



Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco

Lic. En Química Farmacéutica Biológica

Proyecto:

Potencialización del efecto antimicrobiano presente en las nanopartículas de plata mediante su funcionalización.

Asesoras:

Dra. Aída Hamdam Partida

Dra. Lucía Ortega Cabello

Alumna:

Hernández Vargas Andrea

Matrícula:

2173067600

Generación:

2017-2021

1. Antecedentes

1.1 Antibióticos

Existe evidencia histórica de que las civilizaciones más antiguas en Egipto, China, Grecia y Roma utilizaban productos naturales como hierbas, miel e incluso pan mohoso para el tratamiento de ciertas enfermedades. Posteriormente el descubrimiento de “pequeños seres vivos” por Antonie van Leeuwenhoek en 1676 así como la propagación de gonorrea y sífilis en la población de clase alta, fue lo que propició la investigación de los agentes causales, así como sus posibles tratamientos (1).

La piocianasa es uno de los primeros antibióticos usados contra infecciones humanas, fue aislado por Rudolf Emmerich (1856–1914) y Oscar Löw (1844–1941) a partir bacterias verdes presentes en vendajes de pacientes lesionados, años después Paul Ehrlich comenzó la investigación del efecto antimicrobiano de los tintes, ya que entre sus técnicas de tinción para bacilos alcohol-ácido resistentes utilizaba ácido nítrico, violeta de genciana y anilina disuelta en agua, observó que este último componente resultaba tóxico para las bacterias por lo que posteriormente siguió experimentando y probando con diferentes tintes, hasta que descubrió la asfrenamina, la cual fue comercializado bajo el nombre de Salvarsán una sustancia química a base de arsénico que demostró ser un tratamiento eficaz contra la sífilis. Estos acontecimientos iniciaron la era moderna de los antibióticos además de las bases teóricas de las tinciones diferenciales en la microbiología (1–3).

La sulfamidocrisoidina, fue uno de los primeros antibióticos en ser comercializado en 1930 bajo el nombre de “Prontosil”, el cual se utilizaba en el tratamiento contra infecciones estreptocócicas. El descubrimiento estuvo a cargo de Gerhard Domagk en IG Farben y posteriormente los químicos Josef Klarer y Fritz Mietzsch patentaron rutas sintéticas en 1932, cabe recalcar que en la patente solo se especificaba su actividad bactericida mas no la antimicrobiana por lo que tiempo después se clasificaría como un antibiótico de alto espectro y las demás farmacéuticas comenzarían el lanzamiento de la sulfamidocrisoidina en diferentes formas

farmacéuticas, una de ellas era la presentación en Elíxir el cual contenía dietilenglicol un saborizante venenoso. Sin embargo, la regulación de medicamentos en Estados Unidos en ese entonces era muy escasa y ambigua por lo que se registraron alrededor de 100 muertes por consumo de este medicamento antes del retiro de este del mercado (4).

Este tipo de acontecimientos han funcionado para establecer las bases y objetivos de una de las más importantes entidades regulatorias a nivel mundial que es la Administración de Medicamentos y Comida (FDA, por sus siglas en inglés).

La penicilina fue descubierta en 1930 por Alexander Fleming pero, presentaba una gran desventaja ya que su obtención y producción aún no se encontraban establecidas, fue hasta 1940 cuando Howard Florey y Ernst Chain publicaron un artículo de investigación que describía una técnica de purificación dando lugar a la producción a grandes escalas (1–4).

Los próximos años se fueron descubriendo, investigando y modificando la mayoría de los antibióticos que conocemos en la actualidad ya que algunos de los provenientes de microorganismos presentaban propiedades farmacocinéticas deficientes como una limitada biodisponibilidad o un tiempo de vida media bajo, un ejemplo de esto es la tienamicina la cual posee un tiempo de vida media muy corto, por lo que se identificó y modificó este factor agregando cilastatina la cual impide su degradación por dihidropepidasasa I situada en el riñón y por lo tanto aumenta el tiempo de vida media, por lo que recibió el nombre de Meropenem (3).

Así como trajo grandes beneficios a la humanidad el descubrimiento de los antibióticos, a largo plazo también comenzó a presentar ciertos desafíos como la resistencia bacteriana la cual, en un inicio bastaba con tratar la infección con una combinación de antibióticos. Sin embargo, la suma y constancia de diversos factores que se mencionan más adelante ha ido incrementando la resistencia al grado de ser una emergencia de salud a nivel mundial.

1.2 Resistencia bacteriana

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) define a la resistencia bacteriana como “la ausencia de respuesta por parte de la bacteria a la acción de los antibióticos o bien a la inhibición de crecimiento solo bajo concentraciones del fármaco mayores a las que se pueden alcanzar en el sitio de acción” (5).

Actualmente la resistencia bacteriana es una emergencia de salud a nivel mundial de acuerdo con la OMS ya que se estima que la mortalidad anual alcance los 10 millones para 2050 si no se diseña un plan de acción efectivo además de incrementos monetarios representativos en el sector salud, por lo que la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA, por sus siglas en inglés) ha nombrado a un grupo de bacterias como el grupo ESKAPE, estas representan una amenaza a la vida humana ya que ocasionan enfermedades infecciosas graves y se mencionan en la Tabla 1, otras instituciones como el Centro Europeo para Control y Prevención de Enfermedades (por sus siglas en inglés ECDC) incluye a *E. coli* como una de las principales bacterias peligrosas en Europa (6–8).

Dentro de las posibles causas del incremento en la propagación de bacterias multiresistentes se encuentra el uso irresponsable de los antimicrobianos (antifúngicos, antivirales, antibacterianos y antiparasitarios). Como ejemplos de este uso irresponsable se encuentran: como promotores de crecimiento, la profilaxis y el tratamiento de infecciones entre los animales de granja, además del uso erróneo en tratamientos y su escasa regulación de venta ya que en muchos países representa del 19% hasta el 100% del consumo total de medicamentos (6). Otra posible causa es la transmisión entre humanos ya que estos se pueden incorporar como parte de la microbiota intestinal por alimentos contaminados, aumentando la probabilidad de propagación mediante contacto directo (cadena alimenticia) o indirecta (efluentes/desechos agrícolas) (9).

Tabla 1. Bacterias del grupo ESKAPE de acuerdo con el IDSA (6).

Nombre científico
<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>

Klebsiella pneumoniae
Acinetobacter baumannii
Pseudomonas aeruginosa
Enterobacter cloacae

Existen ciertos compuestos identificados como impulsores de la resistencia o de la transferencia de genes de resistencia, estos en un inicio al igual que los antibióticos se utilizaron como controladores de resistencia y con el paso del tiempo las bacterias desarrollaron otros mecanismos los cuales se mencionan más adelante. Uno de estos compuestos son los metales pesados como: arsénico, zinc, cobalto, manganeso, plata y cobre siendo los genes de resistencia a este último metal de los más expresados. El segundo impulsor son los biocidas los cuales han demostrado que al someter a las bacterias a concentraciones subletales facilitan la selección de mutaciones que confieren resistencia a los antibióticos además de potencializar la resistencia antimicrobiana en patógenos (6).

1.2.1 Propagación de la resistencia bacteriana

De acuerdo con la OPS existen dos mecanismos generales de propagación de la resistencia bacteriana los cuales son:

- Por selección natural

Al ser vulnerable a la administración de antibióticos, la bacteria busca mecanismos que le permitan sobrevivir o evadir el efecto bactericida de estos, llamándolos “presión de selección”, si llega a ser constante puede heredar esta capacidad o mecanismo de evasión a sus descendientes y posteriormente llegar a ser la población dominante en el nicho ambiental donde se encuentren.

- Adquisición de material genético de otras bacterias

Estas a su vez, se pueden subclasificar de acuerdo con el mecanismo por el cual se adquiera el material genético.

- Transformación: incorporación del material genético producto de la lisis de otras bacterias.

- Transducción: Transferencia de material genético (cromosómico o plasmídico) mediante bacteriófagos.
- Conjugación: Intercambio de material genético (plasmídico) entre dos bacterias mediante los pili.

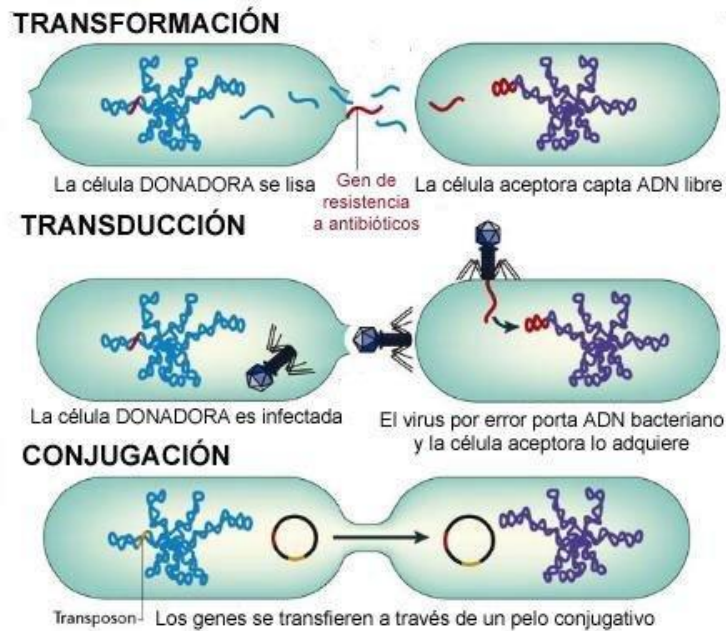


Figura 1.- Flujo de DNA en bacterias (Sociedad española de microbiología, 2017).

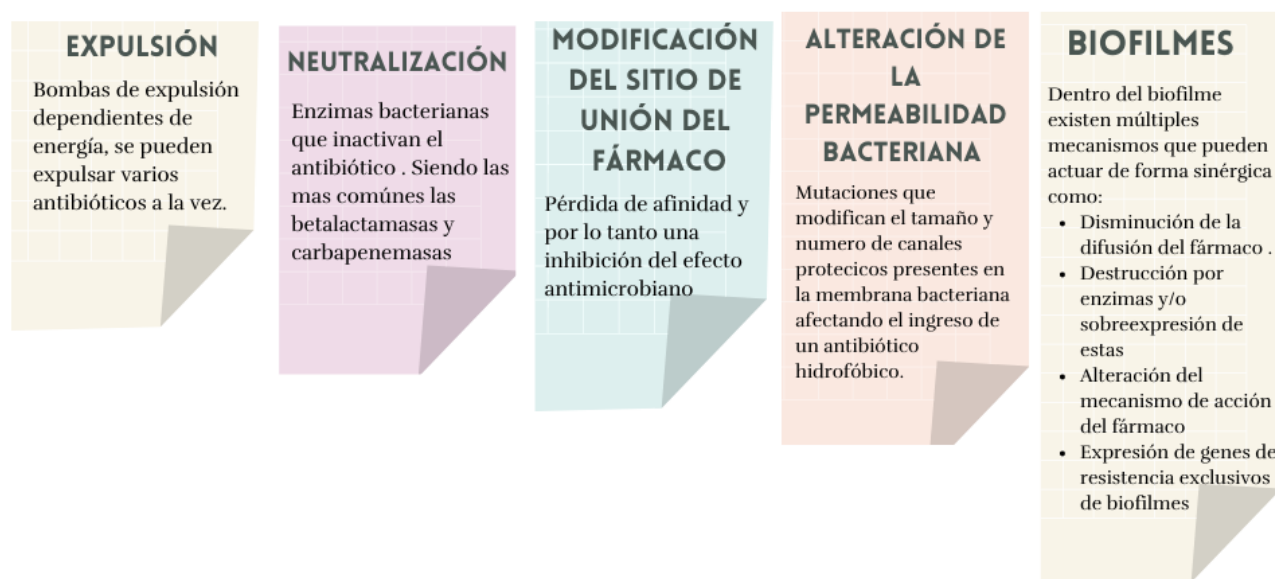
Siendo este último uno de los principales mecanismos de propagación ya que se han detectado en matrices de agua, aguas residuales, ríos y suelos, a través de corrales de engorde y desechos porcinos, por lo que se podría decir que el medio ambiente es un enorme reservorio de genes de resistencia bacteriana que se diversifica, crece y se expande mediante el líquido vital, que es el agua (5,6). Un factor muy importante que se debe considerar en la propagación de la resistencia es la increíble capacidad de los microbios para adaptarse a las diferentes condiciones y el tiempo de reproducción de estos, por lo que la “efectividad” de los antibióticos debería de ser tratada como un recurso que se debe restaurar y proteger ya que si no se logra podría tener consecuencias fatales para la humanidad y por lo

tanto reducir severamente la esperanza de vida en un grado similar al de la era anterior a los antibióticos (11,12).

1.2.2. Mecanismos de resistencia bacteriana.

En el Esquema 1 se describen de manera general los principales mecanismos de resistencia desarrollados por las bacterias (5)

Mecanismos de resistencia bacteriana



Esquema 1. Mecanismos de resistencia bacteriana (3, elaborado por el autor).

1.2.3 Estrategias contra la resistencia bacteriana

➤ Vacunas.

Se han planteado múltiples estrategias y soluciones para el tratamiento y/o disminución de la multiresistencia, una de ellas es el diseño de vacunas utilizando la ingeniería genética, la cual nos permite aumentar la especificidad y por lo tanto

la eficacia de las vacunas, ejemplos de esto son la vacunología inversa y la bioconjugación en donde se utiliza el conocimiento acerca del genoma de la bacteria para aislar y seleccionar aquellos antígenos que podrían funcionar en la producción de vacunas, esta estrategia presenta algunas desventajas como la reproducibilidad y difusión. Sin embargo, sus ventajas son mayores, ya que se abordaría desde un enfoque preventivo disminuyendo la tasa de mortalidad y la resistencia, esto mediante la disminución en la generación de mutaciones espontáneas y propagación de elementos genéticos móviles siendo ambos los principales mecanismos de propagación de la multiresistencia (13)

➤ Bacteriófagos

Sus propiedades se conocieron en 1896, cuando Ernest Hankin, bacteriólogo británico, informó sobre cierta actividad antibacteriana (contra *Vibrio cholerae*) en las aguas de los ríos Ganges. Sin embargo, no fue hasta 1917 cuando Felix d'Herelle, microbiólogo franco-canadiense informó en las actas de la reunión de la Academia de Ciencias de París de la existencia de estos describiéndolos como "virus capaz de parasitar bacterias". Posteriormente el, siguió con la investigación de estos, pero ahora con fines terapéuticos, la primera dosis de bacteriófagos se empleó en el tratamiento de disentería severa obteniendo resultados prometedores no solo en el tratamiento de cólera, sino también en la investigación del tratamiento de diferentes enfermedades, como la enfermedad cutánea estafilocócica, cólera y peste bubónica.

Ante este escenario el interés de la producción comercial de bacteriófagos, aumento y se fundó, el laboratorio comercial de D'herelle el cual, comercializó cinco diferentes preparados contra múltiples patógenos los cuales se denominaban Bacté-coli-phage, Bacté-rhino-phage, Bacté-intesti-phage, Bacté-pyo-phage y Bacté-staphy-phage, esta no fue la única compañía que comercializó bacteriófagos, Eli Lilly Company produjo siete productos de fagos para uso humano dirigidas contra *estafilococos*, *estreptococos*, *Escherichia coli*, entre otros. A comparación de Laboratorios D'herelle , Eli Lilly Company tenía disponible estas preparaciones en caldo o bases de gelatina soluble en agua. Sin embargo, la aparición de los

antibióticos paró totalmente la investigación, producción y uso de los bacteriófagos ya que los antibióticos tenían una mayor eficacia y reproducibilidad.

Existen institutos como el Instituto Eliava de Bacteriófagos, Microbiología y Virología (EIBMV) de la Academia de Ciencias de Georgia y el Instituto Hirsfeld que no han abandonado la investigación de los bacteriófagos e incluso los han planteado como una solución a la multirresistencia bacteriana. Dichas investigaciones se han llevado a cabo en países como Polonia, Estados Unidos y países Soviéticos y han llegado a estudios clínicos donde se utilizan en tratamientos contra *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella* y *E. coli* por mencionar algunos, obteniendo resultados prometedores (13).

➤ Desarrollo de antibióticos con mecanismo de acción novedosos

El principal reto a vencer es el tiempo ya que la propagación de la resistencia bacteriana mediante los múltiples mecanismos es mucho menor que el del desarrollo de un antibiótico ya que tan solo desde la solicitud de la patente, estudios clínicos en sus diferentes fases y su aprobación se reportan alrededor de 12 años con un costo de 500 a 1,000 millones de dólares aproximadamente, a esto se debe añadir la etapa de investigación y producción del fármaco por lo que tanto el costo y el tiempo aumentan razonablemente (14–16).

Sin embargo, la investigación y desarrollo de sistemas multidisciplinarios es de vital importancia además de que permite su reproducción a grandes escalas, una toxicidad relativamente baja y que sean amigables con el medio ambiente (9,11,12).

1.3 Nanotecnología

Una de las ciencias útiles para el desarrollo y conocimiento de sistemas multidisciplinarios que nos permitan cumplir con la mayoría de los requisitos anteriormente mencionados es la nanotecnología, uno de los primeros investigadores en introducir el concepto de nanotecnología como se conoce hoy en día fue Richard Feynman quien en 1959 durante su conferencia titulada "Hay mucho espacio en el fondo" en Caltech, introdujo el concepto de manipulación de la materia a nivel atómico, posteriormente en 1989 Drexler definió a la nanotecnología

como *“manejo controlado y precio de átomos y moléculas individuales”*. Este concepto se fue transformando y adaptando, aún no existe una definición universal pero la Iniciativa Nacional de Nanotecnología de Estados Unidos la define como la comprensión y el control de la materia (nanomateriales) en dimensiones entre 1 y 100 nm donde los fenómenos únicos permiten aplicaciones novedosas en múltiples áreas (17–19).

Una de las características y ventajas de esta ciencia es que es multidisciplinaria ya que aborda el estudio, diseño, síntesis, clasificación, aplicación de los nanomateriales en aparatos y sistemas funcionales, a través de la manipulación, control y explotación de las propiedades de la materia a nano-escala.

1.4. Tipos de nanomateriales.

Existen diversos tipos de clasificación de nanomateriales (NM), uno de los más utilizados es de acuerdo con sus dimensiones y tamaños ya que es una propiedad cuantificable mediante diferentes técnicas de caracterización además de determinar el espacio de forma ordenada que poseen, dicha clasificación se basa en el movimiento de electrones presentes en el NM y existen 4 tipos:

- Dimensión 0: Presencia de electrones
- Dimensión 1: Movimiento libre de electrones a lo largo del eje X.
- Dimensión 2: Movimiento libre de electrones en los ejes X, Y.
- Dimensión 3: Movimiento libre de electrones a través de los ejes X, Y, Z (20,21).

1.5. Tipos de nanopartículas.

Las nanopartículas son agregados de átomos y son clasificados como un NM de dimensión 0, puede estar presente o no el carbono en su estructura siendo esta característica la base de una de las clasificaciones más comunes como se muestra en el Tabla 2.

Tabla 2. Tipos de nanopartículas (20).

Tipo de nanopartículas	Características	Ejemplos
Orgánicas	<ul style="list-style-type: none"> ● Biodegradables ● No tóxicas ● Acarreador de fármacos 	<ul style="list-style-type: none"> ● Liposomas ● Dendrímeros ● Hollow core
Inorgánicas		
Basadas en metales	<ul style="list-style-type: none"> ● Tamaños entre 10 y 100 nm ● Mayor área superficial (puede presentar carga) ● Sensibilidad a ciertos factores como: pH, temperatura, humedad y luz. ● Mayor volumen de radio ● Mayor tamaño de poro 	<p>La mayoría de los metales pueden sintetizarse en NP como:</p> <p>Oro, Cadmio, Cobalto, Cobre, Hierro, Aluminio, Plomo , Zinc y Plata.</p>
Basadas en óxidos metálicos	Modificaciones post-síntesis que influye en las propiedades de las NP.	La oxidación del Fe_2O_3 aumenta su reactividad.
Basadas en carbono	Compuestas totalmente de carbono.	<ul style="list-style-type: none"> ● Fullerenos ● Nanotubos de carbono. ● Grafeno

- Nano fibras de carbono
- Carbono activado.

Uno de los tipos de nanopartículas que han sido mayormente investigadas, sintetizadas y utilizadas son las Nanopartículas Metálicas (NPM) debido a sus múltiples propiedades como el tamaño nanométrico, lo que nos permite un mayor aprovechamiento de las propiedades presentes en los metales e incluso se ha reportado que la aleación de distintos metales, es decir nanopartículas bi o trimetálicas, permite el sinergismo de las propiedades individuales de los metales, por ejemplo las NP bimetálicas de Au-Pt poseen una capacidad catalítica que puede ser potenciada por la luz (22–26)

1.6. Nanopartículas de plata.

En el caso específico de las nanopartículas de plata (*AgNP's*) poseen la propiedad antimicrobiana proveniente de la plata, su uso se remonta incluso antes del año 750 d.C donde en su forma de moneda se utilizaban para conservar el agua, posteriormente en el siglo XVII lo definían como un medicamento “multipropósito” ya que era usado en el tratamiento de epilepsia, cólera e infecciones oculares. Con estos antecedentes, el cirujano WD Halstead en el siglo XX introdujo el uso de vendajes de lámina de plata. Fue hasta 1955 que la FDA aprobó su uso en solución, posteriormente se fueron modificando las formas farmacéuticas, su investigación y aplicación en conjunto con otros compuestos como sulfonamidas, clorhexidina con el objetivo de potenciar su efecto, disminuir su toxicidad al contacto con tejidos y/o células, el control de bacterias resistentes o la ampliación del campo de aplicación.

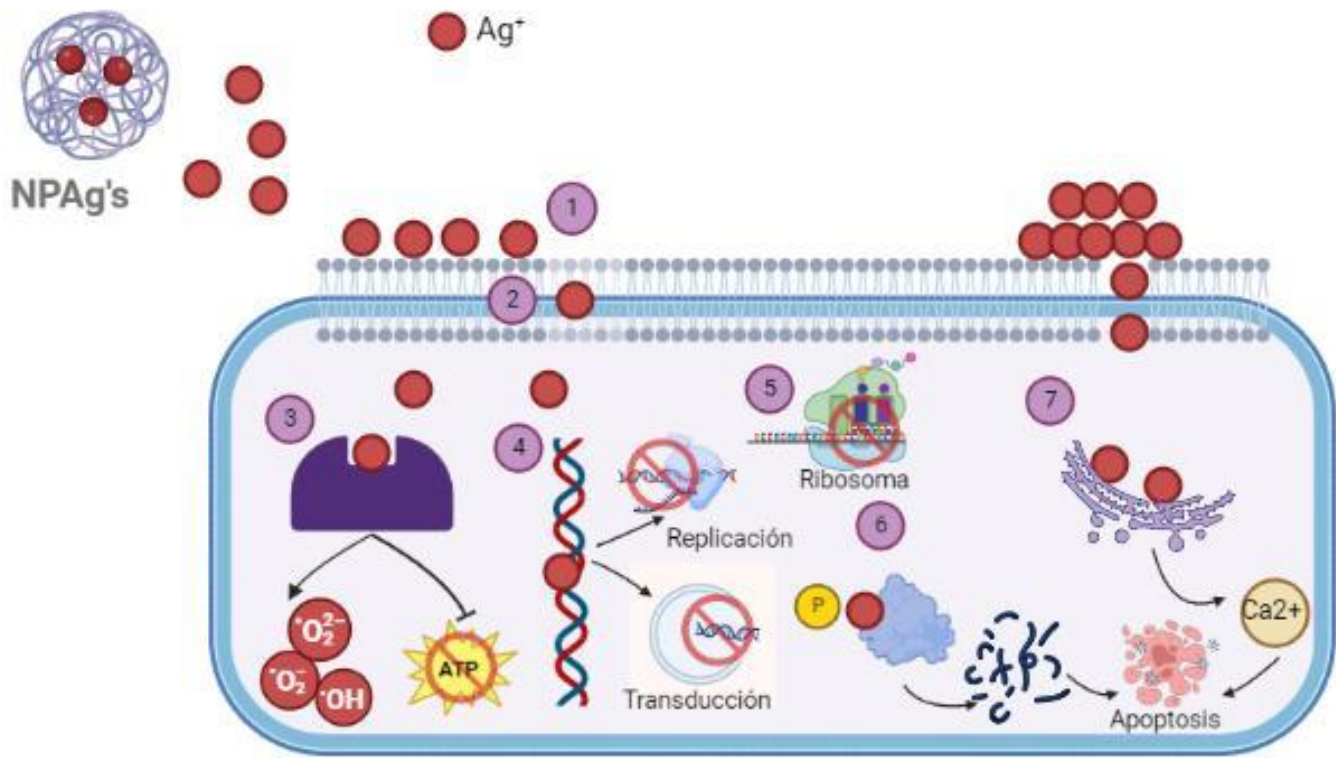
Además ciertas características que poseen las NP aumentan la eficacia del efecto antimicrobiano como, una mayor área superficial, ya que permite una exposición mayor de la superficie a los microorganismos, la presencia de carga positiva o neutra en las *AgNP's* tiene la capacidad de desestabilizar, formar agregados,

descomponer y aumentar/disminuir (según sea el caso) la permeabilidad de la membrana bacteriana; la capacidad de formar agregados influye en la velocidad de disolución ya que dicha capacidad es menor a comparación de la de una *AgNP* aislada, de igual manera la morfología y tamaño influyen en la propiedad antimicrobiana ya que han reportado que aquellas que poseen un mayor número de lados, que son esféricas y/o poseen un tamaño de menos de 10 nm, tiene una relación directa con la velocidad de disolución en el medio debido al área de exposición y facilidad de absorción (23,24).

Por otro lado, también existen ciertos factores extrínsecos como la velocidad y eficiencia de disolución capaces de influir en la liberación de iones de plata y por lo tanto en la eficiencia antimicrobiana, como la presencia de componentes orgánicos o inorgánicos afecta la disolución debido a la formación de complejos con los iones de plata, o bien las condiciones del medio como el pH ya que en soluciones ácidas presentan una mayor liberación, o bien aquellos que dependen del microorganismo como la pared celular; en específico las bacterias Gram negativas presentan mayor susceptibilidad a los iones ya que esta presenta un menor grosor y por lo tanto mayor probabilidad de absorción, formación de poros, etc (25).

1.6.1 Mecanismos antimicrobianos de las *AgNP*'s.

Existen múltiples mecanismos antimicrobianos de la plata que han sido reportados. Sin embargo, los investigadores afirman que aún hay más por explicar e incluso por descubrir, algunos de ellos se muestran en el Esquema 2.



Esquema 2.- Mecanismos antimicrobianos de AgNP's (Elaborado por el autor).

La mayoría de los mecanismos se basan en la liberación y tránsito de los iones de plata mediante la célula bacteriana a partir de las AgNP's. En el número 1 del Esquema 2 los iones se adhieren a la membrana citoplasmática debido a la afinidad electrostática existente entre las proteínas que contienen azufre ubicadas en la membrana y los iones lo cual puede tener múltiples efectos como: aumento de la permeabilidad (número 2, Esquema 2) lo que permite la absorción de los iones de plata que desactivan las enzimas respiratorias generando especies reactivas de oxígeno e interrumpiendo la producción de Adenosín Trifosfato (ATP) (número 3, Esquema 2), por otro lado dada la relación iones de plata- Azufre e iones de plata-fosfato y siendo los principales componentes del ADN, los iones de plata pueden interferir en la replicación y por lo tanto en la reproducción del microorganismo (número 4, Esquema 2), también son capaces de desnaturalizar los ribosomas en el citoplasma (número 5, Esquema 2); son capaces de interrumpir la transducción de señales mediante la desfosforilación de residuos de tirosina en sustratos

peptídicos llevando a la célula a apoptosis (número 6, Esquema 2). O bien la acumulación de estos en la membrana puede formar poros debido a la capacidad de desnaturalización de proteínas provocando estrés en múltiples organelos como el retículo endoplásmico el cual es capaz de liberar Ca^{2+} debido al estrés, el Ca^{2+} se encarga de la activación de proteínas inductoras de la apoptosis (26).

No solo han reportado el efecto bactericida si no también efecto antifúngico por lo que algunos de los microorganismos susceptibles a *AgNP's* se mencionan en la Tabla 3.

Tabla 3.- Bacterias y hongos susceptibles a las *AgNP's* (24).

-Bacterias	Hongos y levaduras
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Cándida sp.</i>
<i>Salmonella enterica</i>	<i>Phoma glomerata</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>P.herbarum</i>
<i>Escherichia coli.</i>	<i>Fusarium semitectum</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Trichoderma sp.</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Salmonella typhimurium</i>	

En ambos casos, se ha reportado que el uso de antibióticos o antifúngicos en conjunto con las *AgNP's* potencializa el efecto (27,28).

1.6.2. Citotoxicidad de las *AgNP's*.

Así como se ha descrito su gran potencial antimicrobiano, se debe tomar en cuenta que es una propiedad citotóxica, por lo que también afecta al ser humano. Mediante ensayos experimentales se ha demostrado que de acuerdo al nivel de exposición serán los efectos nocivos, por ejemplo al contacto es capaz de generar la decoloración gris azulada permanente de la piel o los ojos, frente a compuestos de plata solubles puede producir daño hepático y renal; irritaciones de ojos, piel, vías respiratorias e intestinales; cambios adversos en las células sanguíneas y reproductoras, además de que su almacenamiento posee una relación proporcional

a los efectos citotóxicos, es decir los iones de plata envejecidos presentan una mayor toxicidad que los iones recién liberados.

Las *AgNP's* también poseen efectos nocivos para el medio ambiente, la mayoría residuos provenientes de su síntesis, por lo que se ha investigado otras rutas de obtención una de ellas es la síntesis verde.

Una de las propiedades que ayudaría a disminuir la citotoxicidad presente en las *AgNP's* es su capacidad de formar coronas proteicas, se trata de la adsorción de proteínas en la superficie de la NP esto sucede mediante enlaces de hidrógeno, covalentes o fuerzas de Van der Waals según sea el caso, estas interacciones pueden ser irreversibles denominándose "coronas duras" o reversibles también conocidas como "coronas blandas", por lo que las coronas proteicas tendrían una interacción directa con las células y no las *AgNP's*, además de influir en la absorción, formación de aglomerados y disolución. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que, así como disminuye la toxicidad en células somáticas también la disminuirá en células bacterianas por lo que aún se necesita una mayor comprensión de esta propiedad para lograr diseñar sistemas exitosos de nanomedicamentos y nanodispositivos (29).

Al igual que en el efecto antimicrobiano, existen ciertos factores que pueden modificar la citotoxicidad como: el tamaño entre 20-40 nm, el cual aumenta la toxicidad casi en un 10% en *AgNP's*, la funcionalización por el contrario es capaz de disminuir la citotoxicidad (26).

1.7. Síntesis de nanopartículas.

De manera muy general los tipos de síntesis se pueden clasificar de acuerdo con los métodos de obtención los cuales pueden ser "Bottom-down" (de arriba hacia abajo), las cuales se llevan a cabo la descomposición de materiales a granel hasta llegar al tamaño de las nanoestructuras deseadas mediante métodos físicos, el segundo método es "Bottom-up" (de abajo hacia arriba) en donde se ensamblan o unen átomos y moléculas hasta generar las nanoestructuras mediante métodos

químicos. Es de vital importancia conocer ciertas propiedades de los materiales que se utilizaran como: propiedades superficiales, distribución de tamaño, morfología aparente, composición de partículas, tasa de disolución, ya que estas tienen un impacto directo con las características de las nanopartículas sintetizadas (28).

En el Esquema 3 se describen los métodos de obtención tanto físicos como químicos (28).



Esquema 3. Tipos de síntesis de NP (28,30–34, elaborado por el autor).

Cada método de síntesis tiene ventajas y desventajas, las cuales pueden o no favorecer la síntesis dependiendo de las características que se necesiten en las nanopartículas. Por ejemplo, en el método de molienda es muy difícil el control del tamaño, sin embargo, es bastante accesible a comparación del resto, mientras que en la ablación por láser este parámetro puede ser más controlado mediante la modificación de ciertas condiciones como la temperatura además de una mayor

pureza ya que sólo se necesitan de solventes y tensoactivos para su síntesis. Sin embargo, una desventaja general de los métodos físicos es la aglomeración presente en las NP al no utilizar surfactantes o agentes estabilizadores (26,30).

Por otro lado, los métodos químicos son de los principalmente utilizados en la síntesis de nanopartículas metálicas, ya que para lograr las características deseadas de las *AgNP*'s en términos de distribución de tamaño, forma y tasa de dispersión sólo se necesitan modificar los agentes reductores y de protección. Sin embargo, sus desventajas son los bajos porcentajes de rendimiento además de la liberación de sustancias tóxicas para el ambiente y la salud.

Dentro de los agentes reductores se encuentran: glucosa, hidracina, ascorbato, hidrato de hidracina, etilenglicol, N-dimetilformamida, dextrosa, borohidruro de sodio y citrato por mencionar algunos (26).

Una alternativa de síntesis amigable con el medio ambiente y nuestro organismo es la síntesis verde, la cual utiliza la capacidad de ciertos seres vivos como plantas, levaduras o metabolitos de estos como enzimas, antioxidantes capaces de reducir soluciones metálicas y liberar los metales en forma de iones, hay que recordar que puede existir tanto sensibilidad como resistencia a los iones metálicos por parte de algunos microorganismos. Dentro de las ventajas de esta alternativa se encuentran los mayores a los proporcionados por la síntesis física o química, una mayor pureza, estabilidad, biocompatibilidad, bajo costo y facilidad de caracterización. Por otro lado, las desventajas son tiempos de producción mayores, técnicas de purificación laboriosas (si la producción se da de manera intracelular), comprensión deficiente del mecanismo de producción y por lo tanto de su modificación (35).

1.8. Estabilidad de las NP.

Posterior a la síntesis es fundamental su estabilización, ya que como se ha mencionado anteriormente poseen una gran área superficial y por lo tanto un exceso de energía libre superficial que puede llevar a la aglomeración e incluso oxidación de las NPM, con el objetivo de prevenir estas situaciones el control del tipo de

interacción que se establece con el medio es primordial y esto se logra mediante un equilibrio cinético y termodinámico (36,37).

Existen diferentes tipos de estabilización, las cuales se muestran en el Esquema 4.



Esquema 4. Tipos de estabilización de NP (30, elaborado por el autor).

La estabilización estérica mediante polímeros representa una gran opción para su posterior funcionalización, ya que cada monómero presenta un sitio de unión a un grupo funcional por lo que aumenta considerablemente la afinidad de la NPM al sitio de interés también conocida como funcionalidad lateral, por otro lado, en la funcionalidad terminal el sitio de unión se localiza en el extremo terminal de la cadena. En el caso de los copolímeros, la presencia de diferentes tipos de polímeros representa la unión de diferentes tipos de grupos funcionales con control sobre su distribución a lo largo de la estructura polimérica lo que aumenta la estabilidad y control del comportamiento de la NP en el medio. La aplicación de polímeros

dependerá del medio en que se emplearán, por ejemplo: el óxido de polietileno en medios hidrófilos, la poliisopropilacrilamida (PNIPAM) en sistemas termosensibles y biocompatibles o el poliestireno (PS) en medios dispersantes. Algunos polímeros además de agentes estabilizadores pueden actuar como agentes reductores en el proceso de síntesis ejemplo de ello es la Polivinilpirrolidona (PVP) , poliacrilato de sodio o polietilenimina (36).

1.10. Caracterización de NP.

La gran importancia de conocer las propiedades de las NP se basa en la comprensión de su actividad, transporte, destino y toxicidad ya que si estas no son satisfactorias de acuerdo con el objetivo se podría modificar la NP mediante diferentes rutas como, por ejemplo; la síntesis, las condiciones, o implementar ciertas técnicas que nos permitan modificarlas como la funcionalización. Todo lo anterior con el objetivo de que la relación proceso-estructura-propiedades-rendimiento sea satisfactoria (27,38).

Por lo que el uso de técnicas para determinar estos parámetros es habitual, en la Figura 6. Se muestran algunas de las técnicas que se pueden utilizar de acuerdo con la propiedad.

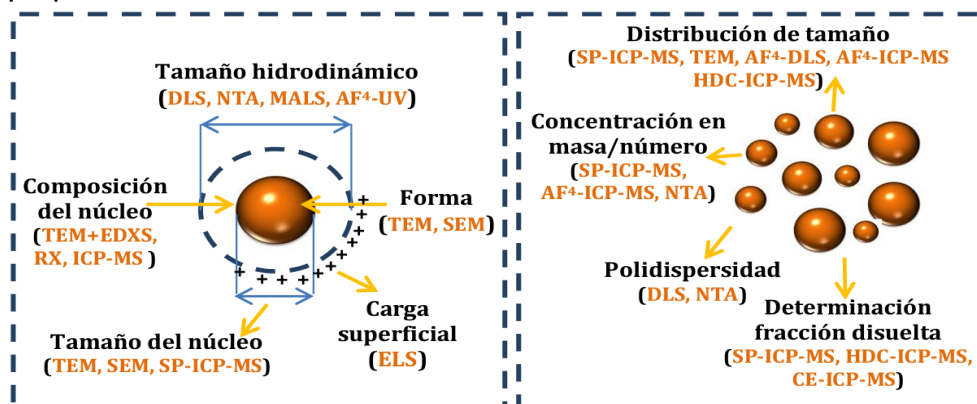


Figura 6.- Técnicas analíticas más empleadas para la caracterización de nanopartículas (Martínez Garcia,2014).

Para determinar el tamaño y potencial zeta de las NP, se utilizan técnicas como la Dispersión de Luz Dinámica, debido a que esta técnica resulta de las más adecuadas para muestras de tamaño nanométrico, su fundamento se basa en el

movimiento browniano, ya que al hacer pasar la luz láser esta se dispersa en diferentes intensidades las cuales son proporcionales a la velocidad del movimiento y mediante la relación de Stokes-Einstein nos permite determinar el tamaño. Se considera una técnica no destructiva y de “conjunto” ya que nos permite la obtención de datos del conjunto de partículas que conforman la solución y no solo de una partícula (27,39).

Para la determinación individual del tamaño de una nanopartícula se utilizan técnicas actuales de alta resolución como el Análisis de Seguimiento de Nanopartículas el cual consiste de manera general en tres pasos: el primero es la captura de un vídeo del movimiento de las partículas, el segundo es el análisis de este movimiento mediante un software y por último la generación de datos de distribución de tamaño. El uso en conjunto de ambas técnicas nos permitiría el análisis de muestras concentradas, heterogéneas y/o partículas fluorescentes (40).

Por otro lado, para determinar la morfología y aglomeración, se utilizan técnicas de microscopía en donde se hace pasar un haz de electrones sobre la muestra los cuales al interactuar se difractan, se dispersan o se transmiten de acuerdo con la técnica elegida. Por lo que este tipo de técnicas se consideran destructivas, además que la muestra necesita de una previa preparación para poder ser analizada. Sin embargo, la dispersión de los electrones es la que nos permite obtener una imagen real debido a la resolución atómica (27).

Dentro de estas técnicas se encuentran:

- Microscopía Electrónica de Transmisión

De manera general, el haz de electrones es enfocado para incidir en la muestra la cual debe tener un espesor menor a 200 nm estos electrones se pueden dispersar o no de acuerdo con la presencia o ausencia de interacción con la muestra estos son captados por una serie de lentes magnéticos los cuales se encuentran debajo de la muestra y a su vez emiten una señal al detector que por lo general es una pantalla fluorescente o una cámara de video. Una de las principales ventajas es la diversidad de materiales sólidos que se pueden analizar como: metales, cerámicas,

polímeros, materiales semiconductores y compuestos, por otro lado, una de sus principales desventajas es la resolución a profundidad limitada (27,41).

- Difracción de Rayos X

Es una técnica que nos permite identificar la composición elemental de las NP además de la forma y tamaño de sus fases cristalinas, su fundamento se basa en que un rayo difractado está compuesto por muchos rayos dispersados a través de átomos presentes en el sólido, para lograr esta “cooperatividad” entre los rayos la diferencia de los ángulos de dispersión “ Θ ” debe ser proporcional a la longitud de (27,29). Es una de las principales técnicas utilizadas para la caracterización de *AgNP*'s, ya que es de las más accesibles. Sin embargo, la principal desventaja es la gran cantidad de muestra que se requiere respecto a las demás técnicas.

- Microscopía Electrónica de Barrido

En este análisis el haz de electrones penetra directamente la muestra ocurriendo una serie de interacciones que culminan con la emisión de electrones o fotones de la superficie donde se encuentra la muestra, de igual manera estos son captados por los detectores emitiendo una imagen. Por lo que se podría decir que a un mayor número de átomos presentes en la muestra habrá un mayor número de electrones o fotones emitidos (28,40).

- Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier

El fundamento de esta técnica analítica cualitativa se basa en las vibraciones presentes en las moléculas, producto de la excitación de los electrones mediante la absorción de rayos infrarrojo. Las vibraciones son detectadas por un detector localizado en el infrarrojo y posteriormente procesadas por el algoritmo de “Transformada de Fourier” para la obtención del “Espectro infrarrojo” el cual este compuesto por picos en ciertas regiones, los cuales revelan un tipo específico de vibración por lo que resulta de gran utilidad para la identificación de grupos funcionales y en la caracterización de NPM ya que nos ayuda a detectar las

especies químicas enlazadas a la superficie y por lo tanto a llevar a cabo una caracterización más específica (42).

En el caso en específico de la síntesis de *AgNP's* donde se utiliza AgNO_3 como precursor se observa una banda de absorción muy intensa a 1376 cm^{-1} característica de dicho compuesto (Figura 7 y 8) (43). Posterior a la síntesis en el Espectro de las *AgNP's* se observa una banda en 1385 cm^{-1} de menor intensidad la cual es característica del ión NO_3^- en su forma libre, por lo que evidencia la interacción de los iones Ag^+ con otros compuestos presentes en las *AgNP's* (44).

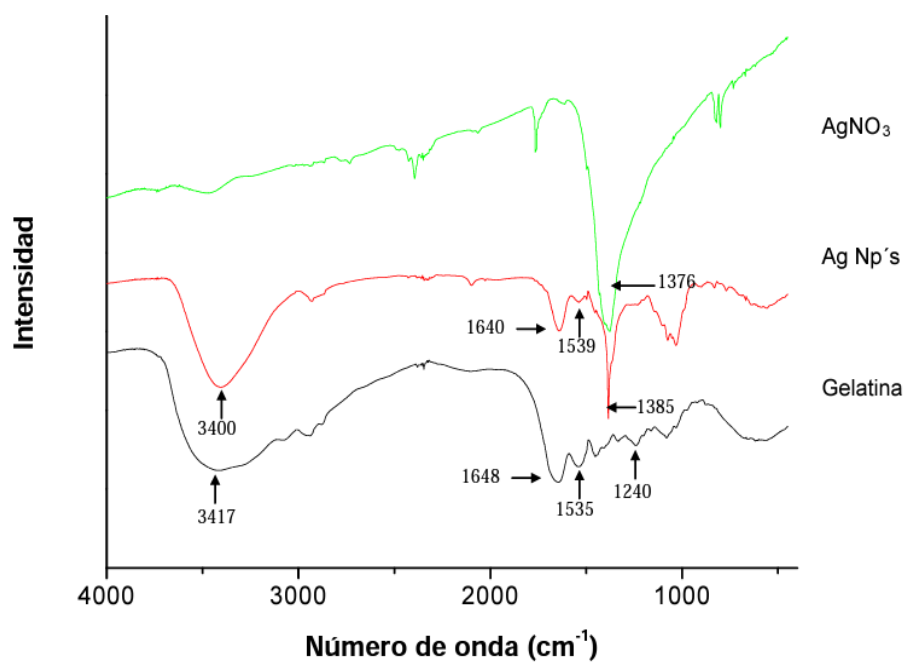


Figura 7. Espectros FTIR de precursores (AgNO_3 - gelatina) y *AgNP's* (Maya et, al, 2014).

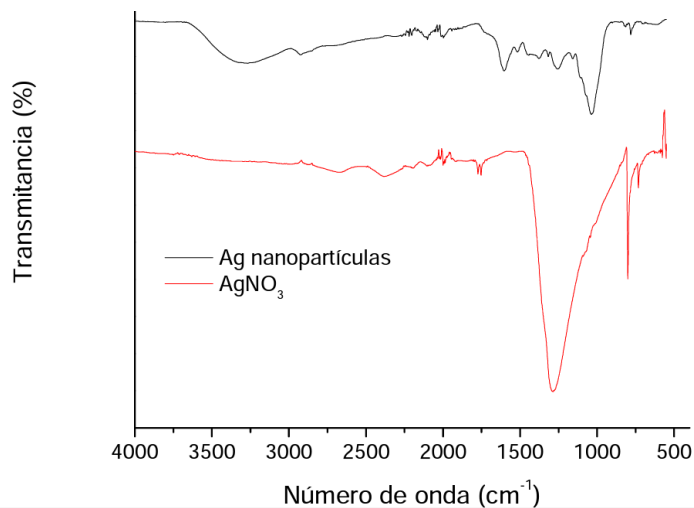


Figura 8. Espectro FTIR de AgNO₃ y AgNP's (Sánchez Moreno, 2017).

- Espectroscopia UV-Visible

Como en la mayoría de los métodos analíticos, esta técnica es cualitativa y se basa en la excitación de los electrones de enlace mediante la absorción de la radiación UV- visible (ya que la longitud de onda está comprendida entre los 160 y 780 nm). En el caso de las NPM los electrones excitados son los que se encuentran libres en la superficie, lo que genera oscilación coherente deslocalizada cuando esta oscilación se acopla con las frecuencias de la onda incidente genera plasmones superficiales de nanoestructuras. En el caso en específico de las *AgNP's* la aparición de bandas de absorción en el espectro se encuentra alrededor de 400 a 450 nm. Además de la presencia de las *AgNP's* el espectro también nos permite saber ciertas características como el tamaño, forma y polidispersidad de las moléculas. Por ejemplo: la emisión de un pico a 400 nm corresponde a *AgNP's* de menos de 5 nm de diámetro, mientras que, si el pico de absorción se desplaza a 420 nm, el tamaño predominante de las *AgNP's* es de alrededor de 20 nm (46).

En la Figura 9 se observa que la absorción aumenta conforme el tiempo de síntesis debido al incremento del número de partículas presentes, además el ancho de la banda nos indica un mayor tamaño y por lo tanto mayor polidispersidad.

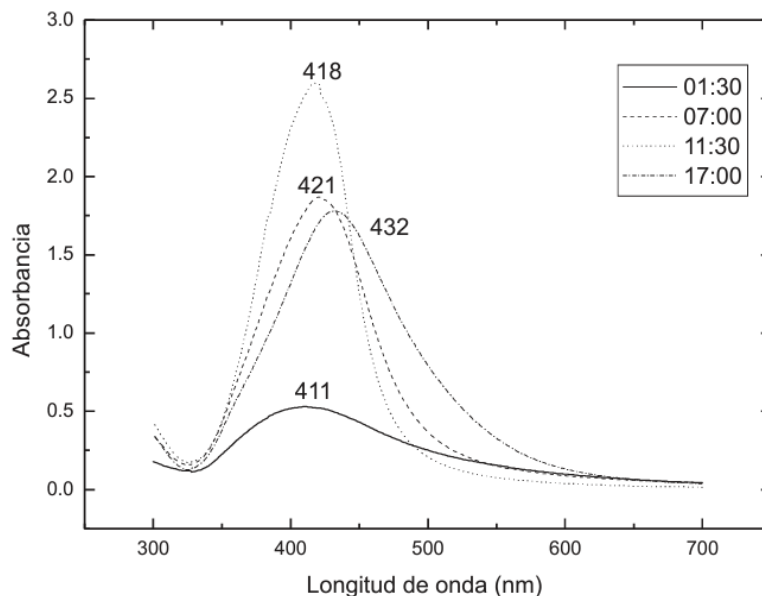
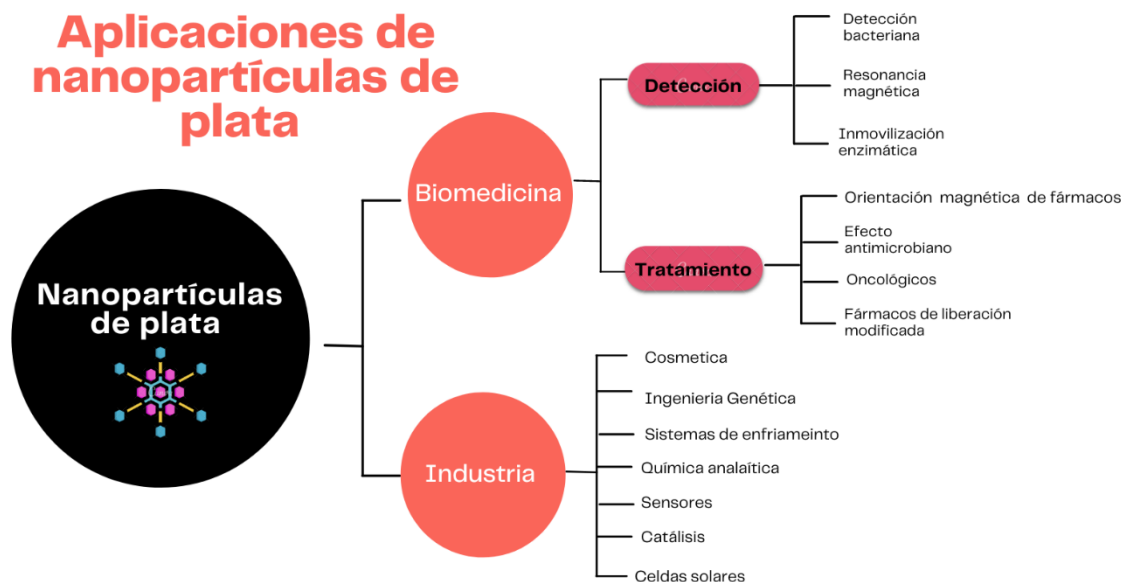


Figura 9. Espectro UV-Visible durante la síntesis de *AgNP's* (Morales at. al., 2009).

1.11. Aplicaciones de las *AgNP's*

Debido a las propiedades de las *AgNP's* existe un amplio campo de aplicaciones las cuales se pueden clasificar de acuerdo con el área o industria en que se desarrollan como se muestra en el Esquema 5 la Biomedicina ha sido uno de los campos más investigados en este ámbito, específicamente en las etapas de detección y tratamiento. Dentro de estas aplicaciones se encuentra la liberación modificada de fármacos utilizando NPM's ya que a diferencia de las formas farmacéuticas tradicionales esta presenta una mayor eficacia al aumentar la interacción ligando-receptor mediante la dosificación y el uso de campos magnéticos cerca de la diana, sin embargo este campo disminuye de acuerdo a la profundidad del receptor respecto a la superficie del cuerpo por lo que han propuesto el implante de imanes cerca de la diana como una posible solución. La funcionalización de las NPM's permite aumentar la interacción ligando receptor

además de evitar efectos adversos como la toxicidad debido a la ausencia de interacción entre las NPM's y células biológicas o proteínas (48,49).



Esquema 5. Aplicaciones de las nanopartículas de plata (48–52, elaboración del autor) .

1.9 Funcionalización de NP.

La funcionalización consiste en sustituir algunos elementos de la capa protectora por grupos funcionales los cuales pueden dar mayor estabilidad, o bien unirse a un sitio específico, como se muestra en la Figura 10 el grupo funcional F necesita de un ligando con afinidad a la NPM para que se logre la unión o interacción con el sitio específico X (53).

La unión del grupo funcional se da mediante enlaces covalentes y no covalentes como puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, siendo los compuestos productores de enlaces covalentes los preferidos para la funcionalización ya que no afectan la estructura de la NP ni la interacción NP-sitio específico, un ejemplo de estos compuestos es el Polietilenglicol (PEG).

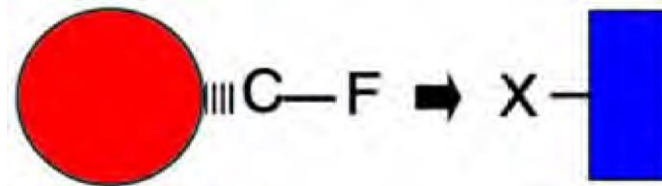


Figura 10. Funcionalización de NPM (Cardoso, 2011).

Para lograr lo anterior se deben de tomar en cuenta ciertos factores de las NPM:

- La cinética de la síntesis ya que dependiendo de esta será el número de ligandos que se unan a la superficie;
- La estructura de las NPM ya que se ha reportado que se presenta una mayor unión en las aristas y vértices;
- La estructura del ligando y de la capa protectora puesto que podría presentarse un impedimento estérico afectando la funcionalización.
- Las condiciones del medio.
- Estabilidad óptima de la NP.

La funcionalización se puede llevar a cabo utilizando compuestos orgánicos/inorgánicos o bien creando enlaces covalentes o no covalentes.

Funcionalización con moléculas orgánicas: en su mayoría son estructuras simples lo que aumenta la eficacia de la funcionalización, dentro de estos se encuentran: citratos, fosfatos, aminas, tioles y en el caso de las NPM se ha logrado la funcionalización con grupos hidroxilo, carboxilo y sulfhidrilo los cuales en su mayoría presentan aplicaciones en la nanomedicina.

Funcionalización con moléculas inorgánicas como silica metales u óxidos metálicos (52).

Funcionalización no covalente: una de las principales ventajas de este tipo de funcionalización es que no daña la estructura básica de la nanopartícula ya que interacciona el sistema π de la NP y ligandos como cationes, aniones o electrones del micromaterial por lo que permite una funcionalización duradera y por lo tanto un incremento en su campo de aplicación. Este tipo de funcionalización es recomendable para estructuras ordenadas y con una gran área de exposición,

dentro de los micromateriales comúnmente empleados se encuentra: polímeros, surfactantes, enzimas, proteínas y moléculas con grupos amino en su estructura (54,55).

Funcionalización covalente: Debido a la estabilidad presente en las nanopartículas es necesario llevar a cabo una modificación covalente, es decir transformar la configuración del carbono de sp^2 a sp^3 con el objetivo de aumentar su solubilidad. Uno de estos procesos es la oxidación donde se utilizan bases o ácidos como el ácido nítrico o sulfúrico los cuales literalmente crean hoyos en la superficie de la molécula debido a que las NP absorben una gran cantidad de oxígeno y agua, lo que aumenta la distancia entre láminas y al mismo tiempo disminuye la interacción entre ellas.

También existen los procesos de reducción controlada como la reducción térmica, electroquímica o fotocatalítica los cuales como su nombre lo dice controlan o disminuyen su reactividad eléctrica (54).

Posterior a la modificación las NP pueden reaccionar con:

- Grupos oxigenados, como: ácidos carboxílicos, anhídridos, lactonas, fenoles, quinonas, carbonilos y éteres; se pueden generar a partir de oxidación húmeda donde la NP entra en contacto con una disolución oxidante o la oxidación seca donde la NP se expone a un gas oxidante.
- Grupos nitrogenados, como: grupos amino, piridínicos y pirrólicos los cuales de acuerdo con su ubicación son capaces de modificar la estructura y propiedades fisicoquímicas de la NP como basicidad, hidrofiliidad, reactividad, estabilidad, conductividad, etc. Su obtención puede llevarse a cabo mediante reacción con reactivos nitrogenados, activación del grupo carboxilo con cloruro de acilo, descomposición térmica de un precursor nitrogenado, carbonización por vapor o hidrotérmica.
- Azufre: La presencia del azufre en las NP aumenta la estabilidad y funciona como centro catalítico, su obtención se da a partir de la interacción con reactivos azufrados,

- Fósforo: Se ha demostrado que es capaz de mantener la estabilidad electroquímica de la NP en diferentes condiciones además de reducir la velocidad de oxidación de la NP aumentando su propia oxidación. Este tipo de funcionalización se lleva a cabo comúnmente mediante la activación con ácido fosfórico de precursores de NP(56).
- Radicales libres: estos son comúnmente producidos por el calentamiento de las sales de diazonio, permiten mantener los enlaces sp^2 de la NP y disminuye la conductividad.
- Dienófilos: altera la configuración sp^2 a sp^3 de un gran número de carbonos presentes en la NP, sin embargo, permite el uso de múltiples precursores como aldehídos o aminoácidos y por lo tanto aumenta la variedad de grupos funcionales (54).

Existen ciertos factores que pueden influir en la funcionalización exitosa de las NP, como:

- Tamaño iónico: dependiendo el tamaño de las NP dependerá la estructura con la que se pueda funcionalizar, por ejemplo: si las NP de un menor tamaño se funcionaliza con partículas de gran tamaño como proteínas es muy probable que disminuya la estabilidad de la NP (57).
- pH: dependiendo del ligando como de la nanopartícula, el grupo funcional es capaz de influir en la especificidad, estabilidad e incluso en la reactividad de la NP con el grupo funcional, por ejemplo, Nobs et. al. menciona que la funcionalización de liposomas con ácido carboxílico disminuye notablemente la especificidad de la unión del liposoma al anticuerpo (57,58).

1.10. Métodos para la evaluación del efecto antimicrobiano.

Existen múltiples institutos encargados de armonizar la terminología y metodología empleada para la evaluación del efecto antimicrobiano, dos de los principales centros son: Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI) y el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: EUCAST).

1.10.1 Métodos de difusión.

Este método cualitativo se basa en la técnica de Kirby Bauer que consiste en el sembrado homogéneo de una cepa bacteriana en un medio de cultivo óptimo como el agar Müeller Hinton, posteriormente se colocan discos de papel filtro impregnados de la sustancia antimicrobiana a evaluar o bien se realizan orificios en el agar donde posteriormente se deposita cierta cantidad de la sustancia a evaluar. Después de cierto tiempo de incubación se mide el halo de inhibición de crecimiento de la cepa, la medición del halo de inhibición nos permite conocer el efecto del antibiótico sobre la bacteria, como:

- Resistencia: No hay impacto sobre el crecimiento de la bacteria por parte del antibiótico al que anteriormente sí era sensible.
- Susceptibilidad intermedia: si existe un impacto directo del antibiótico contra los mecanismos de defensa de la bacteria, pero no el suficiente para eliminarla, para esto se necesitan concentraciones mayores.
- Susceptibilidad: el antibiótico inactiva o modifica los mecanismos de defensa de las bacterias ocasionando la inhibición del crecimiento.

Existen ciertos aspectos que se deben tomar en cuenta para el desarrollo de este método como: cepas de crecimiento rápido, debido al tiempo de incubación como *Staphylococcus aureus* o enterobacterias y propiedades fisicoquímicas de la sustancia antimicrobiana a evaluar como polaridad o peso molecular, ya que ambas

influyen en la capacidad de migración de dicha sustancia y por consecuencia en la formación del halo de inhibición (59,60).

Para su interpretación existen ciertas guías y manuales del CLSI y EUCAST que nos permiten relacionar de manera directa el diámetro del halo de inhibición con la susceptibilidad del microorganismo, además de manuales de optimización que nos permiten adaptarla a una gran diversidad de condiciones, una de ellas es la aplicación con cepas de crecimiento lento (61).

1.10.2. Métodos de dilución

Se basa en la evaluación del efecto antimicrobiano de una sustancia, a diferentes concentraciones las cuales deben formar un gradiente decreciente utilizando inóculos bacterianos estandarizados, existen diferentes métodos de dilución de acuerdo con el medio utilizado, como:

Dilución en agar: A diferencia del método por difusión, en este caso se siembra el agar previamente fundido en conjunto con la concentración establecida de la sustancia a evaluar, se homogeniza y posterior a la solidificación se inoculan con el microorganismo estandarizado.

Dilución en caldo: en determinados volúmenes de caldo se adicionan las diferentes concentraciones en forma creciente de la sustancia antimicrobiana a evaluar y se inocula el microorganismo estandarizado, posteriormente se incuban y se determina la CMI. Existe una variable de este método donde se emplean volúmenes de caldo mucho menores y se inoculan en microplacas, por lo que la cantidad requerida de la sustancia a evaluar como del inóculo estandarizado también es menor (62).

Este proceso cuantitativo nos permite conocer ciertos parámetros como:

Concentración mínima inhibitoria (CMI): Concentración mínima de la sustancia antimicrobiana capaz de inhibir el crecimiento de la cepa en condiciones específicas, generalmente se expresa en mg/L y se presenta cuando no existe crecimiento en la superficie del agar.

Concentración Bactericida Mínima (CBM): Concentración más baja de la sustancia antimicrobiana que en condiciones específicas reduce el 99.9% del número de microorganismos presentes en un medio inoculado con un número de microorganismos conocidos.

Estos parámetros se determinan mediante la presencia/ausencia de turbidez en el medio, en el caso del método de microdilución esta característica no es fácilmente visible por lo que suele utilizarse la adición del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazolium (MTT) el cual es capaz de reducirse a formazán compuesto insoluble que precipita en forma de cristales violeta en presencia de células metabólicamente activas. Generalmente suelen ocuparse de manera conjunta para reafirmar los datos obtenidos (59,62).

Al igual que el método por difusión, EUCAST y la Organización Internacional de Normalización (ISO) trabajan en desarrollar un manual para la estandarización mundial de los puntos de corte para la determinación de CMB y MIC.

Dentro de las ventajas de estos métodos se encuentra: la accesibilidad ya que no se requiere de equipos y materiales costosos, la velocidad del estudio ya que la mayoría de los microorganismos empleados solo requieren de 24 hrs de incubación, la estandarización por instituciones internacionales, la facilidad de la técnica ya que existen proveedores comerciales que proporcionan reactivos en formatos listos para usar que facilitan su uso en laboratorios de microbiología con altas cargas de trabajo (61).

1.10.3. Métodos de detección rápida

Estos métodos poseen una gran ventaja en el ámbito clínico ya que son capaces de disminuir la transmisión de genes de resistencia entre cepas mediante el inicio oportuno y correcto del tratamiento, dentro de estos se encuentran:

- Basados en PCR: detecta la presencia de genes de resistencia sin necesidad de una cepa con alta pureza, sin embargo, dentro de las desventajas se encuentran los falsos positivos dentro de las razones se encuentran los

niveles de expresión de esos genes o los nuevos mecanismos de resistencia (63).

- Microarrays: Es una tecnología reciente que nos permite detectar múltiples genes a la vez en una muestra, se basa en chips de DNA que contienen secuencias complementarias específicas adheridas a una superficie de plástico, sílice o vidrio. Las cuales cuando se hibridan con el genoma de la muestra emite cierta cantidad de luz, esto mediante un fluoróforo. Debido a los múltiples genes presentes en los microarreglos es primordial diferenciarlos, esto se puede lograr mediante software específicos, sin embargo, de manera experimental han observado que los colores rojos-naranjas indican niveles de expresión e incluso expresión aumentada mientras que colores verde-amarillo indican una expresión disminuida. El campo de aplicación de esta tecnología es diverso como: identificación de microorganismos, perfiles de expresión génica, estudios de patogenicidad, identificación de microorganismos, farmacogenómica, detección y tratamiento de enfermedades y resistencia bacteriana, esta última solo se ha llevado a cabo en bacterias formadoras de β -lactamasas, pero se espera que en un futuro se amplie su aplicación en esta área (64,65).

Sin importar el método de elección se debe considerar tres factores:

- Medio de cultivo: la preparación correcta previene la interferencia de ciertas propiedades como el pH capaz de intervenir en la polaridad y por lo tanto la difusión del antibiótico a evaluar, otro factor es la concentración del agar ya que podrían resultar falsas resistencias o falsas sensibilidades. El agar o caldo Mueller Hinton es de los más empleados en ambos métodos.
- Antibiótico: Se debe verificar que la concentración presente en los discos, pastillas o tiras sea realmente la que se desea evaluar.
- Cepa bacteriana: Debe ser pura, fresca (incubación no mayor a 24 hrs) y previamente estandarizada, se recomienda evaluar la cuenta viable constantemente (66).

2. OBJETIVOS

General:

Realizar una revisión bibliográfica sobre la funcionalización de *AgNP's* y su impacto en el efecto antimicrobiano.

Específicos:

- Describir el mecanismo de acción bactericida de las *AgNP's*.
- Investigar los diferentes tipos de funcionalización de las *AgNP's*.
- Describir los procedimientos para llevar a cabo la funcionalización de las *AgNP's*.
- Analizar el impacto de la funcionalización en el efecto antimicrobiano de las *AgNP's*.

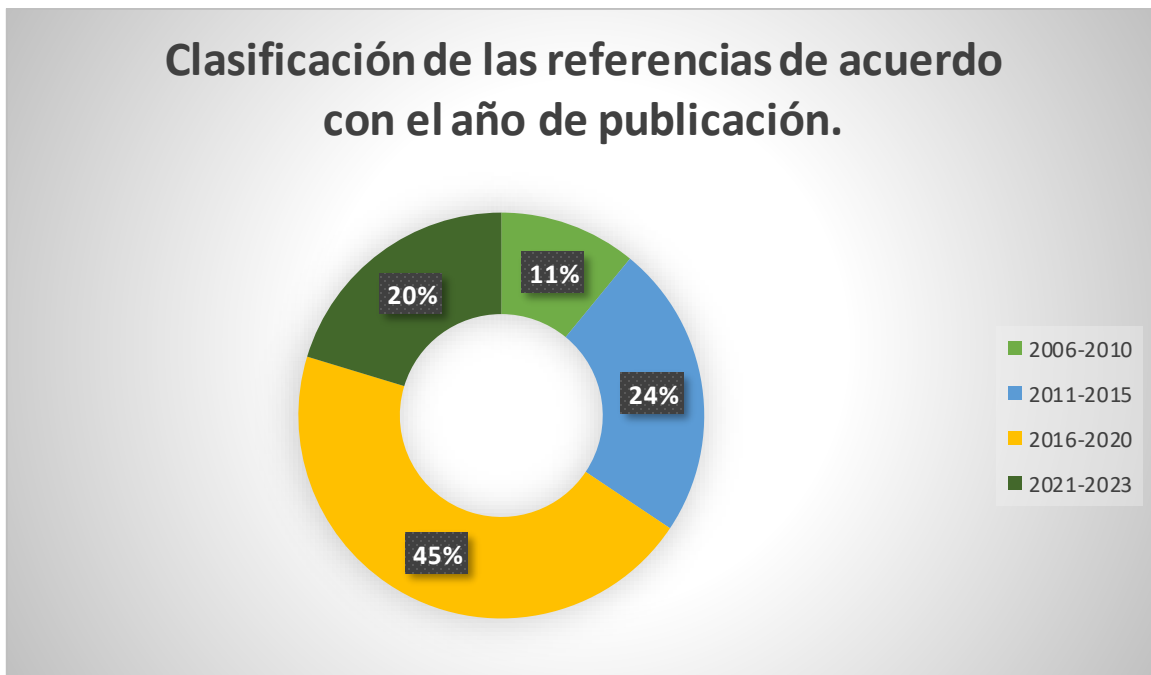
3. METODOLOGÍA

Se llevó a cabo una búsqueda booleana en múltiples bases de datos siendo las principales: BIDIUAM, PUBMED, TESIUNAM y Google académico utilizando palabras clave como silver nanoparticles OR nanomaterials, functionalization AND biofunctionalization, silver nanoparticles AND NOT copper nanoparticles, antibacterial effect AND silver nanoparticles, nanotechnology, antimicrobial resistance OR evaluation antimicrobial. Además de que se consultaron artículos publicados del 2006 al presente año, es decir con una vigencia no mayor a 17 años, obteniendo un total de 67 artículos, de los cuales se clasifican de acuerdo con las palabras clave anteriormente mencionadas (Gráfico 1) y a los años de publicación (Gráfico 2).

Gráfico 1.- Clasificación de las referencias de acuerdo con las palabras clave.



Gráfico 2.- Clasificación de las referencias de acuerdo con el año de publicación.



4. Funcionalización de *AgNP*'s con efecto antimicrobiano.

Dentro de las maneras de potencialización del efecto antimicrobiano se encuentra la capacidad antiadherente, por ejemplo: en la implantación de dispositivos médicos previene la adherencia de bacterias capaces de generar biofilms y por lo tanto infecciones nosocomiales. Xiaojiong et. al. encontró que el uso de copolímeros hidrofílicos como la polioxazolina en conjunto con grupos carboxílicos para la funcionalización de *AgNP*'s aumenta la estabilidad del sistema debido a las interacciones electrostáticas y presenta un efecto bactericida dependiente del pH ya que en medios ligeramente ácidos (5.5-6.5) la carga negativa de la polioxazolina-carboxilo interacciona con la carga positiva presente en el medio, incrementando la liberación de iones de plata. (67). Por otro lado, Ramirez et. al. llevo a cabo la incorporación *in situ* de *AgNP*'s a nanocompuestos de poliuretano (TPU), ya que existen múltiples antecedentes donde la incorporación de NP por ciertas técnicas como fusión o polimerización en masa optimiza las propiedades mecánicas, también existen antecedentes donde la incorporación de NP modifica propiedades mecánicas como módulo de Young, deformación a la fractura y módulo de almacenamiento debido a la interacción NP-matriz. Sin embargo, el procesamiento *in situ* presenta una dispersión homogénea, en este caso de las *AgNP*'s en TPU lo que permite que el efecto bactericida contra *E. coli* sea de igual manera homogéneo. Además de presentar modificaciones de las propiedades mecánicas poco relevantes en los procesos de recubrimiento posteriores (68).

Además de la funcionalización con moléculas orgánicas o inorgánicas también existe la "Biofuncionalización" la cual consiste en la funcionalización de nanopartículas con materiales biológicos, una de las mayores ventajas es la alta compatibilidad, baja toxicidad y en ciertas situaciones más accesible. Dentro de estos agentes funcionalizadores se encuentran:

- Péptidos o proteínas: su naturaleza catiónica y la capacidad de formar estructuras α -helicoidales permite su anclaje a la membrana bacteriana lo que logra su desnaturalización.

- Carbohidratos: es capaz de aumentar notablemente la penetración de las NP debido a la amplia presencia de carbohidratos en la célula bacteriana, tanto en su membrana como en procesos metabólicos
- Lípidos: la característica lipofílica de la membrana bacteriana permite el aumento de la permeabilidad ante compuestos lipídicos y una disminución en el transporte celular.
- Derivados fenólicos: este tipo de metabolitos vegetales ha demostrado tener una relación directa con la estabilidad y formación. Kapoor et al demostró que en presencia de oxígeno es capaz de aumentar la reducción de AgNP's en iones de plata incrementando así el efecto antimicrobiano. Sin embargo, quien comprobó ambas teorías en conjunto fue Rupasree et. al. quien demostró que los iones de citrato presentaban interacciones con las moléculas de catecol aumentando la estabilidad de la NP sin formar agregados.

En el caso en específico de las AgNP's se ha estudiado múltiples tipos de funcionalización y/o recubrimiento, en la Tabla 4 se mencionan algunas de ellas (69).

Tabla 4.- Tipos de biofuncionalización de AgNP's (69).

Agente estabilizador	Agente biofuncionalizador	Aplicación bactericida
Almidón	Glucosamina	<i>K. Pneumoniae</i> y <i>B. cereus</i>
Silice/Polidopamina	Celulosa	<i>E. coli</i> , <i>K. Pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>B. subtilis</i> .
Acetato de polivinilo	Quitina	<i>S. aureus</i> , <i>S. enterica</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. typhi</i> y <i>K. pneumoniae</i>
Ácido oleico	-	<i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>
-	Gelatina	<i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i>

Oxido de polietileno	Fibra de quitosano	<i>E. coli</i>
Poliimida	Dopamina	<i>E. coli</i>
Citrato	Catecol	<i>P. aeruginosa</i> y <i>B. subtilis</i>

Algunos de estos biofuncionalizadores también son capaces de controlar la velocidad de liberación de los iones de plata alargando el efecto antimicrobiano, por ejemplo: la celulosa es capaz de controlar la liberación de iones de plata hasta 48 horas. El quitosano exhibe otras propiedades como la compatibilidad para su formulación en hidrogeles ya que logra estabilizar las *AgNP's* en concentraciones, volúmenes de hasta 5 ml y tamaños mayores (70).

Otro tipo de funcionalización es con antibióticos orgánicos, ya que las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los antibióticos le proporcionan una mayor efectividad y especificidad a las *AgNP's* además de una reducción de toxicidad ya que las concentraciones e interacciones de los iones de Ag con células somáticas son menores. Se ha reportado que liberación in vitro de este tipo de *AgNP's* aumenta en medios con presencia de carboxiesterasa. Shruthi et. al. llevo a cabo la funcionalización con Estreptomina de las *AgNP's* utilizando galato de epigallocatequina como agente estabilizador, presento un efecto bactericida contra *S. aureus* y *E. coli* (71).

Como ya se había mencionado anteriormente el campo de aplicación de las *AgNP's* es diverso, ejemplo de ello es el protocolo experimental de Muñoz et. al. donde propone la modificación de un recubrimiento polimérico de poli(metacrilato de metilo) con *AgNP's*, el objetivo del protocolo es mejorar las propiedades anticorrosivas del recubrimiento. Sin embargo, obtuvieron un recubrimiento con características antibiocorrosivas ya que presentó propiedades antimicrobianas contra *Pseudomona aeruginosa*.

5. Conclusiones

Se llevo realizó una revisión bibliográfica siguiendo la metodología de búsqueda booleana en múltiples bases de datos acerca de la funcionalización de *AgNP's* y su impacto en el efecto antimicrobiano demostrando la gran capacidad que poseen las bacterias para adaptarse ha alcanzado niveles extraordinarios, que incluso no se han logrado descubrir algunos de estos mecanismos o bien no se conocen a detalle, consecuencia de esto es la multiresistencia como emergencia mundial. Como se mencionó anteriormente existen múltiples posibles soluciones, sin embargo, los factores de reproducibilidad, accesibilidad, tiempo de desarrollo y citotoxicidad van delimitando las respuestas ante esta emergencia, dentro de estas se encuentra la reanudación de la producción de bacteriófagos los cuales poseen reproducibilidad, baja citotoxicidad y accesibilidad económica, sin embargo, una de las grandes desventajas es el tiempo de adaptación de los procesos para lograr cubrir las necesidades actuales.

Otra de las soluciones más prometedoras es el uso de nanomateriales debido a su principal característica que es la amplia área superficial que poseen y la facilidad/maleabilidad de modificarla a través de diversas metodologías de acuerdo con el objetivo de la investigación.

Dentro de estas modificaciones se encuentra la funcionalización de *AgNP's* con múltiples grupos funcionales, polímeros, agentes biofuncionalizadores e incluso antibióticos, los cuales son capaces de disminuir una de las mayores desventajas de estos sistemas de nanopartículas, que es la citotoxicidad utilizando agente biofuncionalizadores, otra ventaja de estos sistemas es la capacidad de controlar la velocidad de liberación de los iones de plata ante ciertas condiciones del medio como: el pH lo que presentaría una gran oportunidad en el diseño de fármacos de liberación controlada e incluso lograr actuar en sinergia con los antibióticos actualmente utilizados. Además, estos sistemas se pueden utilizar no solo en el tratamiento, también se le ha dado un enfoque preventivo ya que se han incluido en la fabricación de dispositivos médicos.

A pesar de que las *AgNP*'s cumplen con la mayoría de las necesidades para combatir la emergencia de multiresistencia aún se siguen descubriendo nuevos mecanismos de resistencia por lo que la mayor herramienta que podría parar o al menos ralentizar esta emergencia es la concientización del uso de antibióticos.

5. Bibliografía

1. Gould K. Antibiotics: from prehistory to the present day. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016;71(3):572–5.
2. Alderman N. Paul Ehrlich, el científico que tuvo la idea que le dio inicio a la medicina moderna. *BBC News* . 2016;
3. Ledermann W. En los 500 años del descubrimiento: Colones y Pinzones de la microbiología. *Revista chilena de infectología*. 2003;20:18–20.
4. Dodds DR. Antibiotic resistance: A current epilogue. *Biochem Pharmacol*. 2017 Jun;134:139–46.
5. Organización Panamericana de la Salud. Tratamiento de las enfermedades infecciosas 2020-2022. Washington, DC.: Organización Panamericana de la Salud; 2019. 13–35 p.
6. Samreen, Ahmad I, Malak HA, Abulreesh HH. Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. *J Glob Antimicrob Resist*. 2021 Dec;27:101–11.
7. Giono-Cerezo S, Santos-Preciado JI, Morfín-Otero M del R, Torres-López FJ, Alcántar-Curiel MD. Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta de México*. 2020 Feb 19;156(2).
8. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm; 2013.

9. Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavaleri M, Coenen S, et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes New Infect.* 2015 Jul;6:22–9.
10. Sociedad Española de Microbiología. Intercambio de información de las bacterias por transferencia horizontal: conjugación, transformación y transducción. 2017.
11. Spellberg B, Guidos R, Gilbert D, Bradley J, Boucher HW, Scheld WM, et al. The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections: A Call to Action for the Medical Community from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases.* 2008 Jan 15;46(2):155–64.
12. Ezeuko AS, Ojemaye MO, Okoh OO, Okoh AI. Potentials of metallic nanoparticles for the removal of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes from wastewater: A critical review. *Journal of Water Process Engineering.* 2021 Jun;41:102041.
13. Alghamdi S. The role of vaccines in combating antimicrobial resistance (AMR) bacteria. *Saudi J Biol Sci.* 2021 Dec;28(12):7505–10.
14. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG. Bacteriophage Therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Mar;45(3):649–59.
15. Alfonso G, Guerrero M, Lorenzana-Jiménez M. Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos [Internet]. Vol. 52, *Rev Fac Med UNAM.* 2009. Available from: www.medigraphic.comwww.medigraphic.org.mx
16. Medina E, Pieper DH. Tackling Threats and Future Problems of Multidrug-Resistant Bacteria. *Current topics in microbiology and imm.* 2016;398:3–33.
17. Drexler KE. Engines of Creation : The Coming Era of Nanotechnology Chapter 1 : ENGINES OF CONSTRUCTION [Internet]. Available from: http://www.foresight.org/EOC/EOC_Chapter_1.html
18. Guzmán-Trampe S, Ceapa CD, Manzo-Ruiz M, Sánchez S. Synthetic biology era: Improving antibiotic's world. *Biochem Pharmacol.* 2017 Jun;134:99–113.

19. Hulla J, Sahu S, Hayes A. Nanotechnology. *Hum Exp Toxicol*. 2015 Dec 26;34(12):1318–21.
20. THE NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE [Internet]. Available from: <http://www.whitehouse.gov/administration/eop/ostp/nstc>.
21. Marlon Borja-Borja JI, Stalin Rojas-Oviedo BI. Nanomateriales: métodos de síntesis Nanomaterials: Synthesis Methods Nanomateriais: métodos de síntese Ciencias económicas y empresariales Artículo de investigación. 2020;5:426–45. Available from: <http://polodelconocimiento.com/ojs/index.php/es>
22. Firdos Alam Khan. *Applications of Nanomaterials in Human Health*. Springer; 2020. 1–13 p.
23. German M, Muñoz F. Nanopartículas de Au y Pd: Síntesis, funcionalización y aplicaciones catalíticas [Internet]. Available from: www.tdx.cat
24. Tang S, Zheng J. Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects. *Adv Healthc Mater*. 2018 Jul;7(13):1701503.
25. Anu Mary Ealia S, Saravanakumar MP. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng*. 2017 Nov;263:032019.
26. Riaz Ahmed KB, Nagy AM, Brown RP, Zhang Q, Malghan SG, Goering PL. Silver nanoparticles: Significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies. *Toxicology in Vitro*. 2017 Feb;38:179–92.
27. Yin IX, Zhang J, Zhao IS, Mei ML, Li Q, Chu CH. <p>The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry</p>. *Int J Nanomedicine*. 2020 Apr;Volume 15:2555–62.
28. Beatriz Gómez Gómez. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS Y DE METALOIDES. EVALUACIÓN DE SU INTERACCIÓN CON POBLACIONES BACTERIANAS PARA APLICACIONES EN EL ÁMBITO

ALIMENTARIO. [Doctorado]. [Madrid]: UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID ; 2020.

29. Mathur P, Jha S, Ramteke S, Jain NK. Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018 Oct 31;46(sup1):115–26.
30. Nguyen KC, Seligy VL, Massarsky A, Moon TW, Rippstein P, Tan J, et al. Comparison of toxicity of uncoated and coated silver nanoparticles. *J Phys Conf Ser.* 2013 Apr 10;429:012025.
31. DÍAZ OVANDO MARÍA GUADALUPE. “Obtención de nanopartículas de plata por ablación laser soportadas en hilo de sutura de seda” [Licenciatura]. [Toluca]: Universidad Autónoma del Estado de México; 2013.
32. Alvarez Ondarse Dianelys. Editorial Etecé. 2021. Reacciones Redox.
33. Toledo Bárbara Asier. Aerogeles: Nuevas rutas de síntesis [Licenciatura]. Universidad del País Vasco ; 2014.
34. Gonzáles Doria Yahir Enrique. Diseño y construcción de molino de bolas para la pulverización de arcillas en el laboratorio de catálisis de la Universidad de Córdoba [Licenciatura]. [Montería]: Universidad de Córdoba ; 2016.
35. Lee S, Jun BH. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. *Int J Mol Sci.* 2019 Feb 17;20(4):865.
36. Marlon Borja-Borja JI, Stalin Rojas-Oviedo BI. Nanomateriales: métodos de síntesis. 2020;5:426–45. Available from: <http://polodelconocimiento.com/ojs/index.php/es>
37. Ledo Suárez Ana. SÍNTESIS Y FUNCIONALIZACIÓN DE LIGANDOS POLIMÉRICOS PARA SU EMPLEO EN LA FABRICACIÓN, ESTABILIZACIÓN Y AUTOORGANIZACIÓN DE SISTEMAS DE NANOPARTÍCULAS [Doctorado]. [Santiago de Compostela,]: UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA ; 2011.

38. Martínez García EN. "Síntesis y Funcionalización de Nanopartículas Semiconductoras con Aplicación Potencial a Celdas Solares de Tercera Generación." México ; 2014 Jul.
39. Garduño Zavala Marcia. Fabricación de nanopartículas metálicas para aplicaciones fotovoltaicas [Maestría en Ciencias]. [México]: Instituto Politécnico Nacional ; 2011.
40. Malvern Panalytical. Malvern Panalytical. 2022. Dispersión de luz dinámica DLS .
41. GuiaLab. GuiaLab.com.ar. 2019. Dispersión de luz dinámica: definición de términos comunes.
42. Sánchez Moreno M. TRABAJO DE FIN DE MÁSTER MÓDULO DE QUÍMICA INORGÁNICA E INGENIERÍA QUÍMICA NANOPARTÍCULAS DE PLATA: PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y PROPIEDADES CON APLICACIÓN EN INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS. 2017 Oct.
43. Aguilar Méndez Miguel Angel. Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: Efecto sobre Colletotrichum gloesporioides. [Doctorado]. [CDMX]: Instituto Politécnico Nacional ;
44. Mondragón Cortez P. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO PARA TODOS ...y 51 espectros de alimentos consumidos en México. Jalisco: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C; 2017.
45. Maya R, Roo Q, Ronquillo-De Jesús E, Aguilar-Méndez MA, Guzmán-Mendoza J, San Martín-Martínez E. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EMPLEANDO EXTRACTOS DE PLANTAS. Quintana Roo; 2011 May.
46. Servicios Técnicos de Investigación. Universidad de Alicante. 2022. ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA VISIBLE.
47. Morales J, Morán J, Quintana M, Estrada W. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA POR LA RUTA Sol-Gel A PARTIR DE NITRATO DE PLATA. Rev Soc Quím Perú. 2009 Jun;75(2).

48. Villar Salvador Magdalena, Bonilla Téllez Miguel Ángel. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE LiMn_2O_4 , $\text{LiMn}_{1.5}\text{Fe}_{0.5}\text{O}_4$ y $\text{LiMn}_{1.25}\text{Fe}_{0.75}\text{O}_4$. Puebla; 2015 Feb.
49. kianfar E. Magnetic Nanoparticles in Targeted Drug Delivery: a Review. *J Supercond Nov Magn.* 2021 Jul 17;34(7):1709–35.
50. González-Fernández S, Lozano-Iturbe V, García B, Andrés LJ, Menéndez MF, Rodríguez D, et al. Antibacterial effect of silver nanorings. *BMC Microbiol.* 2020 Dec 19;20(1):172.
51. Crisan CM, Mocan T, Manolea M, Lasca LI, Tăbăran FA, Mocan L. Review on Silver Nanoparticles as a Novel Class of Antibacterial Solutions. *Applied Sciences.* 2021 Jan 26;11(3):1120.
52. Shatan AB, Venclíková K, Zasońska BA, Patsula V, Pop-Georgievski O, Petrovský E, et al. Antibacterial Silver-Conjugated Magnetic Nanoparticles: Design, Synthesis and Bactericidal Effect. *Pharm Res.* 2019 Oct 14;36(10):147.
53. Cardoso Avila Pablo Eduardo. Detección de anticuerpos mediante nanopartículas metálicas. León, Guanajuato; 2011 Feb.
54. Jurex Cuenca Gallo. Chemical Functionalization of Carbon Nanomaterials . 1]. Cuenca Gallo Jurex, editor. Vol. 1. Canada : Arcleer Press; 2010. 119–149 p.
55. Rebeca Aceituno Bueno. Funcionalización covalente y selectiva de grafeno en ultra alto vacío. [Doctorado]. [Madrid]: Universidad Autónoma de Madrid ; 2018.
56. Carolina González-Gaitán, Ramiro Ruiz-Rosas, Emilia Morallón, Diego Cazorla-Amorós. Modificación de la química superficial de los materiales carbonosos. Un aspecto clave para mejorar sus aplicaciones. *Bol Grupo Español Carbón.* 2017 Sep;45:22–31.
57. Ahmad F, Salem-Bekhit MM, Khan F, Alshehri S, Khan A, Ghoneim MM, et al. Unique Properties of Surface-Functionalized Nanoparticles for Bio-Application: Functionalization Mechanisms and Importance in Application. *Nanomaterials.* 2022 Apr 13;12(8):1333.

58. Nobs L, Buchegger F, Gurny R, Allémann E. Current methods for attaching targeting ligands to liposomes and nanoparticles. *J Pharm Sci.* 2004 Aug;93(8):1980–92.
59. Ada Patricia García Pérez, Norma Margarita De la Fuente-Salcido, Jesús Ma. Villarreal-Prieto, Miguel Ángel Díaz León. Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Rev mex cienc farm .* 2015;46(2):7–16.
60. Marco Luis Herrera. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana Metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr Carlos Sáenz Herrera.* 1999;34:33–41.
61. Kahlmeter G, Brown DFJ, Goldstein FW, MacGowan AP, Mouton JW, Odenholt I, et al. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Technical Notes on antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection.* 2006 Jun;12(6):501–3.
62. Stella Ramirez Profesor Asociado L, Marin Castaño D. METODOLOGIAS PARA EVALUAR IN VITRO LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL. *Scientia et Technica Año XV.* 2009;42:263–8.
63. Pulido MR, Garcia-Quintanilla M, Martin-Pena R, Cisneros JM, McConnell MJ. Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2013 Dec 1;68(12):2710–7.
64. National Human Genome Research Institute. Glosario parlante de términos genómicos y genéticos. 2023. *TECNOLOGÍA DE MICROARRAYS (CHIPS DE ADN O ARN).*
65. Everardo Reyna Murrieta M, Francisco Valenzuela Sánchez J. MICROARREGLOS DE ADN: APLICACIONES EN LA MICROBIOLOGÍA DNA microarrays: applications in microbiology *CTS Epistemus. EPISTEMUS [Internet].* 2019 Nov 30;27(13):45–50. Available from: www.epistemus.uson.mx

66. Dr. Marco Luis Herrera. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana Metodología de laboratorio . Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr Carlos Sáenz Herrera. 1999;34:33–41.
67. Bao X, Huang X, Jin X, Hu Q. Bactericidal Anti-Adhesion Potential Integrated Polyoxazoline/Silver Nanoparticle Composite Multilayer Film with pH Responsiveness. *Polymers (Basel)*. 2022 Sep 5;14(17):3685.
68. Ramirez D, Jaramillo F. Improved mechanical and antibacterial properties of thermoplastic polyurethanes by efficient double functionalization of silver nanoparticles. *J Appl Polym Sci*. 2018 May 5;135(17):46180.
69. Veerapandian M, Yun K. Functionalization of biomolecules on nanoparticles: specialized for antibacterial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011 Jun 27;90(5):1655–67.
70. Alavi M, Rai M. Recent progress in nanoformulations of silver nanoparticles with cellulose, chitosan, and alginate acid biopolymers for antibacterial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019 Nov 14;103(21–22):8669–76.
71. Shruthi TS, Meghana MR, Medha MU, Sanjana S, Navya PN, Kumar Daima H. Streptomycin functionalization on silver nanoparticles for improved antibacterial activity. *Mater Today Proc*. 2019;10:8–15.