

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco

División: Ciencias Biológicas y de la Salud

Licenciatura: Química Farmacéutica Biológica

“Efecto de nanopartículas de plata sobre la formación de biofilms bacterianos de especies de *Staphylococcus spp.*”

Flora Deylhi Onofre Bautista

Matricula: 2133063084

Asesores:

Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez No. Económico 8758

M. en C. Samuel González García No. Económico 40142

Lugar de realización: Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular

G-004, Departamento de Atención a la Salud.

Índice

Introducción.....	2
Antecedentes.....	2
Nanotecnología.....	2
Nanopartículas de plata.....	3
Biofilms bacterianos.....	3
Estafilococos.....	5
Objetivo general.....	6
Objetivos específicos.....	6
Material y métodos.....	6
Caracterización de Nanopartículas de plata.....	7
Mocroscopía electrónica de barrido (SEM).....	7
Actividad antibacterial <i>in vitro</i> de las AgNPs.....	7
Prueba de formación de biofilms	8
Resultados y discusión.....	9
Caracterización de Nanopartículas de plata.....	9
Mocroscopía electrónica de barrido (SEM).....	12
Actividad antibacterial <i>in vitro</i> de las AgNPs.....	13
Prueba de formación de biofilms.....	14
Conclusión.....	16
Referencia.....	17

Efecto de nanopartículas de plata sobre la formación de biofilms bacterianos de especies de *Staphylococcus*.

Introducción

En los últimos años, las aplicaciones de las nanopartículas (NPs) se han expandido considerablemente en diversos campos de investigación, debido a sus propiedades medicinales; particularmente las nanopartículas de plata (AgNPs) han atraído mucha atención en el campo científico, ya que son un agente antimicrobiano aplicado en diversos productos por su alta toxicidad para bacterias y otros microorganismos (Dorobantu et al., 2015; Duran et al., 2016). Además, el desarrollo de estas NPs es un área de evolución de la nanotecnología para su posible aplicación en el manejo de infecciones microbianas.

En recientes investigaciones, se descubrió que las AgNPs impiden la producción de factores de virulencia y el desarrollo de biofilm en diferentes bacterias patógenas (Martínez-Gutiérrez et al., 2013; Sahal et al. 2015; Palanisamy et al. 2014). Por lo que a partir de AgNPs sintetizadas se observará el efecto en la producción de biofilms bacterianas en especies de *Staphylococcus*.

Antecedentes

Nanotecnología

La nanotecnología es una ciencia multidisciplinaria relacionada con la química, la bioquímica, la física y la ciencia de los nanomateriales. En diversas investigaciones se ha encontrado un amplio uso para aplicaciones en la medicina (Chen H, et. al., 2013).

Para considerarse nanopartículas estas deben tener un tamaño de hasta 100 nm para la Food and Drug Administration (FDA) y hasta 200 nm para la EMEA, los nanomateriales exhiben propiedades basadas en sus características específicas como tamaño, distribución y morfología, a medida que aumenta la superficie de contacto de las nanopartículas, aumenta también su efectividad biológica (Satyavaani K, et. al., 2011).

Nanopartículas de plata

La nanotecnología es uno de los campos más prometedores, generando diversos tipos y materiales para su aplicación en la biotecnología y nanotecnología. Entre los distintos tipos de nanomateriales se encuentra las nanopartículas de plata (AgNPs), siendo estas las más utilizadas debido a las propiedades físicas y químicas que posee la plata, así como su conductividad, estabilidad química, catalítica y por su actividad antibacterial (Gurunathan S, et al., 2015).

Diversos estudios han demostrado que las nanopartículas inhiben el crecimiento y la actividad de diversos microorganismos, incluyendo bacterias, levaduras, hongos y virus, también de presentar efecto antiinflamatorio (Kalishwaralal K, et. al., 2010). Los mecanismos de toxicidad de las AgNPs dependen de la generan radicales libres tóxicos para la bacteria. Estudios han reportado que la disolución lenta de Ag^+ en condiciones estables, aumenta la toxicidad a través del tiempo, y el Ag^+ es más toxico en la bacteria que las AgNPs (Thumtimdang P, et. al., 2017).

Recientemente la síntesis de AgNPs tiene un alto potencial para las aplicaciones en biomedicina por su biocompatibilidad, estabilidad, su alta solubilidad y su alto rendimiento sin agregación. Además, los nanomateriales y los métodos que se emplean son simples, no son tóxicos y son amigables con el medio ambiente (Takkar K, et al., 2010). Existen varios métodos para la síntesis de AgNPs, sin embargo, los más utilizados son los métodos químicos, en los cuales se utilizan un agente reductor que ayuda a reducir Ag^+ a Ag^0 , y un estabilizador, para controlar el tamaño de partícula y evitar la agregación.

Biofilms bacterianos

Los biofilms o biopelículas son comunidades microbianas individuales o multiespecíficas encerradas en una matriz que se forma en cualquier superficie. La matriz de los biofilms es el adhesivo que mantiene unidas a las células, esta está compuesta por proteínas estructurales y polisacáridos, además de contener DNA extracelular (Soll D, et. al., 2016).

Los microorganismos han desarrollado diversas estrategias para adherirse entre sí y a las superficies, como la producción de fibras amiloides, proteínas adhesinas y polisacáridos, así como mecanismos para modular la producción de matriz de biofilms o interacciones como respuesta a las señales ambientales como el oxígeno o calcio (Visick K, et. al., 2016).

Los biofilms juegan un papel positivo importante en una gran variedad de ecosistemas, sin embargo, también poseen muchos efectos negativos, ya que se relacionan con algunas infecciones. Los biofilms bacterianos representan una antigua estrategia de supervivencia procariótica, debido a que les proporcionan protección frente a humedad, temperatura y pH, además de que facilita la concentración de nutrientes y la eliminación de desechos (Lebeaux D, 2014; Donlan R, 2002).

La composición y la estructura física de los biofilms reflejan varias interacciones complejas que tienen lugar en sus componentes y su entorno como la cohesión celular, intercambio de gases, resistencia a fármacos, defensa de leucocitos y el mantenimiento y rigidez del propio biofilm. También se ha demostrado que los biofilms bacterianos facilitan procesos de intercambio de genes por conjugación, además de permitir la liberación de células o fragmentos del biofilm para su dispersión (Visick K, et. al., 2016; Soll D, et. al., 2016).

La capacidad de formar biofilms no parece restringirse a ningún grupo específico de microorganismos y, en la actualidad, se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas la mayoría de las bacterias, independiente de la especie, puede existir dentro de biofilms adheridos a superficies en una interfase sólido/líquida, incluyendo organismos importantes en algunas enfermedades, tales como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella ssp.* y *Staphylococcus aureus* entre otros (Donlan R, 2002; Davies J, 2001).

El mecanismo de formación del biofilm se debe principalmente a un polisacárido intracelular (PIA), que es un polisacárido específico en el glucocálix compuesto de

residuos de β -1,6-N-acetilglucosamina (80-85%) y no-N-acetilado de residuos de D-glucosaminil que son una fracción aniónica y contienen fosfato y éster-enlazados a succinato (15-20%). Aunque la PIA es un mecanismo principal de formación de biofilm en *S. aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, las proteínas de superficie son el otro mecanismo alternativo de formación de biofilm. La matriz extracelular tiene grandes canales llenos de agua, se acumulan por la degradación antibiótica de las enzimas como β -lactamasas, y juega un papel en los mecanismos de resistencia adaptativa debido al DNA constituyente (Davis J, 2001).

Estafilococos

Los estafilococos son cocos catalasa positivos. El género posee aproximadamente 35 especies. Forman parte de la familia Bacillaceae y están presentes en la mucosa y en la piel de humanos y otros animales (Archer G, 2000).

Las especies de estafilococos están presentes en alrededor del 90 % de la población humana. El género estafilococos es compuesto por diversas especies y subespecies, se agrupa generalmente en dos: coagulasa positivo y coagulasa negativos. Los coagulasa negativo está constituido por varias especies de estafilococos que afectan diversos rangos de huéspedes, algunos de ellos causan mastitis en animales de granja, mientras algunas especies colonizan heridas o infecciones en personas inmunocomprometida. En el grupo de estafilococos de coagulasa positivo las tres especies patógenas principales son *S. aureus*, *S. intermedius* y *S. hyicus*. Estas tres especies son el principal agente patógeno que causa mastitis, tienen la capacidad de transferencia entre humanos y ganado, en humanos causan infecciones leves en la piel y enfermedades graves como neumonía y septicemia (Beyene T, et. al., 2017; Ao W, et. al. 2017; Kastman E, et. al., 2016).

Objetivo general

Estudiar el efecto de nanopartículas de plata sobre la formación de biofilms bacterianas.

Objetivos específicos

1. Sintetizar nanopartículas de plata, (AgNPs).
2. Caracterización de las nanopartículas de plata.
3. Determinar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata.
4. Evaluar el efecto de las nanopartículas de plata sobre la formación de biofilms, de *Staphylococcus spp.*

Material y métodos

Síntesis de AgNPs

Se realizó la síntesis de AgNPs, mediante la reducción de 100ml de nitrato de plata (AgNO_3 usando las concentraciones de 10, 25, 50 y 100 ppm) con 25 ml de borohidruro de sodio (NaBH_4) 10 mM en alcohol polivinílico (PVA) al 0.06% (Choi et. al., 2008).

Se preparó una disolución acuosa de AgNO_3 (0.10 nM, 25 mL), citrato de sodio (30 nM, 1.5 ml), PVA (0.70 nM, 1.5 mL), H_2O_2 (30 %, 60 μL) se mezcló en un y se agitó vigorosamente en un baño de agua a 25 °C. Después de 5 min, se agregó una disolución de NaBH_4 (100 nM, 500 μL) para generar un coloide de color amarillo pálido. Después de unos minutos, el coloide se obscureció, indicando la formación de las nanopartículas de plata; dependiendo de la concentración de NaBH_4 usado en el experimento, el color final de la solución en dispersión coloidal tuvo un intervalo de coloración de morado-turquesa (0.30-0.80 nM NaBH_4) el cual indicó la formación de nanoprismas de Ag (AgNPs). La concentración de BSA y los sitios marcados se mantuvo a 1.0 μM de AgNPs.

Caracterización de Nanopartículas de Plata

Análisis de Espectro Ultravioleta-Visible (UV-Visible)

Para determinar la formación de las AgNPs, se preparó una dilución 1:10, de la disolución de AgNPs, de la cual, 3 mL se llevaron a 100 mL con agua destilada. Se utilizaron soluciones de referencia del precursor de AgNO₃ y agua destilada como blanco. Se obtuvo un barrido espectrofotométrico de la suspensión de las AgNPs a una longitud de onda que va de 200 nm a 800 nm en un espectrofotómetro marca Beckman Coulter DU730.

Análisis de distribución de tamaño de partícula por dispersión laser

El tamaño de las partículas se determinó en una dispersión acuosa de las AgNPs en un Analizador de tamaño de partícula Marca Partica, Modelo LA-950V2. Se obtuvo un histograma que proporcione el promedio del tamaño de partícula de las AgNPs.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para determinar la superficie morfológica de las AgNPs se realizó SEM en un equipo marca Jeol modelo 6000J. Se utilizó una muestra en seco de AgNPs y se obtuvo una imagen tridimensional.

Actividad antibacterial *in vitro* de las AgNPs

Para el desarrollo de la prueba fueron utilizadas las siguientes cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35985), *Shigella flexneri* (ATCC 9199), *Escherichia coli* (ATCC 10586), *Candida albicans* (ATCC 10231) y *Vibrio fluviales* (ATCC 33309).

Se realizó la prueba de susceptibilidad por el método Kirby-Bauer de difusión en disco de papel filtro Whatman (7mm), de acuerdo con el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). Se preparó un inóculo de las cepas ajustando a una concentración de 0.5 McFarland (1×10^8 UFC mL⁻¹) utilizando un equipo Densimat (Biomérieux), y se sembró estriando toda la superficie de las placas con medio agar Muller-Hinton. Se prepararon las dispersiones coloidales de AgNPs de

las concentraciones que se probaron y se colocaron discos de 0.7 mm de diámetro de papel filtro previamente impregnados con la suspensión de cada concentraciones de AgNPs sintetizadas, así como los discos para la disolución de referencia de AgNO₃ a las mismas concentraciones. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 h. Se determinó el diámetro del halo de inhibición, que fue proporcional a la sensibilidad de la bacteria estudiada.

Prueba de formación de Biofilm

Para probar los aislamientos para la formación de biofilm, se realizó un ensayo de adherencia cuantitativa. Se utilizó el método de Schiwon y col. 2013.

Se utilizaron como cepas positivas de formación de biofilm *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (RP62A) y *S. aureus* ATCC 29213 y *S. epidermidis* ATCC 12228 control negativo. Se utilizaron los medios respectivos como blanco, así como nanopartículas y bacterias.

En condiciones de esterilidad se sembró una colonia de *S. aureus* en caldo soya suplementado con NaCl y glucosa toda la noche, posteriormente se tomó 10µL de cultivo bacteriano de cada muestra y se adicionó a un pozo que contenía 200µL de medio TSB (caldo de soya tripticaseina) suplementado (0.5% de dextrosa y 3% de NaCl), y diferentes concentraciones de AgNPs (10, 25, 50 y 100 ppm), se colocó en una placa de 96 pozos (Placas Corning 3596), se tapó la caja y se incubó a 37 °C sin agitación por 24 h.

Pasado el tiempo de incubación las bacterias planctónicas se removieron y se lavaron los pocillos suavemente tres veces con 200 µL de solución estéril PBS. Se retiró de los pocillos por aspiración suave con una punta de pipeta estéril. Se tomaron con cuidado para evitar la aspiración forzada del pozo. Después de la incubación y el lavado, las células se fijaron con etanol puro al 100%, después de 10 minutos se aspiró el etanol y se dejó la placa de microtitulación se secará durante 10 minutos con la tapa abierta en un área estéril.

Terminado el lavado se agregó 125 µL de cristal violeta 0.1% (p/v) y se dejó teñir durante 2 minutos a temperatura ambiente, se agitó el cristal violeta de cada

pocillo, posteriormente se procedió a lavar dos veces los pocillos con 250 μL (PBS), al terminar se volteó la caja y se dejó escurrir el exceso de solución sobre un papel absorbente para después dejar la caja abierta por unos 15 min para eliminar un poco más el exceso de solvente en los pozos. A continuación, se solubilizó la tinción con 200 μL ácido acético glacial 33% (v/v). Para leer la densidad óptica se utilizó un lector de ELISA BioRad Modelo 680 a 595 nm. Cada cepa se leyó por sextuplicado y se descartaron los resultados fuera de tendencia. Los resultados obtenidos de la densidad óptica (DO) fueron interpretados siguiendo la metodología de Babra y colaboradores, 2014, de la siguiente manera:

- DO < 0.120 no hay formación de biofilm
- DO = 0.120 a 0.480 biofilm débil.
- DO > 0.480 a 0.720 biofilm moderado.
- DO > 0.720 formación de biofilm muy fuerte.

Resultados y discusión

Caracterización de nanopartículas de plata

Se realizó la síntesis de las AgNPs mediante la reducción de Ag^+ a Ag^0 , obteniendo soluciones coloidales con diferentes tonalidades de color azul (figura 1), dichas tonalidades se deben principalmente a la concentración de AgNPs, es decir, entre más oscura sea la coloración azul, mayor es la concentración de nanopartículas en la solución.

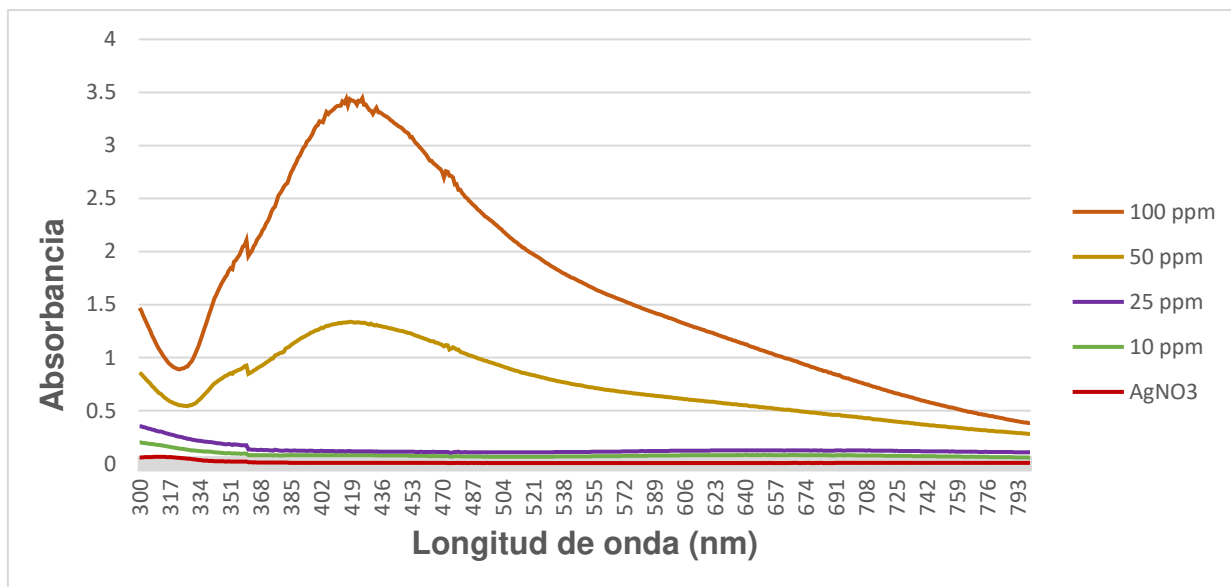


Figura 1. Nanopartículas de plata sintetizadas mediante óxido reducción, en concentraciones de 100, 50, 25 y 10 ppm (De izquierda a derecha).

Según estudios realizados por Xu y colaboradores, la coloración obtenida en las soluciones permite especular la existencia de nanoprismas, ya que ellos mencionan que la coloración final se encuentra en un rango de rosa-púrpura a turquesa, dependiendo de la concentración utilizada de NaBH_4 , y que por lo general este vire de color indica la presencia de pequeñas nanopartículas de plata.

Análisis de Espectro Ultravioleta-Visible (UV-Visible)

Inicialmente se caracterizaron las AgNPs mediante la técnica de espectroscopia UV-visible. Se conoce que las AgNPs exhiben un máximo de absorción UV-visible en el rango de 400-500 nm debido a la resonancia del plasmón superficial, (Srinivasan R, et. al., 2017). En los resultados obtenidos (Gráfica 1) se muestra una absorción máxima en el rango de 405-422 nm, por lo que se estima que las de AgNPs obtuvieron las características idóneas respecto al tamaño.



Gráfica 1. Espectroscopia UV-visible de las AgNPs

Un estudio realizado por Paramelle y colaboradores propone un método para estimar el diámetro de las nanopartículas de plata con solo conocer la longitud de onda máxima de las soluciones y estimando el coeficiente de extinción, dicha teoría podría sugerir que las nanopartículas sintetizadas alcanzan un diámetro de aproximadamente de 30-50 nm.

Análisis de distribución de tamaño de partícula por dispersión laser

Se realizó el análisis de tamaño de partícula de las nanopartículas (fig XXX). Debido a que el equipo opera con soluciones no fue posible obtener la distribución de las concentraciones 10 y 25 ppm, ya que se encontraban muy diluidas y el límite de detección y cuantificación del equipo no permitió obtener los datos en las muestras.

La distribución de las AgNPs de 50 ppm (Figura 2) muestra dos poblaciones, la población más grande se encuentra en un promedio de tamaño de 70 nm, por lo que se estima que dicha población pertenece a las AgNPs, y que el tamaño de partícula se encuentra dentro del rango característico de las nanopartículas (Satyavaani K, et. al., 2011). Sin embargo, la segunda población se muestra con un tamaño de partícula de aproximadamente 1000 nm, por lo que se relaciona con un exceso de NaBH_4 al ser una población pequeña y no significativa.

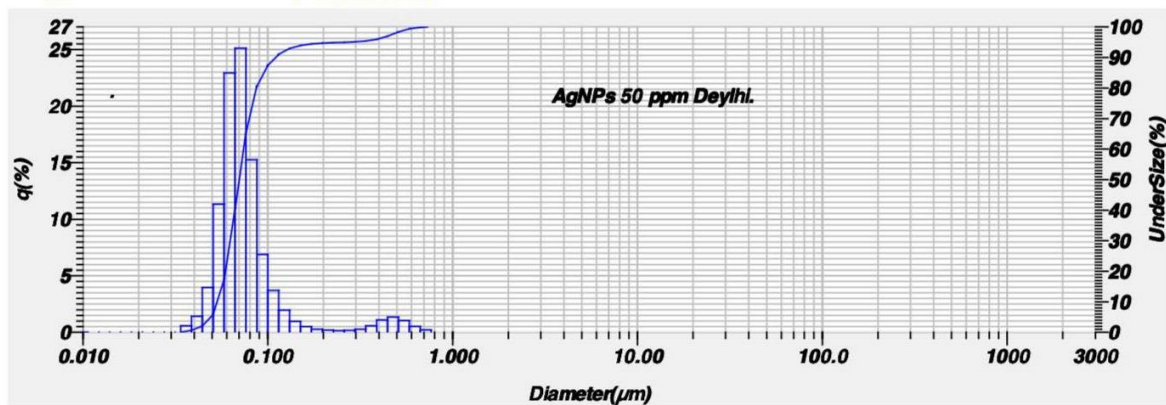


Figura 2. Análisis de distribución de tamaño por dispersión laser de AgNPss en concentración de 5 ppm.

La determinación de la distribución de tamaño de las AgNPs de 100 ppm no fue posible, ya que el intervalo mínimo de detección del equipo es de 10 nm, por lo que se cree que el tamaño de las partículas en la solución corresponde a un tamaño menor.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las micrografías obtenidas revelan poblaciones mixtas (fig. 3), en ellas se observan partículas con formas octagonales, hexagonales, icosaedricas y barras, además estas partículas crean aglomeraciones. Según lo encontrado en la literatura, estas estructuras y la tendencia a aglomerarse son características de las AgNPs, puesto que determinan su toxicidad (Xi-Feng Z, et. al., 2016).

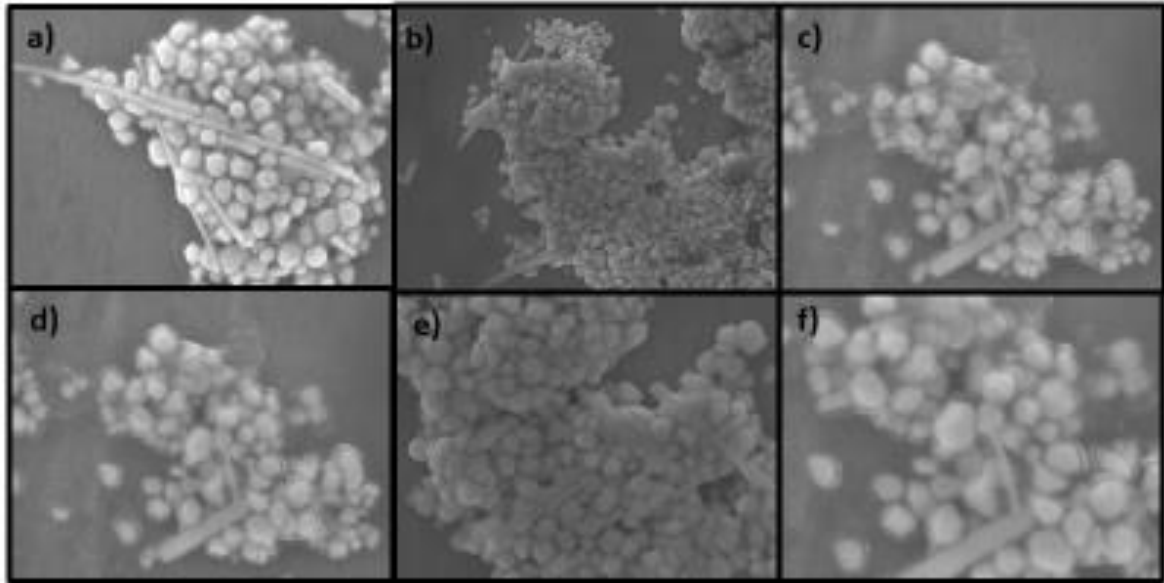


Figura 3. Micrografías de microscopía electrónica de barrido de las AgNPs. Muestra AgNPs 50 ppm a a) 100,000X; b) 50,000X; c), d) y e) 100, 000X; f) 150,000X.

Actividad antibacterial *in vitro* de las AgNPs

Se realizó la prueba de susceptibilidad antimicrobiana usando cepas bacterianas representativas Gram-positivas y Gram-negativas, estas cepas fueron expuestas a diferentes concentraciones de AgNPs (10, 25, 50 y 100 ppm), y como referencia se empleó AgNO₃.

Microorganismo	Zona de Inhibición (mm)*				
	AgNO ₃	AgNPs			
		10 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm
<i>S. flexneri</i>	13	9	12	11	13
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	7	7	9	7	7
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	7	9	11	11	10
<i>V. fluivialis</i>	11	10	11	11	10
<i>E. coli</i>	11	7	10	10	7
<i>C. albicans</i>	11	9	11	8	9
<i>S. epidermidis</i>	9	8	13	7	7

Tabla 1. Zona de inhibición con AgNO₃ y AgNPs

*El diámetro del disco fue de 7 mm.

Los datos obtenidos (tabla 1) muestran que las cepas estudiadas tiene una mayor inhibición de crecimiento en AgNPs en concentración de 25 ppm, un estudio realizado por Hackenberg y colaboradores (2011) indica que para obtener una inhibición de crecimiento se requiere una dosis mayor de 10 µg/ml (10 ppm) de AgNPs, y que en concentraciones menores a 100 µg/ml no existe toxicidad en humanos.

Es importante mencionar que el tiempo de maduración que se le dio a las AgNPs después de la síntesis fue de aproximadamente quince días. El tiempo de envejecimiento, así como la estabilidad, son factores importantes para toxicidad de las AgNPs. Algunos estudios reportan que el tiempo idóneo para que las AgNPs adquieran sus funciones antimicrobianas es de 6 meses, y dicho tiempo se le relaciona con la liberación de Ag⁺ que es atribuido a su toxicidad. No obstante, por medio de la presente investigación se puede demostrar que en un corto periodo las AgNPs también adquieren un efecto citotóxico, pero este aumenta con el tiempo de envejecimiento que se le proporciona (Salahuddin K, et. al., 2018).

Prueba de formación de Biofilm

Se efectuó la prueba de inhibición de la formación de biofilms bacterianos (fig. 4), donde se observó que la cepa *S. aureus* ATCC 29213 tiende a una formación de biofilm moderado, sin embargo, exponiéndola a las diferentes concentraciones de AgNPs se puede observar que con una concentración de 25 ppm la formación de biofilm tiende a disminuir (aproximadamente 25%) convirtiéndose en una productora débil, en contraste, se observa que al estar expuesta con concentraciones de 10 y 100 ppm la formación de biofilm se intensifica, aunque no muestra diferencias significativas.

La formación de biofilm de *S. epidermidis* ATCC 35983 es débil, pero al estar en contacto con AgNPs en concentraciones de 25 y 50 ppm, su formación se reduce, no obstante, en la exposición con AgNPs en 25 ppm se encuentra una diferencia significativa, mostrando una inhibición total en la formación de biofilm.

S. epidermidis ATCC 12228 tiene una formación débil de biofilm, pero al estar expuesta con las diferentes concentraciones de AgNPs su producción disminuye, sin embargo, en la exposición con la concentración de 25 ppm, las nanopartículas de plata no permiten la producción de biofilm, mostrando una diferencia muy significativa con respecto a las concentraciones de 10, 50 y 100 ppm.

En los resultados obtenidos de *S. aureus* ATCC 29213 y *epidermidis* ATCC 35983, se observa que en AgNPs en concentración de 10 ppm la formación de biofilm incrementa más del 100%, a diferencia de diversos estudios realizados, donde concentraciones menores a 1 µg/ml de AgNPs muestran una inhibición de más del 90%, esto puede deberse a que en el estudio el tamaño de partícula es menor (20 nm de diámetro), lo cual es importante debido que a menor tamaño de partícula, mayores características antimicrobianas se confieren a las nanopartículas de plata (Gurunathan S, et. al., 2014; Satyavaani K, et. al., 2011).

En el caso de las tres cepas utilizadas en la prueba, se observó un efecto estadísticamente significativo en presencia de AgNO₃, en donde las cepas reducen la formación de biofilm, y en el caso de las dos cepas de *S. epidermidis*, la formación se aprecia totalmente inhibida, es decir, la solución de AgNO₃ muestra mayor eficacia para inhibir la formación de biofilm, con respecto a las diferentes concentraciones de AgNPs, esto puede deberse a que en la solución de AgNO₃ el Ag⁺ se encuentra en mayor concentración y con mayor disponibilidad para interactuar con la célula, a diferencia de las AgNPs que necesitan un periodo de maduración para que dicho ion pueda liberarse. Sin embargo, el uso de AgNPs puede aminorar la toxicidad en células humanas (Salahuddin K, et. al., 2018).

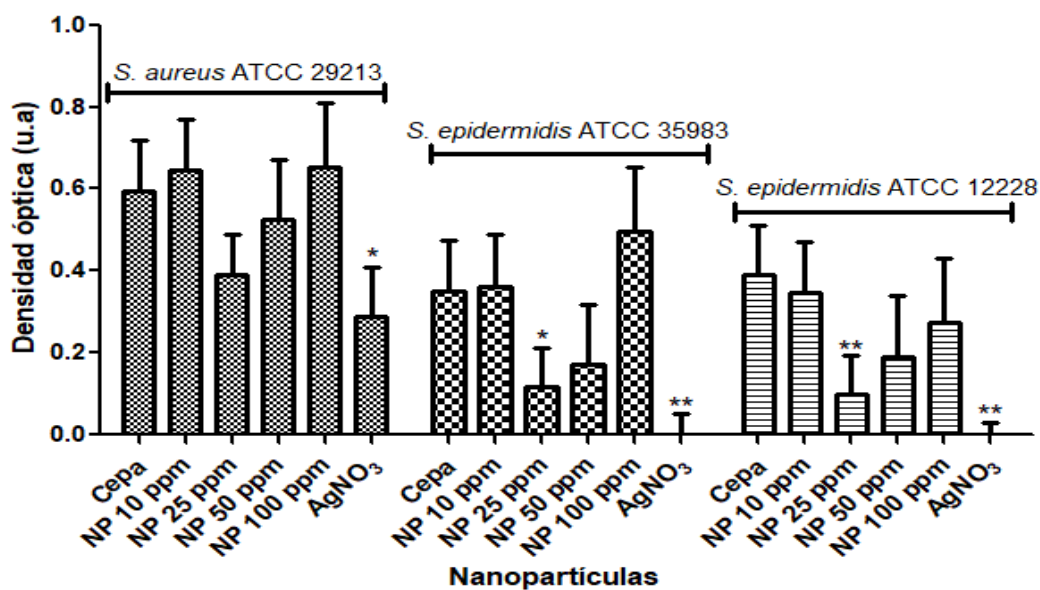


Figura 4. Efecto de AgNPs con diferentes concentraciones en biofilms bacterianos de *S. Aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 35983 y *S. epidermidis* ATCC 12228. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

Conclusión

Como se puede ver la utilización de AgNPs en el tratamiento de infecciones bacterianas que incluyen la formación de biopelículas puede ser de gran utilidad ya que pueden disminuir la formación de éstas. Además, el uso de AgNPs permite la utilización de bajas concentraciones de plata que reducen los posibles problemas de toxicidad en células humanas.

Referencias

- Babra C, Tiwari J, Costantino P, Sunagar R, Isloor S, Hegde N, Mukkur T. 2014. Human methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* biofilms: potential associations with antibiotic resistance persistence and surface polysaccharide antigens. *J. Basic Microbiol.* 54:721-728.
- Choi O, Deng KK, Kim NJ, Ross L Jr, Surampalli RY, Hu Z. 2008. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Res.* 42:3066-3074.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, document M07-A9, no. 2. 9th ed. CLSI, Wayne, PA.
- Davies J. 2007. Microbes have the last word. A drastic re-evaluation of antimicrobial treatment is needed to overcome the threat of antibiotic-resistant bacteria. *Revista* 8:616-621,
- Donlan R, Costerton W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol.* 15:167-193.
- Dorobantu C, Calder A, Noble A, Veinot J, Goss G, Burrell R. 2015. Toxicity of silver nanoparticles against bacteria, yeast, and algae. *J. Nanoparticle.* 17: 1-13.
- Durán N, Durán M, de Jesus M, Seabara A, Fávaro W, Nalcazato G. 2016. Silver nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicina*, 45: 789-799.
- Gurunathan S, Han JW, Kwon DN, Kim JH. 2014. Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Nanoscale Res Lett.* 9(1):373. doi: 10.1186/1556-276X-9-373. eCollection 2014.
- Hackenberg S, Scherzed A, Kessler M, Hummel S, Technau A, Froelich K, Ginzkey C, Koehler C, Hagen R, Kleinsasser N. 2011. Silver nanoparticles: evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicol Lett.* 201: 27-33.

- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews*. 2: 95-108.
- Ibarra-Trujillo C, Villar-Vidal M, Gaitán-Cepeda LA, Pozos-Guillen A, Mendoza-de Elias R, Sánchez-Vargas LO. 2012. Ensayo de formación y cuantificación de biopelículas mixtas de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*. *Rev Iberoam Micol*. 29: 214-222.
- Martinez-Gutierrez F, Boegli L, Agostinho A, Morales Sánchez E, Bach H, Ruiz F, James G. 2013. Anti-biofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms. *Biofouling*. 29:651-660.
- Moretro T, Hermansen L, Holck AL, Sidhu MS, Rudi K, Langsrud S. 2003. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among *Staphylococci* from food and food processing environments. *Appl Environ Microbiol*. 69: 5648-5655.
- O’Gara JP. 2007. *ica* and beyond: biofilms mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*. 270: 179-188.
- Palanisamy NK, Ferina N, Amirulhusni AN, Mohd-Zain Z, Hussaini J, Ping LJ, Durairaj R. 2014. Antibiofilm properties of chemically synthesized silver nanoparticles found against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Nanobiotechnology*. 12:2. doi: 10.1186/1477-3155-12-2.
- Sahal G, Nasser B, Bilkay IS, Piskin E. 2015. Anti-biofilm effect of nanometer scale silver (NmSAg) coatings on glass and polystyrene surfaces against *P. mirabilis*, *C. glabrata* and *C. tropicalis* strains. *J Appl Biomater Funct Mater*. 13(4):e351-5. doi: 10.5301/jabfm.5000248.
- Salahuddin K, Husen A, Rifaqat A. 2018. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J Nanobiotechnology*. 16(1):14. doi: 10.1186/s12951-018-0334-5.
- Satyavani K, Gurudeeban S, Ramanathan T, Balasubramanian T. 2011. Biomedical potential of silver nanoparticles synthesized from calli cells of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. *J Nanobiotechnology*. 9: 43. doi:10.1186/1477-3155-9-43.

- Schiwon K, Arends K, Rogowski KM, Fürch S, Prescha K, Sakinc T, Van Houdt R, Werner G, Grohmann E. 2013. Comparison of antibiotic resistance, biofilm formation and conjugative transfer of *Staphylococcus* and *Enterococcus* isolates from International Space Station and Antarctic Research Station Concordia. *Microb Ecol.* 65:638-651.
- Srinivasan R, Vigneshwari L, Rajavel T, Durgadevi R, Kannappan A, Balamurugan K, Pandima Devi K, Veera Ravi A. 2017. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using Piper betle aqueous extract and evaluation of its anti-quorum sensing and antibiofilm potential against uropathogens with cytotoxic effects: an in vitro and in vivo approach. *Environ Sci Pollut Res.* 25: 10538–10554.
- Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. 2016. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *Int J Mol Sci.* 17(9). pii: E1534. doi: 10.3390/ijms17091534.

Autorización



VoBo.

Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez

No. Económico: 8758



VoBo.

M. en C. Samuel González García

No. Económico: 40142