

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, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los 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 de Autor.

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



**Maestría en Ciencias
en Nanociencias**

**Nanopartículas de plata como potenciador de efecto
microbicida**

Tesis

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

Presenta:

Karina Vargas Tacuba

Ensenada, Baja California, México
2024

Tesis defendida por
Karina Vargas Tacuba

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Diana Garibo Ruiz

Directora de tesis

Dra. Nina Bogdanchikova

Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo

Dra. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández



Dra. Catalina López Bastidas
Coordinadora del Posgrado en Nanociencias

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Karina Vargas Tacuba** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Nanociencias

Nanopartículas de plata como potenciador de efecto microbicida

Resumen aprobado por:

Dra. Diana Garibo Ruiz
Directora de tesis

En los últimos años, la resistencia a los antimicrobianos se ha convertido en un tema alarmante, debido a que los microorganismos patógenos no requieren de mucho tiempo para poder adaptarse y desarrollar resistencia a los antibióticos, lo que da como resultado que aproximadamente el 70% de las bacterias patógenas sean resistentes por lo menos a un antibiótico, convirtiéndose en un desafío importante para la salud pública. Debido a esto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha hecho un llamado de emergencia con la finalidad de desarrollar nuevas estrategias para combatir este gran problema. Dentro de estas alternativas se encuentra la utilización de nanopartículas metálicas, debido a que presentan una excelente actividad antimicrobiana, las nanopartículas de plata (AgNPs) son uno de los nanomateriales más estudiados entre las diversas nanopartículas metálicas, debido a su excelente capacidad como agentes antimicrobianos, actuando de manera extracelular e intracelular. En el presente trabajo se expone una nueva alternativa prometedora para mitigar la resistencia a los antibióticos, al implementar un pos-tratamiento con AgNPs, después de aplicar un antibiótico ampliamente utilizado como el ciprofloxacino (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), evaluando su eficiencia microbicida en un ambiente semi-controlado, donde se abarcaron los siguientes parámetros: temperatura, velocidad de agitación y cantidad inicial de nutrientes para el microorganismo. El postratamiento con AgNPs se realizó en dos diferentes concentraciones (10 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y tiempos de incubación (15 minutos y 1 hora) para obtener un óptimo efecto microbicida. Cabe destacar que en la evaluación del pos-tratamiento con AgNPs, se obtuvo una concentración óptima de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, exhibiendo un excelente efecto microbicida al provocar la muerte del microorganismo hasta en un 99.99 %. La determinación de la concentración mínima biocida de las AgNPs fue de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la cual coincide con la concentración óptima en la evaluación del pos-tratamiento con AgNPs. Así como también se presenta la evaluación de la actividad antimicrobiana de perfiles individuales (AgNPs y ciprofloxacino), evaluados mediante zonas de inhibición y la evaluación del efecto sinérgico y/o antagónico de AgNPs-ciprofloxacino, dando como resultado un efecto antagónico. Estos resultados contribuyen con uno de los temas prioritarios por la OMS.

Palabras clave: resistencia antimicrobiana, nanopartículas de plata, antibióticos, pos-tratamiento, efecto microbicida

Abstract of the thesis presented by **Karina Vargas Tacuba** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience's

Silver nanoparticles as a microbicide effect enhancer

Abstract approved by:

Dra. Diana Garibo Ruiz
Thesis Director

In recent years, antimicrobial resistance has become an alarming issue because pathogenic microorganisms do not require much time to adapt and develop resistance to antibiotics, which results in approximately 70% of pathogenic bacteria being resistant to at least one antibiotic, becoming a major challenge for public health. Because of this, the World Health Organization (WHO) has made an emergency call to develop new strategies to combat this major problem. Among these alternatives is the use of metallic nanoparticles, because they have excellent antimicrobial activity. Silver nanoparticles (AgNPs) are one of the most studied nanomaterials among the various metallic nanoparticles due to their excellent capacity as antimicrobial agents, acting both extracellularly and intracellularly. In the present work, a new promising alternative to mitigate antibiotic resistance is presented by implementing a post-treatment with AgNPs after applying a widely used antibiotic such as ciprofloxacin (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), evaluating its microbicidal efficiency in a semi-controlled environment where the following parameters were covered: temperature, agitation speed, and the initial amount of nutrients for the microorganism. The post-treatment with AgNPs was performed at two different concentrations (10 and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and incubation times (15 minutes and 1 hour) to obtain an optimal microbicidal effect. It should be noted that in the post-treatment evaluation with AgNPs, an optimum concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was obtained, exhibiting an excellent microbicidal effect by causing the death of the microorganism up to 99.99%. The determination of the minimum biocidal concentration of AgNPs was 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, which coincides with the optimum concentration in the post-treatment evaluation with AgNPs. As well as the evaluation of the antimicrobial activity of individual profiles (AgNPs and ciprofloxacin), evaluated by inhibition zones, and the evaluation of the synergistic and/or antagonistic effect of AgNPs and ciprofloxacin, resulting in an antagonistic effect, are also presented. These results contribute to one of the priority issues of the WHO.

Keywords: antimicrobial resistance, silver nanoparticles, antibiotics, post-treatment, microbicidal effect

Dedicatoria

Detrás de un proyecto de investigación está un gran equipo de trabajo que contribuye a lograr los objetivos del trabajo con su esfuerzo, ideas y aportaciones. En este caso, mi más sincero agradecimiento a mi directora de tesis, la Dra. Diana Garibo Ruiz, investigadora por México SNI I, por su amabilidad, por las experiencias vividas en esta estancia en la maestría, por su tiempo, sus ideas y atención en todas mis dudas. A la Dra. Nina Bogdanchikova, gracias por formar parte de este proyecto, por brindarme su apoyo y por donarnos las AgNPs que fueron un punto fundamental de este proyecto.

Recordando también que detrás de un proyecto de investigación están aquellos seres queridos que nos acompañan, nos motivan, nos aportan la energía y la fuerza que nos anima a crecer y mejorar como personas. Gracias infinitas a mi familia, en especial a Norberto Bibiano Memije y Fabiola Vargas Suastegui, por formar parte de mi red de apoyo, gracias por su apoyo a la distancia, por creer en mí y motivarme constantemente. Este trabajo va en memoria de mi abuela Maricela Suastegui Cordero. Gracias a mis amigos; Kevin Daniel Chávez, Paola Contreras, Mariela Ruperto y Alejandro Lozano por estar para mí a pesar de la distancia.

Agradecimientos

El presente trabajo de investigación se realizó en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), en las instalaciones del Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN) bajo la supervisión de la Dra. Diana Garibo Ruiz. Gracias al CICESE por brindarme la oportunidad de realizar mi maestría en esta institución, por permitirme formar parte de su comunidad y contar con el apoyo de sus investigadores. Gracias por los conocimientos adquiridos, las experiencias enriquecedoras y el ambiente de aprendizaje que me han permitido crecer a nivel académico. A su vez, quiero expresar mi agradecimiento al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), gracias por otorgarme la beca, la cual tuvo un impacto significativo en mi educación. Agradezco la confianza que se me brindó.

Gracias a mi directora y mi comité de tesis, por confiar en el proyecto, por guiarme y apoyarme en este proceso, la contribución de cada uno de mi comité fue pieza fundamental para lograr este proyecto. Gracias infinitas a mi directora de tesis, la Dra. Diana Garibo Ruiz, por inspirarme, motivarme constantemente en esta estancia de la maestría, por confiar en mí, agradezco cada una de sus aportaciones, las críticas constructivas que han enriquecido este trabajo, gracias por transmitirme la pasión por la investigación, la admiro como persona y como investigadora. Gracias por su paciencia, su apoyo incondicional y por compartirme sus conocimientos y experiencias.

Agradezco a mi comité, la Dra. Ana G. Rodríguez, la Dra. Nina Bogdanchikova y el Dr. Edgardo Sepúlveda Sánchez Hidalgo, por la paciencia, consejos, compromiso y disposición para compartirme sus conocimientos, ya que esto contribuyó mucho en este gran proyecto. Nuevamente agradezco a la Dra. Nina Bogdanchikova, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo en la Red Internacional de Bionanotecnología.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	viii
Lista de tablas.....	x
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Resistencia a los antimicrobianos	1
1.2 Impacto social y económico	2
1.3 Nuevas alternativas de tratamientos.....	3
1.3.1 Péptidos antimicrobianos	3
1.3.2 Terapia con fagos	4
1.3.3 Compuestos antimicrobianos derivados de plantas	4
1.3.4 Nanopartículas	5
1.4 Antecedentes	6
1.5 Justificación	10
1.6 Hipótesis.....	11
1.7 Objetivos	12
1.7.1 Objetivo general.....	12
1.7.2 Objetivos específicos.....	12
Capítulo 2. Metodología.....	13
2.1 Formulación de AgNPs Argovit-C™	13
2.2 Antibiótico comercial	13
2.3 Bacteria	13

2.4	Caracterización fisicoquímica de las AgNPs de Argovit.....	13
2.4.1	Dispersión dinámica de luz.....	13
2.4.2	Espectrofotometría Uv-Vis.....	14
2.4.3	Morfología y tamaño de nanopartículas.....	14
2.5	Actividad antimicrobiana	14
2.5.1	Efecto antimicrobiano de perfiles individuales, sinérgico y/o antagonista	14
2.5.2	Pos-tratamiento	15
2.5.3	Estudio de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima biocida	16
Capítulo 3.	Resultados	19
3.1	Caracterización fisicoquímica de las AgNPs	19
3.1.1	Análisis por microscopía electrónica de transmisión.....	19
3.1.2	Caracterización de las AgNPs por técnicas espectrofotométricas.....	20
3.2	Actividad antimicrobiana	21
3.2.1	Efecto antimicrobiano de perfiles individuales, sinérgico y/o antagonista	21
3.2.2	Concentración óptima del efecto microbicida.....	21
3.2.3	Pos-tratamiento con AgNPs	22
3.2.4	Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima biocida AgNPs, antibiótico y pos-tratamiento	25
3.2.5	comparación del efecto microbicida en medio líquido y semisólido.....	25
Capítulo 4.	Discusión.....	26
Capítulo 5.	Conclusiones	30
Literatura citada	31
Anexos	39

Lista de figuras

Figura	Página
1. Mecanismo de resistencia a los antibióticos por bacterias patógenas (Varela et al., 2021).	7
2. Mecanismo de acción de ciprofloxacino (Rusu et al., 2021).	8
3. Mecanismos de acción de AgNPs contra bacterias patógenas (Qing et al., 2018).	9
4. Metodología de postratamiento con AgNPs en dos diferentes concentraciones (10 o 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y dos tiempos de incubación (15 minutos o 1 hora).	15
5. Metodología empleada para los controles del pos-tratamiento con AgNPs.	16
6. Concentración mínima inhibitoria y mínima biocida para tratamientos individuales.	17
7. Concentración mínima inhibitoria y mínima biocida para el postratamiento con AgNPs.	18
8. Caracterización de las AgNPs mediante microscopía electrónica de transmisión. (a) imágenes HR-TEM que muestran la morfología de AgNPs. (b) histograma de la distribución del número de partículas por sus tamaños	19
9. Caracterización de las AgNPs mediante espectrofotometría de UV-VIS y analizador de DLS. (a) espectros de absorción UV-VIS de AgNPs (400, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (b) espectro de absorción UV-VIS de ciprofloxacino (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y AgNPs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) combinado con ciprofloxacino (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (c) diámetro hidrodinámico de AgNPs; (d) potencial Z de las AgNPs.	20
10. Halos de inhibición de componentes individuales. (a) control del máximo crecimiento en placa de 1×10^8 UFC/mL de <i>S. aureus</i> ; (b) AgNPs a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (c) AgNPs a la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (d) ciprofloxacino (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (e) tratamiento combinado de AgNPs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con antibiótico (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$).	21
11. Concentración óptima de efecto microbicida. (a) control del máximo crecimiento en placa de 1×10^8 UFC/mL de <i>S. aureus</i> ; (b) tratamiento con ciprofloxacino (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (c) postratamiento 15 minutos con AgNPs a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (d) postratamiento de 1 hora con AgNPs a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	22
12. Concentración óptima de efecto microbicida. (a) control del máximo crecimiento en placa de 1×10^8 UFC/mL de <i>S. aureus</i> ; (b) tratamiento con ciprofloxacino (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (c) postratamiento de 15 minutos con AgNPs a la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (d) postratamiento de 1 hora con AgNPs a la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	23
13. Controles empleados en los ensayos de postratamiento. (a) control del máximo crecimiento en placa de 1×10^8 UFC/mL de <i>S. aureus</i> ; (b) control 1, sustitución del agente del tratamiento (ciprofloxacino) por agua-miliQ 1; (c) control 2, sustitución del agente del postratamiento (AgNPs) por agua mili-Q.	24
14. Comparación del efecto microbicida en medio líquido y semisólido. a) AgNPs empleadas en medio semisólido; b) AgNPs empleadas en medio líquido.	25

15. Halos de inhibición de AgNPs a la concentración de 6 mg/mL	39
16. Metodología empleada para halos de inhibición del postratamiento con AgNPs.....	40
17. Halos de inhibición de la concentración óptima de efecto microbicida del postratamiento con AgNPs. (a) control del máximo crecimiento en placa de 1×10^8 UFC/mL de <i>S. aureus</i> ; (b) tratamiento con ciprofloxacino (250 $\mu\text{g/mL}$), cargando el discon con antibiótico a la concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$; (c) postratamiento de 15 minutos con AgNPs a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, cargando el discon con antibiótico a la concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$; (d) postratamiento de 1 hora con AgNPs a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, cargando el discon con antibiótico a la concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$	41
18. Halos de inhibición de la concentración óptima de efecto microbicida del postratamiento con AgNPs. (a) control del máximo crecimiento en placa de 1×10^8 UFC/mL de <i>S. aureus</i> ; (b) tratamiento con ciprofloxacino (250 $\mu\text{g/mL}$), cargando el discon con antibiótico a la concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$; (c) postratamiento de 15 minutos con AgNPs a la concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$, cargando el discon con antibiótico a la concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$; (d) postratamiento de 1 hora con AgNPs a la concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$, cargando el discon con antibiótico a la concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$	43

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Determinación de UFC del postratamiento con AgNP (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de 15 minutos y 1 hora.....	23
2. Determinación de UFC/mL del postratamiento con AgNPs (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de 15 minutos y 1 hora.....	24
3. Actividad antimicrobiana. Concentración mínima bactericida y concentración mínima inhibitoria de agentes antimicrobianos (AgNPs, ciprofloxacino) y del pos-tratamiento.....	25
4. Algunos articulos de los últimos cinco años sobre el potencial antimicrobiano de las AgNPs.....	27
5. Actividad antimicrobiana de AgNPs vs <i>S. aureus</i>	29
6. Halos de inhibición de la concentración óptima de efecto microbicida del postratamiento con AgNPs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	42
7. Halos de inhibición de la concentración óptima de efecto microbicida del postratamiento con AgNPs (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$).....	42

Capítulo 1. Introducción

1.1 Resistencia a los antimicrobianos

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la resistencia a los antimicrobianos (RAM) se encuentra dentro de las diez principales amenazas para la salud pública (World Health Organization: WHO, 2021). La RAM surge cuando los microorganismos se adaptan y desarrollan mecanismos para evadir el efecto de los antibióticos, su objetivo principal es replicarse, sobrevivir y propagarse de manera muy rápida, que da como resultado su evolución y así garantizan su existencia continua (Mancuso et al., 2021).

La RAM surge a través de la propagación microbiana, donde están involucrados: (a) la presión selectiva que puede definirse como las condiciones ambientales, que permiten la supervivencia y proliferación de microorganismos con nuevas mutaciones o características recientemente desarrolladas (Zhao et al., 2019); (b) diagnóstico inexacto por profesionales de la salud, que en ocasiones se basan en conocimientos poco fiables o inexactos, recetando antibiótico de amplio espectro, cuando un antibiótico de espectro reducido en particular podría ser más apropiado (Chokshi et al., 2019); (c) la automedicación de antibióticos, que está relacionada con la posibilidad del uso inadecuado de los medicamentos, lo que pone en riesgo a los pacientes de reacciones adversas a los medicamentos (Sachdev et al., 2022); (d) la duración incorrecta de tratamiento con antibióticos, que conducen a que las bacterias puedan desarrollar resistencia a ese antibiótico (World Health Organization: WHO, 2021); (e) la falta de control para evitar la propagación y contagios de las enfermedades en hospitales, donde están involucrados: pacientes, personal y visitantes del hospitales, cada uno con su propio conjunto de microbiomas. Además, las bacterias pueden propagarse si los hospitales no cuentan con los protocolos adecuados para ayudar a mantener los espacios limpios (Almagor et al., 2018); (f) el uso indiscriminante de antibióticos en la agricultura, donde se utilizan como suplementos y promotores del crecimiento de los animales. El tratamiento del ganado con algún antibiótico, al igual que en los humanos, da como resultado la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos. Las bacterias resistentes a los antibióticos que se encuentran en el ganado pueden ser patógenas para los humanos. Los microorganismos se propagan fácilmente a los humanos a través de las cadenas alimentarias y circulan ampliamente en el ecosistema a través de los desechos animales (Manyi Loh et al., 2018).

Una característica peculiar de estos microorganismos patógenos es el surgimiento de cepas

multiresistentes a los antimicrobianos que habitualmente se emplean para su eliminación. Por ejemplo, los genes de resistencia a los antibióticos pueden ser transportados en plásmido o transposones (Zhang et al., 2022). La plasticidad del genoma bacteriano y su eficaz mecanismo para transferir información genética vía horizontal de una bacteria a otra, contribuye a la adquisición de nueva información genética. Esta plasticidad genómica beneficia la supervivencia de las bacterias, especialmente cuando se transmiten genes que otorgan la resistencia a los antibióticos o que favorecen su desarrollo en condiciones extremas (ejemplo: temperaturas altas o bajas) (Blair et al., 2015).

1.2 Impacto social y económico

Las enfermedades infecciosas representan un grave problema de salud a nivel mundial, estas infecciones son causadas comúnmente por bacterias. Estos microorganismos, que son causantes de enfermedades infecciosas, provocan la muerte principalmente por neumonía, tuberculosis y enfermedades diarreicas. Son responsables de ocasionar más del 50% en muertes prematuras de niños y adultos jóvenes en todo el mundo (Vazquez, Meza Villezcas, et al., 2019).

La resistencia a los antibióticos ha sido causante de la muerte de aproximadamente 7,000,000 personas cada año en todo el mundo (Mancuso et al., 2021). La habilidad de los microorganismos para sobrevivir a la exposición a los antibióticos se ha acelerado en los últimos 60 años. En consecuencia, la OMS ha declarado la resistencia a los antibióticos como uno de los temas prioritarios en el área de la salud (Garibo et al., 2022). Entre los microorganismos resistentes, destaca el grupo denominado ESKAPE, acrónimo del grupo de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, conformadas por: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp. (Santajit & Indrawattana, 2016).

En 2017, la OMS hizo un llamado de emergencia con la finalidad de encontrar una solución ante este gran problema que es la RAM, priorizando las investigaciones en microorganismos patógenos como: *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, *E. faecium* y *S. aureus*. Cabe destacar que estas bacterias son causantes de infecciones nosocomiales, que ponen en riesgo la vida de personas inmunocomprometidas y en estado crítico que están hospitalizadas (Agaba et al., 2017).

De acuerdo con la Federación Internacional de Fabricantes y Asociaciones Farmacéuticas, se estima que para el 2050, la RAM provocará una derrama económica de \$100 billones de dólares. No obstante, para

contrarrestar lo previsto en el 2050, la OMS en el año 2019 realizó una evaluación de 32 antibióticos en avances clínicos con relación a microorganismos prioritarios, donde solo seis fueron aprobados como innovadores. El no contar con fármacos de calidad provoca un grave problema en todo el mundo, en relación con el sistema de atención médica, los antibióticos se ven afectados a medida que la RAM aumenta a nivel mundial (Velazquez et al., 2022).

1.3 Nuevas alternativas de tratamientos

1.3.1 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos son de naturaleza ubicua y generalmente poseen una estructura catiónica (debido a la presencia de aminoácidos como la cisteína y la lisina, que son necesarios para la unión a la membrana) y anfipática, con un dominio hidrofóbico e hidrofílico, que es indispensable para promover la ruptura de la membrana celular bacteriana. Los péptidos antimicrobianos (AMP, por sus siglas en inglés) poseen amplias funciones, algunas de estas son: estimular la acumulación de células inmunitarias (neutrófilos, macrófagos y linfocitos) en el lugar de la infección, neutralizar las endotoxinas de lipopolisacáridos producidas por bacterias Gram negativas, estimular la angiogénesis, controlan las respuestas del sistema inmunitario frente a un determinado microorganismo, comportándose como inmunomoduladores. Adicionalmente, estos polipéptidos endógenos son activos frente a bacterias multirresistentes (Łojewska & Sakowicz, 2021).

No obstante, cuando se aplican como agentes terapéuticos, los AMP muestran ciertas desventajas, como por ejemplo: son susceptibles a la acción de las proteasas, perdiendo fácilmente su actividad, lo que puede constituir un factor limitante al momento de promover la administración de AMP a nivel sistémico; los AMP pueden ser citotóxicos para varias células huésped, concretamente cuando se administran en altas concentraciones, y logran desestabilizar las membranas celulares, lo que eventualmente conduce a su ruptura; los AMP están influenciados por las variaciones de pH y pueden perder actividad cuando se administran en ambientes con bajas concentraciones de sales o cuando interaccionan con proteínas plasmáticas; los AMP tienen altos costos de producción y purificación; los AMP pueden producir efectos tóxicos tanto a nivel sistémico como tópico; pueden inducir sensibilidad y alergias tras varias aplicaciones; los AMP aún no están bien estudiados desde las perspectivas "farmacocinética", "farmacodinamia" y "toxicológica" (Slaninová et al., 2012; Seo et al., 2012; Sarma et al., 2018).

1.3.2 Terapia con fagos

Los bacteriófagos tienen un potencial considerable para ser utilizados como alternativas al tratamiento con antibióticos. La terapia con fagos se sigue investigando ampliamente como una terapia alternativa para combatir las infecciones bacterianas (Łojewska & Sakowicz, 2021). Los bacteriófagos también pueden actuar como biosensores en el reconocimiento de patógenos peligrosos, bacterias viables, pero no cultivables (VBNC, por sus siglas en inglés) transmitidos por los alimentos, por ejemplo, pueden distinguir las células viables y VBNC de las muertas de *Salmonella*. Desafortunadamente, las regulaciones administrativas para el uso de bacteriófagos y el conocimiento sobre sus posibles efectos secundarios aún son bastante limitados (Fernandes et al., 2014).

1.3.3 Compuestos antimicrobianos derivados de plantas

Khameneh et al., 2019, menciona que las propiedades antibacterianas naturales de las plantas han estado presentes desde hace tiempo en la medicina tradicional; sin embargo, en los últimos años, se reconocieron como alternativas prometedoras contra las bacterias resistentes a los antibióticos. Debido a que las plantas no tienen respuestas inmunitarias basadas en células, estas utilizan otros métodos para combatir las bacterias. Hay muchos compuestos funcionales en las plantas, como polifenoles, fenoles, alcaloides, micronutrientes, fitoquímicos y aceites esenciales. Estas sustancias orgánicas muestran un potencial antioxidante natural, así como propiedades antimicrobianas. Se estima que hay más de 30,000 sustancias antimicrobianas activas identificadas en las plantas (Tajkarimi et al., 2010). La mayoría de los aceites esenciales obtenidos de las hierbas populares tienen una actividad antimicrobiana que se atribuye a los compuestos fenólicos, terpenoides y estos compuestos lipofílicos pueden acumularse en las membranas bacterianas provocando alteraciones.

El mecanismo detallado involucrado es un vínculo importante que contribuye a los estudios antimicrobianos de plantas (Łojewska & Sakowicz, 2021). Actualmente se encuentran un amplio número de investigaciones científicas con relación a los compuestos antimicrobianos derivados de plantas. Sin embargo, sólo una pequeña parte de estos estudios incluye el análisis del modo de acción de los metabolitos antimicrobianos de las plantas para su posterior evaluación, lo que lleva a la información incompleta sobre el modo de acción que actualmente impide la sustitución de antibióticos por metabolitos secundarios de plantas (Khameneh et al., 2019).

1.3.4 Nanopartículas

Los avances en nanociencia y nanotecnología han generado un cambio radical en el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades. Las nanopartículas de plata (AgNPs) son uno de los nanomateriales más estudiados entre las diversas nanopartículas metálicas por su excelente capacidad de actuar como un agente bactericida, fungicidas, viricidas, portadores de fármacos, etc. (Castro et al., 2019). La actividad antimicrobiana de las AgNPs se les atribuye a sus características fisicoquímicas, las AgNPs han demostrado eficacia en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Mann et al., 2021). Las AgNPs causan la destrucción del peptidoglicano, liberando iones de plata, estos se unen a la estructura del ADN, haciendo que pierda su capacidad de replicación y previniendo la reproducción bacteriana por bipartición (Van Dong et al., 2012). Es necesario resaltar que, en el uso de nanomateriales, en específico las AgNPs, uno de los grandes retos a los que se enfrenta son los estudios de toxicidad. Cabe destacar que la formulación de AgNPs Argovit™ es de las más estudiadas por sus excelentes propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias y antivirales (Stephano et al., 2020; Guerra et al., 2020; Valenzuela et al., 2021; Ochoa et al., 2019). Así mismo se ha demostrado que Argovit™ no provoca daño citogenotóxicos en células sanas (Ruiz et al., 2020).

Ahora bien, en los últimos años se han realizado estudios que demuestran que las AgNPs pueden mejorar el efecto de los antibióticos contra bacterias resistentes, existen aproximadamente 37 artículos que emplean la combinación de los antibióticos con AgNPs, considerando esto como una posible solución a la RAM. Se han descrito efectos, principalmente, efecto sinérgico y antagónico (Deng et al., 2016; Hari et al., 2014; Lopez et al., 2018), que hasta el momento han sido la alternativa más explorada.

Sin embargo, en los últimos años nuestro grupo de investigación ha reportado una nueva forma de regresar la actividad antimicrobiana a los antibióticos con un pre-tratamiento de AgNPs (Argovit-C™) y posteriormente evaluar 31 antibióticos, destacando que las AgNPs pueden restaurar gradualmente la actividad de los antibióticos a los que las bacterias ya han desarrollado resistencia y reducir el tiempo de tratamiento para eliminar procesos infecciosos bacterianos en un 50 % (Garibo et al., 2022; Nefedova et al., 2022, 2023). Por lo tanto, en el presente trabajo se realizó la evaluación de la eficiencia microbicida de AgNPs como postratamiento en sustancias biocidas (antibióticos) en un ambiente semi-controlado, donde se abarcaron los siguientes parámetros; temperatura, velocidad de agitación y cantidad inicial de nutrientes para el microorganismo. El postratamiento con AgNPs se realizó en dos diferentes concentraciones y diferentes tiempos de incubación, para obtener un óptimo efecto microbicida de las AgNPs.

1.4 Antecedentes

Las enfermedades intrahospitalarias o también conocidas como infecciones nosocomiales, hoy en día son un gran problema de salud pública. Estas infecciones afectan a un gran número de pacientes en todo el mundo, provocando un aumento de mortalidad y un impacto financiero en los sistemas de salud (Jernigan et al., 2020). Las infecciones nosocomiales son provocadas principalmente por bacterias resistentes a diversos antibióticos como: *Escherichia coli*, *K. Pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* (Suksatan et al., 2022). No obstante, en la actualidad *S. aureus* despierta mayor interés, al ser uno de los principales patógenos en los hospitales, provocando enfermedades como: infecciones leves de la piel y los tejidos blandos, endocarditis infecciosa, osteomielitis, bacteriemia y neumonía mortal (Maysaa et al., 2019).

Las infecciones provocadas por *S. aureus* se encuentran entre las más comunes y problemáticas. Sin embargo, las preocupaciones económicas han alejado a las compañías farmacéuticas de la aprobación y desarrollo de nuevos antibióticos, dejando pocas opciones para tratar a *S. aureus*, que ha ido desarrollando resistencia a diversas clases de antibióticos (Samia et al., 2022).

Los antibióticos han sido reconocidos como medicamentos extraordinarios para combatir a las bacterias. Estos fármacos se han empleado durante décadas y no sólo para usos medicinales, sino también se han utilizado en la ganadería y la agricultura como suplementos y promotores del crecimiento (Uddin et al., 2021). Sin embargo, la RAM es un fenómeno inevitable, debido a que los microorganismos desarrollan mutaciones genéticas para mitigar su efecto letal. La RAM ha sido un tema de preocupación a lo largo de los años, ya que un antibiótico no tarda en establecer resistencia, y aproximadamente el 70% de las bacterias patógenas son resistentes al menos a un antibiótico, convirtiéndose en uno de los desafíos más serios para la salud pública. Por ejemplo, la resistencia a ciprofloxacino, un antibiótico ampliamente utilizado para tratar infecciones del tracto urinario osciló entre el 8,4 y el 92,9 % para *E. coli* y entre el 4,1 y el 79,4 % para *K. pneumoniae*, con resistencia a la penicilina oscilando hasta el 51 % (Watkins & Bonomo, 2016).

La penicilina, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenem, pertenecen a la misma clase de antibióticos betalactámicos. Esta clase de antibióticos contiene un anillo betalactámico, que tiene un mecanismo de acción extracelular bactericida común. Los antibióticos β -lactámicos inhiben la biosíntesis de las paredes celulares de las bacterias Gram-positivas. Sin embargo, ciertas bacterias Gram negativas, como *E. coli* y *Klebsiella* spp. pueden producir enzimas β -lactamasas, que destruyen el anillo β -lactámico del fármaco, lo

que hace que las bacterias sean resistentes. Los derivados semisintéticos de la penicilina, incluyendo meticilina, oxacilina, ampicilina y carbenicilina, mostraron actividades de amplio espectro contra varias bacterias Gram-positivas (*S. aureus*, *E. faecalis*) y Gram-negativas (*Haemophilus influenzae*, *E. coli*) (Bush & Bradford, 2016).

Estos microorganismos han evolucionado con el tiempo, desarrollado varios mecanismos para enfrentar los efectos adversos de los antibióticos (Bruna et al., 2021). En la Figura 1, se muestran los cuatro mecanismos de resistencia reportados hasta ahora, los cuales son los siguientes: (1) alteración de las proteínas microbianas diana del fármaco; (2) degradación enzimática o inactivación del fármaco; (3) disminución de la permeabilidad de la membrana; (4) aumento del flujo de salida del fármaco (Varela et al., 2021).

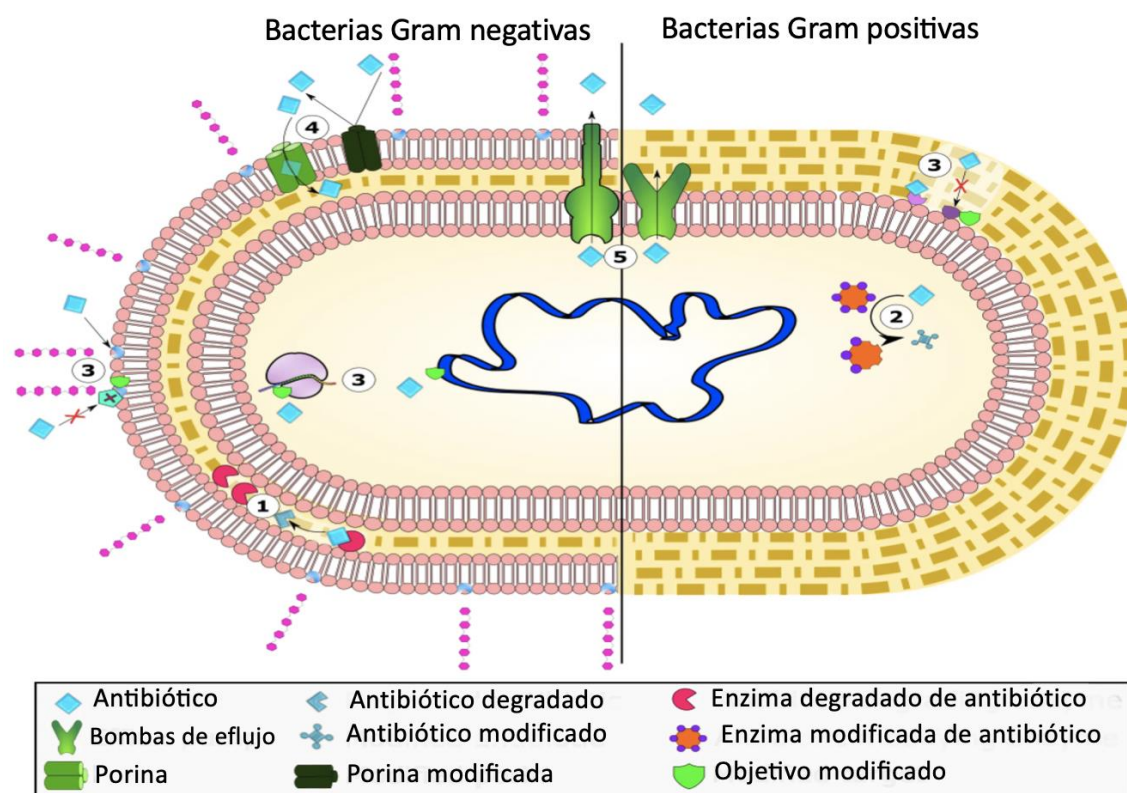


Figura 1. Mecanismo de resistencia a los antibióticos por bacterias patógenas (Varela et al., 2021).

Cabe destacar que *S. aureus* emplea dos principales mecanismos para evadir los efectos de los antibióticos de la clase de las fluoroquinolonas, los cuales se basan en lo siguiente: (1) este primer mecanismo implica la mutación puntual en los genes *grlA /grlB* y *gyrA /gyrB*, que traducen las subunidades de la topoisomerasa IV y la ADN girasa, respectivamente. Debido a que el objetivo principal del antibiótico ciprofloxacino es inhibir la ADN girasa y la topoisomerasa IV. La inactivación de la topoisomerasa afecta la

funcionalidad de la célula y la imposibilita para replicarse correctamente, generando errores o fallos en sus funciones celulares. Por otro lado, si la girasa se inactiva, las demás proteínas implicadas en el proceso de replicación se ven afectadas debido al enrollamiento del ADN y la replicación celular no puede ocurrir adecuadamente (Rusu et al., 2021), como se muestra en la figura 2. Esto conduce a que la célula entre en un estado de senescencia o inactividad, lo cual lleva a la muerte celular (Hooper & Jacoby, 2016); (2) el segundo mecanismo se basa en la salida del antibiótico por la proteína transmembranal NorA. Este mecanismo, denominado como bombas de eflujo, expulsa activamente al antibiótico fuera de la célula bacteriana (Campion et al., 2004).

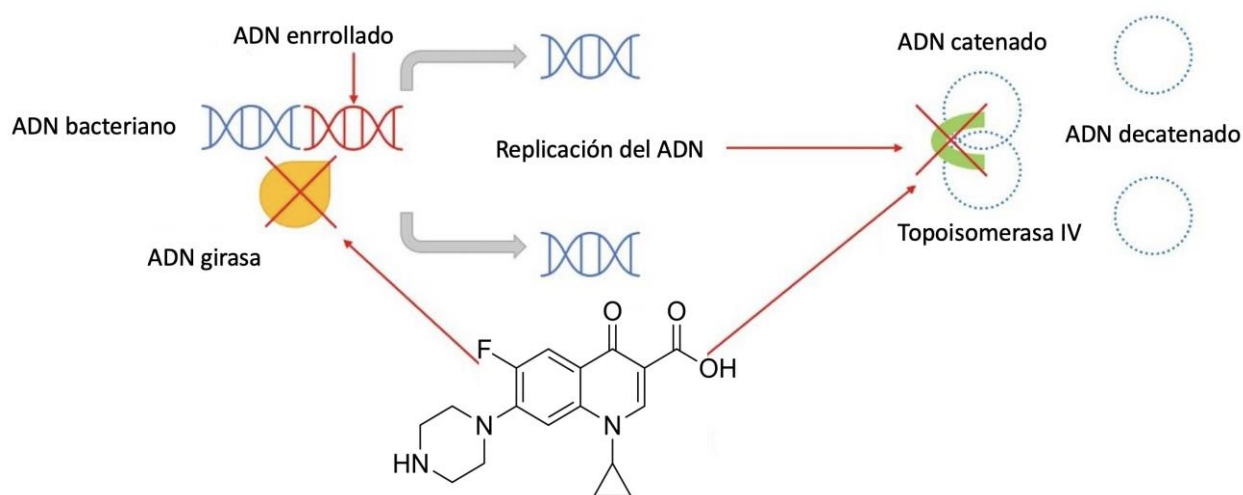


Figura 2. Mecanismo de acción de ciprofloxacino (Rusu et al., 2021).

No obstante, el campo de la nanotecnología ha logrado abrir nuevos horizontes para combatir la resistencia en los microorganismos patógenos. Especialmente, las nanopartículas metálicas, resaltando las AgNPs al ser de las más estudiadas, debido a su capacidad de actuar como un agente bactericida, fungicidas, viricidas, portadores de fármacos, etc. (Castro et al., 2019; Guerra et al., 2020; Ochoa et al., 2019; Ruiz et al., 2020; Stephano et al., 2020; Valenzuela et al., 2021).

En la figura 3, se observa el mecanismo de acción bactericida de las AgNPs, en donde se ven afectados varios procesos metabólicos en la célula bacteriana (Qing et al., 2018): (a) alteración de la pared celular y la membrana, así mismo, aumenta la permeabilidad celular (Li et al., 2010); (b) la penetración de AgNPs provocando daño intracelular que interrumpe las vías metabólicas (Lok et al., 2006); (c) el daño de biomoléculas y generación de especies de oxígeno altamente reactivas (ROS, por sus siglas en inglés) (Xu et al., 2012). Por lo anterior, ha surgido la alternativa de la conjugación de AgNPs-antibiótico, la cual

permite el uso de fármacos que han reportado RAM (Birla et al., 2009), donde principalmente reportan un efecto sinérgico y/o antagónico (Deng et al., 2016; Hari et al., 2014; Lopez et al., 2018).

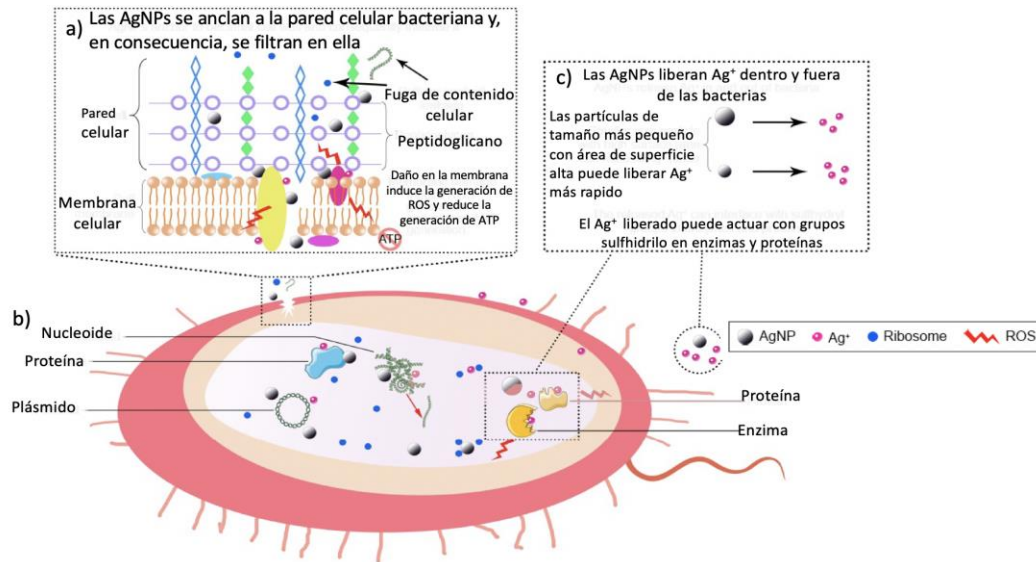


Figura 3. Mecanismos de acción de AgNPs contra bacterias patógenas (Qing et al., 2018).

Hasta el momento es la alternativa más explorada, sin embargo, en los últimos años nuestro grupo de investigación ha reportado una nueva alternativa de restablecer la actividad antimicrobiana de los antibióticos con un pretratamiento con AgNPs (Argovit-C™) y posteriormente evaluar 31 antibióticos (pertenecientes a grupos de aminoglucósido, fluoroquinolona, macrólidos, lincosamidas, entre otros). Realizando análisis *in vitro* y *ex vivo* en 200-400 vacas con mastitis, siendo una de las infecciones más importantes en la industria láctea, causada por diversas bacterias que provocan un daño en las glándulas mamarias, esta infección genera una disminución en la producción de leche y adicionalmente los costos de tratamiento son muy elevados. Abordando esta problemática, Bogdanchikova et al., 2024; Garibo et al., 2022; Nefedova et al., 2022, 2023, realizaron una comparativa de un pretratamiento con AgNPs y un pretratamiento con antibióticos de primera línea (Lactobay™, Spectromast™ y Dienomast™). El pretratamiento con antibióticos de primera línea condujo a una caída del 23-27 % en la sensibilidad a *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus dysgalactiae* y *E. coli* a 31 antibióticos, mientras que después del pretratamiento con AgNPs (Argovit-C™), su susceptibilidad a los antibióticos aumentó entre un 11 y un 19.4 %. La porción de aislamientos que mostraban el efecto de eflujo de estas cuatro bacterias aumentó entre un 8 y un 16 % después del tratamiento con medicamentos que contenían antibióticos, mientras que disminuyó entre un 16 y un 19 % después del pretratamiento con Argovit-C™.

Los cambios observados en la susceptibilidad después de los pretratamientos con Argovit-C™ y fármacos que contienen antibióticos pueden explicarse, al menos parcialmente, por la alteración en la contribución de los aislados con el efecto de eflujo después de los tratamientos. Con la aplicación de un pretratamiento con AgNPs, el período de recuperación disminuyó entre un 26,8% y 48,4%, en comparación con el tratamiento con antibióticos de primera línea. Cabe destacar que después del pretratamiento con AgNPs, las bacterias se volvieron más sensibles, incluso a concentraciones bajas de antibióticos (Bogdanchikova et al., 2024).

Estos trabajos explican el aumento de la susceptibilidad de los antibióticos con el efecto de eflujo del pretratamiento con antibióticos de primera línea (Lactobay™, Spectromast™ y Dienomast™) y su disminución con el pretratamiento con AgNPs y/o los cambios en la adhesión bacteriana y la actividad anti-lisozima después de estos tratamientos. Presentando una nueva alternativa para reducir la resistencia bacteriana mediante la implementación del pretratamiento con AgNPs, que difiere de enfoques anteriormente basados en la aplicación de combinación de antibióticos con AgNPs (Bogdanchikova et al., 2024; Garibo et al., 2022; Nefedova et al., 2022, 2023).

Los anteriores estudios han contribuido a resolver de forma preliminar la investigación a una posible solución a la RAM. Sin embargo, aún faltan por abordar aspectos en relación con el efecto antimicrobiano de los 4 trabajos publicados por nuestro grupo de investigación. Existen variaciones en parámetros que se deben tomar en cuenta, en la evaluación de estos trabajos quedan diversas dudas por responder, por ejemplo, ¿Existe alguna influencia al exponer a las bacterias en postratamiento con AgNPs en diferentes intervalos de tiempo? Por lo cual, es fundamental determinar no solo la evaluación del efecto sinérgico y/o antagónico, sino que también estimar la eficiencia biocida de AgNPs como postratamiento en diferentes concentraciones, diferentes tiempos de incubación, para poder determinar si los cambios en las condiciones alteran su actividad y si es así, ¿cómo?

1.5 Justificación

Hoy en día, la resistencia de los microorganismos a los antibióticos es un grave problema de salud pública. El uso indiscriminado de estos fármacos como tratamientos a las enfermedades infecciosas es el principal factor. La RAM ha provocado el surgimiento de cepas resistentes, convirtiéndose en el principal factor contribuyente a la tasa de mortalidad a nivel mundial. Lo anterior ha llevado a la necesidad de investigar

y desarrollar métodos más eficaces para la eliminación de estas bacterias resistentes (Prestinaci et al., 2015).

Uno de los campos en los que han venido desarrollando avances mediante la utilización de nanotecnología es la nanomedicina. Actualmente, una de las investigaciones que más destaca en este campo es el efecto antimicrobiano que presentan algunas nanopartículas (NPs), cabe mencionar que las NPs más estudiadas son las AgNPs, debido a su excelente efecto bactericida tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas (Holubnycha et al., 2024). Las propiedades antimicrobianas de las AgNPs están vinculadas con las características intrínsecas, lo que permite que entre a la célula con mayor facilidad logrando el anclaje y la penetración en la pared celular bacteriana. La interacción de las NPs con la bacteria depende del área superficial disponible, a través de la liberación de iones plata, enlazándose con grupos sulfhidrilos de biomoléculas y con compuestos fosforosulfurados presentes en el ADN, lo que inactiva a las bacterias, además la producción de ROS causa estrés oxidativo, lo que provoca la muerte bacteriana (Bruna et al., 2021).

Con la finalidad de contribuir en uno de los temas prioritarios por la OMS, se evaluó la eficiencia microbicida del tratamiento con AgNPs posterior a la aplicación con ciprofloxacino, un antibiótico ampliamente utilizado para tratar infecciones mixtas. Este fármaco perteneciente a la clase de las fluoroquinolonas, su modo de acción se basa en detener la replicación del ADN, al inhibir la topoisomerasa y la girasa del ADN bacteriano. Sin embargo, la dosificación de este fármaco genera efectos secundarios como: problemas gastrointestinales, respiratorios, entre otros (Baggio & Ananda-Rajah, 2021). Una posible solución a la resistencia a los antibióticos es la implantación de un postratamiento con AgNPs, con la facilidad de debilitar la membrana bacteriana y que de esta forma el fármaco logre la mayor actividad antimicrobiana posible, sin comprometer su eficacia. La administración del antibiótico y la posterior administración de las AgNPs hace referencia a un esfuerzo coordinado, diseñado para mejorar el uso apropiado del antibiótico. Reduciendo la dosis y optimizando la duración de la terapia. Estos esfuerzos, en última instancia, podrían reducir el costo del tratamiento de las infecciones sanitarias y reducir el potencial de desarrollo de microorganismos resistentes a los antibióticos (Vestergaard et al., 2019).

1.6 Hipótesis

El efecto microbicida del postratamiento de AgNPs dependerá tanto del tiempo de exposición, como de las concentraciones de las AgNPs.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo general

- Evaluar la dependencia del cambio de sensibilidad de *S. aureus* al antibiótico después de un postratamiento con AgNPs en función del tiempo.

1.7.2 Objetivos específicos

- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de las AgNPs para la determinación del tamaño, morfología, sus propiedades ópticas y carga electrostática.
- Analizar el efecto antimicrobiano de perfiles individuales: antibiótico, AgNPs para comparar la capacidad bactericida, además de su efecto sinérgico y/o antagonista.
- Determinar la eficacia microbicida de AgNPs como postratamiento en dos diferentes tiempos: 15 minutos y 1 hora.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria y mínima biocida de perfiles individuales (AgNPs y antibiótico), y del postratamiento con AgNPs.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Formulación de AgNPs Argovit-C™

Se utilizó una formulación de AgNPs Argovit-C™, donada por el Centro Científico y de Producción Vector-Vita Ltd® (Novosibirsk, Rusia). Esta formulación es una suspensión acuosa estable con una concentración total de 200 mg/mL (plata metálica + estabilizadores) en agua destilada. La concentración de plata metálica es de 12 mg/mL, las AgNPs se estabilizan con colágeno hidrolizado (125 mg/mL) y polivinilpirrolidona (PVP) (63 mg/mL).

2.2 Antibiótico comercial

Se utilizó el agente antimicrobiano comercial ciprofloxacino (2 mg/mL), el cual fue seleccionado basándose en su familia y modo de acción. Es un antibiótico de la clase de fluoroquinolonas, que inhibe la replicación del ADN, al inhibir la topoisomerasa y la girasa del ADN bacteriano.

2.3 Bacteria

La cepa que se utilizó fue la cepa de referencia, *S. aureus* (ATCC 49476).

2.4 Caracterización fisicoquímica de las AgNPs de Argovit-C™

2.4.1 Dispersión dinámica de luz (DLS)

La determinación del diámetro hidrodinámico de AgNPs y la potencial zeta (ζ) de las AgNPs se realizó utilizando el analizador de potencial Zeta Zetasizer Nano Ns DTS 1060 (Malvern Instruments®, UK). La muestra de AgNPs se colocó en la celda (ZEN0040) en una dilución en agua a una concentración final de 1 $\mu\text{g/mL}$ y se midió a 25 °C.

2.4.2 Espectrofotometría UV-VIS

Los espectros de UV-Visible se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis (JENWAY 6705, Santa Clara, CA), después de colocar una solución de AgNPs (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en agua Milli-Q, en una cubeta de cuarzo óptico de 1 mm de recorrido, empleando un barrido desde 200 hasta 800 nm.

2.4.3 Morfología y tamaño de nanopartículas

Para conocer la morfología y el tamaño de las AgNPs, se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) utilizando un microscopio electrónico JEM 2010 (JEOL, Tokio, Japón). Antes del estudio, la muestra se diluyó 20 veces con agua y además se sonó para disociar los agregados. Las soluciones acuosas obtenidas se colocaron sobre películas de carbono perforadas fijadas sobre rejillas de cobre según procedimientos estándar y, después de secarlas a temperatura ambiente, se introdujeron en la cámara de muestra del microscopio electrónico, empleando un voltaje de aceleración de 200 kV. El análisis de distribución de tamaño se determinó a partir de micrografías TEM utilizando el software Image J.

2.5 Actividad antimicrobiana

2.5.1 Efecto antimicrobiano de perfiles individuales, sinérgico y/o antagonista

Para la evaluación antimicrobiana, se comparó la capacidad bactericida de perfiles individuales por el método de difusión en discos para AgNPs y ciprofloxacino, así como también se realizó la evaluación del efecto sinérgico y/o antagonista de AgNPs-ciprofloxacino, esto se realizó basándose en los criterios y protocolos del Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, por sus siglas en inglés).

Los pasos consistieron en lo siguiente: 1) se estandarizó el inóculo de *S. aureus* a una concentración de 1×10^8 UFC/mL; 2) posteriormente se cultivó por extensión en placa; 3) se colocó un disco de papel filtro Whatman núm. 1 con un diámetro de 6 mm para cada tratamiento y/o evaluación; 4) se depositó 10 μL de los tratamientos: 1. AgNPs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 2. ciprofloxacino (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 3. AgNPs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) +

ciprofloxacino ($250 \mu\text{g}/\text{mL}$), cada tratamiento en placa separada; 5) se incubaron a 37°C por 24 h. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

2.5.2 Postratamiento

Para la evaluación del postratamiento con AgNPs se determinarán dos diferentes concentraciones; 10 y $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ (concentración de plata metálica). A continuación se describen los pasos realizados: 1) se estandarizó el inóculo a la concentración de 1×10^8 UFC/mL en un tubo de ensayo; 2) se sometió al microorganismo a un tratamiento con ciprofloxacino ($250 \mu\text{g}/\text{mL}$), por 15 minutos; 3) posteriormente, se realizó un postratamiento con AgNPs ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$ o $1 \mu\text{g}/\text{mL}$) dejándolo actuar en dos diferentes tiempos: 15 minutos o 1 hora; 4) para determinar el efecto bactericida, se cultivaron las muestras del postratamiento por extensión en placa de agar LB, como se muestra en la Figura 4. Cada experimento se realizó por triplicado.

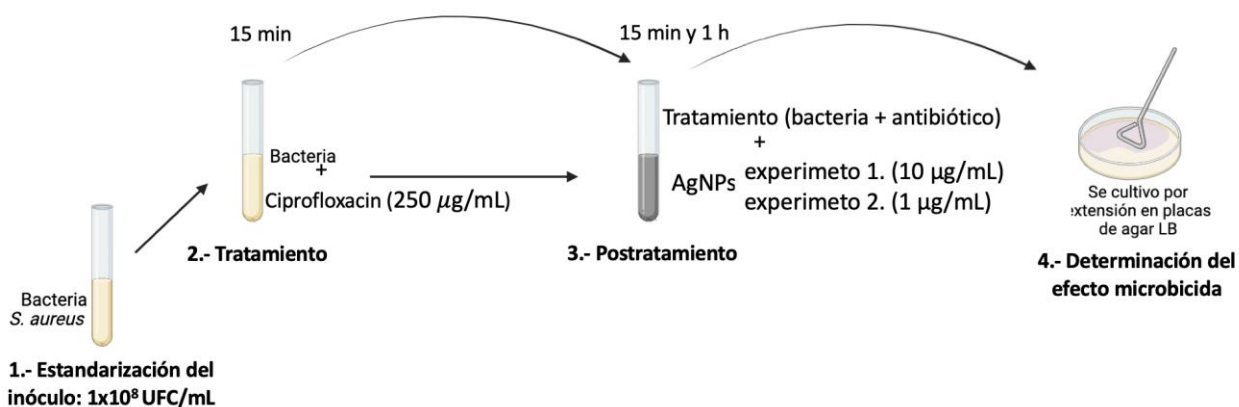


Figura 4. Metodología de postratamiento con AgNPs en dos diferentes concentraciones (10 o $1 \mu\text{g}/\text{mL}$) y dos tiempos de incubación (15 minutos o 1 hora).

En la evaluación del postratamiento se utilizaron dos controles, que consistieron en lo siguiente. Para el control 1 se realizaron los siguientes pasos; 1) se inició estandarizando el inóculo a la concentración de 1×10^8 UFC/mL; 2) el agente del tratamiento se sustituyó por agua mili-Q, dejándolo en contacto con el microorganismo por 15 minutos; 3) posteriormente se realizó un postratamiento con AgNPs ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) dejando actuar por 1 hora; 4) para la determinación del efecto bactericida se cultivó las muestras del postratamiento por extensión en placa de agar LB, como se muestra en la figura 5 a.

Ahora bien, el control 2 se basó en los siguientes pasos; 1) se estandarizó el inóculo a la concentración de 1×10^8 UFC/mL; 2) posteriormente el microorganismo se sometió a un tratamiento con ciprofloxacino (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por 15 minutos; 3) el agente antimicrobiano del postratamiento (AgNPs) se sustituyó por agua mili-Q, dejando actuar por 1 hora; 4) finalmente, para determinar el efecto bactericida se cultivaron las muestras del postratamiento por extensión en placa de agar LB, explicado en la Figura 5 b. Esto con, el propósito de evaluar y analizar si las AgNPs ayudan al antibiótico a tener un mayor efecto microbicida. Cada experimento se realizó por triplicado.

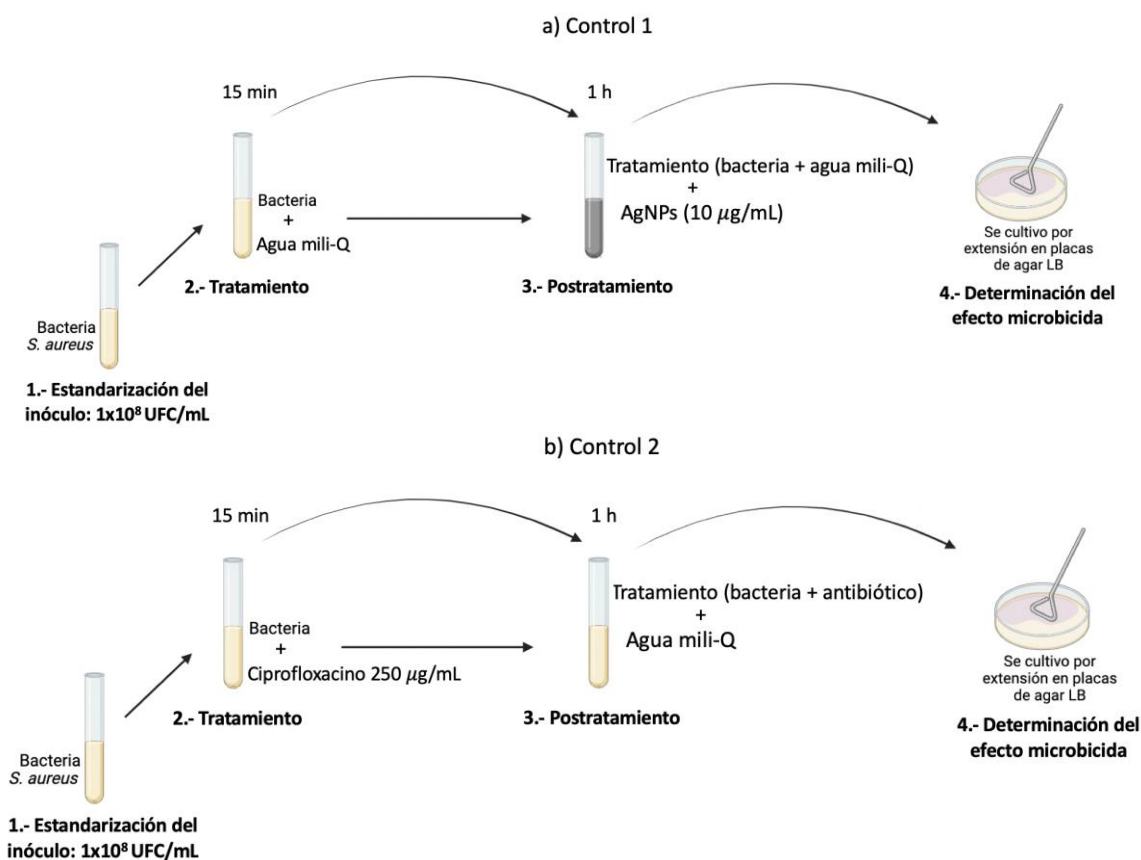


Figura 5. Metodología empleada para los controles del pos-tratamiento con AgNPs.

2.5.3 Estudio de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima biocida

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima biocida (CMB) se basó de acuerdo con los criterios y protocolos del CLSI, iniciando con un inóculo a la concentración de 1×10^6 UFC/mL. Los pasos consistieron en los siguientes: 1) se expuso el inóculo con el tratamiento (AgNPs o ciprofloxacino, de manera individual) en una relación 1:1 en diferentes concentraciones. En el primer

tratamiento (AgNPs) las concentraciones utilizadas fueron de 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.1562 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y para el segundo tratamiento (ciprofloxacino) fue de 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062, 0.0312 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 2) posteriormente se incubó durante 24 h en agitación a 37 °C; 3) transcurridas las 24 h se procedió a sembrar 2.5 μL de cada uno de los tratamientos en agar LB; 4) se incubaron durante 24 h a 37 °C para finalmente de forma visual establecer los valores de la CMI y CMB, como se observa en la Figura 6. Cada experimento se realizó por triplicado.

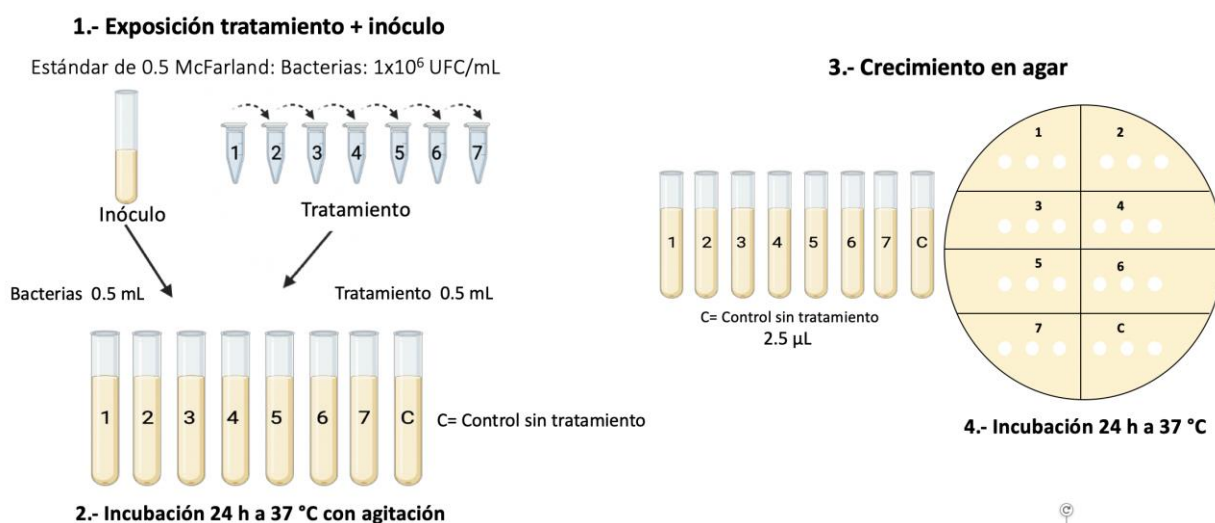


Figura 6. Concentración mínima inhibitoria y mínima biocida para tratamientos individuales.

En la figura 7, se observa la metodología empleada para la determinación de CMI y CMB del postratamiento, en la cual se realizaron modificaciones de la metodología anteriormente descrita. Los pasos para seguir fueron los siguientes: 1) se inició exponiendo a *S. aureus* a un tratamiento con ciprofloxacino (3.962 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 15 minutos, después se realizó el postratamiento que consistió en aplicar AgNPs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 15 minutos; 2) posteriormente se realizó una dilución seriada con medio LB líquido tomando en consideración las dos concentraciones (antibiótico y AgNPs).

Como controles positivos, se utilizó al microorganismo (1×10^6 UFC/mL) en 1 mL de medio LB sin tratamiento, los ensayos fueron incubados a 37 °C por 24 h en agitación; 3) después de las 24 h se sembró 2.5 μL de cada uno de los tratamientos en agar LB; 4) se incubó por 24 h a 37 °C. La CMI se evaluó como la mínima cantidad de tratamiento que es capaz de impedir el crecimiento del microorganismo y la CMB se determinó como la ausencia de crecimiento (99.9%) del microorganismo a las 24 h. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

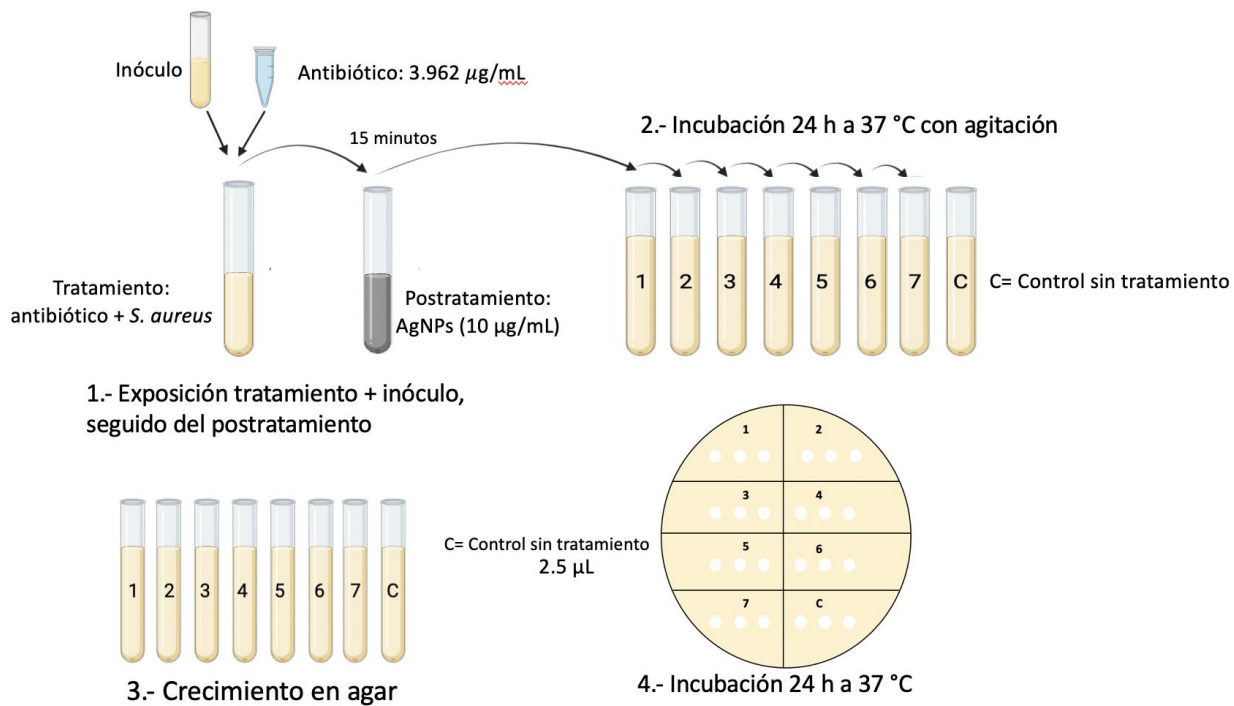


Figura 7. Concentración mínima inhibitoria y mínima biocida para el postratamiento con AgNPs.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Caracterización fisicoquímica de las AgNPs

3.1.1 Análisis por microscopía electrónica de transmisión

La formulación de AgNPs tiene morfología esférica. En la figura 8, se muestran las imágenes TEM y el histograma de la distribución del tamaño de las nanopartículas. El diámetro promedio fue de 13.94 ± 6.35 nm ($n= 111$ partículas), con un rango de distribución de tamaño entre 4 y 30 nm.

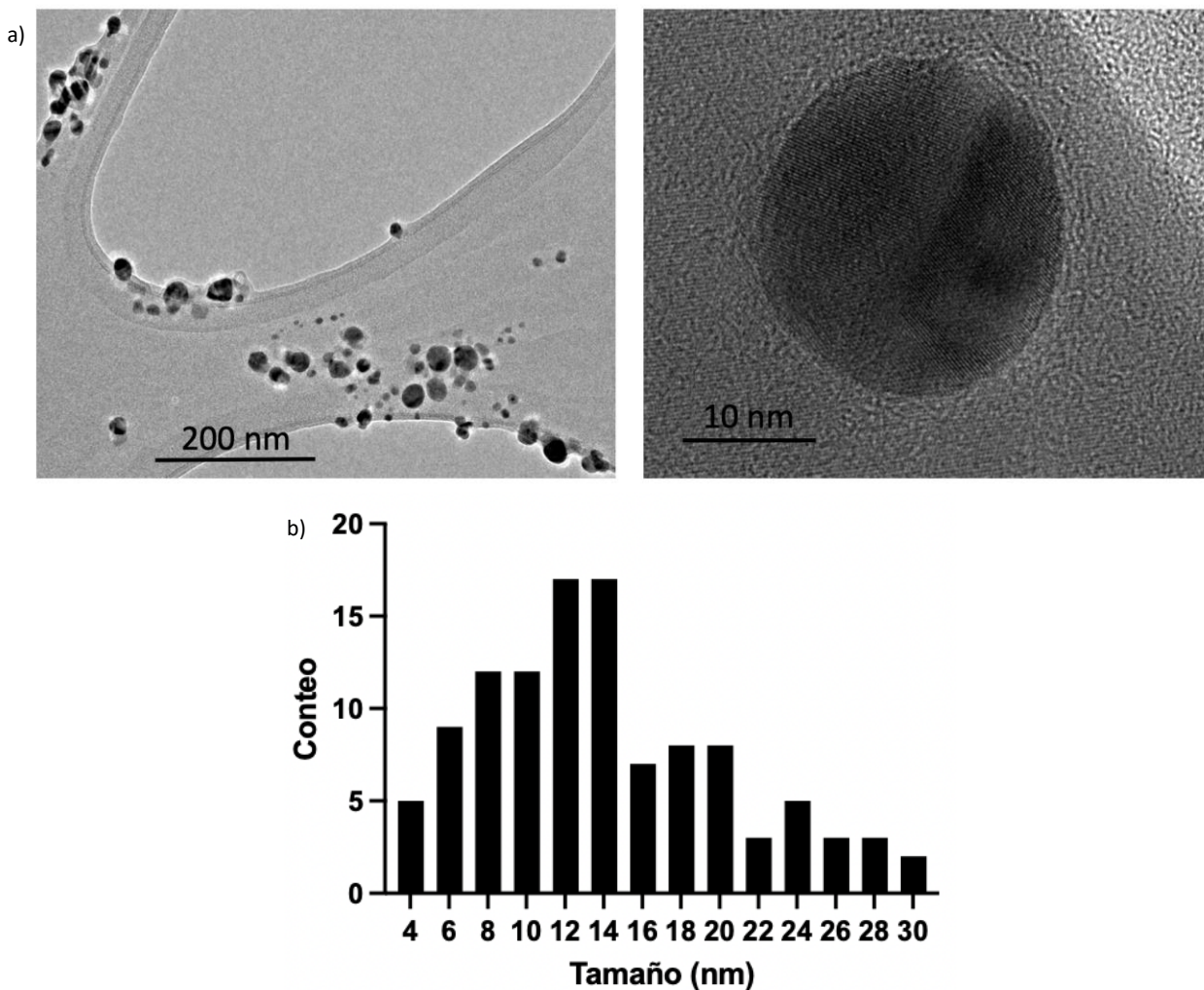


Figura 8. Caracterización de las AgNPs mediante microscopía electrónica de transmisión. (a) imágenes HR-TEM que muestran la morfología de AgNPs. (b) histograma de la distribución del número de partículas por sus tamaños.

3.1.2 Caracterización de las AgNPs por técnicas espectrofotometría de UV-VIS y analizador de DLS

Los resultados del análisis del DLS y los espectros de absorción de UV-Vis se presentan en la Figura 9. La determinación de los espectros de absorción UV-Vis mostró que las AgNPs a la concentración de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, obtuvo un pico de resonancia de plasmón superficial localizado (LSPR, por sus siglas en inglés) a los 442 nm, mientras que la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observó a los 271 nm, el cual se puede observar en la Figura 9 a. No obstante, en el espectro UV-Vis de ciprofloxacino (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), no se observó una banda de absorción, mientras que la combinación AgNPs + ciprofloxacino reveló una banda de absorción a los 579 nm, como se puede ver en la Figura 9 b.

Mientras que, en el análisis del DLS, las AgNPs mostraron un diámetro hidrodinámico con distribución de tamaño de 164 ± 0.5 nm y una potencial zeta de $9.6 \pm 0,6$, el cual se puede observar en la Figura 9 c, d.

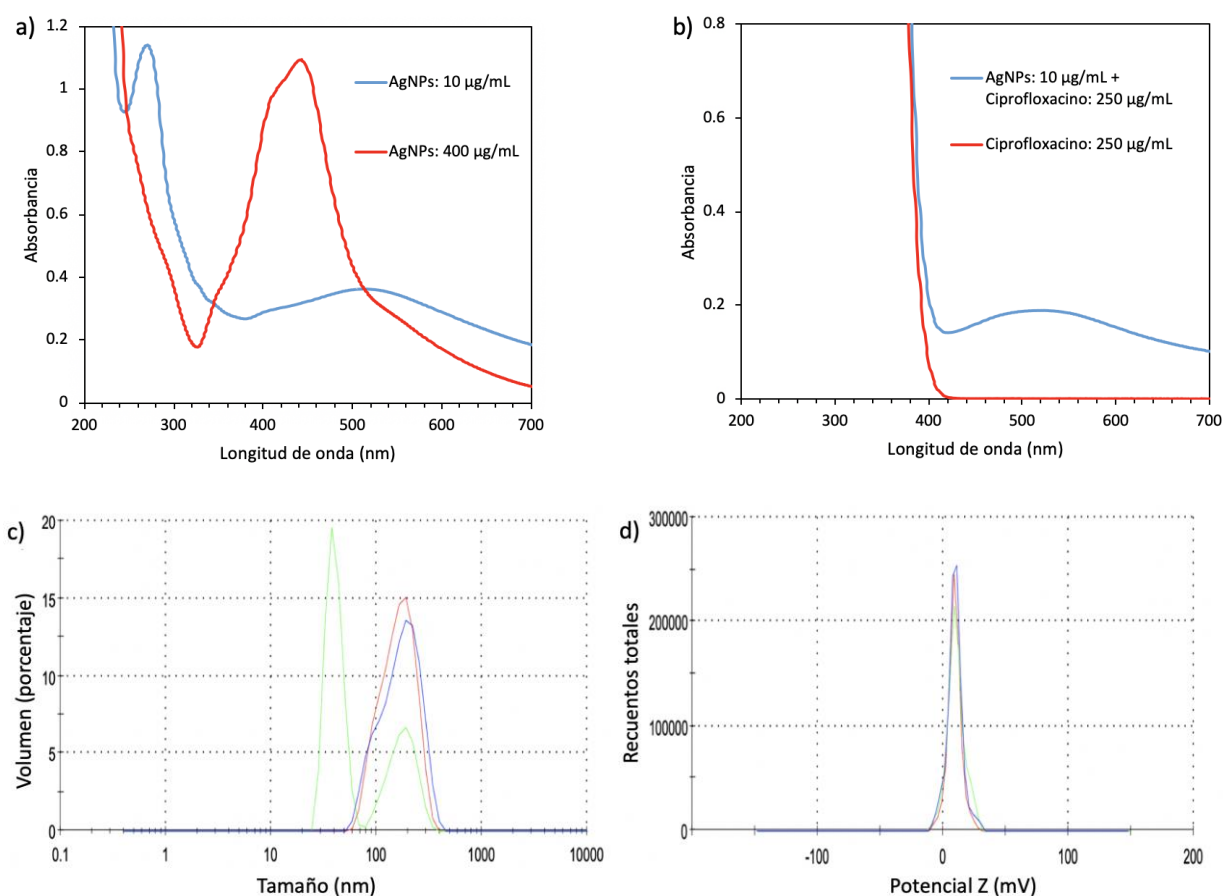


Figura 9. Caracterización de las AgNPs mediante espectrofotometría de UV-VIS y analizador de DLS. (a) espectros de absorción UV-VIS de AgNPs (400, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (b) espectro de absorción UV-VIS de ciprofloxacino (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y AgNPs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) combinado con ciprofloxacino (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (c) diámetro hidrodinámico de AgNPs; (d) potencial Z de las AgNPs.

3.2 Actividad antimicrobiana

Para la determinación del efecto antimicrobiano de perfiles individuales de AgNPs y ciprofloxacino sobre *S. aureus*, se realizó por medio del método de difusión en disco, obteniendo los resultados de susceptibilidad antimicrobiana representados en los halos de inhibición de cada formulación. En el cual se presentan los valores promedio de los diámetros de los halos de inhibición en mm \pm la desviación estándar de las formulaciones.

3.2.1 Efecto antimicrobiano de perfiles individuales, sinérgico y/o antagonista

La Figura 10 muestra los resultados obtenidos de la determinación de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana de los perfiles individuales y del efecto sinérgico y/o antagonista de AgNPs-antibiótico. En la Figura 10 b,c se observa que las AgNPs no formaron un halo de inhibición en concentraciones de 10 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. No obstante, ciprofloxacino (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) formó un halo de inhibición de 19 mm \pm 0.57 (Figura 10 d). Así mismo, la evaluación del efecto sinérgico y/o antagonista de AgNPs-antibiótico dio como resultado un efecto antagónico, ya que este es menor que la suma de los efectos individuales, como se puede observar en la Figura 10 e. Como control positivo se tenía a *S. aureus* en placa con medio LB en su máximo crecimiento de 1×10^8 UFC/mL (Figura 10 a).

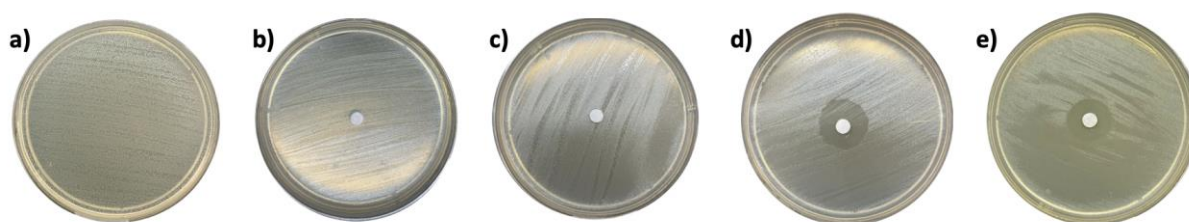


Figura 10. Halos de inhibición de componentes individuales. (a) control del máximo crecimiento en placa de 1×10^8 UFC/mL de *S. aureus*; (b) AgNPs a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (c) AgNPs a la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (d) ciprofloxacino (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (e) tratamiento combinado de AgNPs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + antibiótico (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

3.2.2 Concentración óptima del efecto microbicida

En la evaluación del postratamiento con AgNPs se tomó como referencia la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de acuerdo con lo reportado en el trabajo de Luna et al., 2022, del estudio sistemático de las propiedades hemolíticas, en el cual reveló que se alcanzó el 100 % de hemólisis a la concentración antes mencionada

de AgNPs Argovit-C™. En la evaluación del postratamiento con AgNPs se inició con la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, seguido de eso se bajó la concentración 10 veces (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para comparar el efecto microbicida de ambas concentraciones.

3.2.3 Pos-tratamiento con AgNPs

En la Figura 11, se presentan los resultados del ensayo empleando un postratamiento con AgNPs. La Figura 11 b, muestra la exposición de *S. aureus* al tratamiento con ciprofloxacino (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con un tiempo de exposición de 15 minutos, en el cual no se observó una inhibición significativa, tomando en cuenta que se inició con un inóculo de 1×10^8 UFC/mL, como se muestra en la Figura 11 a. No obstante, cuando el microorganismo es sometido a un postratamiento con AgNP (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con un tiempo de exposición de 15 minutos, se obtiene un efecto microbicida, el cual se puede observar en la Figura 11 c. Sin embargo, con un postratamiento con tiempo prolongado de 1 hora, se obtiene una mayor eficiencia (Figura 11 d), para ambos tiempos se conduce a la muerte del 99.9% de los microorganismos.

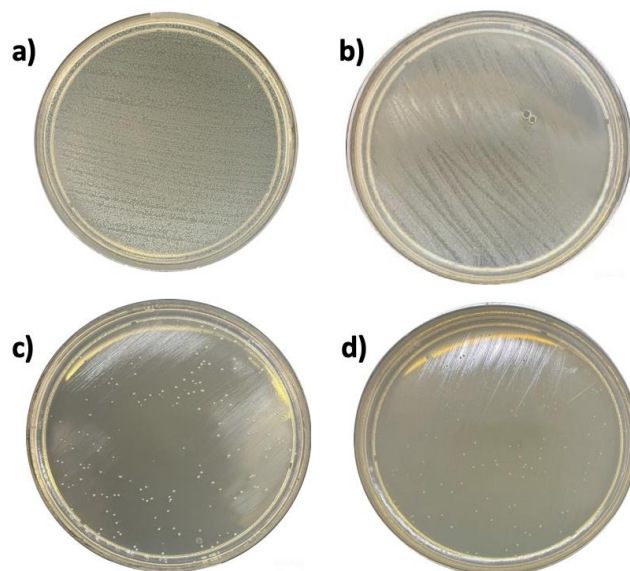


Figura 11. Concentración óptima de efecto microbicida. (a) control del máximo crecimiento en placa de 1×10^8 UFC/mL de *S. aureus*; (b) tratamiento con ciprofloxacino (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (c) postratamiento 15 minutos con AgNPs a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (d) postratamiento de 1 hora con AgNPs a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Por consiguiente, en la Tabla 1, se encuentran los resultados obtenidos de las concentraciones finales en UFC/mL del microorganismo después de ser sometido a un postratamiento con AgNPs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en dos diferentes tiempos. Para el postratamiento de 15 minutos, la concentración final fue 5.82×10^3 UFC/mL,

mientras que con un tiempo de 1 h, la concentración final fue de 1.19×10^3 UFC/mL, el cual se redujo hasta en un 99.9 % para ambos tiempos. Cabe mencionar que la concentración inicial del microorganismo fue de 1×10^8 UFC/mL.

Tabla 1. Determinación de UFC del postratamiento con AgNP ($10 \mu\text{g/mL}$) de 15 minutos y 1 hora.

AgNPs ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo (minutos)	UFC/mL
10	15	5.82×10^3
10	60	1.19×10^3

En la Figura 12, se muestran los resultados del postratamiento con AgNPs al bajar la concentración 10 veces a $1 \mu\text{g/mL}$ y al evaluarlo en tiempos iguales al ensayo anterior, obteniendo lo siguiente: En la Figura 12 c, se observa que con un postratamiento de 15 minutos, se logra conducir la muerte del microorganismo en un 99.2 %. Sin embargo, con un postratamiento de 1 hora se obtiene la muerte del 99.9 % de los microorganismos (Figura 12 d).

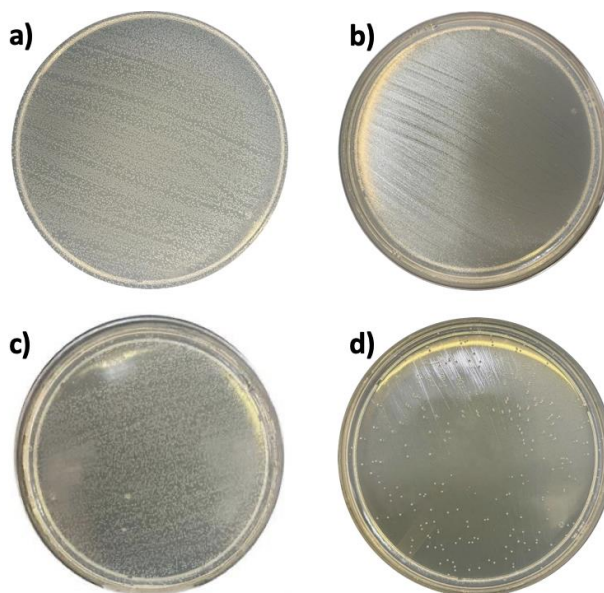


Figura 12. Concentración óptima de efecto microbicida. (a) control del máximo crecimiento en placa de 1×10^8 UFC/mL de *S. aureus*; (b) tratamiento con ciprofloxacino ($250 \mu\text{g/mL}$); (c) postratamiento de 15 minutos con AgNPs a la concentración de $1 \mu\text{g/mL}$; (d) postratamiento de 1 hora con AgNPs a la concentración de $1 \mu\text{g/mL}$.

En la Tabla 2, se presentan las concentraciones finales de *S. aureus* en UFC/mL, después de ser sometido a un postratamiento con AgNPs que se encontraba en una concentración de $1 \mu\text{g/mL}$. El resultado de la

concentración final del postratamiento con un tiempo de 15 minutos fue de 7.636×10^5 UFC/mL. Mientras que, con un postratamiento de 1 hora, se obtuvo una concentración final de 1.95×10^3 UFC/mL. Cabe mencionar que la concentración inicial del microorganismo fue de 1×10^8 UFC/mL.

Tabla 2. Determinación de UFC/mL del postratamiento con AgNPs ($1 \mu\text{g/mL}$) de 15 minutos y 1 hora.

AgNPs ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo (minutos)	UFC/mL
1	15	7.636×10^5
1	60	1.95×10^3

Podemos incluir que se obtuvieron resultados del experimento de halos de inhibición para el postratamiento con AgNPs que se presentan en el **Anexo B**. Estos resultados plantean preguntas interesantes, las cuales se planean profundizar en futuras investigaciones. Por lo tanto, se recomienda una discusión más exhaustiva de este hallazgo en trabajos futuros.

Ahora bien, en la Figura 13, se muestran las concentraciones finales obtenidas de los controles utilizados en el postratamiento, donde se obtuvo que el control 1 en donde se sustituyó el agente del tratamiento (ciprofloxacino) por agua mili-Q dio como resultado una concentración final de 7.93×10^3 UFC/mL, el cual inhibe el 99.8 % (Figura 12 b). En el control 2, en donde se sustituyó el agente del postratamiento (AgNPs) por agua mili-Q, dio como resultado una concentración final 4×10^5 UFC/mL, que inhibe el 90 %, el cual se puede observar en la Figura 12 c.

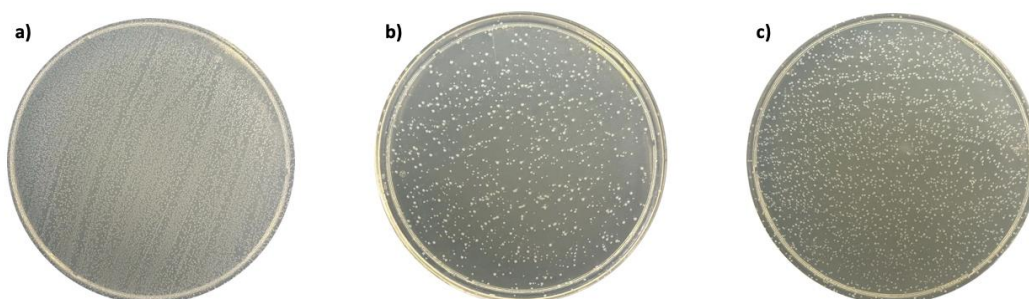


Figura 13. Controles empleados en los ensayos de postratamiento. (a) control del máximo crecimiento en placa de 1×10^8 UFC/mL de *S. aureus*; (b) control 1, sustitución del agente del tratamiento (ciprofloxacino) por agua-miliQ 1; (c) control 2, sustitución del agente del postratamiento (AgNPs) por agua mili-Q.

3.2.4 Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima biocida AgNPs, antibiótico y pos-tratamiento

En la Tabla 3, se presentan las determinaciones de la CMI y CMB para AgNPs, ciprofloxacino y del postratamiento con AgNPs. La CMI para las AgNPs fue de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y CMB de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por otra parte, para ciprofloxacino la CMI fue de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y la CMB de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sin embargo, los resultados de la CMI y CMB del postratamiento disminuyen un orden de magnitud en comparación con las concentraciones determinadas para componentes individuales.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana. Concentración mínima bactericida y concentración mínima inhibitoria de agentes antimicrobianos (AgNPs, ciprofloxacino) y del pos-tratamiento.

Cepa	Agentes antimicrobianos	CMI ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	CMB ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	AgNPs	5	10
	Ciprofloxacino	1	2
	Postratamiento	AgNPs = 2.5 Ciprofloxacino = 0.5	AgNPs = 5 Ciprofloxacino = 1

3.2.5 Comparación del efecto microbicida en medio líquido y semisólido

En la figura 14, se observa la comparativa del efecto microbicida de las AgNPs a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con base en las evaluaciones antimicrobianas realizadas anteriormente. Cuando las AgNPs se emplean en un medio semisólido, no exhibe actividad antimicrobiana, al no formar un halo de inhibición (Figura 14 a). Sin embargo, cuando se emplea un medio líquido, las AgNPs muestran un efecto microbicida al inhibir el 99.8 % del microorganismo (Figura 14 b).

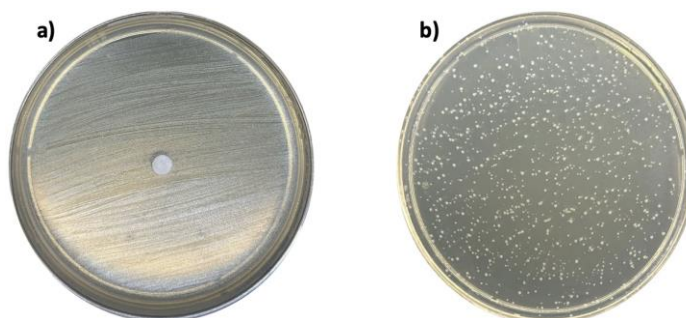


Figura 14. Comparación del efecto microbicida en medio líquido y semisólido. (a) AgNPs empleadas en medio semisólido; (b) AgNPs empleadas en medio líquido.

Capítulo 4. Discusión

La resistencia a los antibióticos hoy en día se ha vuelto un grave problema de salud pública, lo cual dificulta los tratamientos contra las enfermedades infecciosas e incrementa el riesgo de propagación de microorganismos resistentes (Urban et al., 2022). Por lo anterior, se han buscado nuevas alternativas para afrontar este problema, dentro de estas alternativas se encuentra el uso de nanopartículas metálicas por su actividad antimicrobiana. Las AgNPs son uno de los nanomateriales más estudiados entre las diversas nanopartículas metálicas, debido a su capacidad de actuar como agente bactericida (Alotaibi et al., 2022; Campo et al., 2022; Dove et al., 2023).

En la Tabla 4 se muestra una recopilación bibliográfica de los últimos cinco años relacionada con AgNPs sintetizadas por método químico. Se puede observar que la mayoría de estas investigaciones no exhiben una caracterización fisicoquímica completa; esta caracterización es necesaria debido a que las propiedades fisicoquímicas de las NPs podrían tener un impacto significativo en relación con sus propiedades antimicrobianas. De acuerdo con Gouyau et al., 2021, la inducción citotóxica que provocan las AgNPs al microorganismo depende de la dosis, el tamaño y el tiempo en el que estas pueden ingresar a la célula bacteriana e inhibir los sistemas enzimáticos en la cadena respiratoria de las bacterias y, por lo tanto, alterar su síntesis de ADN.

Es por ello por lo que la selección y el uso correcto de las AgNPs dentro de un tratamiento es determinado por sus propiedades fisicoquímicas. Las AgNPs empleadas en este trabajo tienen un tamaño promedio de 14.95 ± 10.1 nm con morfología esférica (Figura 7). De acuerdo con Cheon et al., 2019, las AgNPs con morfología esféricas presentan una mayor actividad antibacteriana, debido a que la actividad antimicrobiana de las AgNPs depende de su morfología, la cual influye en la liberación diferencial de los iones de Ag^+ . El tamaño y la forma de las NPs juega un papel importante en su actividad antibacteriana, ya que las NPs más pequeñas tienen mayor capacidad de atravesar la membrana celular bacteriana (Aflakian et al., 2023; Draviana et al., 2023; Syed et al., 2020).

Por su parte, el análisis del diámetro hidrodinámico mostró una distribución de tamaño de 164 ± 0.5 nm, con una potencial zeta de $9,6 \pm 0,6$ (Figura 8 c, d), este valor indica que las AgNP están dentro del rango de nanopartículas aproximadamente neutras (Haque et al., 2017).

Tabla 4. Algunos artículos de los últimos cinco años sobre el potencial antimicrobiano de las AgNPs

Cepa de <i>S. aureus</i>	Silver (mg/mL)	tamaño promedio (nm)	Potencial Z (mV)	Plasmón (nm)	Diámetro Hidrodinámico (nm)	Estabilizador	Medio de Cultivo	Concentración de inóculo (UFC/mL)	Halo de inhibición (mm)	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)	Ref.
ATCC 49476	12	13.94 ± 6.35	9.6 ± 0,6	442 y 164	44 y 164	PVP	LB	1–1.5×10 ⁸	13 ± 0.8	5	10	Our results
s.d	s.d	38.5	-13.8	410	s.d	PVP	NB	s.d	s. d	s.d	s.d	(Cheon et al., 2019)
ATCC 25923	s.d	5-50	-3.96	400	9.94	Citrato	MH	5×10 ⁴	s.d	s.d	19.88	(Quintero et al., 2019)
UAMS-1	s.d	6.18 ± 5	- 16,2	401	35,18 ± 6,55	PVP	MH	1 × 10 ⁶	s.d	≤ 4	≤ 4	(Vazquez et al., 2019)
ATCC 29213	s.d	12	s.d	391 ± 2	13.6 ± 3.2 nm	Citrato	MH	5×10 ⁵ -5×10 ⁶	s.d	no inhibió	s.d	(Gouyau et al., 2021)
29213	s.d	~5.4	s.d	s.d	s.d	s.d	s.d	1 × 10 ⁶	s.d	s.d	s.d	(Nikolov et al., 2021)
CMCC 26001	50	11.9 ± 3.2	s.d	430	s.d	PVP	LB	1×10 ⁶	13	15	s.d	(Li et al., 2023)

s.d: sin datos

Los resultados del espectro de UV-Vis de las AgNP (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mostraron un pico LSPR a los 442 nm, picos de LSPR característicos que exhiben las AgNPs coloidales en agua desionizada, que varían de 380 a 460 nm, con un diámetro promedio de 100 nm (Alzoubi et al., 2023). No obstante, en la concentración de AgNPs de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el pico LSPR se desplazó hacia la izquierda a los 271 nm (Figura 8a). De acuerdo con Amirjani et al., 2020, la longitud de onda específica a la que las AgNP se someten a LSPR depende significativamente del tamaño y la forma de nanopartícula metálica, así como de la naturaleza de su recubrimiento superficial. Sorprendentemente, las nanopartículas más pequeñas muestran picos LSPR a una longitud <400 nm.

Ahora bien, se deben realizar pruebas de sensibilidad cualitativas o semicuantitativas para determinar la susceptibilidad de un microorganismo frente a medicamentos antimicrobianos (Humphries et al., 2018). Este es un punto clave para lograr interpretar la actividad antimicrobiana y comprender cómo actúa en la célula bacteriana. Cabe mencionar que, el ciprofloxacino inhibe el crecimiento microbiano en un 90% a una concentración de 2 mg/mL (Doble, 2007), sin embargo, esta dosificación provoca efectos secundarios.

De acuerdo con los resultados obtenidos de los perfiles individuales empleados en medio semisólido de LB, se observó que ambas concentraciones de AgNPs (10, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no mostraron un efecto antimicrobiano, sin embargo, empleando concentraciones superiores a 0.6 mg/mL mostró un halo de inhibición de 11 mm (Anexo B). En cambio, cuando las AgNPs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) interactúan con el microorganismo de manera directa en medio LB líquido, muestra un efecto antimicrobiano (Figura 13 b).

Lo anterior, se atribuye a que las AgNPs se encuentran mejor distribuidas permitiendo la interacción total con el microorganismo, caso contrario con el ensayo de sensibilidad, donde se lleva a cabo una interacción delimitada, debido a su poca difusión en el medio (Flanagan & Steck, 2017) I. Por otro lado, ciprofloxacino (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mostró un halo de inhibición de 19 mm \pm 0.57, considerándose un antibiótico con actividad intermedia (Sarker et al., 2014).

De manera independientes, las AgNPs no muestran efecto microbicida y cuando se implementa una conjugación (AgNPs-ciprofloxacino), esta da como resultado un efecto antagónico (Figura 9), contrario a lo reportado en la literatura, donde se menciona un efecto sinérgico (Ghaffar et al., 2024; Naqvi et al., 2013; Abdullah & Alwan, 2017). Sin embargo, al implementar un postratamiento con AgNPs, iniciando con la exposición del microorganismo con ciprofloxacino (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y posteriormente aplicando AgNPs (10, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), dejando un margen de tiempo de 15 minutos para que actúen de manera independiente, se obtiene una mayor eficiencia conduciendo a la muerte del 99% del microorganismo (Figura 10 y 11).

Evidenciando así que las AgNPs pueden ayudar al antibiótico a eludir los mecanismos de resistencia, lo que incrementa la sensibilidad del microorganismo al antibiótico, a una concentración 8 veces menor que la concentración normalmente empleada de ciprofloxacino, reduciendo el riesgo de efectos secundarios que este llega a provocar.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la CMI para las AgNPs fue de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y la CMB de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la CMB coincide con la concentración óptima (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que mostró mejor efecto microbicida implementada en el postratamiento. En la tabla 5, se muestra una revisión bibliográfica de los últimos 6 años de la actividad antimicrobiana de las AgNPs, donde se han reportado una dispersión de los valores de CMB, demostrando que ciertos factores influyen en la capacidad biocida de las AgNPs, tales como el tamaño, forma, recubrimiento, entre otras. Por otra parte, para ciprofloxacino la CMI fue de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y la CMB de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que, de acuerdo con la revisión bibliográfica, la CMI coincide con la reportada por Kashef et al., 2020, de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ frente a la cepa de referencia de *S. aureus* (ATCC 25923).

Tabla 5. Actividad antimicrobiana de AgNPs vs *S. aureus*

AgNPs				
Tamaño (nm)	Forma	Estabilizador	CMB ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Referencias
14.95 \pm 10.1	Esféricas	PVP y colágeno hidrolizado	10	Nuestros resultados
12.9 \pm 4.5	Esféricas	PVP	350	(Kubo et al., 2018)
5-50	Esféricas	Citrato	19.88	(Quintero et al., 2019)
6,18 \pm 5	Esféricas	PVP	\leq 4	(Vazquez et al., 2019)
95.5	Pseudoesférica	Citrato	>10	(Zarei et al., 2021)

Las condiciones de cultivo se basan en los protocolos A07 del CLSI para *S. aureus*: 10^6 células mL^{-1}

Capítulo 5. Conclusiones

Los resultados de este trabajo pueden contribuir con uno de los temas prioritarios por la OMS, ya que las AgNPs Argovit-C mejoran el efecto del antibiótico contra bacterias patógenas, es decir, un uso mucho menor de concentración de antibióticos que pueda evitar la resistencia y los efectos secundarios que producen al implementar las concentraciones normalmente utilizadas en el tratamiento habitual. Además, se propone una nueva estrategia de implementación de un tratamiento posteriori, comenzando por la acción de manera independiente del antibiótico y seguido del esfuerzo conjunto con las AgNPs mediado por el tiempo. Nuestros resultados nos permiten concluir que con la implementación del postratamiento con AgNPs a la concentración de $10 \mu\text{g/mL}$ con un tiempo de 1h, se obtiene una mayor eficiencia conduciendo la muerte del 99.9% de los microorganismos. Por último, resaltamos que la implementación de medios líquidos comparados a los ensayos en medios semisólidos, muestran una mejor interpretación, puesto que no están limitados por el proceso de difusión. Por lo anterior, enfatizamos que cada protocolo debe ser ajustado para obtener un óptimo potencial microbicida de las AgNPs.

Literatura citada

- Abdullah, L. S., & Alwan, M. J. (2017a). Efficiency of silver nanoparticle combined with ciprofloxacin in treatment mastitis induced by *E. coli* O157:H7 isolated from milk of bovine mastitis. *Journal Of Entomology And Zoology Studies*, 5(5), 1895-1902. <https://www.entomoljournal.com/archives/2017/vol5issue5/PartY/5-4-180-773.pdf>
- Aflakian, F., Mirzavi, F., Aiyelabegan, H. T., Soleimani, A., Gholizadeh Navashenaq, J., Karimi-Sani, I., Rafati Zomorodi, A., & Vakili-Ghartavol, R. (2023). Nanoparticles-based therapeutics for the management of bacterial infections: A special emphasis on FDA approved products and clinical trials. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 188, 106–515. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2023.106515>
- Agaba, P., Tumukunde, J., Tindimwebwa, J. V. B., & Kwizera, A. (2017). Nosocomial bacterial infections and their antimicrobial susceptibility patterns among patients in Ugandan intensive care units: A cross sectional study. *BMC Research Notes*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2695-5>
- Almagor, J., Temkin, E., Benenson, I., Fallach, N., & Carmeli, Y. (2018). The impact of antibiotic use on transmission of resistant bacteria in hospitals: Insights from an agent-based model. *PLoS ONE*, 13(5), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197111>
- Alotaibi, A. M., Alsaleh, N. B., Aljasham, A. T., Tawfik, E. A., Almutairi, M. M., Assiri, M. A., Alkholief, M., & Almutairi, M. M. (2022). Silver Nanoparticle-Based Combinations with Antimicrobial Agents against Antimicrobial-Resistant Clinical Isolates. *Antibiotics*, 11(9), 1–17. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091219>
- Alzoubi, F. Y., Ahmad, A. A., Aljarrah, I. A., Migdadi, A. B., & Al-Bataineh, Q. M. (2023). Localize surface plasmon resonance of silver nanoparticles using Mie theory. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 34(32), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10854-023-11304-x>
- Amirjani, A., Firouzi, F., & Haghshenas, D. F. (2020). Predicting the Size of Silver Nanoparticles from Their Optical Properties. *Plasmonics*, 15(4), 1077–1082. <https://doi.org/10.1007/s11468-020-01121-x>
- Autumn S, D., Dzurny, D. I., Dees, W. R., Qin, N., Nunez Rodriguez, C. C., Alt, L. A., Ellward, G. L., Best, J. A., Rudawski, N. G., Fujii, K., & Czyż, D. M. (2023). Silver nanoparticles enhance the efficacy of aminoglycosides against antibiotic-resistant bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1064095>
- Baggio, D., & Ananda-Rajah, M. R. (2021). Fluoroquinolone antibiotics and adverse events. *Australian Prescriber*, 44(5), 161–164. <https://doi.org/10.18773/austprescr.2021.035>
- Birla, S. S., Tiwari, V. V., Gade, A. K., Ingle, A. P., Yadav, A. P., & Rai, M. K. (2009). Fabrication of silver nanoparticles by *Phoma glomerata* and its combined effect against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, 48(2), 173–179. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02510.x>

- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 13, Issue 1, pp. 42–51). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Bogdanchikova, N., Luna Vazquez-Gomez, R., Nefedova, E., Garibo, D., Pestryakov, A., Plotnikov, E., & Shkil, N. N. (2024). Nanoparticles Partially Restore Bacterial Susceptibility to Antibiotics. *Materials*, 17(7), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ma17071629>
- Bruna, T., Maldonado-Bravo, F., Jara, P., & Caro, N. (2021). Silver nanoparticles and their antibacterial applications. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 13, pp. 1–21). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22137202>
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). β -lactams and β -lactamase inhibitors: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(8), 1–23. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>
- Campion, J. J., McNamara, P. J., & Evans, M. E. (2004). Evolution of ciprofloxacin-resistant *Staphylococcus aureus* in in vitro pharmacokinetic environments. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(12), 4733–4744. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.12.4733-4744.2004>
- Campo, B. C., Villamizar, G. R. A., López, J. L. E., González, E. E., Muñoz-Carranza, S., Franco, B., Morales-Espinosa, R., Coria, J. R., Franco, C. R., Hernández, D. M., Lara-Martínez, R., Jiménez-García, L. F., Fernández-Presas, A. M., & García-Contreras, R. (2022). Biologically synthesized silver nanoparticles as potent antibacterial effective against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Letters in Applied Microbiology*, 75(3), 680–688. <https://doi.org/10.1111/lam.13759>
- Castro, G. S., Garcia, G. M. R., Piñon, Z. G., Rojas, L. M., Jarquin, Y. K., Angel, H.-E. M., Fortoul, T. I., Toledano, M. Y., Garcia, I. T., Pestryakov, A., Eliu, C.-R. A., & Bogdanchikova, N. (2019). Toxicity of silver nanoparticles in mouse bone marrow-derived dendritic cells: Implications for phenotype. *Journal of Immunotoxicology*, 16(1), 54–62. <https://doi.org/10.1080/1547691X.2019.1584652>
- Cheon, J. Y., Kim, S. J., Rhee, Y. H., Kwon, O. H., & Park, W. H. (2019). Shape-dependent antimicrobial activities of silver nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 2773–2780. <https://doi.org/10.2147/IJN.S196472>
- Chokshi, A., Sifri, Z., Cennimo, D., & Horng, H. (2019). Global contributors to antibiotic resistance. *Journal of Global Infectious Diseases*, 11(1), 36–42. https://doi.org/10.4103/jgid.jgid_110_18
- Deng, H., McShan, D., Zhang, Y., Sinha, S. S., Arslan, Z., Ray, P. C., & Yu, H. (2016). Mechanistic Study of the Synergistic Antibacterial Activity of Combined Silver Nanoparticles and Common Antibiotics. *Environmental Science and Technology*, 50(16), 8840–8848. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00998>
- Doble, A. (2007). Ciprofloxacin. *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61473-4>
- Draviana, H. T., Fitriannisa, I., Khafid, M., Krisnawati, D. I., Widodo, Lai, C. H., Fan, Y. J., & Kuo, T. R. (2023). Size and charge effects of metal nanoclusters on antibacterial mechanisms. In *Journal of Nanobiotechnology* (Vol. 21, Issue 1, pp. 1–34). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-02208-3>

- Fernandes, E., Martins, V. C., Nóbrega, C., Carvalho, C. M., Cardoso, F. A., Cardoso, S., Dias, J., Deng, D., Kluskens, L. D., Freitas, P. P., & Azeredo, J. (2014). A bacteriophage detection tool for viability assessment of *Salmonella* cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 52, 239–246. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2013.08.053>
- Flanagan, J. N., & Steck, T. R. (2017). The Relationship Between Agar Thickness and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Indian Journal of Microbiology*, 57(4), 503–506. <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0683-z>
- Garibo, R. D., Nefedova, E., Shkil, N. N., Shkil, N. A., Vazquez-Gomez, R. L., Pestryakov, A., & Bogdanchikova, N. (2022). Silver Nanoparticles Targeting the Drug Resistance Problem of *Streptococcus dysgalactiae*: Susceptibility to Antibiotics and Efflux Effect. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ijms23116024>
- Ghaffar, N., Javad, S., Shah, A. A., Ilyas, S., Hashem, A., Avila-Quezada, G. D., Abd Allah, E. F., & Tariq, A. (2024). Restoration of Antibacterial Activity of Inactive Antibiotics via Combined Treatment with AgNPs. *ACS Omega*, 9(12), 13621–13635. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c07000>
- Gouyau, J., Duval, R. E., Boudier, A., & Lamouroux, E. (2021). Investigation of nanoparticle metallic core antibacterial activity: Gold and silver nanoparticles against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms22041905>
- Guerra, J. D., Sandoval, G., Patron, A., Avalos-Borja, M., Pestryakov, A., Garibo, D., Susarrey-Arce, A., & Bogdanchikova, N. (2020). Selective antifungal activity of silver nanoparticles: A comparative study between *Candida tropicalis* and *Saccharomyces boulardii*. *Colloid and Interface Science Communications*, 37, 100–280. <https://doi.org/10.1016/J.COLCOM.2020.100280>
- Haque, M. N., Kwon, S., & Cho, D. (2017). Formation and stability study of silver nano-particles in aqueous and organic medium. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 34(7), 2072–2078. <https://doi.org/10.1007/s11814-017-0096-z>
- Hari, N., Thomas, T. K., & Nair, A. J. (2014). Comparative Study on the Synergistic Action of Differentially Synthesized Silver Nanoparticles with β -Cephem Antibiotics and Chloramphenicol. *Journal of Nanoscience*, 2014, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/201482>
- Holubnycha, V., Husak, Y., Korniienko, V., Bolshanina, S., Tveresovska, O., Myronov, P., Holubnycha, M., Butsyk, A., Borén, T., Banasiuk, R., Ramanavicius, A., & Pogorielov, M. (2024). Antimicrobial Activity of Two Different Types of Silver Nanoparticles against Wide Range of Pathogenic Bacteria. *Nanomaterials*, 14(2), 1–19. <https://doi.org/10.3390/nano14020137>
- Hooper, D. C., & Jacoby, G. A. (2016). Topoisomerase inhibitors: Fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(9), 1–22. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025320>
- Humphries, R. M., Ambler, J., Mitchell, S. L., Castanheira, M., Dingle, T., Hindler, J. A., Koeth, L., & Sei, K. (2018). CLSI methods development and standardization working group best practices for evaluation of antimicrobial susceptibility tests. In *Journal of Clinical Microbiology* (Vol. 56, Issue 4, pp. 1–10). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/JCM.01934-17>

- Jernigan, J. A., Hatfield, K. M., Wolford, H., Nelson, R. E., Olubajo, B., Reddy, S. C., McCarthy, N., Paul, P., McDonald, L. C., Kallen, A., Fiore, A., Craig, M., & Baggs, J. (2020). Multidrug-Resistant Bacterial Infections in U.S. Hospitalized Patients, 2012–2017. *New England Journal of Medicine*, 382(14), 1309–1319. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1914433>
- Kashef, M. T., Saleh, N. M., Assar, N. H., & Ramadan, M. A. (2020). The antimicrobial activity of ciprofloxacin-loaded niosomes against ciprofloxacin-resistant and biofilm-forming staphylococcus aureus. *Infection and Drug Resistance*, 13, 1619–1629. <https://doi.org/10.2147/IDR.S249628>
- Khameneh, B., Iranshahy, M., Soheili, V., & Fazly Bazzaz, B. S. (2019). Review on plant antimicrobials: A mechanistic viewpoint. In *Antimicrobial Resistance and Infection Control* (Vol. 8, Issue 1, pp. 1–28). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0559-6>
- Kubo, A. L., Capjak, I., Vrček, I. V., Bondarenko, O. M., Kurvet, I., Vija, H., Ivask, A., Kasemets, K., & Kahru, A. (2018). Antimicrobial potency of differently coated 10 and 50 nm silver nanoparticles against clinically relevant bacteria Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 170, 401–410. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.06.027>
- Li, H., You, Q., Feng, X., Zheng, C., Zeng, X., & Xu, H. (2023). Effective treatment of Staphylococcus aureus infection with silver nanoparticles and silver ions. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 80, 104–165. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104165>
- Li, W. R., Xie, X. B., Shi, Q. S., Zeng, H. Y., Ou-Yang, Y. S., & Chen, Y. Ben. (2010). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), 1115–1122. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2159-5>
- Łojewska, E., & Sakowicz, T. (2021). An Alternative to Antibiotics: Selected Methods to Combat Zoonotic Foodborne Bacterial Infections. In *Current Microbiology* (Vol. 78, Issue 12, pp. 4037–4049). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02665-9>
- Lok, C. N., Ho, C. M., Chen, R., He, Q. Y., Yu, W. Y., Sun, H., Tam, P. K. H., Chiu, J. F., & Che, C. M. (2006). Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *Journal of Proteome Research*, 5(4), 916–924. <https://doi.org/10.1021/pr0504079>
- Lopez, C. M., Velasco, K. I., Castillo, C., Flores, A., Magaña, M., Martinez, C. G. A., & Martinez, G. F. (2018). In vitro synergism of silver nanoparticles with antibiotics as an alternative treatment in multiresistant uropathogens. *Antibiotics*, 7(2), 1–13. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7020050>
- Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. (2021). Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. In *Pathogens* (Vol. 10, Issue 10, pp. 1–14). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101310>
- Mann, R., Holmes, A., McNeilly, O., Cavaliere, R., Sotiriou, G. A., Rice, S. A., & Gunawan, C. (2021). Evolution of biofilm-forming pathogenic bacteria in the presence of nanoparticles and antibiotic: adaptation phenomena and cross-resistance. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01027-8>

- Manyi Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., & Okoh, A. (2018). Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: Potential public health implications. In *Molecules* (Vol. 23, Issue 4, pp. 1–48). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules23040795>
- Maysaa, E. S. Z., Bastawy, S., & Montasser, K. (2019). Molecular study of resistance of *Staphylococcus aureus* to antiseptic quaternary ammonium compounds. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 17, 94–97. <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2018.11.022>
- Naqvi, S. Z. H., Kiran, U., Ali, M. I., Jamal, A., Hameed, A., Ahmed, S., & Ali, N. (2013). Combined efficacy of biologically synthesized silver nanoparticles and different antibiotics against multidrug-resistant bacteria. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 3187–3195. <https://doi.org/10.2147/IJN.S49284>
- Nefedova, E., Shkil, N. N., Shkil, N. A., Garibo, D., Luna Vazquez-Gomez, R., Pestryakov, A., & Bogdanchikova, N. (2023). Solution of the Drug Resistance Problem of *Escherichia coli* with Silver Nanoparticles: Efflux Effect and Susceptibility to 31 Antibiotics. *Nanomaterials*, 13(6), 1–13. <https://doi.org/10.3390/nano13061088>
- Nefedova, E., Shkil, N., Vazquez-Gomez, R. L., Garibo, D., Pestryakov, A., & Bogdanchikova, N. (2022). AgNPs Targeting the Drug Resistance Problem of *Staphylococcus aureus*: Susceptibility to Antibiotics and Efflux Effect. *Pharmaceutics*, 14(4), 1–14. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040763>
- Nikolov, A. S., Stankova, N. E., Karashanova, D. B., Nedyalkov, N. N., Pavlov, E. L., Koev, K. T., Najdenski, H., Kussovski, V., Avramov, L. A., Ristoscu, C., Badiceanu, M., & Mihailescu, I. N. (2021). Synergistic effect in a two-phase laser procedure for production of silver nanoparticles colloids applicable in ophthalmology. *Optics & Laser Technology*, 138, 106–850. <https://doi.org/10.1016/J.OPTLASTEC.2020.106850>
- Ochoa, M. A. R., Álvarez, S. A. R., Romo, Q. C. R., Barraza, A., Magallón, B. F. J., Chávez, S. A., García, R. J. C., Toledano, M. Y., Bogdanchikova, N., Pestryakov, A., & Mejía, R. C. H. (2019). Silver nanoparticles enhance survival of white spot syndrome virus infected *Penaeus vannamei* shrimps by activation of its immunological system. *Fish & Shellfish Immunology*, 84, 1083–1089. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2018.10.007>
- Prestinaci, F., Pezzotti, P., & Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon. In *Pathogens and Global Health* (Vol. 109, Issue 7, pp. 309–318). Maney Publishing. <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030>
- Qing, Y., Cheng, L., Li, R., Liu, G., Zhang, Y., Tang, X., Wang, J., Liu, H., & Qin, Y. (2018). Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. In *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 13, pp. 3311–3327). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJN.S165125>
- Quintero, Q. C., Acevedo, N., Zapata, G. J., Botero, L. E., Quintero, J., Zárate, T. D., Saldarriaga, J., & Pérez, V. Z. (2019). Optimization of silver nanoparticle synthesis by chemical reduction and evaluation of its antimicrobial and toxic activity. *Biomaterials Research*, 23(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0173-y>
- Ruiz, R. B., Arellano, G. M. E., Radilla, C. P., Salas, V. D. S., Toledano, M. Y., Casillas, F. F., Luna, V.-G. R., Pestryakov, A., García, R. J. C., & Bogdanchikova, N. (2020). Cytokinesis-Block Micronucleus

Assay Using Human Lymphocytes as a Sensitive Tool for Cytotoxicity/Genotoxicity Evaluation of AgNPs. *ACS Omega*, 5(21), 12005–12015. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00149>

Rusu, A., Lungu, I. A., Moldovan, O. L., Tanase, C., & Hancu, G. (2021). Structural characterization of the millennial antibacterial (Fluoro)quinolones—shaping the fifth generation. In *Pharmaceutics* (Vol. 13, Issue 8, pp. 1–37). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081289>

Saad Abdullah, L., & Jwaid Alwan, M. (2017). Efficiency of silver nanoparticle combined with ciprofloxacin in treatment mastitis induced by *E. coli* O157:H7 isolated from milk of bovine mastitis. ~ 1895 ~ *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(5), 1895–1902.

Sachdev, C., Anjankar, A., & Agrawal, J. (2022). Self-Medication With Antibiotics: An Element Increasing Resistance. *Cureus*, 1–8. <https://doi.org/10.7759/cureus.30844>

Samia, N. I., Robicsek, A., Heesterbeek, H., & Peterson, L. R. (2022). Methicillin-resistant staphylococcus aureus nosocomial infection has a distinct epidemiological position and acts as a marker for overall hospital-acquired infection trends. *Scientific Reports*, 12(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21300-6>

Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. In *BioMed Research International* (Vol. 2016, pp. 1–9). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>

Sarker, M. M. R., Islam, K. N., Huri, H. Z., Rahman, M., Imam, H., Hosen, M. B., Mohammad, N., & Sarker, M. Z. I. (2014). Studies of the impact of occupational exposure of pharmaceutical workers on the development of antimicrobial drug resistance. *Journal of Occupational Health*, 56(4), 260–270. <https://doi.org/10.1539/joh.14-0012-OA>

Slaninová, J., Mlsová, V., Kroupová, H., Alán, L., Tůmová, T., Monincová, L., Borovičková, L., Fučík, V., & Čeřovský, V. (2012). Toxicity study of antimicrobial peptides from wild bee venom and their analogs toward mammalian normal and cancer cells. *Peptides*, 33(1), 18–26. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2011.11.002>

Stephano, H. J. L., Torres, G. O., Toledano, M. Y., Gradilla, M. I., Pestryakov, A., Sánchez, G. A., García, R. J. C., & Bogdanchikova, N. (2020). Argovit™ silver nanoparticles to fight Huanglongbing disease in Mexican limes (: *Citrus aurantifolia* Swingle). *RSC Advances*, 10(11), 6146–6155. <https://doi.org/10.1039/c9ra09018e>

Suksatan, W., Jasim, S. A., Widjaja, G., Jalil, A. T., Chupradit, S., Ansari, M. J., Mustafa, Y. F., Hammoodi, H. A., & Mohammadi, M. J. (2022). Assessment effects and risk of nosocomial infection and needle sticks injuries among patents and health care worker. *Toxicology Reports*, 9, 284–292. <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2022.02.013>

Syed, A. A., Sachi Das, S., Khatoon, A., Tahir Ansari, M., Afzal, M., Saquib Hasnain, M., & Kumar Nayak, A. (2020). Bactericidal activity of silver nanoparticles: A mechanistic review. *Materials Science for Energy Technologies*, 3, 756–769. <https://doi.org/10.1016/J.MSET.2020.09.002>

Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199–1218. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2010.02.003>

- Uddin, T. M., Chakraborty, A. J., Khusro, A., Zidan, B. R. M., Mitra, S., Emran, T. Bin, Dhama, K., Ripon, M. K. H., Gajdács, M., Sahibzada, M. U. K., Hossain, M. J., & Koirala, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health*, 14(12), 1750–1766. <https://doi.org/10.1016/J.JIPH.2021.10.020>
- Urban, C. R., Marek, A., Stępień, P. D., Wieczorek, K., Dec, M., Nowaczek, A., & Osek, J. (2022). Antibiotic Resistance in Bacteria—A Review. In *Antibiotics* (Vol. 11, Issue 8, pp. 1–40). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081079>
- Valenzuela, S. L. M., Blanco, S. A., Perrusquía, H. J. D., Nequiz, A. M., Mier, M. P. A., Ruiz, R. B., Campos, G. V., Arellano, G. M. E., García, R. J. C., Pestryakov, A., Villarreal, G. L. J., Toledano, M. Y., & Bogdanchikova, N. (2021). New protein-coated silver nanoparticles: Characterization, antitumor and amoebicidal activity, antiproliferative selectivity, genotoxicity, and biocompatibility evaluation. *Pharmaceutics*, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010065>
- Van Dong, P., Ha, C. H., Binh, L. T., & Kasbohm, J. (2012). Chemical synthesis and antibacterial activity of novel-shaped silver nanoparticles. *International Nano Letters*, 2(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/2228-5326-2-9>
- Varela, M. F., Stephen, J., Lekshmi, M., Ojha, M., Wenzel, N., Sanford, L. M., Hernandez, A. J., Parvathi, A., & Kumar, S. H. (2021). Bacterial resistance to antimicrobial agents. In *Antibiotics* (Vol. 10, Issue 5, pp. 1–22). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050593>
- Vazquez, M. R., Arellano, J. M. J., Lopez, F. D., & Lopez, R. J. L. (2019). Protocol optimization for a fast, simple and economical chemical reduction synthesis of antimicrobial silver nanoparticles in non-specialized facilities. *BMC Research Notes*, 12(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4813-z>
- Vazquez, M. R., Meza Villezcas, A., Fournier, P. G. J., Soria Castro, E., Juarez Moreno, K., Gallego Hernández, A. L., Bogdanchikova, N., Vazquez-Duhalt, R., & Huerta-Saquero, A. (2019). Enhancement of antibiotics antimicrobial activity due to the silver nanoparticles impact on the cell membrane. *PLoS ONE*, 14(11), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224904>
- Velazquez, M. M. E., Galarde, L. M., Carrillo, Q. B., & Alpuche, A. C. M. (2022). Antimicrobial resistance: One Health approach. In *Veterinary World* (Vol. 15, Issue 3, pp. 743–749). Veterinary World. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.743-749>
- Vestergaard, M., Frees, D., & Ingmer, H. (2019). Antibiotic Resistance and the MRSA Problem. *Microbiology Spectrum*, 7(2), 1–23. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0057-2018>
- Watkins, R. R., & Bonomo, R. A. (2016). Overview: Global and Local Impact of Antibiotic Resistance. In *Infectious Disease Clinics of North America* (Vol. 30, Issue 2, pp. 313–322). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.001>
- World Health Organization: WHO. (2023, 21 noviembre). *Antimicrobial resistance*. Recuperado el día 08 de abril del 2024, de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

- Xu, H., Qu, F., Xu, H., Lai, W., Wang, Y. A., Aguilar, Z. P., & Wei, H. (2012). Role of reactive oxygen species in the antibacterial mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli* O157:H7. *BioMetals*, 25(1), 45–53. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9482-x>
- Zarei, M., Karimi, E., Oskoueian, E., Es-Haghi, A., & Yazdi, M. E. T. (2021). Comparative Study on the Biological Effects of Sodium Citrate-Based and Apigenin-Based Synthesized Silver Nanoparticles. *Nutrition and Cancer*, 73(8), 1511–1519. <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1801780>
- Zhang, C., Sun, L., Wang, D., Li, Y., Zhang, L., Wang, L., & Peng, J. (2022). Advances in antimicrobial resistance testing. *Advances in Clinical Chemistry*, 111, 1–68. <https://doi.org/10.1016/BS.ACC.2022.07.001>
- Zhao, R., Feng, J., Liu, J., Fu, W., Li, X., & Li, B. (2019). Deciphering of microbial community and antibiotic resistance genes in activated sludge reactors under high selective pressure of different antibiotics. *Water Research*, 151, 388–402. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.034>

Anexos

A: Halo de inhibición de AgNPs



Figura 15. Halos de inhibición de AgNPs a la concentración de 6 mg/mL

Anexo B: Halo de inhibición de postratamiento con AgNPs

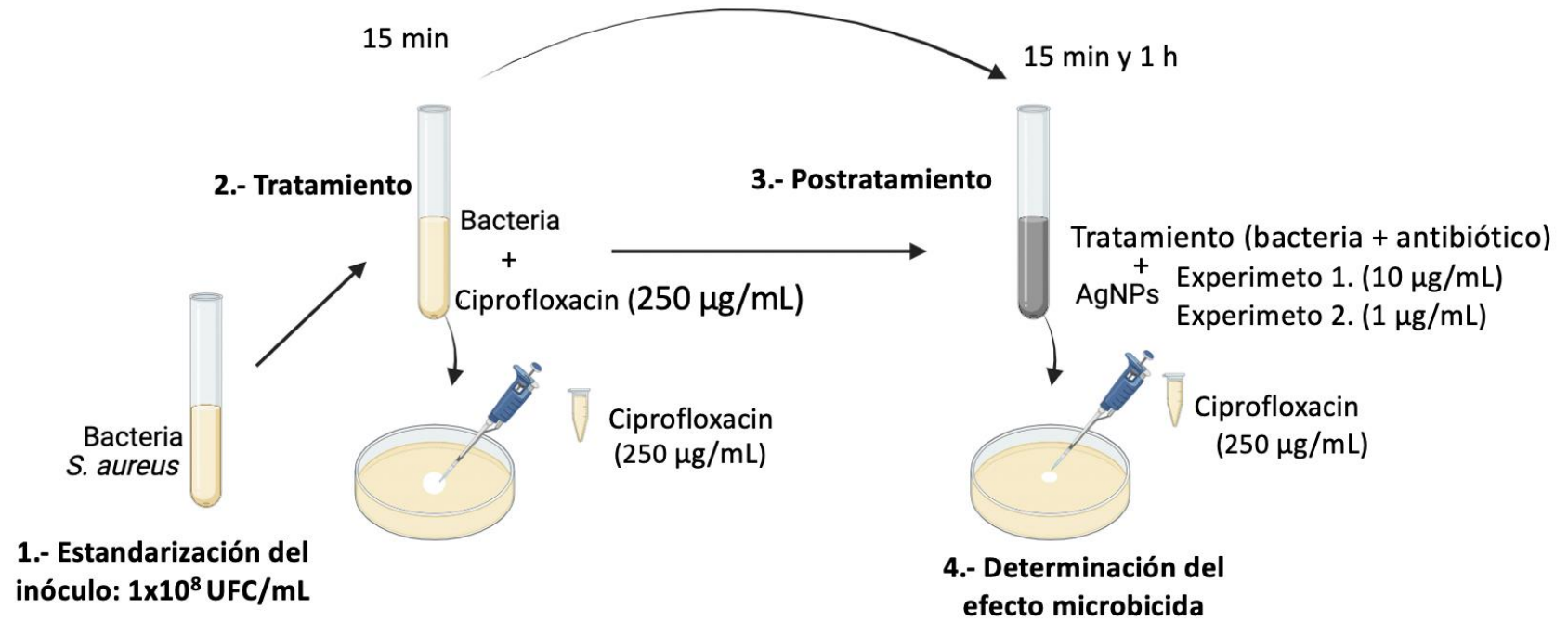


Figura 16. Metodología empleada para halos de inhibición del postratamiento con AgNPs

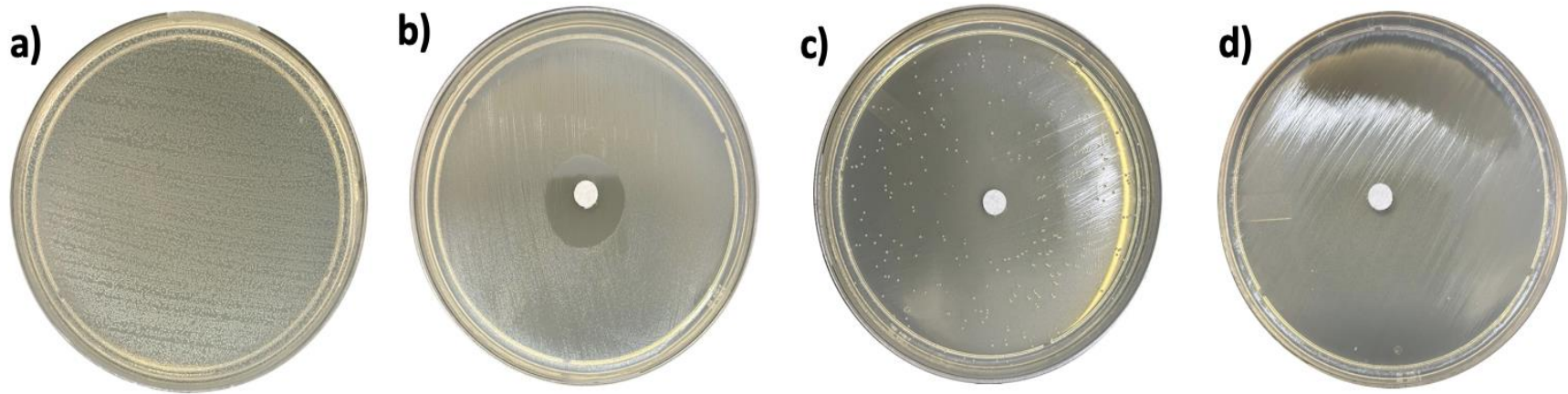


Figura 17. Halos de inhibición de la concentración óptima de efecto microbicida del postratamiento con AgNPs. (a) Control del máximo crecimiento en placa de 1×10^8 UFC/mL de *S. aureus*; (b) tratamiento con ciprofloxacino ($250 \mu\text{g/mL}$), cargando el discon con antibiótico a la concentración de $250 \mu\text{g/mL}$; (c) postratamiento de 15 minutos con AgNPs a la concentración de $10 \mu\text{g/mL}$, cargando el discon con antibiótico a la concentración de $250 \mu\text{g/mL}$; (d) postratamiento de 1 hora con AgNPs a la concentración de $10 \mu\text{g/mL}$, cargando el discon con antibiótico a la concentración de $250 \mu\text{g/mL}$.

Tabla 6. Halos de inhibición de la concentración óptima de efecto microbicida del postratamiento con AgNPs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Agente antimicrobiano ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Tiempo (minutos)	Halo de inhibición (mm)
Tratamiento (ciprofloxacino): 250	15	21 mm \pm 0.57
Postratamiento (AgNPs): 10	15	30 mm \pm 1.15
Postratamiento (AgNPs): 10	60	--

Tabla 7. Halos de inhibición de la concentración óptima de efecto microbicida del postratamiento con AgNPs (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Agente antimicrobiano ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Tiempo (minutos)	Halo de inhibición (mm)
Tratamiento (ciprofloxacino): 250	15	28 mm \pm 1.52
Postratamiento (AgNPs): 1	15	24 mm \pm 0.57
Postratamiento (AgNPs): 1	60	--

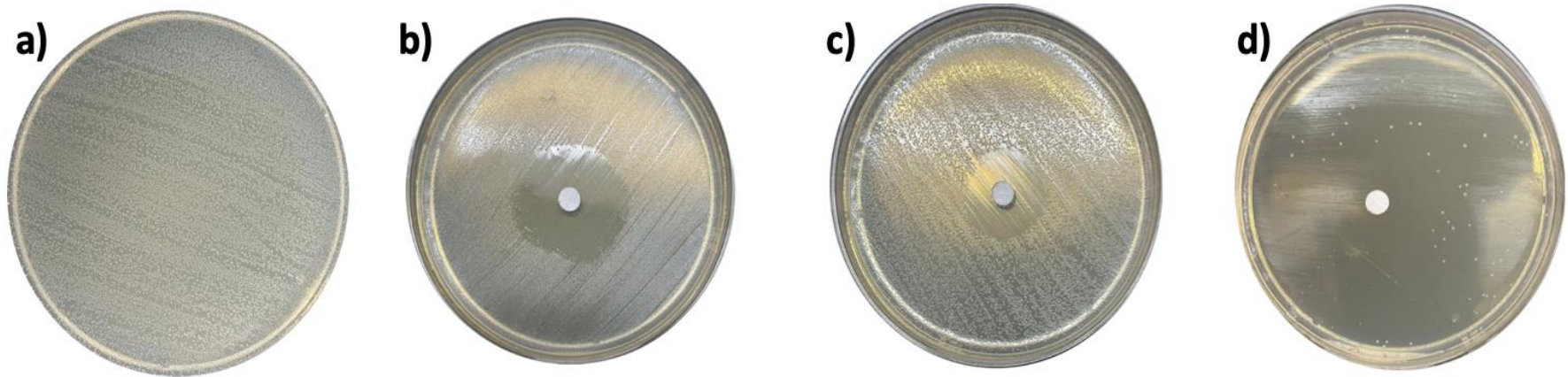


Figura 18. Halos de inhibición de la concentración óptima de efecto microbicida del postratamiento con AgNPs. (a) control del máximo crecimiento en placa de 1×10^8 UFC/mL de *S. aureus*; (b) tratamiento con ciprofloxacino ($250 \mu\text{g/mL}$), cargando el discon con antibiótico a la concentración de $250 \mu\text{g/mL}$; (c) postratamiento de 15 minutos con AgNPs a la concentración de $1 \mu\text{g/mL}$, cargando el discon con antibiótico a la concentración de $250 \mu\text{g/mL}$; (d) postratamiento de 1 hora con AgNPs a la concentración de $1 \mu\text{g/mL}$, cargando el discon con antibiótico a la concentración de $250 \mu\text{g/mL}$.