Nanoarchitectonics*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-323-52733-0.00008-2
- Kiflom Gebremedhn, Mebrahtu Hagos Kahsay, and Muluken Aklilu. 2019. Green Synthesis of CuO Nanoparticles Using Leaf Extract of *Catha edulis* and Its Antibacterial Activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(6). doi: 10.17265/2328-2150/2019.06.007
- Kotranga, H., Najda, A., Bains, A., Gruszecki, R., Chawla, P., and Tosif, M. M. 2021. Metal and Metal Oxide Nanoparticle as a Novel Antibiotic Carrier for the Direct Delivery of Antibiotics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), pp. 9596. doi: 10.3390/ijms22179596
- Krishnapriya, R., Nizamudeen, C., Saini, B., Mozumder, M. S., Sharma, R. K., and Mourad, A.-H. I. 2021. MOF-derived Co²⁺-doped TiO₂ nanoparticles as photoanodes for dye-sensitized solar cells. *Scientific Reports*, 11(1), pp. 16265. doi: 10.1038/s41598-021-95844-4
- Kumar, N. and Sinha Ray, S. 2018. Synthesis and Functionalization of Nanomaterials. doi: 10.1007/978-3-319-97779-9_2
- Kumar, S., Ojha, A. K., Bhorolua, D., Das, J., Kumar, A., and Hazarika, A. 2019. Facile synthesis of CuO nanowires and Cu₂O nanospheres grown on rGO surface and exploiting its photocatalytic, antibacterial and supercapacitive properties. *Physica B: Condensed Matter*, 558, pp. 74–81. doi: 10.1016/j.physb.2019.01.040
- Kvitek, L., Panacek, A., Pucek, R., Soukupova, J., Vanickova, M., Kolar, M., and Zboril, R. 2011. Antibacterial activity and toxicity of silver – nanosilver versus ionic silver. *Journal of Physics: Conference Series*, 304, pp. 012029. doi: 10.1088/1742-6596/304/1/012029
- Le, H., Arnoult, C., Dé, E., Schapman, D., Galas, L., le Cerf, D., and Karakasyan, C. 2021. Antibody-Conjugated Nanocarriers for Targeted Antibiotic Delivery: Application in the Treatment of Bacterial Biofilms. *Biomacromolecules*, 22(4), pp. 1639–1653. doi: 10.1021/acs.biomac.1c00082
- Lee, N.-Y., Ko, W.-C., and Hsueh, P.-R. 2019. Nanoparticles in the Treatment of Infections Caused by Multidrug-Resistant Organisms. *Frontiers in Pharmacology*, 10. doi: 10.3389/fphar.2019.01153
- Liu, P., Qin, R., Fu, G., and Zheng, N. 2017. Surface Coordination Chemistry of Metal Nanomaterials. *Journal of the American Chemical Society*, 139(6), pp. 2122–2131. doi: 10.1021/jacs.6b10978
- Makvandi, P., Gu, J. T., Zare, E. N., Ashtari, B., Moeini, A., Tay, F. R., and Niu, L. 2020. Polymeric and inorganic nanoscale antimicrobial fillers in dentistry. *Acta Biomaterialia*, 101, pp. 69–101. doi: 10.1016/j.actbio.2019.09.025

- Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., and Okoh, A. 2018. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. *Molecules*, 23(4), pp. 795. doi: 10.3390/molecules23040795
- Maryn Mckenna. 2015, May 23. We Need Antibiotics. They're Not Profitable To Make. Who Pays?
- Mba, I. E. and Nweze, E. I. 2021. Nanoparticles as therapeutic options for treating multidrug-resistant bacteria: research progress, challenges, and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(6), pp. 108. doi: 10.1007/s11274-021-03070-x
- Meghana, S., Kabra, P., Chakraborty, S., and Padmavathy, N. 2015. Understanding the pathway of antibacterial activity of copper oxide nanoparticles. *RSC Advances*, 5(16), pp. 12293–12299. doi: 10.1039/C4RA12163E
- Moniri Javadhesari, S., Alipour, S., Mohammadnejad, S., and Akbarpour, M. R. 2019. Antibacterial activity of ultra-small copper oxide (II) nanoparticles synthesized by mechanochemical processing against *S. aureus* and *E. coli*. *Materials Science and Engineering: C*, 105, pp. 110011. doi: 10.1016/j.msec.2019.110011
- Morales Angeles, D. and Scheffers, D.-J. 2021. The Cell Wall of *Bacillus subtilis*. *Current Issues in Molecular Biology*, pp. 539–596. doi: 10.21775/cimb.041.539
- Nabila, M. I. and Kannabiran, K. 2018. Biosynthesis, characterization and antibacterial activity of copper oxide nanoparticles (CuO NPs) from actinomycetes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 15, pp. 56–62. doi: 10.1016/j.bcab.2018.05.011
- Naseer, M., Ramadan, R., Xing, J., and Samak, N. A. 2021. Facile green synthesis of copper oxide nanoparticles for the eradication of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Helicobacter pylori* biofilms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 159, pp. 105201. doi: 10.1016/j.ibiod.2021.105201
- National Nanotechnology Coordination Office (NNCO). 2022, March 12. What's So Special about the Nanoscale?
- Nayak, R., Ali, F. A., Mishra, D. K., Ray, D., Aswal, V. K., Sahoo, S. K., and Nanda, B. 2020. Fabrication of CuO nanoparticle: An efficient catalyst utilized for sensing and degradation of phenol. *Journal of Materials Research and Technology*, 9(5), pp. 11045–11059. doi: 10.1016/j.jmrt.2020.07.100
- Ogunsona, E. O., Muthuraj, R., Ojogbo, E., Valerio, O., and Mekonnen, T. H. 2020. Engineered nanomaterials for antimicrobial applications: A review. *Applied Materials Today*, 18, pp. 100473. doi: 10.1016/j.apmt.2019.100473
- Pajerski, W., Ochonska, D., Brzychczy-Wloch, M., Indyka, P., Jarosz, M., Golda-Cepa, M., Sojka, Z., and Kotarba, A. 2019. Attachment efficiency of gold nanoparticles by Gram-positive and Gram-negative bacterial strains governed by surface charges. *Journal of Nanoparticle Research*, 21(8), pp. 186. doi: 10.1007/s11051-019-4617-z
- Paulowski, L., Donoghue, A., Nehls, C., Groth, S., Koistinen, M., Hagge, S. O., Böhling, A., Winterhalter, M., and Gutschmann, T. 2020. The Beauty of Asymmetric Membranes: Reconstitution of the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. doi: 10.3389/fcell.2020.00586

- Pednekar, P. P., Godiyal, S. C., Jadhav, K. R., and Kadam, V. J. 2017. Mesoporous silica nanoparticles: a promising multifunctional drug delivery system. In *Nanostructures for Cancer Therapy*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-323-46144-3.00023-4
- Peng, H. and Chen, I. A. 2019. Rapid Colorimetric Detection of Bacterial Species through the Capture of Gold Nanoparticles by Chimeric Phages. *ACS Nano*, pp. acsnano.8b06395. doi: 10.1021/acsnano.8b06395
- Pestryakov, A. N., Petranovskii, V. P., Kryazhov, A., Ozhereliev, O., Pfänder, N., and Knop-Gericke, A. 2004. Study of copper nanoparticles formation on supports of different nature by UV–Vis diffuse reflectance spectroscopy. *Chemical Physics Letters*, 385(3–4), pp. 173–176. doi: 10.1016/j.cplett.2003.12.077
- Peterson, E. and Kaur, P. 2018. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.02928
- Potbhare, A. K., Chaudhary, R. G., Chouke, P. B., Yerpude, S., Mondal, A., Sonkusare, V. N., Rai, A. R., and Juneja, H. D. 2019. Phytosynthesis of nearly monodisperse CuO nanospheres using *Phyllanthus reticulatus/Conyza bonariensis* and its antioxidant/antibacterial assays. *Materials Science and Engineering: C*, 99, pp. 783–793. doi: 10.1016/j.msec.2019.02.010
- Ramalingam, G., Kathirgamanathan, P., Ravi, G., Elangovan, T., Arjun kumar, B., Manivannan, N., and Kasinathan, K. 2020. Quantum Confinement Effect of 2D Nanomaterials. In *Quantum Dots - Fundamental and Applications*. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.90140
- Raval, N., Maheshwari, R., Kalyane, D., Youngren-Ortiz, S. R., Chougule, M. B., and Tekade, R. K. 2019. Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. In *Basic Fundamentals of Drug Delivery*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-817909-3.00010-8
- Ren, E., Zhang, C., Li, D., Pang, X., and Liu, G. 2020. Leveraging metal oxide nanoparticles for bacteria tracing and eradicating. *View*, 1(3), pp. 20200052. doi: 10.1002/VIW.20200052
- Ridolfo, R., Tavakoli, S., Junnuthula, V., Williams, D. S., Urtti, A., and van Hest, J. C. M. 2021. Exploring the Impact of Morphology on the Properties of Biodegradable Nanoparticles and Their Diffusion in Complex Biological Medium. *Biomacromolecules*, 22(1), pp. 126–133. doi: 10.1021/acs.biomac.0c00726
- Rios, A. C., Moutinho, C. G., Pinto, F. C., del Fiol, F. S., Jozala, A., Chaud, M. v., Vila, M. M. D. C., Teixeira, J. A., and Balcão, V. M. 2016. Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art. *Microbiological Research*, 191, pp. 51–80. doi: 10.1016/j.micres.2016.04.008
- Román, L. E., Gomez, E. D., Solís, J. L., and Gómez, M. M. 2020. Antibacterial Cotton Fabric Functionalized with Copper Oxide Nanoparticles. *Molecules*, 25(24), pp. 5802. doi: 10.3390/molecules25245802
- Ruiz, N., Gronenberg, L. S., Kahne, D., and Silhavy, T. J. 2008. Identification of two inner-membrane proteins required for the transport of lipopolysaccharide to the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(14), pp. 5537–5542. doi: 10.1073/pnas.0801196105

- Ryowa, T., Ishida, T., Sakakibara, Y., Kitano, K., Ueda, M., Izumi, M., Ogura, Y., Tanaka, M., Nikata, S., Watanabe, M., Takasaki, M., Itoh, T., and Miyanaga, A. 2020. High-efficiency quantum dot light-emitting diodes with blue cadmium-free quantum dots. *Journal of the Society for Information Display*, 28(5), pp. 401–409. doi: 10.1002/jsid.896
- Saka, H. 2003. Transmission Electron Microscopy. In *Carbon Alloys*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-008044163-4/50014-0
- Saleh, T. A. 2020. Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. *Environmental Technology & Innovation*, 20, pp. 101067. doi: 10.1016/j.eti.2020.101067
- Sanità, G., Carrese, B., and Lamberti, A. 2020. Nanoparticle Surface Functionalization: How to Improve Biocompatibility and Cellular Internalization. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7. doi: 10.3389/fmolb.2020.587012
- Sarfraz, S., Javed, A., Sharif Mughal, S., Bashir, M., Rehman, A., Parveen, S., Khushi, A., and Kamran Khan, M. 2020. Copper Oxide Nanoparticles: Reactive Oxygen Species Generation and Biomedical Applications. *International Journal of Computational and Theoretical Chemistry*, 8(2), pp. 40. doi: 10.11648/j.ijctc.20200802.12
- Senthil, B., Devasena, T., Prakash, B., and Rajasekar, A. 2017. Non-cytotoxic effect of green synthesized silver nanoparticles and its antibacterial activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 177, pp. 1–7. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.10.010
- Shaikh, S., Nazam, N., Rizvi, S. M. D., Ahmad, K., Baig, M. H., Lee, E. J., and Choi, I. 2019. Mechanistic Insights into the Antimicrobial Actions of Metallic Nanoparticles and Their Implications for Multidrug Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), pp. 2468. doi: 10.3390/ijms20102468
- Silhavy, T. J., Kahne, D., and Walker, S. 2010. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5), pp. a000414–a000414. doi: 10.1101/cshperspect.a000414
- Singh, L., Kruger, H. G., Maguire, G. E. M., Govender, T., and Parboosing, R. 2017. The role of nanotechnology in the treatment of viral infections. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 4(4), pp. 105–131. doi: 10.1177/2049936117713593
- Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N. H. M., Ann, L. C., Bakhori, S. K. M., Hasan, H., and Mohamad, D. 2015. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Letters*, 7(3), pp. 219–242. doi: 10.1007/s40820-015-0040-x
- Skóra, B., Krajewska, U., Nowak, A., Dziedzic, A., Barylyak, A., and Kus-Liśkiewicz, M. 2021. Noncytotoxic silver nanoparticles as a new antimicrobial strategy. *Scientific Reports*, 11(1), pp. 13451. doi: 10.1038/s41598-021-92812-w
- Slavin, Y. N., Asnis, J., Häfeli, U. O., and Bach, H. 2017. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1), pp. 65. doi: 10.1186/s12951-017-0308-z
- Soldatović, T. 2021. Correlation between HSAB Principle and Substitution Reactions in Bioinorganic Reactions. In *Photophysics, Photochemical and Substitution Reactions - Recent Advances*. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.91682

- Sonia, S., Jayram, N. D., Suresh Kumar, P., Mangalaraj, D., Ponpandian, N., and Viswanathan, C. 2014. Effect of NaOH concentration on structural, surface and antibacterial activity of CuO nanorods synthesized by direct sonochemical method. *Superlattices and Microstructures*, 66, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.spmi.2013.10.020
- Stanić, V. and Tanasković, S. B. 2020. Antibacterial activity of metal oxide nanoparticles. In *Nanotoxicity*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-819943-5.00011-7
- Stetefeld, J., McKenna, S. A., and Patel, T. R. 2016. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, 8(4), pp. 409–427. doi: 10.1007/s12551-016-0218-6
- Sultan, I., Rahman, S., Jan, A. T., Siddiqui, M. T., Mondal, A. H., and Haq, Q. M. R. 2018. Antibiotics, Resistome and Resistance Mechanisms: A Bacterial Perspective. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.02066
- Tamimi, N., Mohammadi Nafchi, A., Hashemi-Moghaddam, H., and Baghaie, H. 2021. The effects of nano-zinc oxide morphology on functional and antibacterial properties of tapioca starch bionanocomposite. *Food Science & Nutrition*, 9(8), pp. 4497–4508. doi: 10.1002/fsn3.2426
- Tamiri, T. and Zitrin, S. 2013. Explosives: Analysis. In *Encyclopedia of Forensic Sciences*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-382165-2.00083-0
- Taylor, D. 2015. *The Pharmaceutical Industry and the Future of Drug Development*. doi: 10.1039/9781782622345-00001
- Torres-Rivero, K., Bastos-Arrieta, J., Fiol, N., and Florido, A. 2021. Metal and metal oxide nanoparticles: An integrated perspective of the green synthesis methods by natural products and waste valorization: applications and challenges. doi: 10.1016/bs.coac.2020.12.001
- Velásquez, C., Rojas, F., Lara, V. H., and Campero, A. 2004. On the textural and morphological properties of crystalline and amorphous α -tin phosphate. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 6(19), pp. 4714–4721. doi: 10.1039/B403830D
- Verma, N. and Kumar, N. 2019. Synthesis and Biomedical Applications of Copper Oxide Nanoparticles: An Expanding Horizon. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5(3), pp. 1170–1188. doi: 10.1021/acsbomaterials.8b01092
- Vines, J. B., Yoon, J.-H., Ryu, N.-E., Lim, D.-J., and Park, H. 2019. Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy. *Frontiers in Chemistry*, 7. doi: 10.3389/fchem.2019.00167
- von Wintersdorff, C. J. H., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., Savelkoul, P. H. M., and Wolfs, P. F. G. 2016. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in Microbiology*, 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.00173
- Wan, J., Ai, J., Zhang, Y., Geng, X., Gao, Q., and Cheng, Z. 2016. Signal-off impedimetric immunosensor for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Scientific Reports*, 6(1), pp. 19806. doi: 10.1038/srep19806

- Wang, F., Zhang, W., Li, H., Chen, X., Feng, S., and Mei, Z. 2022. How Effective are Nano-Based Dressings in Diabetic Wound Healing? A Comprehensive Review of Literature. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 17, pp. 2097–2119. doi: 10.2147/IJN.S361282
- Wang, H., Wang, M., Xu, X., Gao, P., Xu, Z., Zhang, Q., Li, H., Yan, A., Kao, R. Y.-T., and Sun, H. 2021. Multi-target mode of action of silver against *Staphylococcus aureus* endows it with capability to combat antibiotic resistance. *Nature Communications*, 12(1), pp. 3331. doi: 10.1038/s41467-021-23659-y
- Wang, L., Hu, C., and Shao, L. 2017. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 12, pp. 1227–1249. doi: 10.2147/IJN.S121956
- World Health Organization (WHO). 2019, April 29. New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis.
- World Health Organization (WHO). 2020, January 17. Lack of new antibiotics threatens global efforts to contain drug-resistant infections.
- Xie, Y., He, Y., Irwin, P. L., Jin, T., and Shi, X. 2011. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Zinc Oxide Nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(7), pp. 2325–2331. doi: 10.1128/AEM.02149-10
- Xu, G.-R., An, Z.-H., Xu, K., Liu, Q., Das, R., and Zhao, H.-L. 2021. Metal organic framework (MOF)-based micro/nanoscaled materials for heavy metal ions removal: The cutting-edge study on designs, synthesis, and applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 427, pp. 213554. doi: 10.1016/j.ccr.2020.213554
- Yang, G. and Wang, Y. 2018. Dynamic Light Scattering of DNA-Ligand Complexes. doi: 10.1007/978-1-4939-8675-0_10
- Ye, L., Cao, Z., Liu, X., Cui, Z., Li, Z., Liang, Y., Zhu, S., and Wu, S. 2022. Noble metal-based nanomaterials as antibacterial agents. *Journal of Alloys and Compounds*, 904, pp. 164091. doi: 10.1016/j.jallcom.2022.164091
- Yeh, Y.-C., Huang, T.-H., Yang, S.-C., Chen, C.-C., and Fang, J.-Y. 2020. Nano-Based Drug Delivery or Targeting to Eradicate Bacteria for Infection Mitigation: A Review of Recent Advances. *Frontiers in Chemistry*, 8. doi: 10.3389/fchem.2020.00286
- Yu, Z., Li, Q., Wang, J., Yu, Y., Wang, Y., Zhou, Q., and Li, P. 2020. Reactive Oxygen Species-Related Nanoparticle Toxicity in the Biomedical Field. *Nanoscale Research Letters*, 15(1), pp. 115. doi: 10.1186/s11671-020-03344-7
- Zeng, R., Liu, L., Li, S., Zou, Y., Zhang, F., Yang, Y., Cui, H., and Han, E. 2013. Self-assembled silane film and silver nanoparticles coating on magnesium alloys for corrosion resistance and antibacterial applications. *Acta Metallurgica Sinica (English Letters)*, 26(6), pp. 681–686. doi: 10.1007/s40195-013-0397-0
- Zerbib, D. 2016. Bacterial Cell Envelopes: Composition, Architecture, and Origin. In *Handbook of Electroporation*. Springer International Publishing, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-26779-1_28-1

- Zhao, J. and Liu, X. 2022. Electron microscopic methods (TEM, SEM and energy dispersal spectroscopy). In Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-822974-3.00013-6
- Zook, J. M., MacCuspie, R. I., Locascio, L. E., Halter, M. D., and Elliott, J. T. 2011. Stable nanoparticle aggregates/agglomerates of different sizes and the effect of their size on hemolytic cytotoxicity. *Nanotoxicology*, 5(4), pp. 517–530. doi: 10.3109/17435390.2010.536615

Anexos

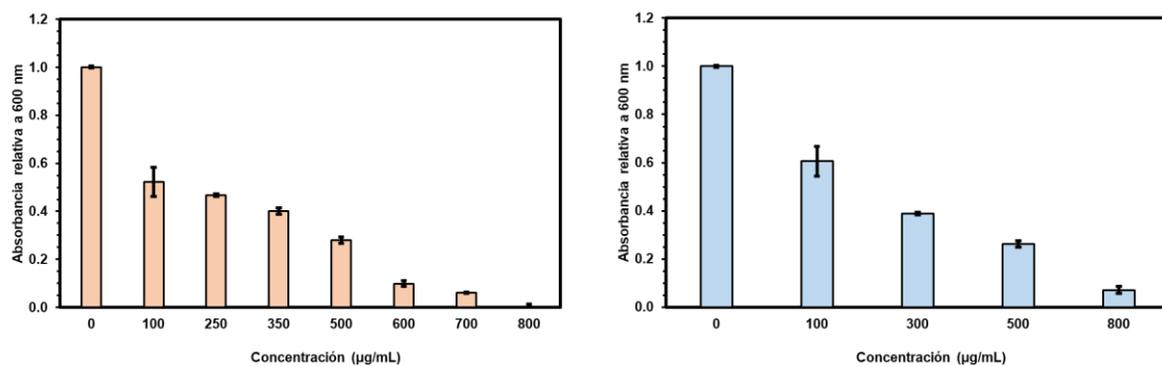


Figura 18. Evaluación de la actividad antibacteriana de las @CuONE. Cultivos de (A) *E. coli* y (B) *B. subtilis* se expusieron a CuONP durante 24 h.