

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: DISEÑO, OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE  
FÁRMACOS Y BIOMOLÉCULAS**

**SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA MEDIANTE EXTRACTOS DE  
*Nocardia corallina***

**IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

**PRESENTA**

**DIEGO ARROYO PERALTA**

**MATRÍCULA 2211801644**

**COMITÉ TUTORAL**



**Dra. Aida Hamdan Partida**



**Dra. Lucía Ortega Cabello**



**Mtro. en C. Juan Carlos Gutiérrez Santana**

**Mayo 2023**

# SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA MEDIANTE EXTRACTOS DE *Nocardia corallina*

Vo.Bo Cotutora

Dra. Aida Hamdan Partida

Vo.Bo Cotutora

Dra. Lucía Ortega Cabello

Vo.Bo Asesor externo

Mtro. Juan Carlos Gutiérrez Santana

Alumno

QFB Diego Arroyo Peralta

Matrícula 2211801644

# Sinodales de Examen de Grado



---

Presidente

Dra. Izlia Jazheel Arroyo Maya



---

Secretaria

Dra. Aida Hamdan Partida



---

Vocal

Dra. Julia Dolores Toscano Garibay

## Resumen

En la obtención de nanopartículas de plata (*AgNPs*) por métodos químicos, se ha observado que presenta inconvenientes en la modulación de tamaño y forma, así como la generación de desechos tóxicos, por otro lado, con el uso de biocatálisis, podemos disminuir la generación de estos desechos. El uso de bacterias con fines biocatalíticos ha sido probado ampliamente, dentro de éstas, podemos encontrar algunas actinobacterias de la familia *Nocardiaceae*, aunque la habilidad de *Nocardia corallina* no ha sido estudiada hasta ahora para la obtención de *AgNPs*, se sabe que posee el complejo enzimático de nitrato reductasas, las cuales son capaces de llevar a cabo la síntesis extracelular de *AgNPs*, a partir de un precursor de plata presente en el medio. Paralelamente, se puede observar el aumento de resistencia bacteriana a antibióticos por el uso inadecuado de estos, se han registrado infecciones nosocomiales de bacterias multirresistentes, es por eso, que la Organización Mundial de la Salud, ha emitido una lista de patógenos prioritarios para investigación como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, entre otras enterobacterias. En el presente trabajo, se sintetizaron *AgNPs* a partir del extracto extracelular de *N. corallina*. Se usaron como medios de cultivo el GYEA e ISP2 a pH de 7.0 y 8.5,  $\text{KNO}_3$  20, 30 y 40 mM y controles, siendo los de pH 7.0 control de ambos medios, en los que se obtuvieron tamaños menores a 10 nm, mientras que las obtenidas a pH 8.5, obtuvieron tamaños de partícula mayores a los 100 nm; se observó en todas las muestras el plasmón de plata en el espectro UV-Vis, con un máximo de absorción alrededor de los 400nm. En la espectroscopia FT-IR, se pudo observar la banda característica de Ag cerca de los  $1375 \text{ cm}^{-1}$  en todas las muestras analizadas. En el análisis realizado por TEM, se pudo observar una distribución homogénea de tamaños siendo, las *AgNPs* obtenidas de las condiciones de pH 7.0 control de ambos medios, las que poseen una forma cuasiesférica, mientras que las de pH 8.5 fueron amorfas. Se caracterizó el potencial Z, el cual en todos los casos fue negativo inferior a -5mV. En la caracterización microbiológica, se observó que la mayoría de las CMI de las *AgNPs* de los medios de pH 7.0 son menores a los  $6.6 \mu\text{g/mL}$ , mientras que en las obtenidas a pH 8.5, no se observó actividad.

Palabras clave: Nanotecnología, *AgNPs*, biosíntesis, *Nocardia corallina*, actividad antibacteriana.

### Agradecimientos institucionales

- Al sistema de becas del programa de posgrados de calidad del CONACyT para el programa 001546 – Maestría en Ciencias Farmacéuticas de la UAM-X, con mi número de CVU 1032146.
- Al Instituto de Física de la UNAM, especialmente al Dr. José Reyes Gasga, Ing. Samuel Tehuacanero Núñez, Tec. Pablo Lopez Arriaga, Tec. Diego Quiterio, por el análisis de microscopía de transmisión realizado en sus instalaciones.
- A los Laboratorios de la UAM Xochimilco de Nanomedicina por prestar el equipo de FT-IR, de Farmacia Molecular y Liberación controlada por el análisis de potencial Z y tamaño de partícula, al de Biotransformaciones por proporcionar las cajas petri con la cepa de *Nocardia corallina* y Biología Molecular por ser la sede para la realización del presente trabajo.
- Al Laboratorio de Bacteriología Experimental del INP por ser la sede alternativa del presente trabajo.
- A la Abogada Ma. Cristina Graciela Peralta Palma, por su contribución al ser la revisora de redacción del presente trabajo.

## Agradecimientos personales

A mis padres, por estar siempre conmigo y brindarme todo su apoyo, alentándome a pesar de los obstáculos encontrados, y siempre con las palabras de aliento exactas para llegar al final de mi Maestría.

A todos mis amigos que siempre estuvieron a mi lado en cada paso de este camino para conseguir el título de Maestro en Ciencias Farmacéuticas

## ÍNDICE

1.	Introducción	10
2.	Antecedentes	11
	2.1. Nanomateriales	11
	2.1.1. Definición	11
	2.1.2. Historia de los nanomateriales	11
	2.1.3. Aplicación de los nanomateriales en el área médica	12
	2.1.4. Nanopartículas metálicas	13
	2.1.5. Biosíntesis de nanopartículas de plata	16
	2.2. Caracterización fisicoquímica de nanopartículas de plata	18
	2.2.1. Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)	18
	2.2.2. Espectrofotometría Ultravioleta/Visible (UV/Vis)	20
	2.2.3. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	21
	2.2.4. Potencial Z	22
	2.3. Antibióticos y resistencia antimicrobiana	23
	2.3.1. Perspectiva general	23
	2.3.2. Resistencia a antibióticos	25
	2.4. Nanopartículas como antimicrobianos	26
	2.4.1. Posibles campos de utilización	26
	2.4.2. Mecanismos de acción propuestos para las nanopartículas de plata	26
	2.5. Principales bacterias farmacorresistentes	27
	2.5.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
	2.5.2. <i>Escherichia coli</i>	28
	2.5.3. <i>Salmonella typhimurium</i>	29
	2.5.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	29
3.	Planteamiento del problema	30

4.	Pregunta de investigación	30
5.	Hipótesis	31
6.	Objetivos	31
7.	Metodología	31
7.1.	Obtención de caldos de fermentación de <i>N. corallina</i> B-276	31
7.2.	Cuantificación de proteínas totales de los extractos de <i>N. corallina</i>	33
7.3.	Síntesis extracelular de las nanopartículas de plata	33
7.4.	Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de plata	33
7.4.1.	Caracterización de las nanopartículas de plata por espectrofotometría UV/Vis	33
7.4.2.	Caracterización morfológica de las nanopartículas de plata por TEM	34
7.4.3.	Caracterización de las nanopartículas de plata por FT-IR	34
7.4.4.	Tamaño de partícula de las nanopartículas de plata	34
7.4.5.	Potencial Z de las nanopartículas de plata	35
7.5.	Prueba de Kirby-Bauer y determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las nanopartículas de plata sintetizadas	35
7.6.	Análisis estadístico	36
8.	Resultados y discusión de la determinación fisicoquímica y de actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata	36
8.1.	Cultivo y aislamiento de <i>N. corallina</i>	36
8.2.	Síntesis de las nanopartículas de plata	37
8.3.	Cuantificación de proteínas totales de los extractos de <i>N. corallina</i>	38
8.4.	Caracterización por espectrofotometría UV/Vis de las nanopartículas de plata	39
8.5.	Caracterización por FT-IR de las nanopartículas de plata	41
8.6.	Caracterización por TEM de las nanopartículas de plata	42
8.7.	Potencial Z y tamaño de partícula de las nanopartículas de plata	47



8.8. Actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata	48
8.8.1. Actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata vs <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	49
8.8.2. Actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata vs <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	51
8.8.3. Actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata vs <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 700603)	53
8.8.4. Actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata vs <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (ATCC 43300)	55
8.8.5. Actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata vs <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	57
8.8.6. Actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata vs <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	59
8.8.7. Actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata vs <i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028)	61
9. Conclusiones	63
10. Perspectivas	63
11. Referencias	64

## 1. Introducción

La nanotecnología ha demostrado su versatilidad en diversas áreas, que van desde el desarrollo de materiales, hasta el diseño de formas de liberación modificada de moléculas bioactivas, así como nuevas alternativas terapéuticas. Asimismo, las nanopartículas metálicas, debido a sus propiedades ópticas, se han utilizado para diseñar herramientas diagnósticas precisas (Lechuga, 2010).

La síntesis de nanopartículas metálicas, ha presentado un reto *per se*, ya que la modulación de tamaño y forma se ha visto como una de las principales complicaciones, características esenciales en su actividad biológica, dónde el uso de estabilizadores y moduladores, implica un mayor costo para su producción, además de una mayor generación de residuos contaminantes, y condiciones difíciles de alcanzar, como la temperatura y la elección correcta de polímeros moduladores de tamaño y forma. Por ello, se han buscado rutas alternas de síntesis, mediante el uso de extractos de plantas o microorganismos, con la finalidad de mejorar la modulación de su morfología y reducir la cantidad de contaminantes, así como para mejorar su actividad antibacterial (Díaz del Castillo Rodríguez, 2012).

Algunos miembros de la familia *Nocardiaceae*, han demostrado su capacidad de reducir diferentes sales metálicas, como las de oro y plata, esto mediante la expresión de la enzima nitrato reductasa, permitiendo la producción eco-amigable de nanopartículas.

En la presente investigación, se utilizó la cepa de *Nocardia corallina* B-276 (actualmente conocida como *Rhodococcus ruber* ATCC 31338), para sintetizar nanopartículas de plata (*AgNPs*), la cual, ha demostrado llevar a cabo el proceso redox de diferentes compuestos orgánicos (Fletes & Rosas, 2015).

Por otro lado, debido a la resistencia a los antibióticos, la OMS ha emitido una lista de patógenos prioritarios, para investigación de nuevas moléculas o compuestos con actividad antimicrobiana, dónde las *AgNPs*, podrían ser promisorias al inhibir el crecimiento de especies bacterianas, ya que la plata, ha demostrado tener

actividad antimicrobiana contra diferentes bacterias multirresistentes a los antibióticos (World Health Organization, 2021).

El objetivo de este trabajo fue la obtención de *AgNPs*, mediante la utilización de extractos crudos del medio de cultivo de *Nocardia corallina* B-276, a diferentes valores de pH y diferentes concentraciones de  $\text{KNO}_3$  añadido al medio, utilizado como inductor de nitrato reductasa, así como su caracterización fisicoquímica y su actividad antimicrobiana.

## **2. Antecedentes.**

### **2.1 Nanomateriales.**

#### **2.1.1 Definición.**

Los nanomateriales, son estructuras cuyas dimensiones varían de 1 a 100 nm, dichos materiales, pueden estar hechos de cerámicas, polímeros, carbono, metales, o una combinación de dos o más de éstos. Su uso ha abierto un nuevo panorama enorme para la ciencia, ya que, en comparación con los materiales micrométricos, son capaces de cambiar su comportamiento, de sólido macroscópico a sólido cuántico, es decir, sólidos que se comportan como átomos aislados, confiriéndoles así, propiedades únicas (Gutiérrez Wing, 2013).

#### **2.1.2 Historia de los nanomateriales.**

Los nanomateriales han estado presentes en la evolución del hombre, las primeras aplicaciones se remontan a Egipto, con el uso del plomo para tuberías (4000 a.C.), que, por su método de fabricación, se han encontrado rastros de nanoestructuras de dicho metal. En Roma, la copa de Lycurgus (s. IV a.C.) tiene su interesante cambio de coloración de verde a rojo, por el efecto de nanomateriales de oro y plata, asimismo, las nanopartículas de óxidos metálicos, eran usadas para colorear vitrales de catedrales medievales. Las nanopartículas de carbono, son responsables de la dureza del acero de Damasco. Por su parte, en el nuevo mundo también se hacía uso de esta tecnología en las culturas Maya y Azteca, sus pigmentos azules han probado ser resistentes al paso del tiempo, debido a que fueron adsorbidos en nanocristales de paligorskita, un tipo de arcilla que usaban

para realizar sus pigmentos y darles durabilidad (Luna, 2011; Honrubia, 2019; Universidad de Burgos, 2016; UDLAP, 2021; Chiari, *et al*, 2008).

Faraday en 1857 inició el estudio de las nanopartículas, pero hasta el año de 1959, el científico que fue premiado con el Nobel de Física, Richard Feynman, propuso la elaboración de materiales con base en un reordenamiento a nivel atómico o molecular, ganándose el nombre de: “Padre de la nanotecnología” (Díaz del Castillo Rodríguez, 2012).

El término de nanotecnología fue usado por primera vez en 1974, por el científico Norio Taniguchi en su libro: “*Engines of Creation*”, desde su publicación, grandes avances han permitido el estudio de esta nueva área. En 1986, los galardonados con el premio Nobel de física Rohrer y Binning, inventores del microscopio de efecto túnel, marcaron la pauta a los microscopios de proximidad, equipos utilizados para caracterizar y manipular diferentes objetos de tamaños nanométricos (Serena Domingo, 2013).

Pasados algunos años (1991), los nanotubos de carbono fueron caracterizados por Lijima; y en 1996, los fullerenos fueron descritos por Smalley, Curl y Kroto, quienes recibieron el premio nobel de Química en ese año. En 2010, Geim y Novoselov, galardonados con el premio Nobel de Física, descubrieron el grafeno. Estas nuevas estructuras, han demostrado su utilidad en el área de la microelectrónica, cumpliendo las predicciones de la Ley de Moore, que menciona el ritmo de evolución en esta área (Serena Domingo, 2013).

### **2.1.3 Aplicación de nanomateriales en el área médica.**

La nanomedicina, está enfocada al desarrollo de nuevos tratamientos y métodos diagnósticos a escala nanométrica, lo que podría incrementar su eficacia al alcanzar blancos terapéuticos de difícil acceso, procurando disminuir costos y tener una propuesta amigable con el medio ambiente (Lechuga, 2010).

El uso de biosensores nanofotónicos, nanoplasmónicos o nanomecánicos, ha permitido la detección de cualquier tipo de sustancias en tiempo real, sin la necesidad de marcadores fluorescentes o radioactivos. Asimismo, se ha progresado en sistemas “*lab-in-a-chip*” que brindan un diagnóstico completo,

basado en cambios moleculares de la composición, de incluso, una sola gota de sangre del paciente (Lechuga, 2010).

En la farmacología, se han desarrollado sistemas con nuevas formas de liberación de fármacos, como nanopartículas transportadoras de fármacos, para terapias dirigidas a receptores, células u órganos específicos, permitiendo la eliminación de células cancerosas, o la regeneración de tejidos y/u órganos dañados, por medio de terapias génicas de bioregeneración, ingeniería de tejidos y también terapia celular (Lechuga, 2010).

#### **2.1.4 Nanopartículas metálicas.**

Las nanopartículas metálicas, han tenido gran auge en el área de desarrollo de nanomateriales por sus aplicaciones y su versatilidad. En el caso de las *AgNPs*, han servido para el estudio de plasmones en superficies, es decir, el fenómeno que describe el movimiento libre de electrones, detectado cuando su equilibrio es alterado, lo que genera ondas vibracionales a frecuencias determinadas que, permiten cargas positivas en los núcleos atómicos (Cruz, *et al*, 2012).

Las *AgNPs* han sido obtenidas comúnmente por métodos diversos de síntesis química, basados en reacciones redox, siendo principalmente utilizado el borohidruro de sodio como agente reductor, que cambian el estado de oxidación de la plata de  $Ag^{+1}$  a  $Ag^0$ . Esos métodos generan residuos corrosivos y tóxicos para el medio ambiente, por lo que es importante desarrollar métodos de síntesis menos contaminantes, ya que sus posibles usos en el área médica (como antibiótico o antineoplásico) (Tabla 1) son de vital importancia (Cruz, *et al*, 2012).

Tabla 1.- Nanopartículas metálicas y sus principales aplicaciones potenciales en el área médica (Vazquez-Muñoz & Huerta Saquero, 2014).

Nanomaterial	Aplicaciones potenciales: Clínicas e industriales
<b>Nanopartículas de plata</b>	Revestimiento de material quirúrgico, usos clínicos y tratamiento de agua. Regeneración de quemaduras, heridas y úlceras de pie diabético
<b>Nanopartículas de Zinc</b>	Artículos antibacteriales, revestimiento quirúrgico
<b>Nanopartículas de Dióxido de titanio</b>	Agente antibacterial, purificador de agua y aire
<b>Nanopartículas de oro</b>	Terapia fototérmica y antifúngico
<b>Nanopartículas de óxido nítrico</b>	Heridas infectadas y pie diabético

Otros métodos químicos comúnmente utilizados para la síntesis de *AgNPs*, son el método de Sol-Gel, que consiste en una matriz polimérica, permitiendo la modulación de tamaño y forma de las nanopartículas resultantes, por otro lado, la síntesis basada en la deposición química de vapor o la síntesis húmeda, representan desventajas, como la elección del disolvente, temperatura y moduladores correctos para la forma y tamaño requeridos. Los métodos físicos, por su parte, consisten en la molienda o desbaste del material hasta llegar al tamaño nanométrico, lo que configura un reto para la obtención de formas específicas (Tabla 2) (Monge, 2009; Kaabipour & Hemmati, 2021).

Tabla 2.- Ventajas y desventajas de los principales métodos de obtención de nanopartículas metálicas (Zanella, 2012).

Método	Ventajas	Desventajas
<b>Coloidal</b>	Control de tamaño y forma Dispersión estable	Selección de condiciones idóneas para el tamaño deseado Uso de moduladores Uso de reductores corrosivos
<b>Reducción foto y radioquímica</b>	Alta pureza por ausencia de reductores Reacción en estado sólido y bajas temperaturas	Equipo muy costoso
<b>Irradiación con microondas</b>	Muy baja dispersión de tamaño Método muy rápido	Poco control de morfología
<b>Utilización de dendrímeros</b>	Modulación exacta de tamaño y forma	Procesos adicionales para retirar el dendrímero
<b>Solvotermal</b>	Mejora disolución de reactivos Uso de agua como disolvente	Uso de moduladores estables a temperaturas y presiones elevadas
<b>Sol-Gel</b>	Modulación de tamaño y forma Baja temperatura	Elección de condiciones ideales

### 2.1.5 Biosíntesis de AgNPs.

Debido a las limitaciones que presentan los métodos físicos y químicos para la obtención de nanopartículas, la biosíntesis de AgNPs, a partir de extractos de plantas o mediante procesos microbianos, debido a los metabolitos que poseen (proteínas, enzimas y azúcares, entre otros), permiten la reducción de la plata en ausencia de sustancias corrosivas, disminuyendo la generación de contaminantes, además de prescindir de temperaturas y presiones altas, así como el uso de polímeros moduladores del tamaño y forma; lo que favorece a la reducción del costo de producción (Dhuper, *et al*, 2012; Barkat, *et al*, 2018; Kumari, *et al*, 2020; Mousavi, *et al*, 2018).

Los métodos de biosíntesis de AgNPs basados en bacterias, hongos o plantas, utilizan complejos enzimáticos diversos. Los métodos basados en bacterias pueden ser intracelulares o extracelulares, ésta última ha sido de mayor relevancia ya que permite la síntesis de nanopartículas sin lisar a las bacterias, así como la posibilidad de evitar el uso de algún compuesto o polímero estabilizador (Priyanka, *et al*, 2016).

En las bacterias, se puede inducir la enzima nitrato reductasa, usando nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ) como inductor, así como reductasas extracelulares dependientes del NADH y proteínas que son excretadas al medio de cultivo, las cuales hacen posible la síntesis de AgNPs, misma que es dependiente de la composición del medio y pH (Barkat, *et al*, 2018; Kapahi y Sachdeva, 2019; Kumari, *et al*, 2017).

Las bacterias de la familia *Nocardiaceae*, específicamente los géneros *Nocardia* y *Rhodococcus*, han demostrado, con el uso de enzimas, la habilidad de producir nanopartículas de plata, oro, selenio y telurio, cuyo tamaño de partícula oscila entre 5 y 100 nm. Un miembro de estas familias que ha sido utilizado es *Nocardia farcinica*, para la síntesis de nanopartículas de oro, mediante la reducción del ácido cloroáurico a oro elemental, por medio de la enzima nitrato reductasa, enzima que posee un núcleo de molibdeno en su sitio catalítico, con un residuo de sulfito para poder revertir el acomplejamiento, permitiendo a su vez, la polimerización de las nanopartículas. Sin embargo, es necesaria la inducción de la enzima, para que se



expresarse de forma periplásmica, donde la presencia del ion nitrato, promueve la maquinaria necesaria para reducirlo a nitrito, integrándose al ciclo del nitrógeno. Otro ejemplo de la utilización de miembros de la familia *Nocardiaceae*, es *Nocardia mediterranea*-5016, usando  $\text{AgNO}_3$  como precursor, usando tanto la biomasa como el sobrenadante, para la obtención de nanorod de plata como tratamiento anticancerígeno, otro caso, es el uso de *Nocardia sp.* OX5, usando nitrato de plata, que sirvió para la obtención de *AgNPs* con actividad antibacteriana (Presentato, *et al* 2019; Sparacino-Watkins, *et al*, 2014; Könen-Adgüzel, *et al*, 2018; Kuang *et al*, 2018; Tischler, *et al*, 2017; Subbaiya, *et al*, 2015).

En este sentido, *N. corallina* B-276, ha demostrado expresar la enzima nitrato reductasa, misma que ha sido caracterizada en su secuencia de aminoácidos (a.a.), encontrando dos subunidades: alfa, una flavoproteína con 1235 restos de a.a. y beta, con 552 restos de a.a., de igual forma, se sabe que necesita una proteína chaperona de 214 residuos de a.a. con núcleo de molibdeno para la actividad catalítica, así mismo, se ha reportado que puede polimerizar la subunidad alfa, para reducir sulfito de manera dependiente de  $\text{NAD}^+$  (nicotinamina adenina dinucleótido), lo que hace a esta flavoproteína una nitrato/sulfito reductasa bifuncional, así como presentar actividad catalítica en la oxidación de alcoholes, y en la reducción enantioselectiva de aldehídos y cetonas, debido a la presencia de óxido reductasas, observando que la actividad biocatalítica del microorganismo, es afectada por el pH del medio, debido a que esto puede alterar la interacción entre aminoácidos y su sustrato (Kuang, *et al* 2018; Lee, *et al* 2018, Manjarrez, *et al*, 2020; Tischler, *et al*, 2017).

Lo anterior, permite proponer que las enzimas que contiene *N. corallina*, son capaces de sintetizar *AgNPs* de manera extracelular, cuya eficiencia dependerá del pH y composición del medio de cultivo, los cuales, a su vez, serán factores importantes para la modulación de tamaño y forma de las *AgNPs*, cabe señalar, que no hay estudios anteriores sobre el uso de esta cepa para la síntesis de *AgNPs*.

## 2.2 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de plata.

### 2.2.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).

El espectro electromagnético tiene utilidad en el análisis químico; el IR, que va de una longitud de onda de 12800 hasta  $10\text{ cm}^{-1}$ , se ha utilizado para la determinación de grupos funcionales y así, poder realizar la caracterización de una molécula. El espectro de IR se divide en tres regiones por su longitud de onda: el IR lejano, medio y cercano. Para el análisis instrumental se utiliza la región media ( $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ ) porque, en ese rango las moléculas, especialmente orgánicas, presentan absorción. El análisis por FT-IR, tiene como fundamento, un modelo que implica las vibraciones inherentes de los enlaces presentes en una molécula, en los cuales, al pasar el haz de luz, se presentará una vibración específica, debido a que cada enlace presenta diferente energía y, por lo tanto, pueden darse vibraciones como las de aleteo, estiramiento, tijereteo y doblamiento como se puede observar en la Figura 1 (Skoog, *et al*, 1971).

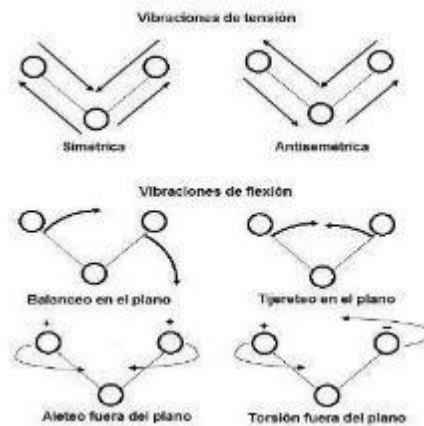


Figura 1.- Movimientos vibracionales de enlaces moleculares detectados en espectroscopia infrarroja (fuente: <http://cambioclimaticoenergia.blogspot.com/2014/06/por-que-hay-gases-de-efecto-invernadero.html>).

Los equipos cuentan en la actualidad, con sistemas que les permite convertir las señales captadas (interferograma), en porcentaje de transmitancia usando la transformada de Fourier (FT-IR) (Figura 2). Para hacer un correcto análisis, es necesario cumplir ciertos requisitos para la muestra: se requiere que esté

totalmente seca, tener las señales de fondo (aire), con la menor cantidad de dióxido de carbono y de humedad posibles (Skoog, *et al*, 1971).

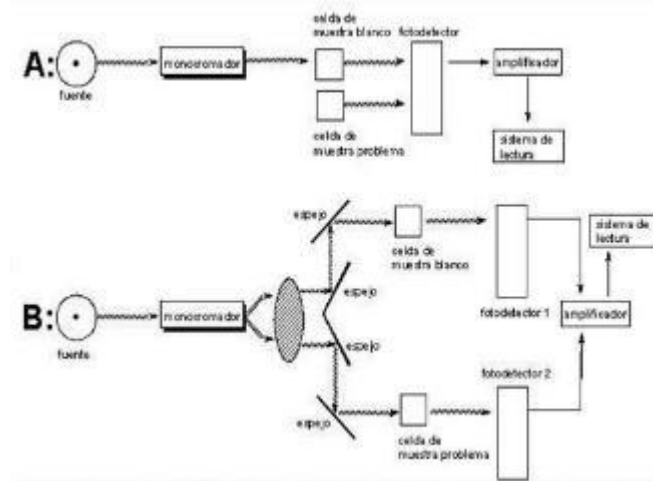


Figura 2.- Esquema de las partes de un equipo de análisis de espectroscopia infrarroja de haz de luz sencillo y doble (fuente: <http://navarrof.orgfree.com/Docencia/AnalisisInstrumental/UT2/UV2.htm>).

La caracterización de *AgNPs* es de gran relevancia, se ha descrito que la espectrometría infrarroja, permite identificar el ion de plata con una banda cerca de  $1377\text{ cm}^{-1}$  (Figura 3, Tabla 3), así como la presencia de diversos grupos funcionales como  $1450$  y  $1043\text{ cm}^{-1}$  (N-H y C-N de aminas),  $1377\text{ cm}^{-1}$  (N=O),  $1240\text{ cm}^{-1}$  (C-N),  $2856\text{ cm}^{-1}$  (O-H),  $2921\text{-}2856\text{ cm}^{-1}$  (C-H),  $1743\text{ cm}^{-1}$  (C-C no conjugado, C=O),  $1631\text{ cm}^{-1}$  (C-N y C-C), que podrían corresponder a diversos metabolitos residuales de la síntesis, como ácidos grasos, lípidos, o restos del medio de cultivo (Escobar Falconi, 2015; Zea Álvarez, *et al*, 2019).

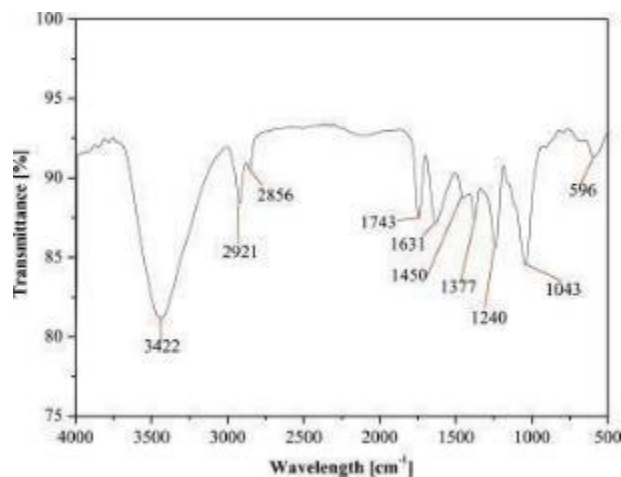


Figura 3: Espectro FT-IR de *AgNPs* obtenidas por biocatálisis (Kumari, *et al*, 2016).

Tabla 3.- Grupos funcionales y la localización de su banda en FT-IR para caracterización de *AgNPs* (Zea Álvarez, et al, 2019).

Longitud de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupo funcional
1377	Plata
1240	C-N
1377	N=O
1450, 1043	N-H, C-N
1631	C-N, C-C
1743	C=O
1743	C-C
2921-2856	C-H
2856	O-H

### 2.2.2 Espectrofotometría Ultravioleta/Visible (UV/Vis).

Para determinar la presencia de las *AgNPs* de manera preliminar, se utiliza otra sección del espectro electromagnético: UV/Vis (100-800 nm), asociado a las transiciones electrónicas, que existen entre diferentes niveles energéticos en ciertos grupos funcionales, o átomos de una molécula, permitiendo caracterizar a la molécula (Skoog, *et al*, 1971).

Específicamente, los análisis realizados por varios grupos de investigación, han caracterizado que las *AgNPs* exhiben longitudes de onda con máxima absorción en el rango de 395-450 nm, indicando la presencia del plasmón de plata, es decir, los electrones libres de la última capa de valencia de un sólido conductor, en este caso la plata, que involucra la onda electromagnética del haz de luz incidente y este *pool* electrónico, disipando la energía de manera dependiente del área superficial de la partícula. Se ha descrito que la longitud de onda es desplazada dependiendo del tamaño de la nanopartícula (Figura 4) (Escobar Falconi, 2015; Vidal, *et al*, 2008).

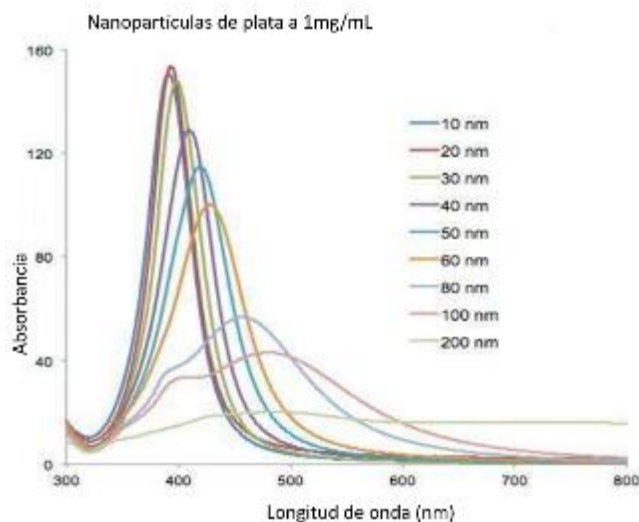


Figura 4.- Espectro UV/Vis de *AgNPs* (modificada de: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/aldrich/730785>).

### 2.2.3 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

Este tipo de microscopía, a diferencia de la óptica que utiliza la luz para la ampliación de objetos hasta 100 veces su tamaño, utiliza un haz de electrones de 200 keV (Figura 5). El haz de electrones se produce en la fuente de iluminación paralela a la muestra, se originan entonces, efectos elásticos inversos, al tiempo que, al chocar con una superficie conductora, genera una interferencia (contraste de fase), lo que da la imagen al detector por electrones secundarios y Augier, así como rayos X, esto se debe a que, cuando los electrones colisionan con la superficie de la muestra, parte del haz es dispersado selectivamente, luego pasan a través de una lente para enfocar la imagen final, en escala de grises que corresponden al grado de dispersión. Otra de las aplicaciones que podemos observar en este tipo de análisis, son las imágenes en campo oscuro, ya que permiten observar con mayor nitidez la superficie, debido a la mejor resolución del haz de electrones dispersado; otro análisis que se puede realizar con esta misma tecnología es el análisis del patrón de difracción de electrones, que es único de cada elemento, lo cual ayuda a hacer una caracterización no definitiva de la composición del analito. Esta tecnología, permite hacer la determinación de la morfología de la superficie de materiales, como lo son las *AgNPs*, tanto en campo claro, como campo oscuro, permitiendo determinar su forma exacta y hasta un

aproximado de su composición elemental, con la obtención de los patrones de difracción (Universitat d'Alacant, 2022).

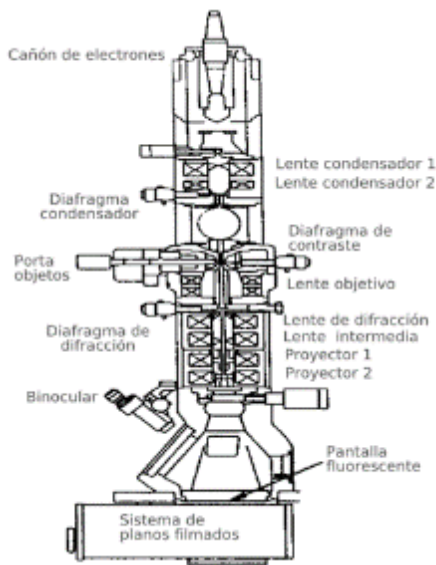


Figura 5.- Esquema de Microscopio electrónico de transmisión (fuente: [https://es.wikipedia.org/wiki/Microscopio\\_electr%C3%B3nico\\_de\\_transmisi%C3%B3n](https://es.wikipedia.org/wiki/Microscopio_electr%C3%B3nico_de_transmisi%C3%B3n) ).

## 2.2.4 Potencial Z.

El potencial Z indica la carga que presenta una partícula en solución, lo cual permite determinar su estabilidad (Betancur, *et al*, 2012).

Para la estabilidad de una suspensión, es necesario el correcto balance de atracción-repulsión originado en la doble capa, por ejemplo, si tuviéramos un núcleo con carga negativa, habría una capa de iones de la carga opuesta, a ésta le llamaríamos la capa de Stern, seguiría una capa difusa con ambas cargas y luego los iones en solución. Entre el núcleo y la capa de Stern (Figura 6), se daría una atmósfera cargada que provocaría un potencial eléctrico, que será relativo a la solución en que estén suspendidas las nanopartículas, es donde la teoría de DVLO (Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek) explica, mediante fuerzas de Van der Waals, la repulsión entre las partículas, teniendo como limitante, la tendencia a aglomerarse para hacer de estas fuerzas electrostáticas, una mayor para vencer la fuerza de repulsión entre ellas, dando como resultado una energía neta de interacción, la cual, solo será el referente para determinar cuánta energía necesitan para vencer y formar el aglomerado, ya que al estar en suspensión, deben ser

contempladas la masa y velocidad con la que se mueven las nanopartículas y así, determinar si la energía cinética sobrepasa el umbral, para permitir el “choque” entre las nanopartículas, lo que significa, que nanopartículas con potencial Z distante de cero ya sea positivo o negativo el valor, tendrán mayor repulsión que las que están cercanas al cero, como podemos observar en *AgNPs* que poseen valores menores a -15mV, que demuestran estabilidad en solución hasta por meses (Sandoval *et al*, 2022; Batalla Mayoral *et al*, 2014).

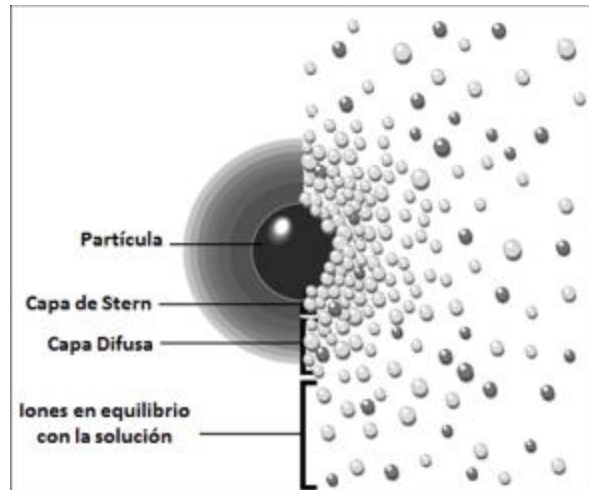


Figura 6.- Diagrama de capa de Stern (fuente: [https://www.researchgate.net/figure/Figura-12-Potencial-zeta-de-una-particula\\_fig3\\_263180788](https://www.researchgate.net/figure/Figura-12-Potencial-zeta-de-una-particula_fig3_263180788) ).

## 2.3 Antibióticos y resistencia antimicrobiana

### 2.3.1 Perspectiva General.

Los antibióticos son moléculas bioactivas que poseen un efecto tóxico contra bacterias, éstos se consideran como uno de los descubrimientos más importantes de la historia de la humanidad. El uso de agentes terapéuticos se remonta hasta el s. II a.C. con Galeno, cuando usó productos naturales para restablecer los “humores” descritos por Hipócrates en el s. IV a.C., esto abrió una nueva forma de tratar enfermedades (Sierra Benítez, *et al*, 2019).

El uso de agentes terapéuticos externos no vio un avance formal hasta el s. XIII, cuando se empieza a dar el surgimiento de los apotecarios en Inglaterra y Alemania, quienes eran los encargados de la dispensación y preparación de los compuestos galénicos de la época. Con la llegada de los estudios de Paracelso,

sobre la extracción de principios activos de plantas en el s. XVI, se empezó a dilucidar que eran solo algunos compuestos los responsables de la acción terapéutica, y además fue el responsable de introducir el concepto de “dosis” (Sierra Benítez, *et al*, 2019).

En el s. XIX con la introducción de la Teoría Microbiana de la Enfermedad, por Louis Pasteur, que permitía determinar la causa subyacente de las enfermedades, llevando así, a la utilización de agentes específicos para cierta patología, marcando la pauta para el desarrollo de agentes antibacterianos. Por su lado, Joseph Lister, fue uno de los primeros en probar la teoría de Pasteur, mediante experimentos que lo llevaron a desarrollar, métodos de antisepsia en la cirugía, con el objeto de destruir agentes patogénicos, además del desarrollo de moléculas bioactivas dirigidas a órganos específicos (Sierra Benítez, *et al*, 2019).

En 1881, el médico Robert Koch, fue de los primeros en introducir medios para el crecimiento de microorganismos y así poderlos caracterizar, permitiendo así, distinguir entre diferentes agentes patógenos y su aislamiento, logrando identificar a los responsables del cólera y tuberculosis. La aportación que hizo Gram (1882), fue la tinción con cristal violeta y safranina a las bacterias, lo que permite diferenciarlas entre Gram positivas y Gram negativas, convirtiéndose en una de las técnicas más utilizadas para la clasificación de éstas (Volcy, 2008).

En 1889, Paul Vuillemin presentó la descripción del fenómeno contraintuitivo de la época, denominado “influencias antibióticas”, con el que se empezó a estudiar la producción por otros microorganismos de sustancias capaces de inhibir, hasta aniquilar otros organismos. En 1920, Alexander Flemming, descubrió una sustancia activa secretada por *Penicillium notatum*, la cual había inhibido el crecimiento de una cepa de *Staphylococcus aureus*, misma que sería conocida como penicilina. Selman Waksman, descubrió la estreptomicina, y propuso en 1941 el término antibiótico. En adición, E. Freudenreich describió a la piocianasa como la primera molécula con actividad antibacteriana obtenida naturalmente, la cual es producida por *Pseudomonas aeruginosa*, desafortunadamente, su inestabilidad y toxicidad impidieron su uso en humanos (Acuña, 2002; Sierra Benítez, *et al*, 2019).



La búsqueda de nuevos compuestos antibióticos, llevó a descubrir otros derivados de microorganismos como la estreptomina, gramicina, cloranfenicol, clortetraciclina, eritromicina, vancomicina, cefalotina, cefaloridina y cefalexina, entre otras. En paralelo, el desarrollo por síntesis química, también daba algunas propuestas para la problemática del tratamiento de infecciones bacterianas, como los derivados de sulfas, y también la ruta semisintética daba otras oportunidades como la metil penicilina, así, el primero de éstos últimos en llegar al mercado, fue la trimetoprima en los años 70's (Figura 7) (Belloso, 2009).

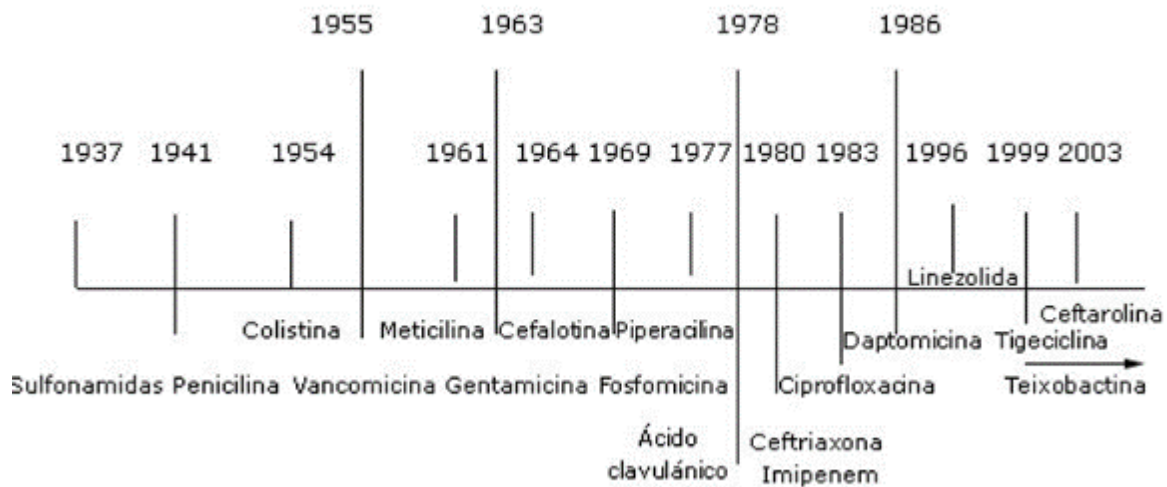


Figura 7.-Cronología del descubrimiento e introducción en la terapéutica de los principales antibióticos durante el Siglo XX (Quiñones, 2017).

### 2.3.2 Resistencia a antibióticos.

El uso incorrecto de antibióticos, así como la falta de apego terapéutico, han facilitado la adquisición de diversos mecanismos adaptativos de las bacterias, como la producción de beta-lactamasas, desarrollo de bombas de eflujo, entre otros, generando un problema de salud importante conocido como: “resistencia antimicrobiana”, el cual, se ha acentuado en las décadas recientes, al reducir la eficacia de la mayoría de los antibióticos conocidos. La OMS ha impulsado la investigación y desarrollo de nuevas moléculas o compuestos químicos, que puedan inhibir el crecimiento de patógenos multirresistentes a los antibióticos (*MDR*, por sus siglas en inglés), emitiendo una lista de patógenos prioritarios, entre las que destacan bacterias como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus*

*aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Con base a lo anterior es necesario contar con nuevos compuestos, que permitan combatir la actual “crisis de resistencia a los antibióticos”, y es aquí, donde las *AgNPs* pueden ser una opción viable para esa finalidad (World Health Organization, 2020; Merck Sharp & Dohme Corp. MSD, 2020; Polanco, *et al*, 2013; Quiñones, 2017).

Un ejemplo de la pérdida de sensibilidad a los antibióticos, por parte de las bacterias multirresistentes, son los estudios realizados por Betrán, *et al*, 2020, que mencionan una resistencia por parte de *Escherichia coli*, superior al 20%, contra ciprofloxacino y amoxicilina, en infecciones urinarias en contagios nosocomiales; Solano, *et al*, 2019, mencionan la ineffectividad de tratamientos básicos contra otitis media. Otro caso, son los perfiles de resistencia publicados por Choque Día, 2020, en el que se evidencia la resistencia en urocultivos tomados en el Hospital Carlos Alberto Seguin Escobedo, donde el uso de antibióticos como el ácido nalidíxico, ampicilina y ciprofloxacino, resulta ineficiente en más del 50% de los casos, llegando a 89.7% en el caso de *Escherichia coli*.

## **2.4 Nanopartículas como antimicrobianos.**

### **2.4.1 Posibles campos de utilización.**

Lo anterior hace evidente la necesidad de crear nuevos compuestos con actividad antimicrobiana, y es ahí, donde la nanotecnología está cobrando mayor relevancia. Diversos grupos de investigación han demostrado que las nanopartículas metálicas (óxido de zinc, oro, plata, cobre, etc.) poseen citotoxicidad baja, y una actividad antibacteriana resaltable contra cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (Ali, *et al*, 2016).

### **2.4.2 Mecanismos de acción propuestos para las nanopartículas de plata.**

Los mecanismos de acción antibacteriana propuestos para las *AgNPs* descritos hasta el momento (Figura 8), incluyen al estrés oxidativo producido por los iones de plata, mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO's); la inhibición de procesos de respiración mediante la inactivación de la coenzima Q; la interacción con el azufre de la membrana bacteriana que modifican su

permeabilidad, que aunado al mecanismo de “squeezing”, es deformada hasta la lisis. Por otro lado, los iones de plata pueden unirse a grupos fosfato de ADN, impidiendo su replicación, incluso las AgNPs son capaces de inactivar la enzima fosfomanosa isomerasa, inhibiendo la glucólisis (Coutiño, *et al*, 2017; Simón, 2020; Ivask, 2014; Marin-Llera, *et al*, 2012).

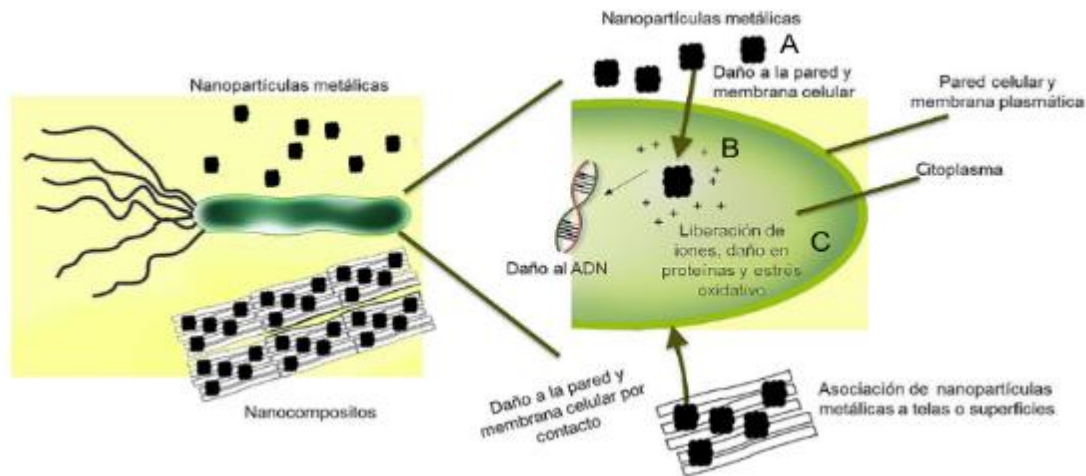


Figura 8. Mecanismo de acción propuestos para nanopartículas metálicas. A) Daño a la pared celular; B) Liberación de iones metálicos; C) Daño en proteínas y estrés oxidativo (fuente: [https://www.researchgate.net/figure/FIGURA-2-Mecanismo-de-accion-de-las-nanopartículas-sobre-celulas-bacterianas\\_fig1\\_326611458](https://www.researchgate.net/figure/FIGURA-2-Mecanismo-de-accion-de-las-nanopartículas-sobre-celulas-bacterianas_fig1_326611458)).

## 2.5 Principales bacterias farmacorresistentes.

En 2017, la OMS emitió la primera lista de patógenos prioritarios, debido a su elevada resistencia a los antibióticos, es imprescindible desarrollar nuevas moléculas que puedan inhibir su crecimiento.

La lista de patógenos muestra una agrupación por relevancia: crítica, elevada y media. La agrupación crítica incluye a *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, resistentes a carbapenémicos. La categoría elevada, está integrada por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter spp*, el género *Salmonella* y *Neisseria gonorrhoeae*, mientras que la categoría media está conformada por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Shigella spp*. (World Health Organization, 2017).

### **2.5.1 *Pseudomonas aeruginosa*.**

Esta bacteria es un bacilo Gram negativo con morfología colonial puntiforme, lisa, con bordes reglados en agar específico Cetrimide, con la producción de una coloración verdosa característica de la especie, de igual forma se puede caracterizar en agar McConkey con crecimiento de color blanquecino, ya que son incapaces de utilizar la lactosa, dan positivo para la prueba bioquímica de citocromo peroxidasa, citrato, gluconato, glucosa, malato y manitol, pero negativo a arabinosa, fenilacetato, maltosa y manosa; produce  $\beta$ -hemólisis, y puede crecer a 42°C, producción de pirocianina y pioverdina en los medios King A y King B respectivamente. En algunas especies de *Pseudomonas* es una bacteria aerobia (Callicó, *et al*, 2004).

Es un patógeno oportunista, capaz de causar infecciones nosocomiales, las cuales pueden conducir a sepsis y muerte de los pacientes infectados, esta bacteria posee una versatilidad resaltable, caracterizada por su capacidad de crecer a un rango amplio de temperaturas (4 a 42°C), su capacidad de adhesión a diferentes superficies, establecimiento de biopelículas, así como su capacidad de tolerar bajas concentraciones de oxígeno y nutrientes escasos. Esto aunado a su enorme capacidad adaptativa, que le ha otorgado la posibilidad de producir metalo- $\beta$ -lactamasas, la producción de biofilm selectivamente permeable, entre otros (Ochoa, *et al*, 2013).

### **2.5.2 *Escherichia coli*.**

Es un bacilo Gram negativo, corto que posee flagelos para darle motilidad, de colonias circulares, bordes regulares, opacas y convexas en agar sangre, bioquímicamente lo podemos caracterizar como catalasa positivo, oxidasa negativo, nitrato positivo, indol positivo, lisina descarboxilasa positivo, productor de gas, fermentadores de glucosa y lactosa, anaerobio facultativo, en su superficie presentan antígeno O (somático) en la parte externa de los lipopolisacáridos, poseen de igual forma antígenos K de envoltura y H (flagelares). Esta bacteria vive de manera normal en el microbiota intestinal, aunque puede llegar a adquirir un comportamiento patógeno. Esta bacteria puede llegar a volverse patógeno afectando principalmente tres sistemas: urogenital, digestivo y nervioso central

clasificándose por las enfermedades que provocan como diarrogénicas, uropatógenas y causantes de meningitis (González, 2013).

Se ha descrito que *E. coli*, ha desarrollado sistemas de producción de betalactamasas de espectro extendido, mutaciones para cambiar la enzima diana, bombas de eflujo para tetraciclinas, inactivación enzimática por acetilación del cloranfenicol, entre otros (WHO, 2021; Mosquit, *et al*, 2011).

### **2.5.3 *Salmonella typhimurium*.**

*Salmonella typhimurium* es una enterobacteria, que puede crecer en un rango de pH 4-8, y temperaturas entre 8-45°C, con morfología colonial puntiforme, de bordes lisos, convexa, transparentes con punto negro en el centro en medio XLD, además, posee flagelos y es anaerobia facultativa fermenta glucosa, es negativo para indol, lactosa, y urea, pero lisina y ornitina positivo. Esta bacteria Gram negativa es responsable de la fiebre tifoidea, y se puede encontrar con mayor frecuencia en Asia, África y Sudamérica, donde el acceso al agua potable es limitado, siendo países en vías de desarrollo con mayor retraso los principales afectados por dicha enfermedad. La transmisión de *Salmonella* es fecal-oral principalmente, incluyendo también alimentos contaminados (ORPHANET, 2021).

Este patógeno ocasiona infecciones intracelulares, principalmente en los macrófagos y su diseminación por el organismo, es mediante los vasos sanguíneos, lo cual puede conducir a la muerte del hospedero. De los mecanismos de resistencia, podemos encontrar los plásmidos, o mutaciones en el cromosoma para la generación de resistencia a diferentes antibióticos (Ríos, *et al*, 2019; Flores Aguilar, 2003).

### **2.5.4 *Staphylococcus aureus*.**

Es un coco Gram positivo sin movilidad, capaces de colonizar sitios diversos en sus hospederos, se puede describir como anaerobia facultativa, capaz de sobrevivir en ambientes con más del 7% de NaCl, siendo el medio de crecimiento sal-manitol o Chapman que los hacen casi selectivos, se pueden observar cómo colonias puntiformes blanquecinas, opacas, de borde regular convexas en ambos agares; en las pruebas bioquímicas son catalasa positivo y coagulasa positivo, así

como la producción de fosfatasa alcalina. Este patógeno es capaz de establecer biopelículas, secretar toxinas, hemolisinas, superantígenos, entre otras (Cervantes, *et al*, 2014).

Las infecciones causadas por este microorganismo, se producen con frecuencia después de lesiones cutáneas, tienden a ser supurativas con abscesos y penetrar en el organismo hasta el sistema nervioso central, tracto urinario y sistema respiratorio. Se ha descrito que *S. aureus*, presenta resistencia por beta-lactamasas y la sobreproducción de estas enzimas, así como la modificación de proteínas de unión a la penicilina. Las primeras cepas MRSA (meticilino resistentes, por sus siglas en inglés), fueron reportadas a finales de la década de los 60's, se logró identificar un mecanismo de resistencia, la producción de la proteína PBP2a que funciona como el resto de las PBP's, estas enzimas siguen formando la pared celular de la bacteria, aún con la presencia de antibióticos betalactámicos (Cervantes, *et al*, 2014; Torroba, *et al*, 2000).

### **3 Planteamiento del problema.**

La elevada resistencia a los antibióticos exhibida cada vez por más especies bacterianas, se ha convertido en un problema grave en los sistemas de salud internacionales, por lo que es crucial el desarrollo de estrategias y herramientas que permitan combatir esta problemática. Entre las opciones más destacadas, se encuentran las *AgNPs*, cuya síntesis química, suele generar una gran cantidad de sustancias contaminantes, por lo que su obtención mediante extractos extracelulares de *N. corallina* y  $\text{AgNO}_3$  como precursor, podrían representar una opción eco-amigable, que además colabore en la batalla contra la multiresistencia a los antibióticos, siendo imprescindible evaluar la actividad antimicrobiana de las *AgNPs* sintetizadas.

### **4 Pregunta de investigación.**

¿Es posible sintetizar *AgNPs*, con actividad antibacteriana, utilizando los extractos extracelulares de *N. corallina*?

## 5 Hipótesis.

Los extractos extracelulares de *N. corallina* permitirán la síntesis de *AgNPs*, con actividad antibacteriana, variando condiciones de pH y composición del medio de cultivo.

## 6 Objetivos.

General.

- Sintetizar y caracterizar *AgNPs*, obtenidas a través de los extractos extracelulares de *N. corallina*, a partir de  $\text{AgNO}_3$  y determinar su actividad antibacteriana de las *AgNPs*.

Particulares.

- Obtener extractos de *N. corallina* de los medios GYEA e ISP2 a pH 7.0 y 8.5, con diferentes concentraciones de inductor ( $\text{KNO}_3$  20, 30, 40 mM) y control (sin agente inductor)
- Sintetizar las *AgNPs* a partir de  $\text{AgNO}_3$ , usando extractos de *N. corallina*, variando pH de 7.0 y 8.5 de los medios de cultivo GYEA e ISP2 y concentración de inductor ( $\text{KNO}_3$  20, 30, 40 mM) y control.
- Determinar, en función de los medios GYEA e ISP2, como la variación del pH 7.0 y 8.5, influyen en el tamaño y forma de las *AgNPs*
- Caracterizar el tamaño y la forma de las *AgNPs*, mediante técnicas espectroscópicas y microscópicas.
- Determinar la actividad antibacteriana de las *AgNPs* contra *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *S. aureus* (ATCC 43300, 29213, 25923), *E. coli* (ATCC 25922) *K. pneumoniae* (ATCC 700603) y *S. typhimurium* (ATCC 14028), mediante la técnica de Kirby-Bauer y la concentración mínima inhibitoria.

## 7 Metodología.

### 7.1 Obtención de los caldos de fermentación de *N. corallina* B-276.

*N. corallina* B-276 se sembró en caldo nutritivo y se dejó en crecimiento por 48 h a  $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$  en agitación orbital a 230 rpm, del caldo se tomó una asada y se sembró

por estría cruzada en medio de agar Müller-Hinton. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 5 días, observando la aparición de colonias puntiformes de bordes regulares redondos, convexas de color salmón-naranja, características de *N. corallina*, se buscaron bacilos largos pseudofilamentosos en forma de “Y”, Gram positivos.

Colonias aisladas de las placas fueron inoculadas en 10 mL de caldo de GYEA (10 g/L de glucosa, 10 g/L de extracto de levadura) e ISP2 (10 g/L de glucosa, 10 g/L de extracto de malta, 1 g/L de extracto de levadura) pH 7.0 con diferentes concentraciones de KNO<sub>3</sub> (20mM, 30mM y 40mM) y sin inductor (control), e incubadas a 28°C durante tres a cinco días. El cultivo resultante, fue resembrado en placas del mismo medio e incubado bajo las mismas condiciones, con el objetivo de obtener colonias aisladas. Una colonia aislada fue inoculada nuevamente a caldo del mismo medio, e incubado a las mismas condiciones descritas anteriormente, hasta alcanzar una turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland, equivalente a 1.5x10<sup>8</sup> unidades formadoras de colonias (UFC)/mL (Hernández, 2018; Arellano, 2020).

A continuación, se inocularon caldos de medio GYEA e ISP2, a diferentes concentraciones de KNO<sub>3</sub> (20 mM, 30 mM y 40 mM) y control; ajustando el pH a 7.0 y 8.5, con un inóculo al 1% v/v y una densidad óptica de 0.5 unidades McFarland de *N. corallina* y se incubó a 28°C, en una incubadora con agitador rotatorio de 230 rpm, durante 2 días, para asegurar la presencia de enzimas nitrato reductasa y del complejo de óxido reductasas.

Cada medio se elaboró por triplicado. Se consideraron controles negativos los medios GYEA e ISP2, con las mismas condiciones de pH, sin la adición de KNO<sub>3</sub>. así como la actividad reductora que pueda presentar el caldo de fermentación (Shanmugasundaram, *et al*, 2017).

El cultivo resultante fue sometido a centrifugación de 8000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue conservado a 4°C en viales sellados, hasta su uso posterior.



## **7.2 Cuantificación de proteínas totales de los extractos de *N. corallina*.**

Se centrifugó el caldo de fermentación a 800 rpm para separar la biomasa del sobrenadante. Se realizó la cuantificación de proteínas, de acuerdo con el método establecido por Bradford (1976) usando el sobrenadante del caldo de fermentación, se utilizó 1 mL de la muestra con 200  $\mu$ L del reactivo de Bradford, la curva de calibración se realizó utilizando diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina.

## **7.3 Síntesis extracelular de las nanopartículas de plata.**

A 50 mL de  $\text{AgNO}_3$  1 mM fueron añadidos 50 mL del extracto crudos de la fermentación de *N. corallina* obtenido de los diferentes medios. La mezcla fue incubada a 40°C por 48 h. La reducción de la plata fue identificada mediante el cambio de coloración de la mezcla, de amarillo pálido a café-rojizo.

La mezcla de reacción se centrifugó a distintas velocidades, con la finalidad de remover componentes del medio o partículas grandes. Inicialmente, se centrifugó a 8000 rpm por 10 min, el sobrenadante fue recuperado y centrifugado a 10000 rpm durante 35 min, cuyo pellet se lavó con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.1 X y fue recuperado centrifugándolo a 14000 rpm por 35 min, se realizaron otros dos lavados más con agua estéril y se concentraron las *AgNPs* obtenidas repitiendo el último paso de centrifugación. Las *AgNPs* obtenidas para los ensayos microbiológicos fueron resuspendidas en agua estéril, mientras que, las utilizadas para la caracterización, se resuspendieron en 200  $\mu$ L de buffer de PBS 0.1X, ambas se almacenaron en viales sellados a temperatura de 4°C y sin exponerse a la luz para su posterior uso (Shanmugasundaram, *et al*, 2017).

## **7.4 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de plata.**

### **7.4.1 Caracterización de las nanopartículas de plata por espectrofotometría UV/Vis.**

Se tomó 1 mL de la solución concentrada de *AgNPs* (sección 8.3) y se colocó en la celda de cuarzo. Se utilizó una solución de referencia de  $\text{AgNO}_3$  1 mM preparada

en la sección 8.3 para observar la síntesis de las *AgNPs*, se utilizó agua destilada como blanco. Se obtuvo un barrido de la solución de las *AgNPs*, a una longitud de onda que va de 300 nm a 700 nm en un equipo marca Beckman Coulter DU730 UV-Vis Spectrophotometer.

#### **7.4.2 Caracterización morfológica de las nanopartículas de plata por TEM.**

Las muestras fueron preparadas mediante aspersion de la suspensión de *AgNPs* en buffer de PBS 0.1 X, sobre rejillas de cobre cubiertas por colodión, se colocó una capa de carbón y se pusieron a secar al vacío. Una vez secas las muestras se determinó la morfología de las *AgNPs*, mediante la técnica de TEM en un equipo JEOL modelo Jem-2010F con el programa Digital Micrograph versión 3.7.0.

#### **7.4.3 Caracterización de las nanopartículas de plata por FT-IR.**

El análisis por FT-IR se realizó en un equipo IRAffinity-1 Shimadzu. La solución concentrada de *AgNPs* fue centrifugada a 14000 rpm por 15 min; se descartó el sobrenadante, el pellet se dejó secar en una estufa a 37°C por 48 h, se elaboraron tabletas de KBr al 10% de *AgNPs* para su análisis.

#### **7.4.4 Tamaño de Partícula de las nanopartículas de plata.**

El análisis dispersión de luz dinámica, (DLS, por sus siglas en inglés), de todas las *AgNPs*, se realizó con un sistema DLS Zetasizer Nano ZS90 equipado con un láser verde (532 nm, 4 mW) y un detector de fotodiodo de avalancha (APD) (eficiencia cuántica >50 % a 532 nm) (Malvern Instruments Ltd. Inglaterra). La intensidad de la luz de dispersión medida, se muestra como velocidad de recuento de los fotones, con una unidad de recuento de kilociclos por segundo (kcps). Debido a las diferentes intensidades de luz dispersada de *AgNPs* con diferentes tamaños, la potencia del rayo láser incidente, debe ajustarse para obtener una velocidad óptima de conteo de los fotones. La potencia del láser incidente, se ajustó a niveles específicos según fue necesario mediante el uso de un atenuador incorporado. Se utilizó el software Malvern DTS versión 5.10 para procesar y analizar los datos. Todos los tamaños de nanopartículas promedio informados, se basan en promedios ponderados de intensidad de luz dispersada. Para cada suspensión de

muestra, se realizaron dos mediciones de DLS, con un tiempo de ejecución fijo de 20 s. El ángulo de dispersión se fijó en 90°.

#### **7.4.5 Potencial Z de las nanopartículas de plata.**

La medición del potencial Z, se realizó en una celda capilar curva a 25°C. Se resuspendieron 5 mL de la solución concentrada de *AgNPs* en una solución de NaCl ( $2 \times 10^{-2}$  M) como electrolito para la medición, se le añadió PBS 0.1X a diferentes valores de pH (5.5, 7.3 y 7.5). La muestra fue agitada por 30 min, se determinó el pH final para observar si se presentaba una variación en éste. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado en un equipo Zetasizer nano zs90 (Czajkowska – Kosnik, *et al*, 2015; Mohammed, *et al*, 2014).

#### **7.5 Prueba de Kirby-Bauer y determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las nanopartículas de plata sintetizadas.**

Las cepas de referencia de *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *S. aureus* (ATCC 43300: 29213, 25923), *E. coli* (ATCC 25922) *K. pneumoniae* (ATCC 700603) y *S. typhimurium* (ATCC 14028), almacenadas en viales de gelosa especial a 4°C, en el cepario bacteriano del Laboratorio de Bacteriología Experimental, del Instituto Nacional de Pediatría (LBE-INP), fueron inoculadas en 3 mL de caldo nutritivo e incubadas a 37°C durante 18-24 h. El cultivo resultante, fue sembrado por estría cruzada en placas de agar Müller-Hinton, con la finalidad de obtener colonias aisladas.

Las colonias aisladas de cada cepa fueron inoculadas en 3 mL de caldo nutritivo, e incubadas a 37°C hasta alcanzar una turbidez equivalente al estándar 0.5 McFarland, correspondiente a absorbancias entre 0.08-0.1 a una longitud de onda de 625 nm.

Se tomó una alícuota del caldo de cultivo ajustado a 0.5 McFarland, cada cepa fue inoculada en cajas Petri por estría masiva, colocando sensidiscos de 6mm de diámetro cargados con 10 µL de sol. de *AgNPs*, ajustadas a una concentración aproximada de 1 µg/10µL en peso húmedo.

El cultivo bacteriano ajustado a 0.5 McFarland, fue diluido en una relación 1:10 con solución salina, del cual se tomaron 10 µL para ser depositados en micropozos independientes, de una placa de 96 micropozos, se realizaron pruebas con diluciones seriadas de *AgNPs*, usando soluciones de concentración aproximada de 13.3, 6.6, 3.3, 1.65, 0.825 µg/mL de peso húmedo, siguiendo los criterios y recomendaciones del CLSI (*Clinical Laboratories Standard Institute*), por sus siglas en inglés) en su documento M07, bajo la rúbrica “método de microdilución en caldo” (CLSI, 2018).

## **7.6 Análisis estadístico de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata.**

Para evaluar las condiciones de la síntesis de las nanopartículas, en las que se presenta la mejor actividad antibacteriana, se llevó a cabo, una comparación de medias, para determinar las diferencias entre los halos de inhibición, de las diferentes condiciones de cada medio, eligiendo las que presentaran mayor halo de inhibición. Para la prueba de CMI, se procedió a realizar el análisis de homocedasticidad de las muestras de medio GYEA e ISP2 a pH de 7.0 y 8.5 control; se realizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, para determinar si existía una diferencia estadística entre las condiciones. Se utilizó como programa estadístico GraphPad Prism, versión 8.0.1 así como para graficar, de igual forma se utilizó el programa Excel 360, ver. 20, para graficar los espectros UV-Vis y FT-IR.

## **8 Resultados y discusión de la determinación fisicoquímica y de actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata.**

### **8.1 Cultivo y aislamiento de *N. corallina*.**

Un vial de *N. corallina* del Laboratorio de Biotransformaciones UAM-X, fue sembrado por estría cruzada en placas de agar GYEA pH 7.0, e incubadas a 28°C durante 48 h. Colonias aisladas fueron teñidas mediante tinción de Gram, identificando una contaminación del cultivo con bacilos Gram negativos (Figura 9), por lo cual, una colonia aislada fue inoculada en caldo nutritivo, e incubada a 28±0.5°C durante 48 h bajo agitación orbital constante a 230 rpm. El cultivo

resultante fue sembrado por estría cruzada en placas de agar Müller-Hinton, incubadas a  $28\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  durante 48 h. Se realizó tinción de Gram de las colonias aisladas, para verificar la presencia/ausencia de contaminación. Este proceso fue repetido aproximadamente 10 ocasiones, hasta visualizar en las placas de agar, una morfología colonial única que correspondiera a *N. corallina* (Figura 10).

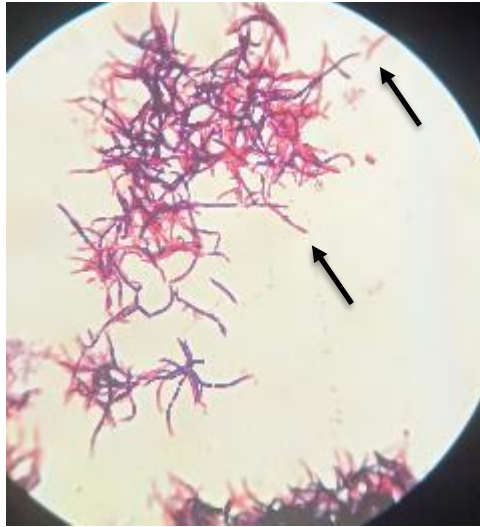


Figura 9.- Cultivo de *N. corallina* contaminado con bacilos Gram negativos, visto al microscopio (100x).

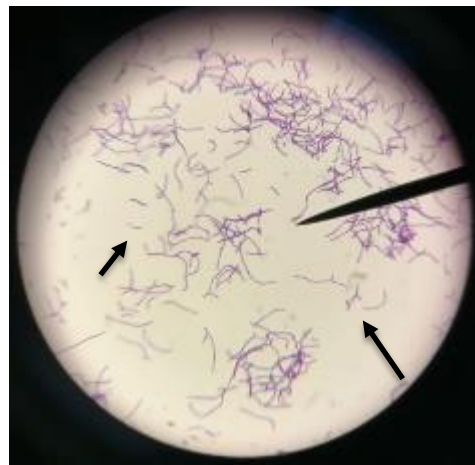


Figura 10.- Cultivo de *N. corallina* teñido mediante la técnica de Gram, aislado sin contaminación, visto al microscopio (100x).

## 8.2 Síntesis de las nanopartículas de plata.

Se observó la síntesis de *AgNPs* en los medios GYEA e ISP2 a pH 7.0 y 8.5 control y  $\text{KNO}_3$  20, 30, 40 mM, gracias al cambio de coloración del medio de amarillo a

café-rojizo, esto debido a la reducción del metal que pasa de  $Ag^{+1}$  a  $Ag^0$  (Figura 11).



Figura 11.- Cambio de coloración de medios de fermentación. A) medios antes de la fermentación, B) medios después de la fermentación

Rajegaonkar, *et al*, 2018, usando actinobacterias aisladas de la ciudad de Jalana, India, obtuvieron *AgNPs* usando incubación a  $30^{\circ}C$  en agitación, con el mismo precursor de plata que en este trabajo, pero con la diferencia de usar 3 días más en la síntesis, es decir, ellos utilizaron 5 días en la obtención de sus *AgNPs*. En la revisión presentada por Esquivel-Figueroa, *et al*, 2021, hacen referencia a diversas biosíntesis usando *Lactobacillus sp.*, *Shewanella oneidensis*, *Pseudomonas antarctica*, *Pseudomonas proteolytica*, *Arthrobacter gangotriensis*, *Pseudomonas mandelli* y *Psychrobacter sp.*, en los cuales se pudo observar la reducción de la plata.

### 8.3 Cuantificación de proteínas totales de los extractos de *N. corallina*.

Se realizó una curva de cuantificación de proteínas totales, basada en el método de Bradford, obteniendo una curva de calibración con albúmina sérica bovina, que se expresó por la ecuación  $y=0.0665x+0.1776$ , con un coeficiente de determinación de 0.9932. La curva de calibración permitió calcular la cantidad de proteínas totales presentes en las muestras, en un rango de 0.3-1.2  $\mu g/mL$ . (Figura 12).

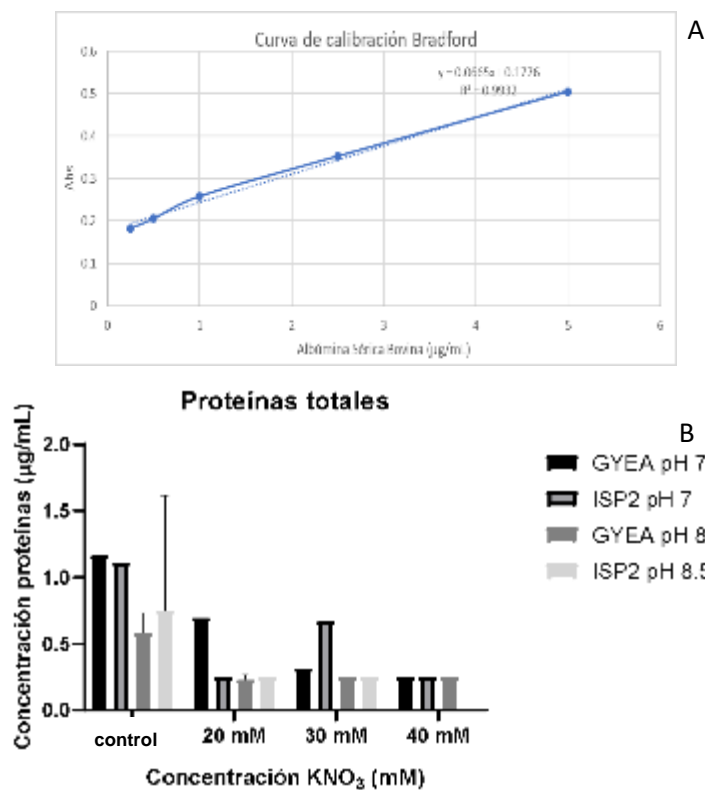


Figura 12.- A) Curva de calibración de cuantificación de proteínas totales; B) Concentración de proteínas totales de los medios GYEA e ISP2 pH 7.0 y 8.5, control y KNO<sub>3</sub> 20, 30, 40 mM de *N. corallina*

Con base a los resultados obtenidos, se pudo observar que se reduce la cantidad de proteínas totales conforme aumenta la cantidad de KNO<sub>3</sub> en el medio, siendo probable, que se deba a la inducción de estrés oxidativo causado por dicho agente, y que puede producir especies reactivas de nitrógeno (Camps, 2010).

#### 8.4 Caracterización por espectrofotometría UV/Vis de las nanopartículas de plata.

Las *AgNPs* fueron resuspendidas en PBS 0.1X. Los análisis espectrales, exhibieron picos máximos de absorbancia de 395-398 nm para las *AgNPs* sintetizadas a pH 7.0, en contraste, las obtenidas a pH 8.5 mostraron picos máximos en un rango de 395 a 400 nm, característicos del plasmón de plata (Figura 13), debido a lo anterior, se puede hacer una inferencia de tamaño para las *AgNPs* obtenidas de los medios de pH 7.0 de aproximadamente entre 10-50 nm de diámetro, mientras que las obtenidas de pH 8.5, se estima un tamaño de 80-150

nm, tamaños aproximados que no se distancian mucho de los resultados obtenidos en la determinación de tamaño de partícula por DLS.

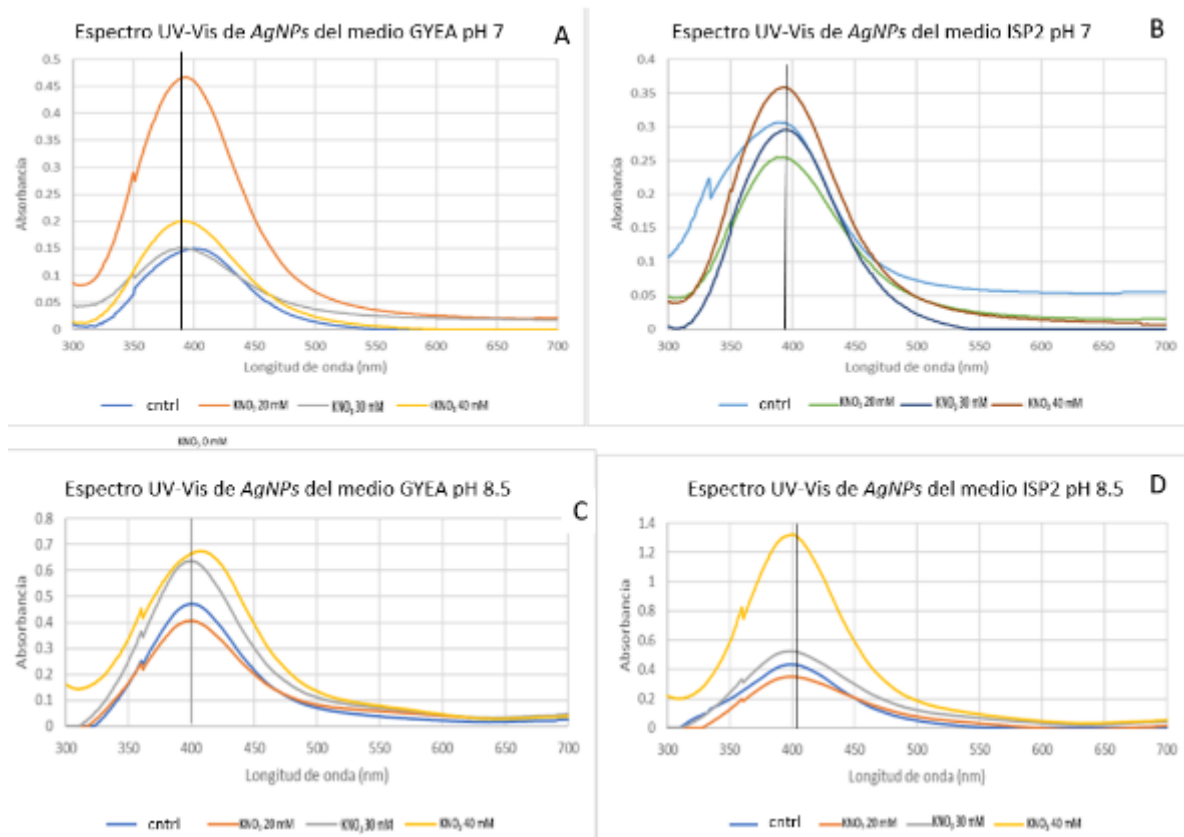


Figura 13.- Espectros UV-Vis de AgNPs obtenidas de los medios A) GYEA pH 7.0 control y KNO<sub>3</sub> 20, 30, 40 mM; B) ISP2 pH 7.0 control y KNO<sub>3</sub> 20, 30, 40 mM; C) GYEA pH 8.5 control y KNO<sub>3</sub> 20, 30, 40 mM; D) ISP2 pH 8.5 control y KNO<sub>3</sub> 20, 30, 40 mM.

Escobar Falconi, 2015, describe la relación entre el pico máximo de absorbancia de las AgNPs, con su tamaño de partícula. Ha sido descrito en las ecuaciones de Maxwell, que la absorbancia del plasmón del metal, en este caso de la plata, va a ser dependiente de diversos factores, como lo es el tamaño de la nanopartícula analizada, forma y del medio en que se realice la medición, incluso, se puede observar esta relación de tamaño/pico máximo de absorción en la ficha técnica de las nanopartículas comerciales de Sigma Aldrich (Figura 5), por lo anterior, se puede inferir que en los medios de pH 7.0, se puede obtener una caracterización preliminar de las AgNPs, con un tamaño promedio entre 10 y 50 nm, mientras que en los medios de pH 8.5 se observa el desplazamiento del pico máximo de absorción a la derecha, por lo cual, se puede inferir un mayor tamaño de 50 a 100 nm (Cruz *et al*, 2011; Campbell & Xia, 2007; Xia & Halas, 2005).



En la literatura, se pueden observar diversos estudios realizados con biosíntesis para la obtención de *AgNPs*, teniendo tamaños de partícula mayores a los obtenidos en este proyecto, por ejemplo, Ahmed, *et al*, 2020, usaron el sobrenadante del cultivo de *Bacillus subtilis* para la obtención de *AgNPs*, en su trabajo, obtuvieron el máximo de absorción del plasmón de plata en 410 nm, correspondiendo a un tamaño de 5-50 nm de diámetro, en su mayoría esféricas. Ajani, *et al*, 2021, para la biosíntesis de *AgNPs* por *Nocardia sp.*, obtuvieron un máximo de absorción a 600 nm, reportando nanopartículas de mayor tamaño aproximadamente 150 nm. Goel, *et al*, 2021, usaron una actinobacteria aislada (*Streptomyces sp.*), con la cual sintetizaron nanopartículas con un máximo de absorción de 433 nm, con un tamaño de partícula de 42.5 nm.

### 8.5 Caracterización por FT-IR de las nanopartículas de plata.

Los análisis por FT-IR, exhibieron una banda cercana a los 1377  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente a la señal de plata descrita por Escobar Falconi, 2015 y Zea Alvares, *et al*, 2017; se observó, además, la banda en 3500  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente al grupo -OH, también fueron visibles las bandas cerca de 1730, 1250  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a grupos C=O y C-C=C, así como sobre tonos correspondientes a sales inorgánicas cerca de los 500  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 14; tabla 4) (Shriner, *et al*, 2003).

Tabla 4.- Señales y grupos funcionales observados en FT-IR

Señal ( $\text{cm}^{-1}$ )	Grupo funcional
1377	Plata
3500	O-H
1730	C=O
1250	C-C=C

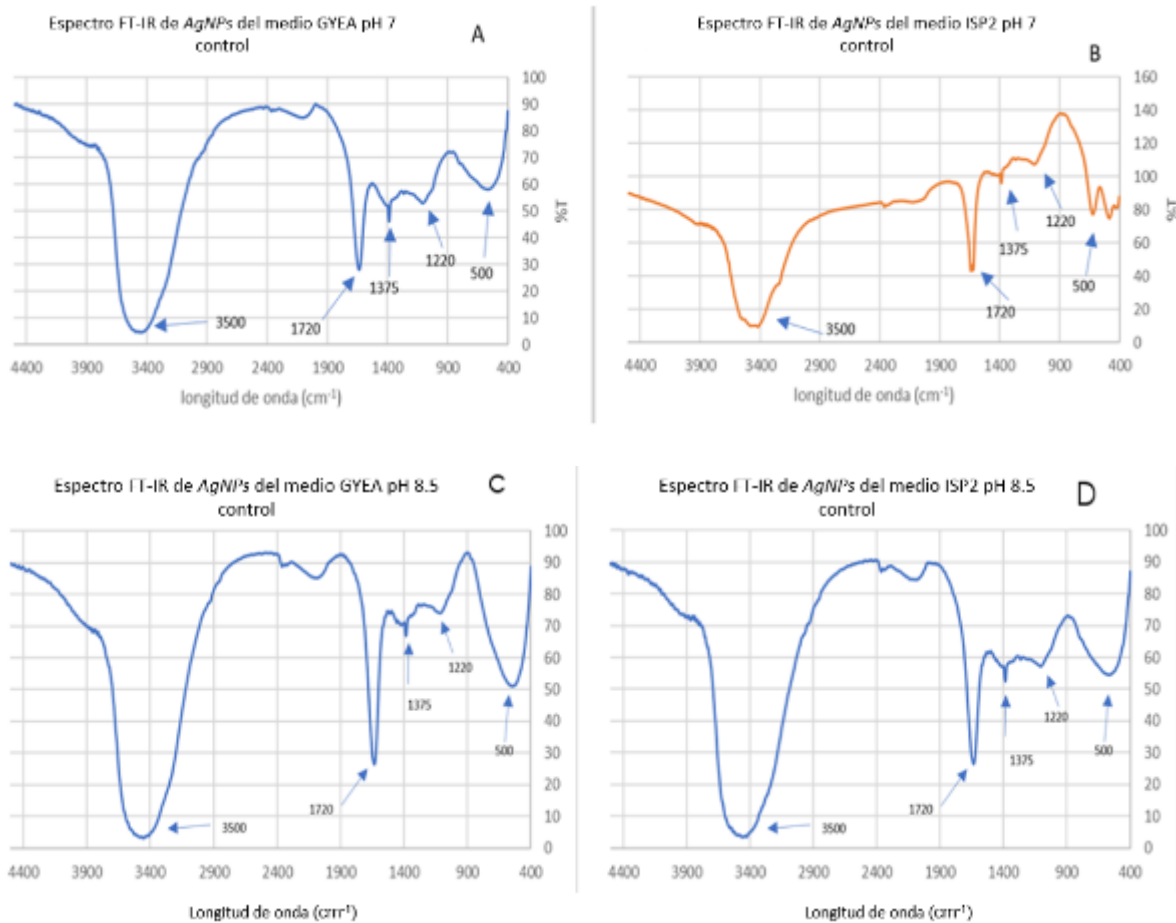


Figura 14.- Espectros IR-FT de *AgNPs* de medio A) GYEA pH 7.0 control B) ISP2 pH 7.0 control C) GYEA pH 8.5 control D) ISP2 pH 8.5 control

Las señales orgánicas visualizadas, podrían corresponder a restos de los medios de cultivo utilizados en la síntesis de *AgNPs*, sugiriendo pasos adicionales de lavado. Estas señales que se presentan a 1730, 1250 y 3500  $\text{cm}^{-1}$ , pueden deberse a la identificación de ácidos grasos, que probablemente provengan de restos de los extractos de levadura, malta e inclusive macromoléculas de la misma bacteria, los cuales pudieron haber quedado incrustados en la síntesis *bottom up*, que se podría suponer que se llevó a cabo en la obtención de las *AgNPs*.

### 8.6 Caracterización por TEM de las nanopartículas de plata.

Las *AgNPs* visualizadas por TEM, mostraron diferencias morfológicas, que se presume, fueron causadas por las diversas condiciones de síntesis, tanto de la composición del medio, como del pH utilizado. En la Figura 15, se observaron las *AgNPs* del medio ISP2 pH 7.0 control, con tamaños de partícula menores a 100 nm, así como los aglomerados que éstas forman, con morfología cuasiesférica; en

la Figura 16 de campo oscuro, se muestra que no existe en la superficie caras definidas ni ángulos, lo que llevó a deducir que su morfología es relativamente homogénea aproximándose a lo esférico.

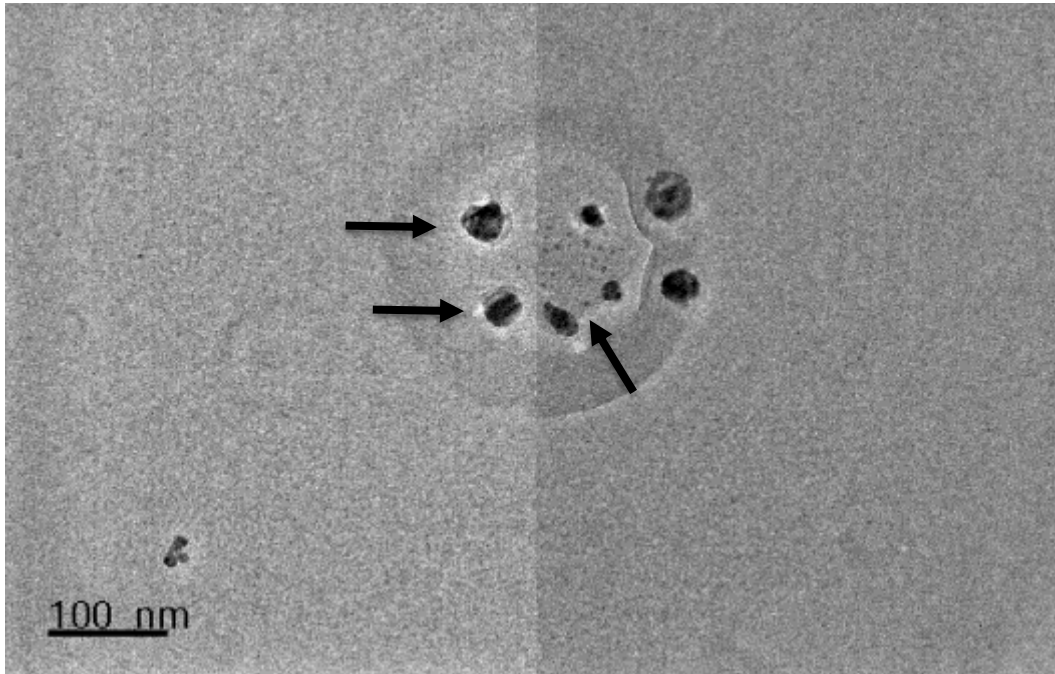


Figura 15.- *AgNPs* obtenidas del medio ISP2 pH 7.0 control, en campo claro.

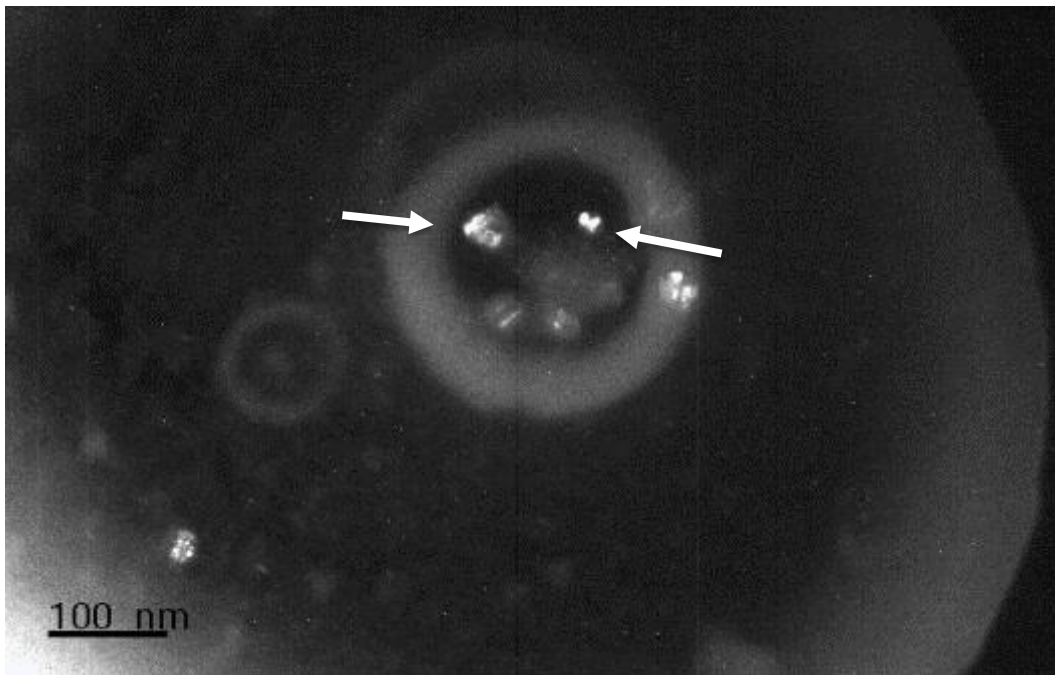


Figura 16.- *AgNPs* obtenidas del medio ISP2 pH 7.0 control, campo oscuro.

En la Figura 17, se observan *AgNPs* sintetizadas en medio GYEA pH 7.0 control, presentando un tamaño menor a los 10 nm de diámetro, así como una morfología uniforme con tendencia esférica. En la Figura 18, en campo oscuro, se visualizó de mejor manera, que la superficie no presentó una cantidad abundante de defectos, lo que hace suponer que, poseen una forma cuasi esférica.

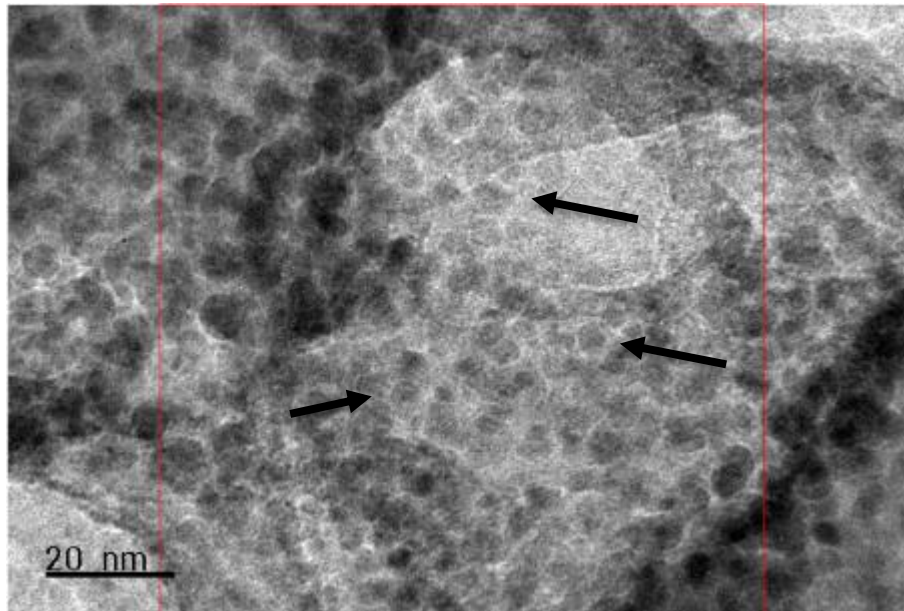


Figura 17.- *AgNPs* obtenidas del medio GYEA pH 7.0 control, campo claro.

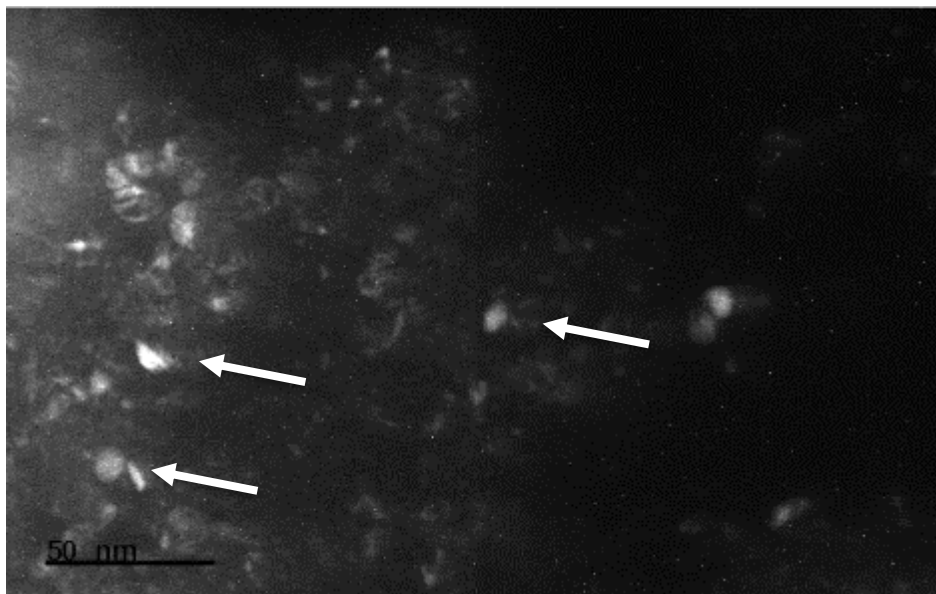


Figura 18.- *AgNPs* obtenidas del medio GYEA pH 7.0 control, campo oscuro.

En la Figura 19, se puede observar las *AgNPs* obtenidas del medio ISP2 pH 8.5 control, con un tamaño mayor a 50 nm aproximadamente y una morfología oval con una superficie con evidencia de defectos.

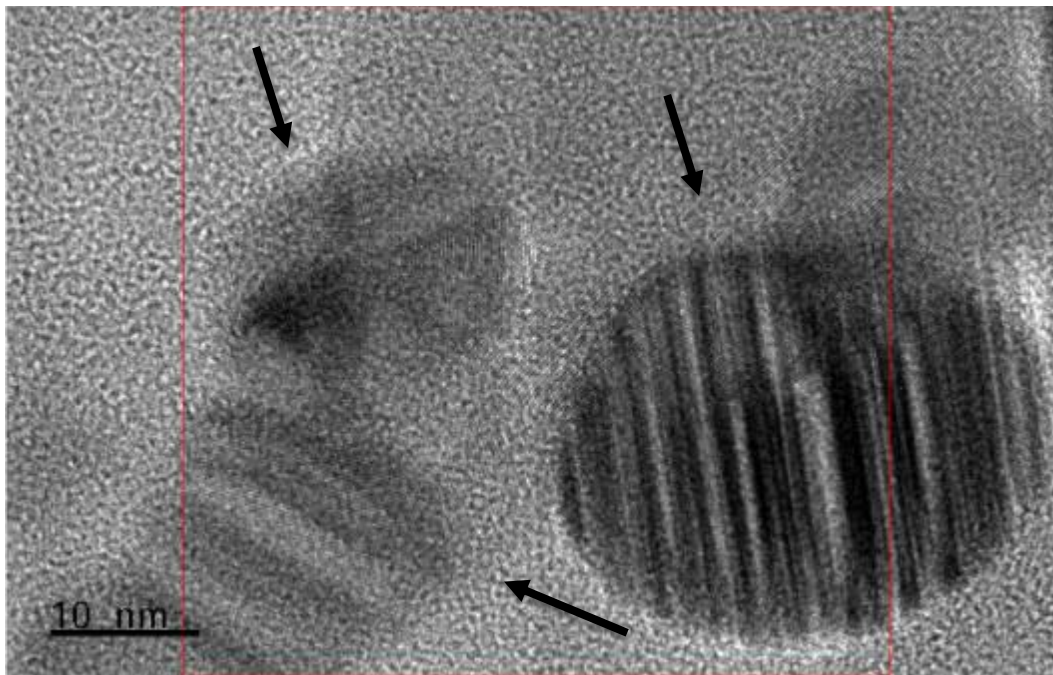


Figura 19.- *AgNPs* obtenidas del medio ISP2 pH 8.5 control, campo claro.

En la Figura 20, se observan las *AgNPs* obtenidas del medio GYEA pH 8.5 control, así como los aglomerados que formaron estas; su morfología se pudo describir como amorfa, con gran cantidad de defectos en la superficie, pero observando la Figura 21, se pudo apreciar una morfología de “flor” y el principio de formación de caras, suponiendo que, con mayor tiempo de reacción, se hubieran podido observar *AgNPs* poliédricas, teniendo como estimado de tiempo de reacción óptimo, el reportado por Rajegaonkar, *et al*, 2018.

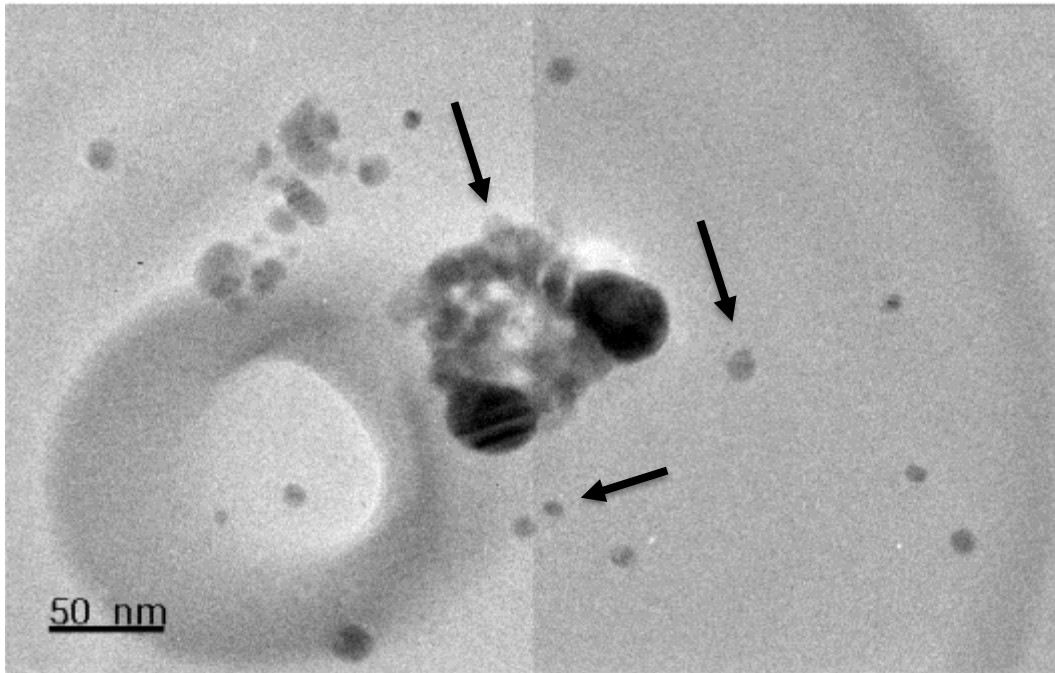


Figura 20.- AgNPs obtenidas del medio GYEA pH 8.5 control, campo claro.

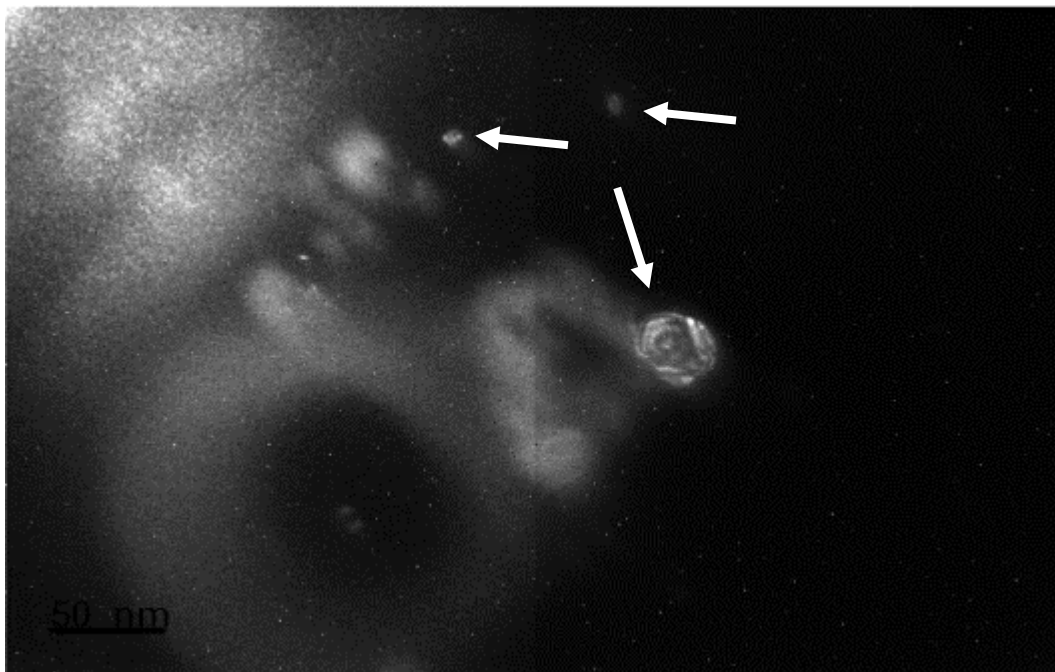


Figura 21.- AgNPs obtenidas del medio GYEA pH 8.5 control, campo oscuro.

Con base en las Figuras obtenidas, podemos suponer que con más tiempo de reacción, se podría haber obtenido una mejor definición en la morfología de la superficie de las nanopartículas, obteniendo características totalmente poliédricas, o formando nanopartículas más aproximadas a lo esférico, además, de manera

general, se encontró que las *AgNPs* sintetizadas a pH 7.0, tanto en medio GYEA e ISP2, presentan morfologías con tendencias esféricas y de menor tamaño, lo cual es destacable al ser el primer estudio de síntesis de *AgNPs*, mediante extractos extracelulares de *N. corallina*, ya que otros autores que han usado otras especies del mismo género, han obtenido nanopartículas entre 20 a 150 nm de diámetro con morfologías variadas, de igual forma, se logró la modulación de un tamaño menor a las reportadas por Pereyra, J., *et al*, 2018, ya que las obtenidas por dicho autor, fueron sintetizadas utilizando *Streptomyces sp.* y obtuvieron tamaños de *AgNPs* entre 17 a 99 nm de diámetro con morfología irregular, así mismo, se puede observar que las *AgNPs* obtenidas en presente trabajo, lograron una mayor aproximación a la forma esférica, esto en comparación a los trabajos de Oves, *et al*, 2013, que las obtuvieron de forma cúbica con los extractos extracelulares de *Stenotrophomonas maltophilia*, con tamaño mayor a 10 nm, así como las triangulares y hexagonales obtenidas de los extractos intracelulares de *Pseudomonas stutzeri* por Klaus, *et al*, 1999, de 20 a 100 nm, o los nanoplatos obtenidos con *Morganella psychrotolerans* por Ramanathan, *et al*, 2011, con tamaños mayores a 20 nm.

### **8.7 Potencial Z y tamaño de partícula de las nanopartículas de plata.**

Los datos generados con la difracción láser y potencial Z, permitió determinar el tamaño de nanopartícula, definido entre 1-3.05 nm para los medios de GYEA e ISP2 pH 7.0, a su vez que exhibieron valores de -8 a -5mV de potencial Z, demostrando así, su estabilidad en solución de PBS 0.1X, ya que se consideran que valores alejados de 0, pueden propiciar menor floculación. En contraparte, las nanopartículas obtenidas de los medios GYEA e ISP2 pH 8.5 mostraron valores mayores de tamaño y un potencial Z menor (Tabla 5).

Tabla 5.- Tamaño de partícula y potencial Z de las *AgNPs* obtenidas de los medios GYEA e ISP2 pH 7.0 y 8.5, control

Muestra	Tamaño de partícula (d.nm)	Potencial Z (mV)
ISP2 pH 7.0 control	3.044±0.4143	-5.07±4.02
GYEA pH 7.0 control	1.421±0.2897	-8.45±5.64
ISP2 pH 8.5 control	107.07±19.78	-18.18±1.57
GYEA pH 8.5 control	165.28±42.28	-8.63±0.97

El uso de *N. corallina* en la biosíntesis de *AgNPs*, a diferencia de las síntesis químicas reportadas en la literatura, mostró mayor heterogeneidad de tamaños de las *AgNPs*, así como la necesidad del proceso de extracción del medio; otros artículos como Kumari, *et al*, 2016, hacen referencia a la extracción por centrifugación, sin embargo, reportaron un tamaño promedio cerca de los 36 nm, Mohammed, *et al*, 2014, mencionaron un tamaño promedio de 10 a 25 nm, a diferencia de las recuperadas en la presente síntesis, donde se obtuvieron nanopartículas menores a 5 nm, de los medios GYEA e ISP2 pH 7.0 control y en los medios GYEA e ISP2 pH 8.5 control, se recuperaron nanopartículas de más de 100 nm, mediante el proceso de “tamizaje” realizado por centrifugación diferencial.

De manera similar, se pudo determinar el valor del potencial zeta en medio de PBS 0.1X, que fue parecido a las obtenidos por Kumari, *et al*, 2016, y Ronquillo de Jesús, *et al*, 2018, siendo menores a -5 mV, los que concluyeron que las *AgNPs* poseyeron una estabilidad prolongada en solución acuosa.

### 8.8 Actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata.

La actividad antibacteriana exhibida por las *AgNPs* sintetizadas en la presente investigación, mostró ser heterogénea para las especies bacterianas analizadas, lo cual podría deberse no solo a las características de las nanopartículas, sino a las diferencias propias de cada bacteria, como la constitución de su pared celular,



membrana celular, actividad bioquímica, resistencia intrínseca, entre muchos otros factores.

### 8.8.1 Actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata vs *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

Se realizó la prueba de Kirby-Bauer (Figura 22), y se observó que las condiciones de los medios GYEA e ISP2 a pH 8.5 con control y KNO<sub>3</sub> 20, 30, 40 mM, no presentaron actividad, mientras que las de los medios GYEA pH 7.0, solo presentaron actividad las condiciones control y KNO<sub>3</sub> 40 mM, y las de ISP2 pH 7.0, mostraron actividad en todas las condiciones de KNO<sub>3</sub> 20, 30, 40 mM y control.

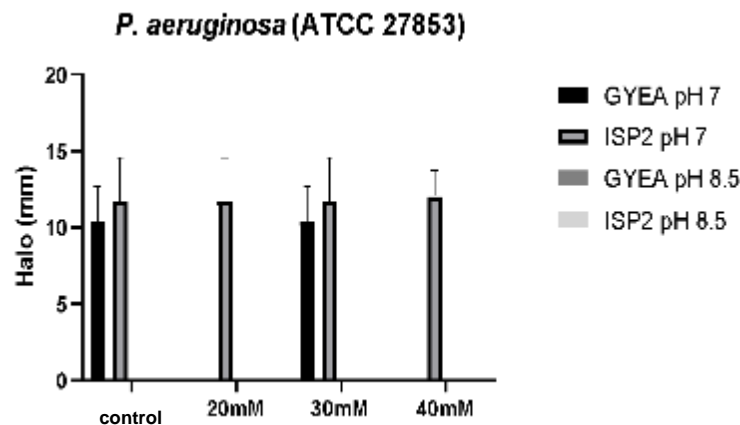


Figura 22.- Halos de inhibición de las AgNPs de los medios GYEA e ISP2 pH 7.0 y 8.5, control y KNO<sub>3</sub> 20, 30, 40 mM vs *P. aeruginosa* (ATCC 27853).

La CMI de las AgNPs sintetizadas de los medios GYEA e ISP2 pH 7.0, mostraron la inhibición total del crecimiento con 3.3 µg/mL, en contraste a los medios GYEA e ISP2 pH 8.5 que no exhibieron inhibición a las concentraciones evaluadas (Figura 23). Los datos obtenidos, no presentaron una distribución normal, por lo que se empleó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, para determinar diferencias entre ambos medios de dicho pH, obteniendo un valor  $p=0.8368$ , lo que indica que no hay diferencia significativa entre ellos.

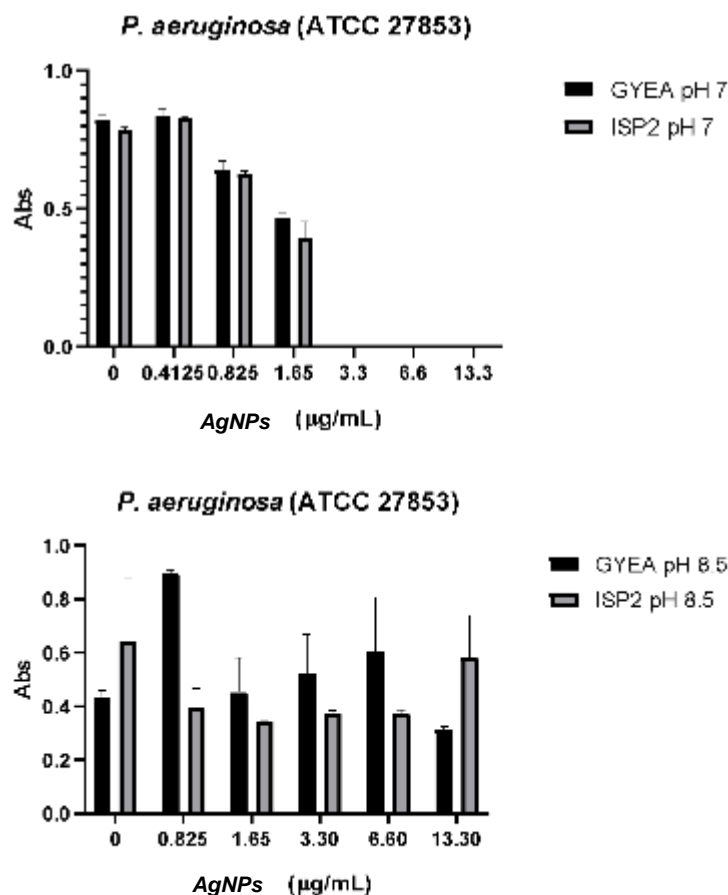


Figura 23.- CMI de las AgNPs de los medios GYEA e ISP2 pH 7.0 y 8.5 control vs *P. aeruginosa* (ATCC 27853).

La inhibición del crecimiento bacteriano, a una concentración baja de AgNPs sintetizadas a pH 7.0, concuerda con lo reportado por Soberón, 2011, también explica la capacidad que tiene, tanto la membrana celular, como el *biofilm* que produce esta cepa, para ser atravesada por moléculas iónicas pequeñas, o sustratos iónicos en fase acuosa. Adicionalmente, la concentración requerida de AgNPs obtenidas a pH 8.5, para inhibir el crecimiento de esta bacteria, podría ser superior a los 1000 mg/mL, conforme a la descripción de Martínez-Gutiérrez *et al*, 2013, que estableció una CMI de 1000 mg/mL de AgNPs esféricas de 50 nm de diámetro. Akram Raza, *et al*, 2016, determinó la mejor actividad con las AgNPs esféricas, teniendo un halo de inhibición de 14 mm, siendo aproximadamente lo obtenido en este trabajo de 10-13 mm de diámetro; de igual forma, observaron que las AgNPs que no tenían forma esférica, su actividad fue disminuida considerablemente, así como las de mayor tamaño. Morones, *et al*, 2005,

determinaron que la actividad antibacteriana se llevaba por daño a la membrana celular, así como la concentración necesaria para inhibir el crecimiento de la bacteria en 75 µg/mL. Kumari, *et al*, 2017, también reportaron el efecto de diferentes formas y tamaños de *AgNPs*, siendo las que presentaron la mejor actividad, las de forma esférica entre 2-5 nm de diámetro. Yu-Guo, *et al*, 2017, determinaron que la actividad de las *AgNPs* sobre *P. aeruginosa*, se debía a la inhibición de la deshidrogenasa de la cadena respiratoria, con una CMI de 1 µg/mL, esto probablemente debido al efecto del potencial Z de 25.5 mV en las *AgNPs*, ya que las obtenidas por dichos autores en síntesis con quercetina tenían un tamaño de 11 nm, un tamaño más grande al obtenido por otros investigadores, pero con un efecto mayor en la prueba de CMI, siendo que las *AgNPs* del medio GYEA a pH 7.0 control poseen un tamaño de  $1.42 \pm 0.2897$  nm, pero con un potencial Z de  $-8.45 \pm 5.64$  mV.

### 8.8.2 Actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata vs *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Se realizó la prueba de Kirby-Bauer, y se observó que las condiciones de los medios GYEA e ISP2 pH 8.5 control y KNO<sub>3</sub> c20, 30, 40 mM, no presentaron actividad, mientras que las de los medios GYEA pH 7.0, solamente presentaron actividad las condiciones control y KNO<sub>3</sub> 40 mM y las de ISP2 pH 7.0, mostraron actividad en todas las condiciones de KNO<sub>3</sub> 20, 30, 40 mM y control (Figura 24).

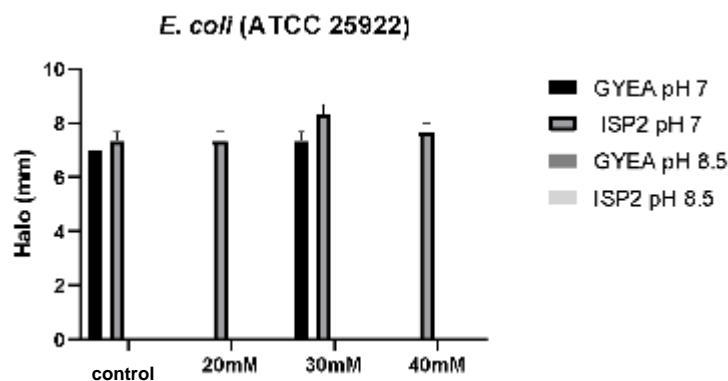


Figura 24.- Halos de inhibición de las *AgNPs* de los medios GYEA e ISP2 pH 7.0 y 8.5, control y KNO<sub>3</sub> 20, 30, 40 mM vs *E. coli* (25922)

Se determinó el punto de corte para el medio GYEA pH 7.0 control en 3.3  $\mu\text{g/mL}$  y en el medio ISP2 pH 7.0 control en 13.3  $\mu\text{g/mL}$ , no se observó inhibición en las muestras de pH 8.5 de ambos medios (Figura 25). Para el primer grupo se realizó la prueba de homocedasticidad, se determinó que no correspondía a una distribución normal con un valor de  $p < 0.001$ , por lo cual, se realizó la prueba de Mann-Whitney, para determinar diferencias entre los grupos, esta mostró que no existían con un valor  $p = 0.3268$ .

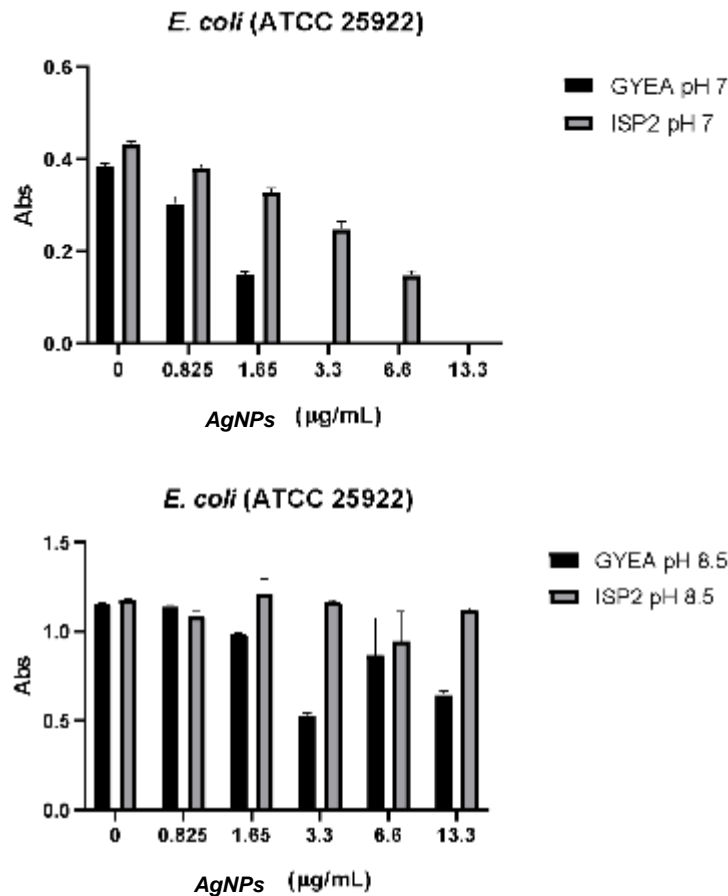


Figura 25.- CMI de las AgNPs de los medios GYEA e ISP2 pH 7.0 y 8.5 control vs *E. coli* (ATCC 25922).

Se sabe de igual manera, como ocurre con otras enterobacterias, que *E. coli* en la caracterización bioquímica es nitrato positivo, por lo cual posee enzimas óxido reductasas, pero no es capaz de inhibir la acción de los iones metálicos como ocurre con la cepa de *S. aureus* (ATCC 29213), lo cual explicaría la sensibilidad a las AgNPs, siendo las del medio GYEA pH 7.0 control, las de mayor eficacia por su menor tamaño. Un estudio realizado por Martínez-Castañón, *et al*, 2008, comparó

tres diferentes tamaños de *AgNPs* de 7, 29 y 89 nm, y realizó la prueba de microdilución para determinar la CMI, teniendo como mejor resultado las *AgNPs* de 7 nm, con un valor de corte de 6.25 µg/mL, se puede observar que es correspondiente a lo obtenido en el análisis del presente estudio ya que las *AgNPs* con mejor actividad fueron las de menor diámetro. En otro estudio realizado por Kumari, *et al*, 2017, se probaron *AgNPs* de diferente forma y tamaño, siendo las que presentaban una mejor actividad antibacteriana contra ésta cepa, las que poseían menor tamaño y forma esférica, también Morones, *et al*, 2005, determinó que las *AgNPs*, que presentaban mejor efecto antibacteriano, son las menores a 15 nm de diámetro, de la misma forma, determinó que se unían a la membrana celular modificando su permeabilidad, así como la respiración, además de interactuar con compuestos que tuvieran azufre y fósforo, por la acción de iones libres de plata. Xi-Feng, *et al*, 2016, probó *AgNPs* biosintetizadas, menores a 25 nm y obtuvieron una CMI de 8 µg/ml, así como Akram Raza, *et al*, 2016, obtuvieron un halo de inhibición de 6.2 mm de diámetro en la prueba de Kirby-Bauer, teniendo en este trabajo, un máximo aproximado de 7 mm de diámetro en el halo de inhibición.

### 8.8.3 Actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata vs *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603).

Se realizó la prueba de Kirby-Bauer, y se observó que las condiciones de los medios GYEA e ISP2 pH 8.5 control y KNO<sub>3</sub> 20, 30, 40 mM, no presentaron actividad, mientras que las de los medios GYEA pH 7.0, solo presentaron actividad las condiciones control y KNO<sub>3</sub> 40 mM y las de ISP2 pH 7.0, mostraron actividad en todas las condiciones de control y KNO<sub>3</sub> 20, 30, 40 mM (Figura 26).

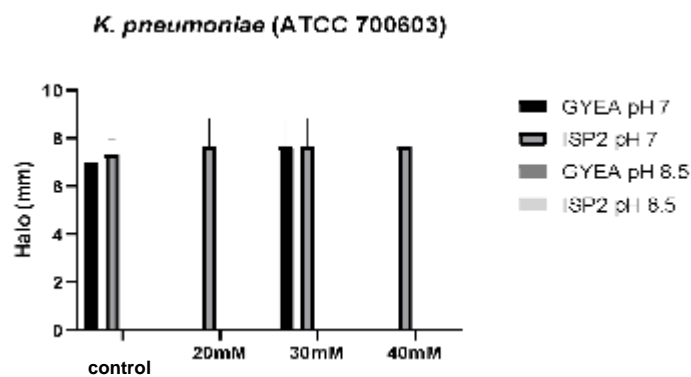


Figura 26. Halos de los medios GYEA e ISP2 pH 7.0 y 8.5, control y KNO<sub>3</sub> 20, 30, 40 mM vs *K. pneumoniae* (ATCC 700603).

Se determinó la CMI de las AgNPs del medio GYEA e ISP2 pH 7.0 control, en 3.3 µg/mL, de igual forma, se determinó en los medios de pH 8.5 control, en 6.6 µg/mL para el medio GYEA y en 3.3 µg/mL para el medio ISP2 (Figura 27). Se realizó la prueba de homocedasticidad, para determinar si se seguía una distribución normal para cada grupo, se obtuvieron valores de  $p < 0.001$  para los dos pH, en ambos casos se determinó que no se seguía una distribución normal, por lo cual, se optó por elegir la prueba de Mann-Whitney, determinándose que no hubo variación entre las muestras en ambos pH, teniendo un valor de  $p = 0.3065$  para los medios de pH 7.0 y de  $p = 0.5628$  para las obtenidas del pH 8.5.

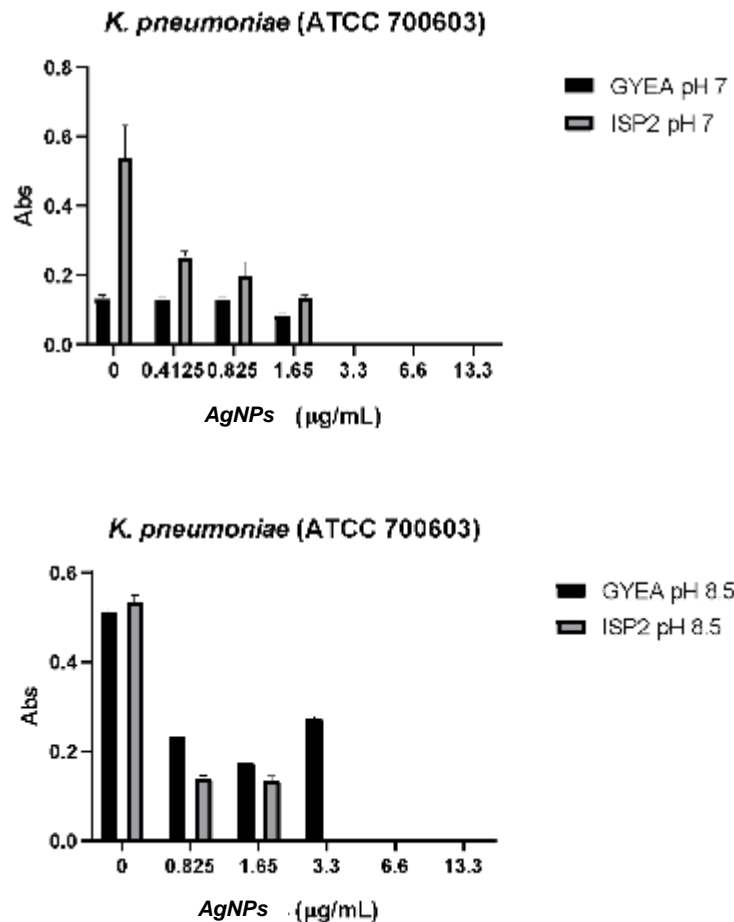


Figura 27. CMI de las AgNPs de los medios GYEA e ISP2 pH 7.0 y 8.5 control vs *K. pneumoniae* (ATCC 700603).

Se observó aparición de colonias aisladas dentro del halo de inhibición a las 24 h, lo que hace suponer que tiene la capacidad de desarrollar resistencia, una de las explicaciones posibles, puede ser la presencia de sideróforos descritos por Holden, *et al*, 2016, y Namikawa, *et al*, 2022, éstos quelantes han sido utilizados con fines de biorremediación, un ejemplo de ello, es la utilización por Beltrán-Pineda, *et al*, 2016, para quelar metales como cadmio, cromo y mercurio para el tratamiento de aguas residuales, otra propuesta para el desarrollo de resistencia, podrían ser las bombas de eflujo, lo que hace suponer que el mecanismo de acción de las *AgNPs*, sería por la ruta de la liberación de iones de plata, inhibiendo así, la formación de ERO's como lo describe Coutiño, *et al*, 2017, en uno de los posibles mecanismo de acción de las *AgNPs*, esta inferencia la podemos sustentar en el trabajo de Tsung-Ying, *et al*, 2021, que caracterizaron el mecanismo de acción de las *AgNPs* en dos partes: la primera es la adherencia y la internalización de las nanopartículas y la segunda, la producción de ERO's por la liberación de iones de plata de las *AgNPs*, desacoplando la cadena de electrones; en ese mismo trabajo caracterizaron sus *AgNPs* entre 6.2-7.5 nm, obteniendo puntos de corte para la CMI de 5 mg/mL. En el trabajo realizado por Bernardo-Mazariegos, *et al*, 2018, probaron sus *AgNPs* biosintetizadas en una concentración de 100 mg/mL, obteniendo un halo de inhibición de 8.3 mm, lo que indica que se obtuvo una mejor actividad antibacteriana de las *AgNPs* sintetizadas en los medios GYEA e ISP2 pH 7.0 control, ya que se requiere una concentración 10 veces menor para obtener el mismo halo de inhibición. En otro trabajo realizado por Alotaibi, *et al*, 2022, encontraron una CMI de 128 µg/mL, lo que representa una concentración 39 veces mayor a la utilizada en esta investigación.

#### **8.8.4 Actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata vs *Staphylococcus aureus* MRSA (ATCC 43300).**

Se realizó la prueba de Kirby-Bauer, y se observó que las condiciones de los medios GYEA e ISP2 pH 8.5 control y KNO<sub>3</sub> 20, 30, 40 mM, no presentaron actividad, mientras que las de los medios GYEA pH 7.0, solo presentaron actividad las condiciones control y KNO<sub>3</sub> 40 mM y las de ISP2 pH 7.0, mostraron actividad en todas las condiciones de control y KNO<sub>3</sub> 20, 30, 40 mM (Figura 28).

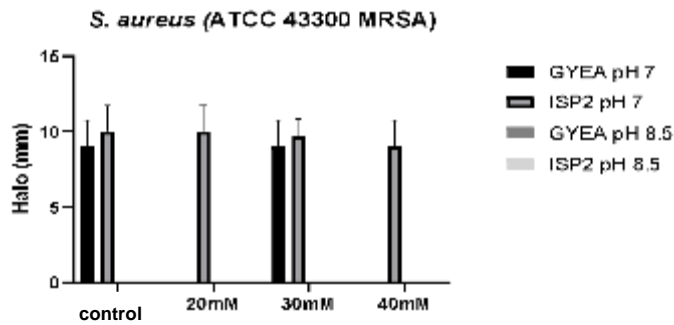


Figura 28.- Halos de inhibición AgNPs de los medios GYEA e ISP2 pH 7.0 y 8.5, control y KNO<sub>3</sub> 20, 30, 40 mM vs *S. aureus* (ATCC 43300 MRSA).

Se observó una CMI para los medios GYEA e ISP2 pH 7.0 control de 6.6 µg/mL (Figura 26), de igual manera, se determinó que no presentan una distribución normal mediante la prueba de homocedasticidad con una  $p < 0.001$ . Se realizó el análisis por Mann-Whitney, el cual demostró que no hay diferencias entre los medios de síntesis, con un valor  $p = 0.3561$ . Para los medios GYEA e ISP2 pH 8.5 control, se observó crecimiento bacteriano a todas las concentraciones usadas de AgNPs en el ensayo.

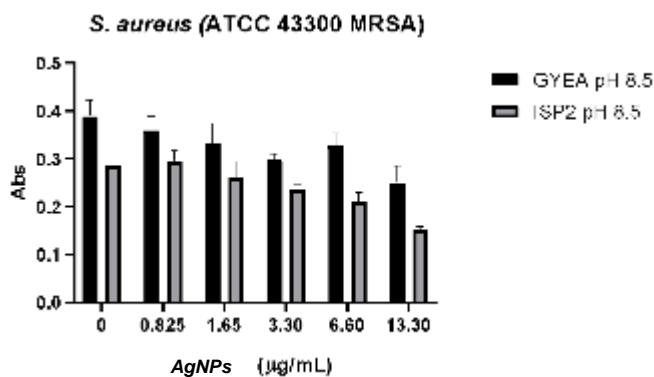
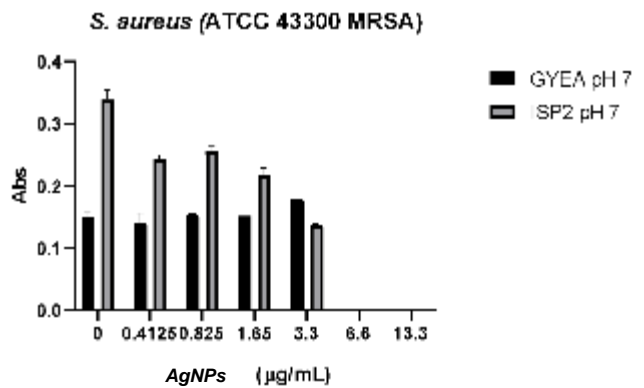




Figura 29.- CMI de las AgNPs de los medios GYEA e ISP2 pH 7.0 y 8.5 control vs *S. aureus* (ATCC 43300 MRSA).

La actividad antibacteriana, se pudo observar en los medios de pH 7.0 control, siendo de especial interés la cepa de *S. aureus* MRSA (ATCC 4300) ya que permite pensar que la forma del mecanismo de acción, no es por vía de inhibición de transpeptidasas, como lo es la meticilina G+, y lleva a creer que puede ser por vía de desacoplamiento de cadena de electrones, o con la generación de especies reactivas de oxígeno, como lo menciona Coutiño, *et al*, 2017, para describir su mecanismo de acción en el interior de la célula procariota. En el trabajo publicado por Nanda, *et al*, 2009, obtuvieron AgNPs sintetizadas con *S. aureus*, éstas presentaron un halo de inhibición contra MRSA de 17.5mm, en otro estudio realizado por Paredes, *et al*, 2014, obtuvieron una CMI de 10 µg/mL, con sus AgNPs sintetizadas por una reducción con quitosano. En otro trabajo realizado por Ansari, *et al*, 2015, encontró una CMI entre 11 a 45 µg/mL de las AgNPs, contra cepas MRSA de aislados clínicos, de igual manera, pudieron observar que tienen actividad, en la inhibición de la producción de biofilm por parte de la cepa.

### 8.5 Actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata vs *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Se realizó la prueba de Kirby-Bauer, y se observó que las condiciones de los medios GYEA e ISP2 pH 8.5 control y KNO<sub>3</sub> 20, 30, 40 mM, no presentaron actividad, mientras que las de los medios GYEA pH 7.0, solo presentaron actividad las condiciones control y KNO<sub>3</sub> 40 mM y las de ISP2 pH 7.0, mostraron actividad en todas las condiciones de control y KNO<sub>3</sub> 20, 30, 40 mM (Figura 30).

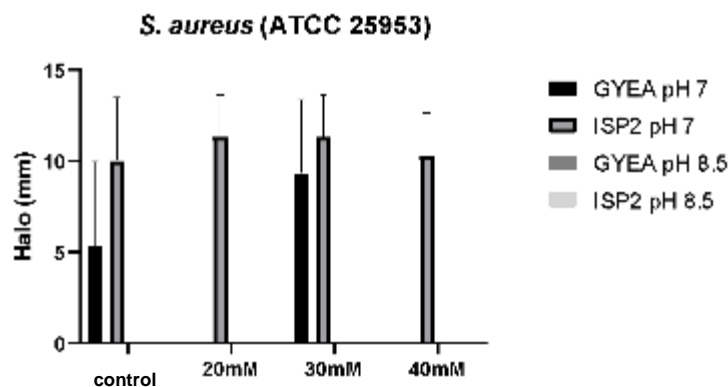


Figura 30.- Halos de inhibición *AgNPs* de los medios GYEA e ISP2 pH 7.0 y 8.5, control y  $\text{KNO}_3$  20, 30, 40 mM vs *S. aureus* (ATCC 25953)

En el caso de las *AgNPs* obtenidas del pH 7.0 control, tanto GYEA como ISP2, tuvieron un punto de corte en 3.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 31), se realizó la prueba de homocedasticidad mostrando una distribución no normal, con un valor  $p < 0.001$ ; se realizó de la misma forma la prueba de Mann-Whitney y no se observaron diferencias entre ambos medios, obteniendo un valor de  $p = 0.5338$ ; de igual forma, para los medios de pH 8.5 no se observó inhibición.

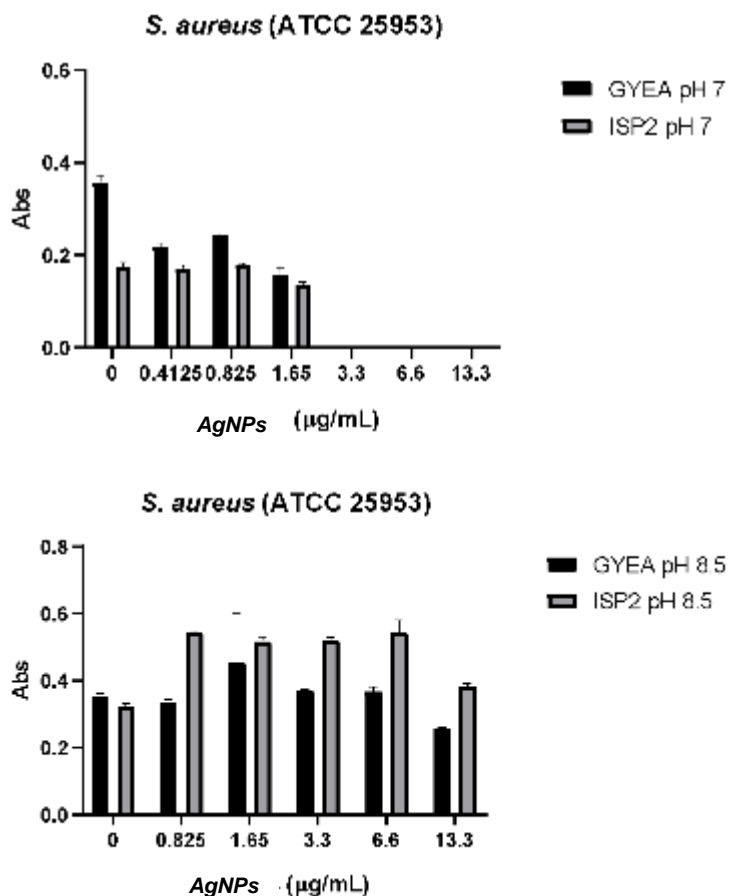


Figura 31.- CMI de las *AgNPs* de los medios GYEA e ISP2 pH 7.0 y 8.5 control vs *S. aureus* (ATCC 25953).

Se sabe que el mecanismo por el cual podrían tener su efecto antibacteriano las *AgNPs*, es por la liberación de iones de plata, esto por lo observado contra la cepa de *K. pneumoniae* (ATCC 700603), lo cual sería consistente con la actividad presentada contra la cepa de *S. aureus*, ya que para ambos medios de pH 7.0 control, poseen una CMI muy baja, toda vez que dicha cepa, no posee alguna

enzima capaz de inhibir la acción de los iones para desacoplar la cadena respiratoria. Martínez-Castañón, *et al*, 2008, también probaron las *AgNPs* contra esta cepa de *S. aureus*, siendo el mejor resultado obtenido con las nanopartículas de 7 nm de diámetro, con una CMI de 7.5 µg/mL, poco más del doble de lo obtenido con las *AgNPs* del medio GYEA pH 7.0 control. En un estudio realizado por Barabadi, *et al*, 2021, encontraron la CMI para las *AgNPs*, comerciales utilizadas en su estudio y las biosintetizadas, en 4 y 8 µg/mL respectivamente, lo que equivale aproximadamente entre 2 a 4 veces la concentración requerida de las obtenidas de los medios GYEA e ISP2 pH 7.0 control.

### 8.8.6 Actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata vs *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).

Se realizó la prueba de Kirby-Bauer, y se observó que las condiciones de los medios GYEA e ISP2 pH 8.5 control y KNO<sub>3</sub> 20, 30, 40 mM, no presentaron actividad, mientras que las de los medios GYEA pH 7.0, solo presentaron actividad las condiciones control y KNO<sub>3</sub> 40 mM y las de ISP2 pH 7.0, mostraron actividad en todas las condiciones de control y KNO<sub>3</sub> 20, 30, 40 mM (Figura 32).

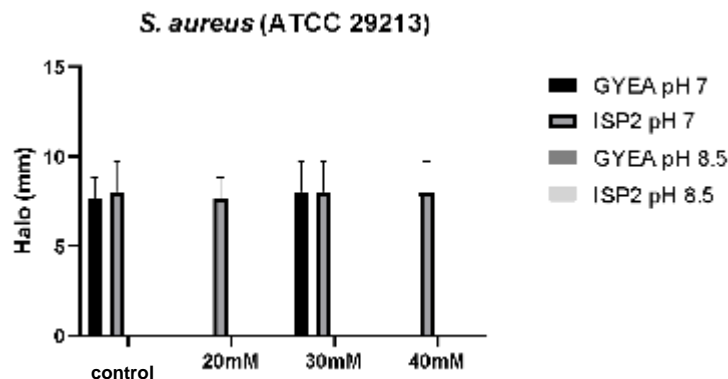


Figura 32.- Halos de inhibición *AgNPs* de los medios GYEA e ISP2 pH 7.0 y 8.5, control y KNO<sub>3</sub> 20, 30, 40 mM vs *S. aureus* (ATCC 29213).

Se observó el punto de corte para el medio GYEA pH 7.0 control en 6.6 µg/mL, mientras que para el medio ISP2 del mismo pH se observó en 13.3 µg/mL (Figura 33), se realizó la prueba de homocedasticidad teniendo un valor  $p < 0.001$ , lo cual indica que los datos obtenidos no siguen una distribución normal, motivo que llevó a realizar la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, así se observó que no hay

diferencias entre ambos medios con un valor  $p=0.6991$ . Para las *AgNPs* obtenidas con los medios GYEA e ISP2 pH 8.5 control, no hubo actividad antimicrobiana.

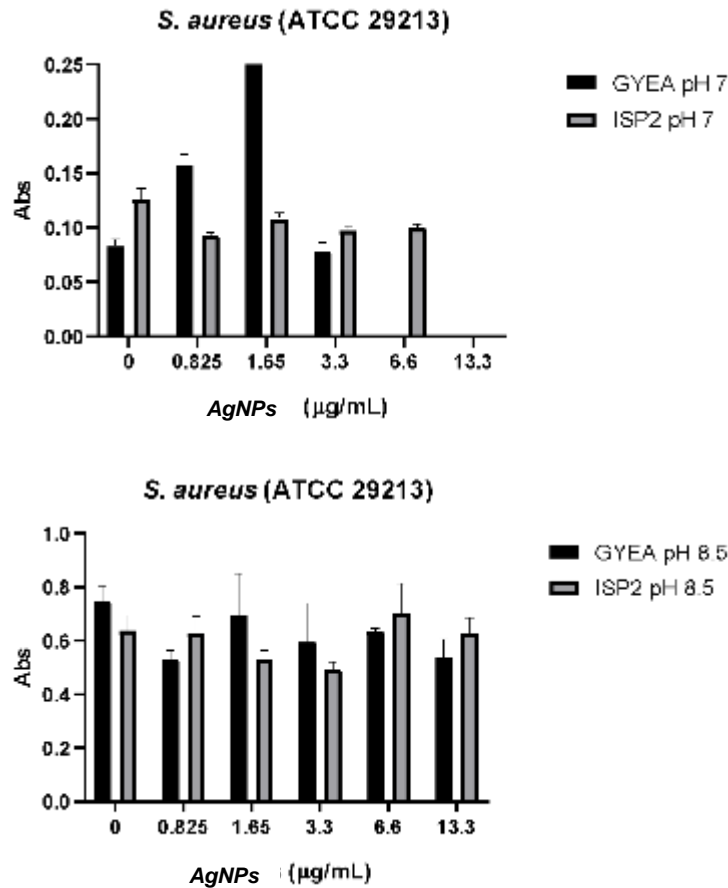


Figura 33.- CMI de las *AgNPs* de los medios GYEA e ISP2 pH 7.0 y 8.5 control vs *S. aureus* (ATCC 29213)

Esta cepa sensible a meticilina genotipificada por Soni, *et al*, 2015, es usada para control de calidad en ensayos de laboratorio, debido a dicha sensibilidad, no se han observado mecanismos de resistencia, como bombas de eflujo para iones metálicos, o cualquier otro tipo de mecanismo de resistencia, lo cual daría la explicación a la actividad de nuestras *AgNPs*. En un trabajo presentado por Alotaibi, *et al*, 2022, con *AgNPs* de un tamaño promedio de 51 nm, presentaron una CMI de 256 µg/mL. En el trabajo presentado por Dos Santos, *et al*, 2021, hacen el comparativo con *AgNPs* totalmente esféricas y cuasi esféricas, teniendo una CMI para la primera de 0.8 µg/mL, y para el resto entre 3.1 y 6.3 µg/mL, misma situación que observamos con las *AgNPs* del presente trabajo, ya que las que más se aproximan a la forma esférica, presentaron la menor CMI. En otro estudio

publicado por Devanesan, *et al*, 2018, se observó un halo de inhibición de 19 mm en promedio, para la cepa de *S. aureus*, con una concentración de 75  $\mu\text{g}$  de *AgNPs* obtenidas a partir de *Punica granatum*.

### 8.8.7 Actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata vs *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028).

Se realizó la prueba de Kirby-Bauer, y se observó que las condiciones de los medios GYEA e ISP2 pH 8.5 control y  $\text{KNO}_3$  20, 30, 40 mM, no presentaron actividad, mientras que las de los medios GYEA pH 7.0, solo presentaron actividad las condiciones control y  $\text{KNO}_3$  40 mM y las de ISP2 pH 7.0, mostraron actividad en todas las condiciones de control y  $\text{KNO}_3$  20, 30, 40 mM (Figura 34).

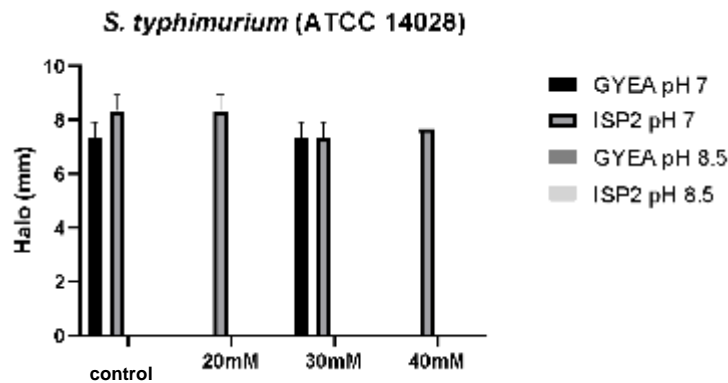


Figura 34.- Halos de inhibición *AgNPs* de los medios GYEA e ISP2 pH 7.0 y 8.5, control y  $\text{KNO}_3$  20, 30, 40 mM vs *S. typhimurium* (ATCC 14028).

Se determinó la CMI para las condiciones de pH 7.0 control en 6.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para el medio GYEA y de 13.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para el medio ISP2 (Figura 35), se realizó la prueba de homocedasticidad, la cual obtuvo un valor de  $p < 0.001$ , lo que muestra una distribución no normal, se realizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney y se determinó, que no hay diferencias significativas entre los medios con un valor  $p = 0.8834$ . Las *AgNPs* de la condición de pH 8.5 control no presentaron ninguna actividad.

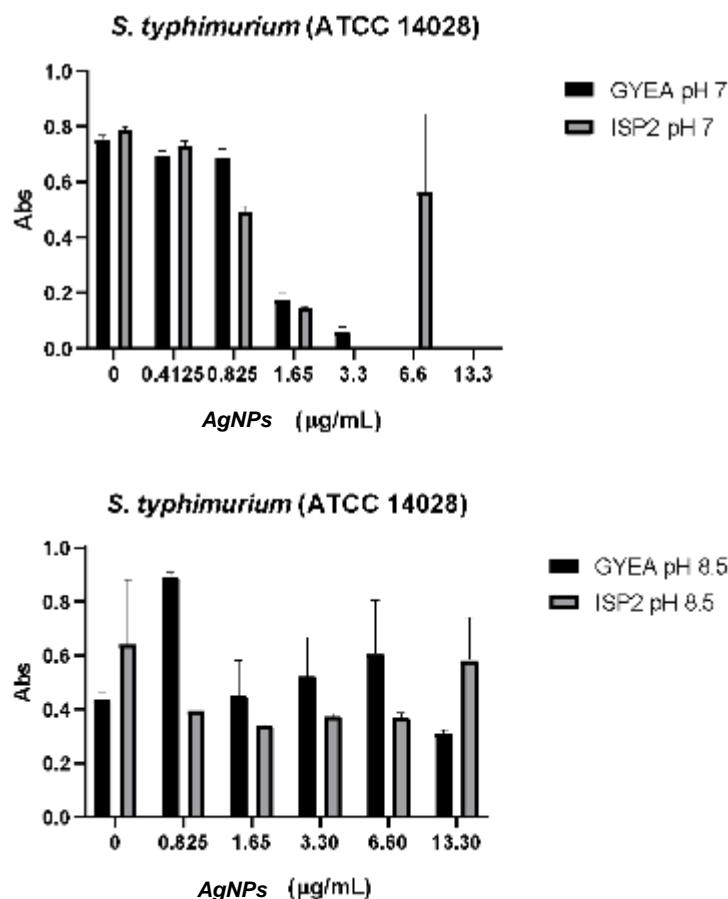


Figura 35.- CMI de las AgNPs de los medios GYEA e ISP2 pH 7.0 y 8.5 control vs *S. typhimurium* (ATCC 14028).

Para *S. typhimurium*, se han descrito mecanismos de resistencia antibiótica como lo es la expresión de los genes *tetA* y *tetB*, para protección ribosomal contra tetraciclinas, evitando así su acción, los mecanismos descritos de dichos genes no solo se limitan a dicho protector, sino también a bombas de eflujo para la expulsión del fármaco ionizado, mecanismo también utilizado en su resistencia contra lincomicina, como lo han reportado Marti, *et al*, 2006, y Stahl, 2017, en cambio, no se han observado mecanismos efectivos contra plata coloidal, o contra algún ion metálico utilizado, por tal motivo, se creó que esa podría ser una de las posibles explicaciones para observar la actividad de las AgNPs. Se sabe que esta cepa de *Salmonella* posee complejo de nitrato reductasa (NapA, NarG y NarZ) de manera constitutiva, lo que lleva a pensar, que agentes antibacterianos comunes, como el nitrato de plata, no tendrían actividad contra ella, aunque iones metálicos libres,

como el caso del posible mecanismo de acción de las *AgNPs* del presente estudio, tendrían actividad antimicrobiana observable (Arroyo Reyes, *et al*, 2018).

En el trabajo realizado por Losasso, *et al*, 2014, se probaron *AgNPs* entre 6 y 8 nm de diámetro con forma cuasi esférica, encontrándose una CMI de 20 µg/mL. En el trabajo de Kapadia, *et al*, 2021, se usaron *AgNPs* de 44-66 nm de diámetro, obteniendo una CMI de 10.14 µg/mL, por otra parte, el trabajo de Thakur, *et al*, 2022, presenta la obtención biosintética de *AgNPs*, con una CMI de 97 µg/mL de las obtenidas a partir de los extractos metanólicos de eucalipto.

## 9 Conclusiones.

- Se obtuvieron *AgNPs* con actividad antibacteriana contra todas las cepas propuestas, a partir de los extractos extracelulares obtenidos de *N. corallina*, a partir de los diferentes medios de cultivo;
- Las *AgNPs* obtenidas de los medios GYEA e ISP2 pH 7 control, tuvieron un tamaño promedio entre 1 y 4 nm de diámetro, mientras que las de los medios GYEA e ISP2 pH 8.5 control, tuvieron un tamaño mayor de los 100 nm;
- Se determinó que las *AgNPs* obtenidas de los medios GYEA e ISP2 pH 7.0 control, presentaron actividad antimicrobiana con CMI entre 3.3 y 13.3 µg/mL, las obtenidas de los medios de pH 8.5, solo presentaron actividad contra la cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603 con una CMI entre 3.3 y 6.6 µg/mL.

## 1 Perspectivas.

- Realización de estudios de tamizaje metabólico, para determinar los metabolitos antioxidantes responsables de la síntesis de las *AgNPs*;
- Estudio con cepas multirresistentes y cepas silvestres para determinar la actividad antibacteriana de las *AgNPs*, así como la comparación contra antibióticos de referencia;
- Estudios de citotoxicidad *in vitro*;
- Aumento en el tiempo de la reacción de reducción.

## 11 Referencias.

- Acuña L., G. (2002). Descubrimiento de la penicilina: un hito de la medicina. Cómo el azar puede ayudar al científico. **Revista de Clínica las Condes**, 13(1).
- Ahmed, T., Shahid, M., Noman, M., Niazi, M. B. K., Mahmood, F., Manzoor, I., ... & Chen, J. (2020). Silver nanoparticles synthesized by using *Bacillus cereus* SZT1 ameliorated the damage of bacterial leaf blight pathogen in rice. **Pathogens**, 9(3), 160.
- Ajani, T. F., Adebayo-Tayo, B. C., & Ominoyi Alao, S. (2021). Bio-fabrication, Optimization and Characterization of Silver Nanoparticles Using *Streptomyces* sp. HDW7 and *Nocardia* sp. OX5 Biofloculants; Flocculation and Antibacterial Efficiency. **Acta microbiológica Bulgárica**, 37(3), 126-134.
- Akram Raza, M., Kanwai, Z., Rauf, A., Nasim Sabri, A., Riaz, S., & Naseem, S. (2016). Size- and shape-dependant antibacterial studies of silver nanoparticles synthesized by wet chemical routes. **Nanomaterials**, 6(74). doi:10.3390/nano6040074
- Ali, K., Dwivedi, S., Azam, A., Saquib, Q., Al-Said, M. S., Alkhedhairy, A. A., & Musarrat, J. (2016). Aloe vera extract functionalized zinc oxide nanoparticles as nanoantibiotics against multi-drug resistant clinical bacterial isolates. **Journal of Colloid and Interface Science** (472), 145-156.
- Alotaibi, A. M., Alsaleh, N. B., Aljasham, A. T., Tawfik, E. A., Almutairi, M. M., Assiri, M. A., ... & Almutairi, M. M. (2022). Silver Nanoparticle-Based Combinations with Antimicrobial Agents against Antimicrobial-Resistant Clinical Isolates. **Antibiotics**, 11(9), 1219.
- Andrade Guel, M. L., López López, L. I., & Sáenz Galindo, A. (2012). Nanotubos de Carbono: Funcionalización y aplicaciones Biológicas. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**, 43(3), 9-18.
- Ansari, M. A., Khan, H. M., Khan, A. A., Cameotra, S. S., & Alzohairy, M. A. (2015). Anti-biofilm efficacy of silver nanoparticles against MRSA and MRSE isolated from wounds in a tertiary care hospital. **Indian journal of medical microbiology**, 33(1), 101-109.
- Arellano Cortés, María L. Extracción y caracterización de sustancias poliméricas extracelulares de *Nocardia corallina* ATCC B-276. **Tesis de Ingeniería en Biotecnología**.
- Arroyo Reyes, O., & Vázquez Martínez, D. (2018). Efecto de nitrato/nitrito sobre la supervivencia de la flora microbiana en leche cruda. (M. Colín Cruz, & A.



- Guadarrama Lezama, Edits. Toluca, México: **Universidad Autónoma del Estado de México**.
- Barabadi, H., Mojab, F., Vahidi, H., Marashi, B., Talank, N., Hosseini, O., & Saravanan, M. (2021). Green synthesis, characterization, antibacterial and biofilm inhibitory activity of silver nanoparticles compared to commercial silver nanoparticles. **Inorganic Chemistry Communications**, 129, 108647.
- Barkat, M. A., Beg, S., Naim, M., Pottoo, F. H., Singh, S. P., & Ahmad, F. J. (2018). Current progress in synthesis, characterization, and applications of silver nanoparticles: precepts and prospects. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, 13(1), 53-69.
- Batalla Mayoral, J., Cuadros Moreno, A., & San Martín-Martinez, E. (Dec. de 2014). Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. **Latin-American Journal of Physics Education**, 8(4), 4319-1-4319-6.
- Belloso, W. H. (2009). Historia de los antibióticos. **Revista del Hospital Italiano de Buenos Aires**, 29(2), 102-111.
- Bernardo-Mazariegos, E., Valdez-Salas, B., González-Mendoza, D., Abdelmoteleb, A., Tzintzun Camacho, O., Ceceña Duran, C., & Gutiérrez-Mceli, F. (2019). Silver nanoparticles from *Justicia spicigera* and their antimicrobial potentoalities in the biocontrol of foodborne bacteria and phytopathogenic fungi. **Revista Argentina de Microbiología**, 51(2), 103-109. doi: 10.1016/j.ram.2018.05.002
- Betancur, B. C., Jimenez, D. M., & Linares, B. G. (2012). Potencial zeta ( $\zeta$ ) como criterio de optimización de dosificación de coagulante en planta de tratamiento de agua potable. **Dyna**, 175, 166-172.
- Betrán, A., Lavilla, M. J., Cebollada, R., Calderón, J. M., & Torres, L. (2020). Resistencia antibiótica de *Escherichia coli* en infecciones urinarias nosocomiales y adquiridas en la comunidad del Sector Sanitario de Huesca 2016-2018. **Revista Clínica de Medicina de Familia**, 13(3), 198-202.
- Beltrán-Pineda, M. E., & Gómez-Rodríguez, A. M. (2016). Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg), mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión. **Revista Facultad de Ciencias Económicas: Investigación y Reflexión**, 12(2), 172.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annals of Biochemistry** (72), 248-254.
- Bravo, A., & Cerón, J. (2004). *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. **Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Biblioteca Agropecuaria de Colombia, (BAC)**, 294.

- Butala NS, Falkinham JO. (2018) Nitrate and nitrite reductase activities of *Mycobacterium avium*. **International Journal of Mycobacteriology** Oct-Dec;7(4):328-331. doi: 10.4103/ijmy.ijmy\_118\_18. PMID: 30531029.
- Callicó, A., Cedré, B., Sifontes, S., Torres, V., Pinoy., Callís, A. H., & Esnard, S. C. (julio-septiembre de 2004). Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. **VacciMonitor**, 13(3).
- Campbell, D.J. & Xia, Y. (2007). Plasmons: why should we care? **Journal of Chemistry**. Ed.: 84, 91-96.
- Camps, D. (2010). Bioquímica del estrés oxidativo. Lulu. com.
- Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características Generales del *Staphylococcus aureus*. **Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio**, 61(1), 28-40.
- Chiari, G., Giustetto, R., & Carsony. D. (2008). Azul maya: una maravillosa nanotecnología precolombina. **Boletín de Monumentos Históricos**, INAH, 12, 39-48.
- Choque Diaz, J. M. (2020). Perfil microbiológico y resistencia antibiótica de los urocultivos en pacientes ambulatorios de emergencia del Hospital Carlos Alberto Seguin Escobedo, de Junio a Diciembre del 2019. **Repositorio de la UNSA**. <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/10892>
- CLSI. (2018). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition (9 ed., Vol. 32). Pennsylvania, USA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**.
- CLSI. (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (28th ed., Vol. 38). Pennsylvania, USA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**.
- Conn, E. E., Stumpf, P. K., Bruening, G., & Doi, R. H. (1976). **Bioquímica fundamental** (No. 572 572 C6B5 1976 CONN6 1976). Limusa.
- Coutiño, E. M., Ávila Lagunes, L., & Arroyo Helguera, O. (2017). Las Nanopartículas De Plata: Mecanismos De Entrada, Toxicidad Y Estrés Oxidativo. **Revista De Educación Bioquímica**, 36(2), 39-54.
- Cruz, D. A., Rodríguez, M. C., López, J. M., Herrera, V. M., Orive, A. G., & Creus, A. H. (2012). Metallic Nanoparticles And Surface Plasmons: A Deep Relationship. **Avances en ciencias e ingeniería**, 3(2), 67-78.
- Cuba Ruiz, V. (12 de 03 de 2022). Difractometría de rayos x. Obtenido de <https://pt.slideshare.net/cubariuz/difractometria-de-rayos-x?ref=>
- Czajkowska-Kośnik, A., Szekalska, M., Amelian, A., Szymańska, E., & Winnicka, K. (2015). Development and evaluation of liquid and solid self-emulsifying drug delivery systems for atorvastatin. **Molecules**, 20(12), 21010-21022.

- Devanesan, S., AlSalhi, M. M., Vishu Balaji, R., Ranjitsingh, A. A., Ahamed, A., Alfuraydi, A. A., . . . Othman, A. H. (2018). Antimicrobial and Cytotoxicity effects of synthesized silver nanoparticles from *Punica granatum* Peel extract. **Nanoscale Research Letters**, 13(315).
- Díaz del Castillo Rodríguez, M. (2012). Introducción a los nanomateriales. (L. d. materiales, Ed. Cuautitlan Izcalli, Estado de México, México: **Lecturas de ingeniería 20**.
- Dhuper, S., Panda, D., & Nayak, P. L. (2012). Green synthesis and characterization of zero valent iron nanoparticles from the leaf extract of *Mangifera indica*. **Nano Trends: Journal of Nanotechnology Applications**, 13(2), 16-22.
- Dos Santos, E. M. P., Martins, C. C. B., de Oliveira Santos, J. V., da Silva, W. R. C., Silva, S. B. C., Pelagio-Flores, M. A., ... & Cavalcanti, I. M. F. (2021). Silver nanoparticles–chitosan composites activity against resistant bacteria: tolerance and biofilm inhibition. **Journal of Nanoparticle Research**, 23(8), 1-13.
- Echlin, P. (2009). *Handbook of Sample Preparation for Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis* (1ra ed.). New York, New York, United States of America: **Springer Science+Business Media LLC**. doi:10.1007/978-0-387-85731-2
- El Sayed MT, El-Sayed ASA. (2020, Feb 28) Biocidal Activity of Metal Nanoparticles Synthesized by *Fusarium solani* against Multidrug-Resistant Bacteria and Mycotoxigenic Fungi. **Journal of Microbiology and Biotechnology**;30(2):226-236. doi: 10.4014/jmb.1906.06070. PMID: 31474084; PMCID: PMC9728364.
- Escobar Falconi, V. E. (2015). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por espectroscopía infrarroja (FT-IR), UV-Vis, absorción atómica de llama (FAAS) y microscopía de barrido electrónico (SEM)*. (M. F. Pilaquina, Ed.) Quito, Ecuador: **Universidad Pontificia de Ecuador**.
- Esquivel-Figueroa, Rosalia de la Caridad, & Mas-Diego, Siannah María. (2021). Síntesis biológica de nanopartículas de plata: revisión del uso potencial de la especie *Trichoderma*. **Revista Cubana de Química**, 33(2), 23-45. Epub 26 de abril de 2021. Recuperado en 24 de enero de 2023, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2224-54212021000200023&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212021000200023&lng=es&tlng=es).
- Falke D, Biefel B, Haase A, Franke S, Fischer M, Sawers RG. (2019 May 89) Activity of Spore-Specific Respiratory Nitrate Reductase 1 of *Streptomyces coelicolor* A3(2) Requires a Functional Cytochrome *bcc-aa<sub>3</sub>* Oxidase Supercomplex. **Journal of Bacteriology**;201(11): e00104-19. doi: 10.1128/JB.00104-19. PMID: 30858301; PMCID: PMC6509660.
- Fierro-Amature, M. A., Osorio-Amortegui, C. A., Faudiño de Rubio, L. C., & Rondón-Barragán, I. S. (2011). Resistencia antibiótica en *Salmonella enterica*

- serovar *typhimurium* aisladas de granjas porcícolas en el departamento del Tolima. (U. d. Lanos, Ed.) **Orinquia**, 15(1).
- Fletes, N. A., & Rosas, G. (2015). Síntesis Verde De Nanopartículas De Plata Usando Extracto Acuoso De *Valeriana officinalis* Y Su Evaluación Como Agentes Antibacteriales. **XII Encuentro de la Participación de la Mujer en la Ciencia**.
- Flores Aguilar, L. E. (2003). Caracterización fenotípica y genotípica de estirpes de *Salmonella choleraesuis* aisladas de ambientes marinos. Tesis. Lima, Perú: **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**.
- Goel, N., Ahmad, R., Singh, R., Sood, S., & Khare, S. K. (2021). Biologically synthesized silver nanoparticles by *Streptomyces sp.* EMB24 extracts used against the drug-resistant bacteria. **Bioresource Technology Reports**, 15, 100753.
- González, M. (2013). Caracterización fenotípica de cepas de *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) en pacientes pediátricos y sus perfiles de resistencia a aminoglucósidos, quinolonas y betalactámicos. Montevideo, Uruguay: **Universidad de la República de Uruguay**.
- Gonzalo, T., & Muñoz-Fernandez, M. (2009). Dendrímeros y sus aplicaciones biomédicas. **Anales de la Real Academia de Farmacia**, 169-200.
- Gutiérrez-Osnaya, L. J., Guzmán-Ortiz, F. A., Román-Gutiérrez, A. D., & Uribe, J. P. H. (2020). Evaluación de la actividad enzimática, morfológica y cambios fisicoquímicos en diferentes tipos de cebada germinada. **Boletín de Ciencias Agropecuarias del ICAP**, 6(11), 12-14.
- Gutiérrez Wing, C. E. (2013). Las NANOPARTÍCULAS: pequeñas estructuras con gran potencial ¿Por qué el interés en estos materiales? ¿Qué aplicaciones tiene? **Contacto Nuclear**, 24-29.
- Hernández Rodríguez, Jorge. (5 de Marzo-6 de Septiembre de 2019) Extracción, purificación y su evaluación antioxidante de los carotenoides de *Rhodococcus sp.* C7. Tesis de Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica. **Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco**. Laboratorio de Biotransformaciones.
- Herráez, A. (2011). Las asombrosas estructuras del carbono: fullerenos, grafenos y nanotubos. **Apuntes de ciencia**, 22-25.
- Holden, V., Breen, P., Houle, S., Dozois, C. M., & Bachman, M. A. (2016). *Klebsiella pneumoniae* Siderophores Induce Inflammation, Bacterial Dissemination, and HIF-1 $\alpha$  Stabilization during Pneumonia. **American Society for Microbiology**, 7(5). doi:10.1128/mBio.01397-16
- Honrubia, M. (25 de 02 de 2019). *Nanomateriales: breve historia y aplicaciones actuales*. Recuperado el 26 de 04 de 2021, de **Ennomotive**: <https://www.ennomotive.com/es/nanomateriales-historia-aplicaciones>

- Ivask, A., Juganson, K., Bondarenko, O., Mortimer, M., Aruoja, V., Kasemets, K., ... & Kahru, A. (2014). Mechanisms of toxic action of Ag, ZnO and CuO nanoparticles to selected ecotoxicological test organisms and mammalian cells in vitro: a comparative review. **Nanotoxicology**, 8(sup1), 57-71.
- Jover Martínez, H. (2021). Sideróforos y receptores asociados a *Pseudomona aeruginosa*. (A. Doménech Sánchez, Ed.) **Illes Balears**: Universitat de les Illes Balears.
- Kaabipour, S., & Hemmati, S. (2021). A review on the green and sustainable synthesis of silver nanoparticles and one-dimensional silver nanostructures. **Beilstein journal of nanotechnology**, 12(1), 102-136.
- Kapahi, M., & Sachdeva, S. (2019). Bioremediation options for heavy metal pollution. **Journal of health and pollution**, 9(24).
- Kapadia, C., Alhazmi, A., Patel, N., Elesawy, B. H., Sayyed, R. Z., Lokhandwala, F., ... & Datta, R. (2021). Nanoparticles combined with cefixime as an effective synergistic strategy against *Salmonella enterica typhi*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 28(8), 4164-4172.
- Klaus, T., Joerger, R., Olsson, E., & Granqvist, C.-G. (1999). Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. **Applied Physical Sciences**, 96(24), 13611-13614.
- Könen-Adigüzel, S., Adigüzel, A. O., Ay, H., Alpdoğan, S., Şahin, N., Çaputçu, A., Serap Ergene, R., Metin G., Hülya, Tunçer, M., (2018). Genotoxic, cytotoxic, antimicrobial and antioxidant properties of gold nanoparticles synthesized by *Nocardia* sp. GTS18 using response surface methodology. **Materials Research Express**, 5(11), 115402.
- Kuang, S., Fan, X., & Peng, R. (2018). quantitative proteomic analysis of *Rhodococcus ruber* responsive to organic solvents. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 32(6), 1418-1430. doi:10.1080/13102818.2018.1533432
- Kumari, M., Pandey, S., Prakash Giri, V., Bhattacharya, A., Shukla, R., Mishra, A., & Nautiyal, C. (2017). Tailoring shape and size of biogenic silver nanoparticles to enhance antimicrobial efficacy against MDR bacteria. **Microbial Pathogenesis**, 105, 346-355. doi: 10.1016/j.micpath.2016.11.012
- Kumari Jyoti, Mamta Baunthiyal, Ajeet Singh. (2016). Characterization of silver nanoparticles synthesized using *Urtica dioica* Linn. leaves and their synergistic effects with antibiotics, **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, Volume 9, Issue 3, Pages 217-227, ISSN 1687-8507, <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.10.002>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687850715001132>)

- Lechuga, L. M. (2010). Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud. En J. Bueren Roncero, J. Bueren Roncero, & 2. EdikaMed (Ed.), **Biotecnología Aplicada a la Salud Humana** (9na ed., págs. 98-112). Madrid, España: CIEMAT. Obtenido de [http://digital.csic.es/bitstream/10261/44635/1/7\\_Nanomedicina.pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/44635/1/7_Nanomedicina.pdf)
- Linklater, D. P., Baulin, V. A., Le Guével, X., Fleury, J.-B., Hanssen, E., The Hong Phoong Nguyen, . . . Ivanova, E. P. (2020). Antibacterial Action of Nanoparticles by Lethal Stretching of Bacterial Cell Membranes. **Advanced Materials**. doi:10.1002/adma.202005679
- Llabot, J. M., Palma, S. D., & Allemandi, D. A. (2008). Nanopartículas poliméricas sólidas. **Nuestra Farmacia** (53), 40-47.
- Losasso, C., Belluco, S., Cibin, V., Zavagnin, P., Mičetić, I., Gallocchio, F., ... & Ricci, A. (2014). Antibacterial activity of silver nanoparticles: sensitivity of different *Salmonella* serovars. **Frontiers in microbiology**, 5, 227.
- Luna, M. (21 de 06 de 2011). Los mayas y la nanotecnología. **El Mundo**. Obtenido de <https://www.elmundo.es/elmundo/2011/06/16/nanotecnologia/1308212180.html>; consultado en septiembre de 2021.
- Marti, S., Fernández-Cuenca, F., Pascual, A., Ribera, A., Rodríguez-Bano, J., Bou, G., ... & Vila, J. (2006). Prevalence of the tetA and tetB genes as mechanisms of resistance to tetracycline and minocycline in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, 24(2), 77.
- Martínez-Castañón, G., Niño-Martínez, N., Martínez-Gutierrez, F., Martínez-Mendoza, J., & Ruiz, F. (2008). Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. **Journal of Nanoparticle Research**, 10, 1343-1348. doi:10.1007/s11051-008-9428-6
- Manjarrez, A. N., Pérez, M. H. I., Solís, O. A., Ortega, C. L., Lara, C. M. T., Valencia, L. O. E., & Martínez-Casares, R. M. (2020). Application of the redox system of *Nocardia corallina* B-276 in the enantioselective biotransformation of ketones and alcohols. **Journal of the Serbian Chemical Society**, 85(3), 279-290.
- Manimaran, M., & Kannabiran, K. (2017). Actinomycetes-mediated biogenic synthesis of metal and metal oxide nanoparticles: progress and challenges. **Letters in Applied Microbiology**, 64(6), 401-408.
- 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. **The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, 29(6), 651-660.
- Marin-Llera J, O, Arroyo-Huelguera y Coutiño- Rodríguez EMR (2012) Efecto de la Plata Coloidal en la lipoperoxidación de linfocitos humanos. **Universalud** (antes Altepel kli);8(16):26-31.

- Melgarejo, J. C., Proenza, J. A., Galí, S., & Llovet, X. (2010). Techniques of mineral characterization and their use in mining exploration and exploitation. ***Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana***, 62(1), 1-23.
- Mesa, R. G., Rodríguez, L. I., & Teja, J. (2004). Las enfermedades emergentes y reemergentes: un problema de salud en las Américas. ***Revista Panamericana de Salud Pública***, 15(4), 285-287.
- Merck Sharp & Dohme Corp. MSD. (2020). ***Manual MSD, Profesionales de la Salud***. Recuperado el 25 de 01 de 2020, de <https://www.msmanuals.com/es-mx/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas/infecciones-por-pseudomonas>
- Mohammed, J. H., & Mohammed, S. M. (2014). Study of morphology and Z potential analyzer for the silver nanoparticles. ***International Journal of Scientific & Engineering Research***, 7(5), 381-387.
- Monge, M., Fornaguera, C., Quero, C., Dols-Perez, A., Calderó, G., Grijalvo, S., ... & Solans, C. (2020). Functionalized PLGA nanoparticles prepared by nano-emulsion templating interact selectively with proteins involved in the transport through the blood-brain barrier. ***European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics***, 156, 155-164.
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Hour, J. B., Tapia Ramírez, J., & Yacamán, M. J. (2005). The bacterial effect of silver nanoparticles. ***Nanotechnology***, 16, 2346-2353. doi:10.1088/0957-4484/16/10/059
- Mosquit, S., Ruiz, J., Bauer, J. L., & Ochoa, T. J. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. ***Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública***, 28(4), 648-56.
- Mousavi, S. M., Hashemi, S. A., Ghasemiy., Atapour, A., Amani, A. M., Savar Dashtaki, A., ... & Arjmand, O. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles toward bio and medical applications: review study. ***Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology***, 46(sup3), S855-S872.
- Namikawa, H., Niki, M., Oinuma, K., Iyamada, K., Nakaie, K., Tsubochi, T., . . . Shuto, T. (Abril de 2022). Siderophore production as a biomarker for *Klebsiella pneumoniae* strains that cause sepsis: A pilot study. ***Journal of Formosan Medical Association***, 121(4), 848-855. doi: 10.1016/j.jfma.2021.06.027
- Nanda, A. (2022). Molecular Characterization of Extended Spectrum B-Lactamase Producing *Escherichia Coli* Isolated From Urine Samples. ***Asian Journal of Pharmaceutics (AJP)***, 16(3).
- NCBI. (s.f.). bifunctional nitrate reductase/sulfite reductase flavoprotein subunit alpha [*Gordonia rubripertincta*]. Obtenido de ***National Library of Medicine***: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP\\_204717762.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_204717762.1)

- Ochoa, S. A., López-Montiel, F., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L. B., López-Martínez, B., . . . Xicohtencatl-Cortes, J. (2013). Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. **Medigraphic**, 70(2), 138-150.
- ORPHANET. (11 de 04 de 2021). *Fiebre tifoidea*. Recuperado el 11 de 04 de 2021, de [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=ES&data\\_id=14318&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseType=ORPHA&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseGroup=99745&Ziekte\(n\)/ziektegroep=Salmonella-typhi&title=Salmonella-typhi&search=Disease\\_Search\\_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=ES&data_id=14318&Disease_Disease_Search_diseaseType=ORPHA&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=99745&Ziekte(n)/ziektegroep=Salmonella-typhi&title=Salmonella-typhi&search=Disease_Search_Simple)
- Oves, M., Khan, M. S., Zaidi, A., Ahmed, A. S., Ahmed, F., Ahmad, E., ... & Azam, A. (2013). Antibacterial and cytotoxic efficacy of extracellular silver nanoparticles biofabricated from chromium reducing novel OS4 strain of *Stenotrophomonas maltophilia*. **PLoS one**, 8(3), e59140.
- Paredes, D., Ortiz, C., & Torres, R. (2014). Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial effects of Ag nanoparticles against *Escherichia coli* O157: H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **International Journal of Nanomedicine**, 9, 1717.
- Pereyra, J., Paterlini, P., Luciana, N., Álvarez, A., & Romero, C. M. (17, 18, 19 de Octubre de 2018). Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de plata por actinobacterias metalo-resistentes. **XXVI Jornadas de jóvenes investigadores AUGM**. Obtenido de [https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos\\_digitales/13135/17-cienciatecnologia-e-innovacion-pereyra-julian-unt.pdf](https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/13135/17-cienciatecnologia-e-innovacion-pereyra-julian-unt.pdf)
- Priyanka, N., & Venkatachalam, P. (2016). Biofabricated zinc oxide nanoparticles coated with phycomolecules as novel micronutrient catalysts for stimulating plant growth of cotton. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, 7(4), 045018.
- Polanco, H. F., & Loza, M. R. (2013). Resistencia antibiótica en infecciones urinarias en niños atendidos en una institución privada, periodo 2007-2011. **Revista Médica Herediana** (24), 210-216.
- Quiñones Pérez, Dianelys. (2017). Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque "Una salud". **Revista Cubana de Medicina Tropical**, 69(3), 1-17. Recuperado en 22 de enero de 2023, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602017000300009&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602017000300009&lng=es&tlng=es).
- Rajegaonkar PS, Deshpande BA, More MS, Waghmare SS, Sangawe VV, Inamdar A, Shirsat MD, Adhapure NN. (2018). Catalytic reduction of p-nitrophenol and methylene blue by microbiologically synthesized silver nanoparticles. **Material Science and Engineering C Materials for Biological Applications**. Dec 1;



93:623-629. doi: 10.1016/j.msec.2018.08.025. Epub 2018 Aug 8. PMID: 30274095.

- Ramanathan, R., O'Mullane, A. P., Parikh, R. Y., Smooker, P. M., Bhargava, S. K., & Bansal, V. (2011). Bacterial Kinetics-controlled Shape-Directed Biosynthesis of Silver Nanoplates Using *Morganella psychrotolerans*. **Langmuir**, 27(2), 714-719.
- Ríos C, A., Morales-Cauti, S., Vilca L., M., Carhuallanqui P., A., & Ramos D., D. (2019). Determinación de perfiles de resistencia antibiótica de *Salmonella enterica* aislada de cerdos faenados en un matadero de Lima, Perú. **Revista de Investigación Veterinaria**, 30(1), 438-445.
- Ronquillo-de Jesús, E., Aguilar-Méndez, M. A., López-Perea, P., Guzmán-Mendoza, J., Hernández-Martínez, V., Quiroz-Reyes, N., ... & Ortiz-Balderas, M. (2018). Synthesis of silver nanoparticles using aqueous tejocote extracts as reducing and passivating agent. **Ingeniería Agrícola y Biosistemas**, 10(2), 67-75.
- Sadowski, Z., Maliszewska, I. H., Grochowalska, B., Polowczyk, I., & Kozlecki, T. (2008). Synthesis of silver nanoparticles using microorganisms. **Materials Science-Poland**, 26(2), 419-424.
- Samadian, H., Hosseini-Nami, S., Kamran Kamrava, S., Ghaznavi, H., & Shakeri-Zadeh, A. (2016). Folate-conjugated gold nanoparticle as a new nanoplatform for targeted cancer therapy. **Journal of Cancer Research Clinical Oncology**, 142, 2217-2229.
- Sandoval Yoal, L., Montellano Palacios, L., Piña Soberanis, M., & Sánchez Guzmán, L. O. (04 de 10 de 2022). Potencial zeta como una herramienta para determinar la aglomeración de las nanopartículas en la reducción del volumen del lodo a disponer. **Instituto Mexicano de Tecnología del Agua**, Jiutepec, Morelos, México.
- Serena Domingo, P. A. (2013). La nanotecnología, una revolución desconocida. **Encuentros Multidisciplinares**, 15(45), 32-40. Obtenido de <http://www.encuentros-multidisciplinares.org/Revistan%BA45/Pedro%20Serena.pdf>
- Shanmugasundaram, T., Radhakrishnan, M., Gopikrishnan, V., Kadirvelu, K., & Balagurunathan, R. (2017). Biocompatible silver, gold, and silver/gold alloy nanoparticles for enhanced cancer therapy: in vitro and in vivo perspectives. **Royal Society of Chemistry** (9), 16773-16790. doi:10.1039/c7nr04979j
- Shriner, R. L., Hermann, C. K., Morrill, T. C., Curtin, D. Y., & Fuson, R. C. (2003). The systematic identification of organic compounds. **John Wiley & Sons**.

- Sierra Benítez, E. M., & León Pérez, M. Q. (sep-oct de 2019). Terapia antibacteriana: origen y evolución en el tiempo. *Revista Médica Electrónica*, 41(5), 1300-1309. Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/rme/v41n5/1684-1824-rme-41-05-1300.pdf>
- Sierra Benítez; Enrique, E. M., & León Pérez, M. Q. (sep-oct de 2019). Terapia antibacteriana: origen y evolución en el tiempo. *Revista Médica Electrónica*, 41(5), 1300-1309. Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/rme/v41n5/1684-1824-rme-41-05-1300.pdf>
- Simón, Carlos De Leonardo, (2020) *Facultad De Farmacia Universidad Complutense*. Trabajo de fin de grado.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (1971). *Análisis Instrumental* (Quinta ed.). (C. Fernández Madrid, Ed., M. Martínez Gómez, B. López Ruiz, M. A. Martín Carmona, G. Garcedo Güémez, & A. I. Olives Barba, Trads.) Madrid, España: **Mc Graw Hill**.
- Soberón, G. (13 de mayo de 2011). *Pseudomona aeruginosa*. Recuperado el 22 de septiembre de 2022, de **Microbios** en línea: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap3/>
- Soni, I., Chakrapani, H., & Chopra, S. (2015). Draft Genome Sequence of Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. *Genome Announcements*, 3(5). doi:10.1128/genomeA.01095-15
- Sorrivas de Lozano, V., Morales, A., & Yañez, M. J. (2014). *Principios y práctica de la Microscopía Electrónica* (1ra ed.). **Bahía Blanca: Viviana Sorrivas de Lozano**. Obtenido de <https://www.bahiablanca-conicet.gov.ar/biblioteca/principios-practica-microscopia-electronica.pdf>
- Solano, S. Q., Visbal, F. M., & Mejía, M. C. (2019). Otitis media aguda: generalidades y resistencia antibiótica. *Revista Médica Sinergia*, 4(5), 130-138.
- Sparacino-Watkins, C., Stolz, J. F., & Basu, P. (2014). Nitrate and periplasmic nitrate reductases. *Chemical Society Reviews*, 43(2), 676-706.
- Stahl, J.-P. (2017). Lincosamidas. *EMC-Tratado de Medicina*, 21(4), 1-4. doi:10.1016/S1636-5410(17)86925-7
- Subbaiya, R., Selvam, M. M., & Sundar, K. (2015). Biological synthesis of silver nanorods from *Nocardia mediterranei*-5016 and its antitumor activity against non-small cell lung carcinoma cell line. *International Journal of Pharmaceutical Technology Research*, 8(2), 974-979.
- Thakur, T. M., Lokhande, R. S., Thigle, M. M., & Patil, V. R. (2022). Nanoparticles of chromium oxide by green synthesis using *Eucalyptus globulus* leaves extract; characterization and biological activity studies. *Materials Today: Proceedings*.

- Tischler, D., Kleeberg, S., Ballmann, A., Heine, T., Riedel, A., Oelschlagel, M., Schlomann, M. (2017). Complete genome sequence of *Gordonia rubripertincta* CWB2. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ASR02241.1>
- Torres Cabra, E., Hernández Fernández, J., & Pérez Rubiano, C. C. (julio-diciembre de 2013). Cuantificación de proteínas totales de extractos crudos de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de Bayacá y Cundinamarca. **Conexión Agropecuaria JDC**, 3(2), 37-43.
- Torroba, L., Rivero, M., Oternin, I., Gil, A., Iruin, A., Maraví-Poma, E., & Irure, J. G. (2000). Resistencia antimicrobiana y política de antibióticos: MRSA, GISA y VRE. **Anales del sistema sanitario de Navarra** (Vol. 23, pp. 69-80).
- UDLAP. (2021) La nanotecnología a través del arte. <https://contexto.udlap.mx/la-nanotecnologia-a-traves-del-arte/> ; consultado el día 16 de febrero de 2023
- Universidad de Burgos. (2016). *Historia de los nanomateriales*. Recuperado el 26 de 04 de 2021, de **Unidad de Cultura científica en Innovación**: <https://historiamateriales.ubuinvestiga.es/nanomateriales>
- Universidad Nacional de Quilmes. (2018). Extracción y cuantificación de proteínas. En **Introducción a la biología celular y molecular - IBCM**.
- Universidad Politécnica de Cartagena. (2012). Difracción de rayos X. Cartagena, España. Obtenido de [https://www.upct.es/~minaees/difraccion\\_rayosx.pdf](https://www.upct.es/~minaees/difraccion_rayosx.pdf)
- Universitat de Alacant. (20 de 06 de 2022). Microscopía Electrónica de Transmisión. Recuperado el 04 de 10 de 2022, de <https://ssti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-microscopia/microscopia-electronica-de-transmision.html>
- Vazquez-Muñoz, R., & Huerta Saquero, A. (julio-diciembre de 2014). Nanomateriales con actividad microbicida: una alternativa al uso de antibióticos. **Mundo Nano**, 7(13), 37-47.
- Vidal, F. J. G., & Moreno, L. M. (2008). Plasmones superficiales. **Investigación y Ciencia**, 67.
- Volcy, C. (2008). Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología. Una Revisión. **Agronomía Colombiana**, 26(1), 107-115.
- World Health Organization. (17 de 02 de 2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Recuperado el 13 de 04 de 2021, de <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- World Health Organization. (2021). *Escherichia coli*. Recuperado el 11 de 04 de 2021, de [https://www.who.int/topics/escherichia\\_coli\\_infections/es/](https://www.who.int/topics/escherichia_coli_infections/es/)

- Xia, Y. & Halas, N. (2005). Shape-controlled synthesis and surface plasmonic properties of metallic nanostructures. **MRS Bull.**: 30, 338-344.
- Xi-Feng, Z., Zhi-Guo, L., Wei, S., & Sangiliyandi, G. (2016). Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. **Internal journal of Molecular Sciences**, 17(1534). doi:0.3390/ijms17091534
- Yang, T. Y., Hsieh, J., Lu, P. L., Lin, L., Wang, L. C., Wang, H. Y., ... & Tseng, S. P. (2021). In vitro and in vivo assessments of inspired Ag/80S bioactive nanocomposites against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Materials Science and Engineering: C**, 125, 112093.
- Yu-Guoy., Qiu-Ling, P., & Sangiliyandu, G. (2017). Effects of silver nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from mastitis-infected goats: an alternative approach for antimicrobial therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, 18(569). doi:10.3390/ijms18030569
- Zanella, Rodolfo. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. **Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología**, 5(1), 69-81. Epub 30 de agosto de 2021. Recuperado en 23 de enero de 2023, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2448-56912012000100069&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-56912012000100069&lng=es&tlng=es)
- Zea Álvarez, J. L., Talavera Núñez, M., Arenas Chávez, C., Pachecho Salazar, D., Osorio Anaya, A. M., & Vera Gonzalez, C. (2019). Obtención Y Caracterización Del Nanocomposito: Nanopartículas De Plata Y Carboximetil Quitosano (NpsAg-Cmq). **Revista De La Sociedad Química De Perú**, 85(1), 14-24.