



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD XOCHIMILCO**

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

**Licenciatura en Medicina**

**Reporte final del Servicio Social:**

**“Efectos citotóxicos de las nanopartículas de plata en cultivos celulares”**

Daniel Christian Martínez Jiménez.

Matrícula: 2133076189

Asesor:

Dra. Aída Hamdan Partida.

Profesor Titular C. Tiempo Completo.

No. Económico 26343

Dr. Jaime A. Bustos Martínez

No. Económico 8589

Laboratorio de Microbiología y Biología  
Molecular

Departamento de Atención a la Salud

Fecha de inicio: 01 de febrero de 2019

Fecha de término: 31 de enero de 2020

## Índice.

1. Introducción.....	3
2. Marco teórico.....	4
2.1 Utilidad de la plata.....	4
2.2 Nanopartículas.....	4
2.2.1 Actividad antibacteriana.....	6
2.3 Proteína corona.....	6
2.4 Líneas celulares.....	6
2.5 Enfermedades oportunistas e infecciones relacionadas con la atención sanitaria.....	7
2.6 Bacterias.....	8
2.6.1 <i>S. flexneri</i> .....	8
2.6.2 <i>P. aeruginosa</i> .....	9
2.6.3 <i>S. aureus</i> .....	9
2.6.4 <i>S. epidermidis</i> .....	9
2.6.5 <i>K. pneumoniae</i> .....	10
2.6.6 <i>S. typhimurium</i> .....	10
2.6.7 <i>C. albicans</i> .....	10
2.7 Pruebas de sensibilidad bacteriana.....	11
2.7.1 Antibiograma. ....	11
2.7.2 Concentración mínima inhibitoria.....	11
2.7.3 Método del antibiograma en difusión en placa (M. Kirby-Bauer).....	12
2.7.4 Método de macrodilución. ....	12
2.8 Escala de McFarland. ....	12
2.9 Análisis de espectro UV.....	12
2.10 Medio Muller Hinton. ....	13
3. Objetivos.....	14
3.1 Objetivo general. ....	14
3.2 Objetivos específicos: ....	14
4. Metodología.....	15
4.1 Material para la síntesis de nanopartículas de Plata.....	15

4.2 Síntesis de nanopartículas de Plata. ....	15
4.3 Análisis de Espectro UV. ....	15
4.4 Formación de discos antibacterianos.....	16
4.5 Antibiograma disco-placa: método Kirby Bauer. ....	16
4.6 Método de macrodilución. (Concentración mínima inhibitoria).....	16
4.7 Aumento de solución de NaBH <sub>4</sub> para la síntesis de nanopartículas de plata.....	17
4.8 Solución de nitrato de plata esterilizada.....	17
5. Resultados.....	18
5.1 Síntesis de nanopartículas de plata. ....	18
5.2 Antibiograma por el método de Kirby-Bauer. ....	19
5.3 Análisis de Espectro UV. ....	21
5.4. Método de macrodilución. ....	22
5.4.1 Nanopartículas de plata de 50 ppm. ....	22
5.4.2 Solución de nitrato de plata 50 ppm con esterilizar. ....	22
5.4.3 Solución de AgNO <sub>3</sub> 50 ppm sin esterilizar. ....	23
5.4.4 Diferencias entre AgNO <sub>3</sub> con esterilizar y AgNO <sub>3</sub> sin esterilizar.....	24
6. Discusión.....	25
7. Conclusiones. ....	28
8. Recomendaciones. ....	28
9. Bibliografía.....	29
10. Anexos.....	34

## 1. Introducción

La utilización de partículas de plata de tamaño nanométrico es un campo de trabajo bien establecido desde hace siglos (Monge, 2009). En la actualidad, la nanotecnología presenta un papel importante a nivel mundial en cuanto a la investigación y desarrollo científico e industrial. Su importancia radica en que cuando la materia se presenta y es tratada a escala nanométrica, ésta presenta propiedades y fenómenos totalmente novedosos, que difieren significativamente de las que presentan a escala macroscópica (Sánchez, 2007).

Las nanopartículas de plata (AgNPs) son uno de los nanomateriales más vitales y fascinantes entre varias nanopartículas metálicas que están involucradas en las aplicaciones biomédica (Zahang, et al., 2016). En la actualidad, debido a sus propiedades peculiares, se han utilizado para varias aplicaciones, como agentes antibacterianos, en productos industriales, domésticos y relacionados con la salud, en productos de consumo, recubrimientos de dispositivos médicos, como agentes anticancerosos en donde han mejorado los efectos de destrucción de tumores de los fármacos anticancerosos, entre otras aplicaciones (Chemousova, et al., 2013). La actividad biológica de los AgNPs depende de su tamaño, forma y recubrimientos superficiales. Por lo tanto, el desarrollo de AgNPs con características morfológicas y fisicoquímicas bien controladas para la aplicación fisiológica en humanos es necesario para expandir sus aplicaciones biomédicas (Wei, et al., 2015).

La plata ha obtenido mucho interés debido a sus propiedades químicas, catalíticas, antibacterianas y sus características de una buena estabilidad química y conductividad. Debido a las propiedades novedosas que exhiben, que dependen de su tamaño, forma y morfología que les permiten interactuar con plantas, animales y microbios, ha despertado preocupaciones acerca de sus efectos no deseables potenciales para la salud humana y el medio ambiente (Siddiqi, et al., 2018). La mayor utilización de AgNP's ha generado preocupación con respecto a los efectos en la salud humana después de su administración, debido a que se conoce que genera citotoxicidad y genotoxicidad. Es necesario investigar las incertidumbres sobre los efectos adversos de los nanopartículas de plata sobre el ser humano, en especial la citotoxicidad en líneas celulares específicas, para conocer cuales efectos se podrían utilizar para beneficio de los seres humanos.

Así también, las nanopartículas de plata han llamado la atención debido a su actividad antibacteriana, incluidos los microorganismos de resistencia a múltiples fármacos (MDR) (Składanowsk, et al., 2016) y microorganismos que son capaces de producir enfermedades oportunistas. En los últimos años, varios estudios han demostrado que las AgNPs, sintetizados por métodos convencionales de reducción química, técnicas físicas o por diferentes entidades biológicas, exhiben potentes efectos inhibitorios contra especies bacterianas Gram positivas y Gram negativas

que pueden llegar a producir enfermedades oportunistas e inducen citotoxicidad en varios hongos patógenos (Rónavári, et al., 2018).

Esta investigación tuvo como objetivo la identificación de la actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata sintetizadas por el método de reducción química propuesto por Métrauz, et al., 2005, contra bacterias que pueden llegar a ocasionar enfermedades oportunista o infecciones relacionadas con la atención sanitaria.

## **2. Marco teórico**

### **2.1 Utilidad de la plata.**

La plata ha sido utilizada durante miles de años como metal precioso por el ser humano en aplicaciones tan dispares como joyería, utensilios, moneda, fotografía o explosivos (Monge, 2009). Originalmente, se usaban utensilios construidos con este metal para preservar el agua y para su desinfección. Su aplicación como propuesta medica está documentada desde 750 D.C. (Behera, et al., 2011). A partir del siglo XVII se describe como producto medicinal con múltiples propósitos y a fines del siglo XIX se introduce la solución de nitrato de plata para uso en gotas oculares en el recién nacido. En la década de 1920 la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos aprueba soluciones de plata iónica (electrocoloidales) como agentes antibacterianos (Cardoso, 2016).

La plata ha sido utilizada como un agente antimicrobiano cuyo uso ha disminuido debido a la innovación de una amplia gama de antibióticos. Sin embargo, la resistencia causada por el abuso a varios antibióticos ha motivado el resurgimiento de su empleo en el control de infecciones (Leyva, 2013). Su fuerte actividad antimicrobiana es la principal característica para el desarrollo de productos con AgNP's.

### **2.2 Nanopartículas**

Durante las últimas décadas, la investigación en ciencia y tecnología se ha centrado en la fabricación de estructuras atómicas y materiales a escalas nanométricas ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ), lo que comúnmente se conoce como "Nanotecnología" (Ávalos, et al., 2013). Las nanopartículas (NP's) para propósitos farmacéuticos se definen en el Handbook of Pharmaceutical Technology como las partículas coloidales sólidas con un rango de tamaño de 1 a 100 nm (Leyva, 2013).

Las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los nanomateriales difieren significativamente de los materiales macroscópicos correspondientes debido a su gran área de superficie a volumen (Liao, et al., 2019). Entre las NP's que han demostrado tener propiedades microbicidas las más importantes son las de plata, óxido de zinc, cobre u óxidos de hierro. Las primeras tres sustancias ya presentan

esta propiedad en su forma macroscópica, mientras que los óxidos de hierro únicamente resultan ser microbicidas en forma nanoestructurada (Ávalos, et al., 2013).

El rasgo característico de los nanomateriales, como el tamaño, la forma, la distribución del tamaño, el área de la superficie, la forma, la solubilidad, la agregación, etc. deben evaluarse antes de evaluar la toxicidad o la incompatibilidad en el ser humano (Cardos, 2016). El nitrato de plata es utilizado para la síntesis de AgNP's, debido a su bajo costo y estabilidad química comparada con otras sales disponibles. Los estabilizantes incluyen surfactantes y ligando o polímeros que contienen grupos funcionales como polivinilpirrolidona, polietilenglicol, ácido polimetacrílico, polimetilmetacrilato, citrato sódico y otros (Evanoff, et al., 2005).

Existen diferentes métodos de síntesis de nanopartículas, que conducen a tamaños variables, morfología, e incluso estabilidad (Khanna, et al., 2007). Los métodos se clasifican en físicos, químicos, y biológicos. Los dos primeros se ha observado que pueden llegar presentar muchos inconvenientes y por ende limitan el uso de las nanopartículas en aplicaciones biológicas; estas desventajas incluyen el uso de solventes tóxicos, la generación de subproductos peligrosos y el alto consumo de energía (Singh, et al., 2015). Así también, los nanomateriales de plata se pueden obtener por dos métodos, clasificados como "de arriba hacia abajo" y "de abajo hacia arriba". El método de "arriba hacia abajo" es la molienda mecánica de metales a granel con la posterior estabilización utilizando agentes de protección coloidal. Los métodos "de abajo hacia arriba" incluyen la reducción química, los métodos electroquímicos y la descomposición sonora (Zhang, et al., 2016).

En la actualidad la mayoría de los estudios con nanopartículas de plata se centran en la síntesis por medio de métodos biológicos debido a que son simples, económicos y con menores efectos adversos. Pero los métodos de reducción química han permitido la formación de diferentes formas de nanopartículas (Bahlol, et al., 2019). Dado que la fabricación de diferentes formas de nanoestructuras metálicas ha aumentado en los últimos años debido a las características morfológicas que presentan y que permiten una mejor interacción celular, muchas rutas se han desarrollado rápidamente para producir estas magníficas estructuras bidimensionales. Los nanocristales de plata triangulares, conocidos como nanoprismas (Ag-NPrs), se desarrollaron con éxito a través de procedimientos incluyendo agregación fotoinducida, rutas de reducción química y rutas térmicas sintéticas (Bahlol, et al., 2019).

### **2.2.1 Actividad antibacteriana**

Aún a pesar del efecto antibacteriano que se ha reportado de las nanopartículas de plata, la acción de este metal sobre los microbios no se conoce completamente. Se ha planteado la hipótesis de que las nanopartículas de plata pueden causar lisis celular o inhibición del crecimiento a través de diversos mecanismos. La letalidad de la plata para las bacterias también puede explicarse en parte por las reacciones del grupo tiol que inactivan las enzimas (Salem, et al., 2015). Otros estudios sugieren que las nanopartículas de plata tienen la capacidad de dañar la permeabilidad de la membrana celular, dañar las funciones de respiración de la célula y fomentar la formación de radicales libres. Estos factores causan el efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata (Singh, et al., 2015).

### **2.3 Proteína corona.**

Se sabe que las AgNP's son capaces de adsorber proteínas citosólicas en su superficie, lo que puede influir en la función de los factores intracelulares que regulan los genes implicados en el daño del ADN, la progresión del ciclo celular y la respuesta / reparación del daño del ADN en líneas celulares de cáncer (Zhang, et al., 2016). Por lo tanto, la presencia de una corona de proteínas alrededor de los nanomateriales podría hacer una gran diferencia en su actividad biológica (Durán, et al., 2015).

Las llamadas "protein-corona" (PC) influyen en las características superficiales de los nanomateriales y puede afectar su interacción con las células. Las interacciones proteína-nanopartícula que resulta en la formación de PC no sólo beneficiará la evaluación de la toxicidad por enfoques *in vitro*, sino también su utilidad en las aplicaciones de la salud humana (Shannahan, et al., 2013).

Las proteínas con mayor afinidad por la superficie se intercambian lentamente, formando la corona dura, la capa más interna compuesta por proteínas fuertemente unidas (durante largos períodos de horas). Otras proteínas con baja afinidad se reemplazan muy rápidamente, formando la corona blanda, la capa externa compuesta por proteínas unidas a la menor afinidad por la superficie de la nanopartícula (en escalas de tiempo cortas de segundos o minutos) (Durán, et al., 2015).

### **2.4 Líneas celulares.**

Las AgNP's pueden ser como una espada de doble filo con efectos beneficiosos y dañinos, es decir, pueden servir como antibacterianos pero también inducir citotoxicidad. Como se conoce, la exposición prolongada a Ag por vía oral e inhalación puede conducir a Argyria o Argyrosis, es decir, trastornos crónicos de los microvasos de la piel y los ojos en humanos (Chemousova, et al., 2013). Estudios

recientes han informado sobre los efectos toxicológicos de los AgNP en ciertas condiciones. Varios estudios han informado que los AgNP inducen genotoxicidad y citotoxicidad tanto en afecciones como el cáncer, así como en las líneas celulares normales (Gurunathan, et al., 2015). Esto se produce alterando la morfología celular, reduciendo la viabilidad celular y causando estrés oxidativo en fibroblastos de pulmón, células de glioblastoma, y células de cáncer de mama humano. La citotoxicidad inducida por AgNP reduce la viabilidad celular en varias líneas celulares al causar apoptosis a través de la vía mitocondrial (Zhang, et al., 2016). Los resultados de algunos estudios sugieren que la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) es un mecanismo importante y general de la citotoxicidad mediada por nanopartículas a través del daño al ADN, la apoptosis y la necrosis (Gurunathan, et al., 2015).

Los estudios de cultivos celulares *in vitro* han indicado efectos tóxicos de las AgNP en los queratinocitos inmortales de la piel humana (HaCaT), eritrocitos humanos, células de neuroblastoma humano, células de riñón embrionario humano (HEK293T), células de hígado humano (HepG2) y células de colon humano (Caco2) (Liao, et al., 2019). Los estudios *in vivo* en animales han revelado los efectos tóxicos de los AgNP en roedores al acumularse en su hígado, bazo y pulmón (Ávalos, et al., 2013). De manera similar, la citotoxicidad mediada por AgNP's en células de mamíferos depende en gran medida del tamaño de la nanopartícula, la forma, la carga superficial, la dosis, el estado de oxidación y la condición de aglomeración, así como el tipo de célula (Alessandrini, 2017). La comprensión adecuada de las interacciones entre los AgNP's y las células de mamíferos es esencial para el uso seguro de estas nanopartículas.

## **2.5 Enfermedades oportunistas e infecciones relacionadas con la atención sanitaria.**

Las enfermedades oportunistas son una causa mundial común de morbilidad y mortalidad, especialmente en el mundo en desarrollo. Se define como enfermedad oportunista a aquella que se presenta en un individuo con un sistema inmunitario inmunodeprimido, es decir con actividad inmunitaria disminuida ya sea por una enfermedad infecciosa como el VIH o por una neoplasia, como los distintos tipos de canceres (Díaz, et al., 2009).

Las *infecciones* relacionadas con la atención sanitaria o infecciones nosocomiales, que se define como aquella que aparece durante la estancia hospitalaria es, de la misma manera, importante ya que estas infecciones a veces son motivo de ingreso en las unidades de cuidados intensivos (UCI) y en ocasiones son consecuencia de muerte (Cervantes, et al. 2014).



Entre la causa de estas afecciones podemos encontrar diferentes microorganismos, entre ellos virus, bacterias, hongos o protozoarios. Se ha observado que nanopartículas de plata pueden llegar a tener actividad antibacteriana contra algunos agentes que ocasionan estas afecciones (Chernousova, et al., 2013).

## 2.6 Bacterias.

Las bacterias son microorganismos unicelulares, su método de reproducción es por fisión binaria, son de vida libre la mayoría a excepción de algunas que son de vida intracelular obligada. Conforman el reino procariota y se componen de estructuras en común como la membrana celular, los ribosomas encargados de la síntesis proteica y el ácido desoxirribonucleico (ADN) portador de la información genética (Piréz, et al., 2000).

En un sistema biológico se define al crecimiento como el aumento ordenado de las estructuras y los constituyentes celulares de un organismo. El crecimiento está normalmente limitado por el agotamiento de nutrientes o por la acumulación de productos del mismo metabolismo microbiano, que les son tóxicos a la población. El crecimiento al cabo de un cierto tiempo llega a disminuir hasta detenerse. En cuanto a las bacterias presentan cuatro fases de crecimiento (Benintende, et al., 2000).

**Fase de latencia** existe un aparente reposo en el que las células sintetizan las enzimas necesarias para la actividad metabólica que deben llevar adelante, es la fase de adaptación al medio. **Fase de crecimiento exponencial** la velocidad de crecimiento es máxima, depende del tipo de microorganismo que se trate y diversos factores ambientales como son la temperatura, el pH, oxigenación, etc. **Fase estacionaria**, esta fase se presenta por agotamiento del suministro de algún nutriente esencial o por acumulación de productos metabólicos que sean tóxico. **La fase de muerte** culmina el crecimiento y el número de células que mueren se va haciendo mayor.

### 2.6.1 *S. flexneri*

*Shigella spp.* Es un bacilo Gram negativo entérico, no capsulado, inmóvil y que no forma esporas. Presenta 47 serotipos divididos en cuatro serogrupos en función de su similitud serológica y capacidad de fermentación a azúcares: grupo A. *S. dysenteriae*, B. *S. flexneri*, C. *S. boydii*, D. *S. sonnei* (Delgado, et al., 2018). En todo el mundo, las especies de *Shigella* se encuentran entre los patógenos entéricos más prevalentes, constituyendo una de las principales causas de disentería en personas con infección con VIH, *Shigella spp.* También se encuentra entre los patógenos

bacterianos frecuentemente asociados a episodios de diarrea junto a *Campylobacter spp.* y *Salmonella spp.* (Hitateguy et al., 2013).

### **2.6.2 *P. aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo Gram negativo aerobio, considerado un patógeno oportunista. Es un microorganismo altamente versátil, capaz de tolerar condiciones bajas de oxígeno. Puede sobrevivir con bajos niveles de nutrientes y crecer en rangos de temperatura de 4 a 42°C. Estas características le permiten adherirse, sobrevivir en equipos médicos y en otras superficies hospitalarias (Ochoa, et al., 2013). Se le considera la quinta causa más frecuente en las infecciones en general a nivel mundial, la segunda causa de neumonía nosocomial, la tercera causa de infecciones urinarias, el cuarto de infecciones de sitio quirúrgico y el séptimo responsable de sepsis. Este patógeno afecta principalmente a pacientes inmunocomprometidos como en el caso de pacientes quemados o que tienen fibrosis quística (Paz, et al., 2019).

### **2.6.3 *S. aureus***

*Staphylococcus aureus* es un anaerobio facultativo, pero crece mejor en condiciones aerobias, está formado por cocos Gram positivos, con diámetro de 0.5 a 1.5 µm, agrupados desde células únicas hasta racimos. Es una bacteria no móvil, no esporulada, usualmente sin cápsula y anaerobia facultativa (Cervantes, et al., 2014). Los estafilococos conforman un importante grupo de patógenos en el hombre y originan un amplio espectro de enfermedades sistémicas, infecciones de la piel, tejidos blandos, huesos y del aparato genitourinario e infecciones oportunistas (Baos, 2017).

### **2.6.4 *S. epidermidis***

*Staphylococcus epidermidis*, es un coco Gram positivo, coagulasa negativo. Su virulencia de está relacionada a su habilidad para colonizar la superficie de biomateriales formando una película o biofilm (Moreno, et al., 2007). En la última década se ha encontrado que *S. epidermidis* es un patógeno nosocomiales oportunista responsable de infecciones, especialmente en pacientes inmunocomprometidos o en estado crítico, en quienes se implantan biomateriales como catéteres, prótesis óseas, tubos de diálisis, válvulas y lentes intraoculares, entre otros (Ruíz, et al., 2010).

### **2.6.5 *K. pneumoniae***

*K. pneumoniae* es un bacilo Gram negativo, no móvil, de la familia *Enterobacteriaceae*. Es un patógeno oportunista que puede causar enfermedades tales como sepsis, neumonía e infecciones del tracto urinario y de los tejidos blandos. La mayoría de las infecciones causadas por esta bacteria se presentan en personas hospitalizadas, inmunosuprimidos o con enfermedades de base (López, et al., 2010). En México existen algunos reportes que muestran a *K. pneumoniae* como uno de los principales organismos causantes de infecciones intrahospitalarias, que causan niveles significativos de morbilidad y mortalidad (Andrade, et al., 2004).

### **2.6.6 *S. typhimurium***

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y está constituido por bacterias Gram negativas, intracelulares facultativas, que se han agrupado en las especies *S. entérica* y *S. bongori*. *Salmonella enterica* se divide en seis subespecies, entre ellas *S. typhi* y *S. typhimurium* (Barreto, et al., 2016). Las formas clínicas de infección por *Salmonella* suelen dividirse en cinco grupos: fiebre entérica o tifoidea, septicemia sin localización, enfermedad focal (con o sin bacteriemia asociada), gastroenteritis y estado de portador (crónico o transitorio). Estas formas se asocian a inmunodepresión y alcoholismo (Tacchini, et al., 2010).

### **2.6.7 *C. albicans***

*Cándida* es el género de levaduras ubicadas en el filo Ascomycota, que incluye aproximadamente 150 especies, son levaduras mitospóricas alargadas u ovaladas de 2-6 x 3-9 µm, las cuales se reproducen por gemación a través de blastoconidios. Entre 85 y 95% de las levaduras aisladas de vagina, pertenecen a la especie *C. albicans*, siguiéndole en frecuencia *C. glabrata* y en menos del 5% especies como *C. krusei*, *C. parasilopsis*, *C. tropicalis* y *C. africana* entre otras (Pineda, et al., 2017). Se ha observado un incremento de las micosis invasoras, principalmente por *Candida* debido al aumento paralelo de pacientes de alto riesgo, trasplantados, con neoplasias, los inmunosuprimidos (HIV-SIDA y otras), los recién nacidos de bajo peso, los pacientes de edad avanzada, a los que se les han practicado cirugías extensas y los hospitalizados en las unidades de cuidado intensivo (UCI) (Bedout, et al., 2010). La siembra adecuada para la identificación y aislamiento se realiza según técnicas convencionales y se incuba a 30-37°C durante 24- 48 h para que las levaduras desarrollen el color que las caracteriza (Cantón, et al., 2000).

## **2.7 Pruebas de sensibilidad bacteriana**

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad (Cantón, et al., 2000).

### **2.7.1 Antibiograma.**

El antibiograma tiene como objetivo evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o a varios antimicrobianos, y traducir, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica (Cantón, 2011). El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios (en inglés *Clinical and Laboratories Standards Institute*, o CLSI, define el antibiograma como: un perfil general de los resultados de la susceptibilidad antimicrobiana de una especie microbiana frente a una batería de agentes antimicrobianos (CLSI, 2010). En general, se entiende por antibiograma el resultado de las pruebas de sensibilidad in vitro llevadas a cabo para conocer el comportamiento de un microorganismo frente a determinados antibióticos, cuyos resultados se expresan en términos de "sensibilidad" y "resistencia" (Hernández, 2013).

### **2.7.2 Concentración mínima inhibitoria**

La concentración mínima inhibitoria (CMI), es la concentración más baja (en µg/ml) de un antibiótico que inhibe el crecimiento de una determinada cepa bacteriana (Guía microbiológica, 2018). Para llevarlo a cabo es necesario utilizar cepas control (de referencia) con el fin de que los resultados sean reproducibles y comparables. Este método nos ofrece información sobre la sensibilidad de las bacterias S (sensible), I (intermedia) y R (resistente) (Cantón, et al., 2000).

- Sensible: si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en el caso de un tratamiento a la dosis habitual.
- Intermedia: cuando el éxito terapéutico es imprevisible. Se puede conseguir efecto terapéutico en ciertas condiciones (fuertes concentraciones locales o aumento de la posología).
- Resistente: si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida. No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuere el tipo de tratamiento.

### **2.7.3 Método del antibiograma en difusión en placa (M. Kirby-Bauer)**

La prueba de sensibilidad utilizando el procedimiento del disco-placa es una modificación de la técnica descrita por Bauer, Kirby, Sherris y Turk; es la técnica que se recomienda para los laboratorios clínicos para realizar las pruebas de antibiograma, la prueba es rápida, práctica y reproducible (Bernal, et al., 1984). El antibiograma en placa consiste en depositar, en la superficie del agar de una caja de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición (Cantón, et al. 2000).

### **2.7.4 Método de macrodilución.**

En el método de macrodilución se emplea por cada combinación microorganismo/antimicrobiano un conjunto de tubos. Habitualmente se preparan los tubos con 1ml de medio estéril sin antimicrobiano. Al primero de ellos se añade 1 ml de la solución inicial del tubo de antimicrobiano hasta conseguir la concentración más alta a estudiar (teniendo en cuenta que este primer paso supone la dilución a la mitad de la solución madre, y que una vez inoculados los tubos, con 1 ml de inóculo, se diluirá nuevamente la concentración de antimicrobiano a la mitad). Tras mezclar adecuadamente, se pasa 1 ml al siguiente tubo; el proceso se repite tantas veces como diluciones se quieran estudiar (Cantón, et al., 2000).

### **2.8 Escala de McFarland.**

Los estándares de McFarland son usados como una referencia para ajustar la turbidez de suspensiones bacterianas hasta que el número de bacterias llegue al rango establecido, específicamente para identificación y pruebas de susceptibilidad. Se determina los valores de referencia de células en suspensiones de opacidad estándar empírica para establecer un conteo preliminar en suspensiones bacterianas teniendo una opacidad óptica y no a simple vista. El patrón de McFarland 0.5 y corresponde aproximadamente a una suspensión homogénea de  $1.5 \times 10^8$  células bacterianas por ml (Avilés, et al., 2010).

### **2.9 Análisis de espectro UV**

El estudio a nivel bioquímico de cualquier biomolécula requiere la utilización de técnicas analíticas que permitan su determinación cualitativa y cuantitativa, así como su caracterización físico-química y biológica (Díaz, et al., 2009). Un

espectrofotómetro es un instrumento utilizado para determinar a qué longitud de onda la muestra absorbe la luz y la intensidad de la absorción. Aunque varían en el diseño, todos los espectrofotómetros consisten de una fuente de luz, un selector de longitud de onda, un contenedor transparente en el cual se deposita la muestra, un detector de luz y el medido. El fundamento de la espectroscopia se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV-visible. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas (Arenas, et al., 2004).

### **2.10 Medio Muller Hinton.**

Es un medio de cultivo recomendado y estandarizado universalmente para la realización de la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos mediante los métodos de difusión en agar o de dilución en agar. La composición del medio Muller-Hinton debe ser estandarizada para obtener resultados fiables de sensibilidad a los antimicrobianos, con concentraciones definidas de  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  y  $\text{ZnCl}_2$ , porque se sabe que las variaciones en las concentraciones de los cationes  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  afectan a los resultados obtenidos (diámetros y concentraciones mínimas inhibitoras o CMI) (Casillas, et al., 1981).

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo general.**

- Sintetizar y determinar el efecto antibacteriano de nanopartículas de plata a distintas concentraciones en diferentes cepas bacterianas.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

1. Sintetizar nanopartículas de plata a diferentes concentraciones por el método síntesis de reducción química de un precursor de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) (Métrauz, et al., 2005)
2. Determinar el grado absorbencia de nanopartículas de plata.
3. Determinar el efecto antibacteriano de las nanopartículas de plata sobre diferentes cepas bacterianas.
4. Determinar la concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas de plata que presenten actividad antibacteriana.

## 4. Metodología

Se utilizó para la formación de las nanopartículas de plata el método síntesis de reducción química de un precursor de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) (Métrauz, et al., 2005).

### 4.1 Material para la síntesis de nanopartículas de Plata.

Se pesaron diferentes concentraciones (50 mg, 25mg, 12.5mg y 6.25 mg) de un precursor de plata ( $\text{AgNO}_3$  /0.10mM) y se diluyó cada concentración en un matraz aforado de 100 ml de agua no ionizada.

Se pesó 0.77g/mol citrato de sodio (30mM), posteriormente se diluyó en un matraz aforado de 100 ml de agua no ionizada, este compuesto actúa como estabilizador.

De la misma manera se pesó 0.175g/mol de polivinilpirrolidona (PVP/0.70 mM), posteriormente se diluyó en un matraz aforado de 100ml de agua no ionizada. Este compuesto evita la agregación de las nanopartículas.

Se pesó 0.03783g/mol de borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ / 100mM), posteriormente se diluyó en un matraz aforado de 10 ml de agua no ionizada, este compuesto actúa agente reductor. Se tomó 60  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

### 4.2 Síntesis de nanopartículas de Plata.

Se colocaron cuatro vasos de precipitados de 50 ml en cuatro parrillas con agitación. En cada vaso se colocó 25 ml (0.5mg/mL de  $\text{AgNO}_3$ ) de cada una de las concentraciones de las soluciones de  $\text{AgNO}_3$ , se agregaron a cada vaso 1.5 ml de la solución de citrato de sodio previamente preparada, 1.5 ml de PVP y 60  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno, en agitación a velocidad media, posterior a 5 minutos se agregó 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaBH}_4$ , observándose un cambio en la coloración. Se dejó en agitación a la misma velocidad por 30 minutos para la formación final de nanopartículas y se cubrió de la luz.

### 4.3 Análisis de Espectro UV.

Se midió la absorbancia de las diferentes soluciones de nitrato de plata y de las nanopartículas de plata en un espectrofotómetro marca Beckman Couter®. Realizando un barrido en un rango de absorbancia de 250 nm a 800 nm. Utilizando como solución de referencia el precursor de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), una solución de referencia de las nanopartículas de plata ( $\text{AgNP}$ 's) y agua destilada como blanco. Observando los picos de absorción y comparándolos con lo reportado en la literatura.



#### **4.4 Formación de discos antibacterianos**

Se utilizó papel filtro grueso en círculos de 6 mm, posteriormente se agregaron a las diferentes soluciones de nanopartículas de plata y las soluciones de nitrato de plata, que se encontraban en frascos pequeños de 40 ml. Se esterilizaron en autoclave a 10 libras durante 20 minutos.

#### **4.5 Antibiograma disco-placa: método Kirby Bauer.**

Se obtuvieron las cepas bacterianas con las que se llevó a cabo la investigación del laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Estas bacterias fueron: *S. flexneri* ATCC 9191, *P. aeruginosa* ATCC 25619, *S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* NRS 643, *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 35983, *S. epidermidis* ATCC 12228, *E. coli* ATCC 10586, *K. pneumonia* ATCC 10031, *S. typhimurium* ATCC 14028 y *C. albicans* ATCC 10231.

Se activaron las cepas, cerca de un mechero Fisher, agregando 20 µL en tubos estériles de 13X 100 con 3 ml de caldo Müller Hinton y se dejaron crecer en una incubadora microbiológica a 37° C durante 24 horas para obtener las cepas en su fase exponencial (en el caso de la cepa de *C. albicans* se dejó en una incubadora a 30°C por 24 horas para su mejor crecimiento). Posteriormente se ajustó a 0.5 McFarland tubos estériles de 13x100 con 3 ml de caldo Müller Hinton por medio de un Desimat marca Biomerieux® para obtener  $1.5 \times 10^8$  UFC. A continuación con la ayuda de un hisopo estéril se realizó un sembrado masivo (haciendo 3 giros de 60°) en cajas Petri estériles con agar Muller Hinton previamente preparadas. Después se colocaron por duplicado, para verificar su reproducibilidad, los discos impregnados con cada una de las soluciones, separándolos adecuadamente para que no se encimaran los halos de inhibición. Se rotularon y se dejaron incubar a 37°C durante 24 horas (Los antibiogramas con *C. albicans* se dejaron a 30°C por 24 horas por sus características). Posterior a las 24 horas se realizó la lectura de los halos de inhibición midiendo el diámetro de borde a borde pasando por el centro del halo. De las distintas concentraciones del precursor de plata con las que se trabajó se utilizaron para la siguiente prueba de sensibilidad aquellas que mostraron mayor actividad bacteriana (halo de inhibición mayor) y las bacterias en las que se observó esta actividad.

#### **4.6 Método de macrodilución. (Concentración mínima inhibitoria)**

Para esta prueba se utilizaron las soluciones de nanopartículas de plata de 50 ppm y la solución de nitrato de plata 50 partes por millón por la mayor actividad bacteriana que presentaron. Las bacterias utilizadas en esta prueba fueron *S. flexneri* ATCC 9191, *Escherichia coli* ATCC 10586, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35983 y *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

Para determinar la concentración mínima inhibitoria de cada solución, se utilizaron una batería de tubos estériles de 13x 100 con 1 ml de caldo Müller-Hinton, dependiendo el número de tubos de la macrodilución a la que se necesitará llegar para encontrar la CMI en cada una de las soluciones. Se ajustó a 0.5 M McFarland las cepas de las bacterias en tubos estériles de 13x100 con 3 ml de caldo Müller Hinton. Posteriormente se tomaron 66 µl de esta solución y se colocaron en tubos estériles de 16x150 con 10 ml de caldo Müller-Hinton para lograr una dilución bacteriana de 1:150. Se trabajó dentro de una campana de flujo laminara para condiciones de esterilidad. Para realizar la dilución 1:2 se agregó un mililitro de la solución AgNP's 50 ppm en un tubo de 13x100 que contenía un mililitro de caldo Müller Hinton y se homogenizó. Para realizar la dilución 1:4 se tomó un mililitro de la solución anterior y se vertió en el siguiente tubo con 1 mililitro de caldo Müller Hinton y se homogenizó. Se utilizó el mismo procedimiento para las siguientes macrodiluciones hasta llegar a la concentración 1:512, a esta última se le eliminó 1 mililitro, para obtener 1 mililitro en cada tubo. Posteriormente se agregó 1 mililitro de la solución de las bacterias (1:150) en cada tubo, obteniendo como final 2 mililitros en cada tubo. Para homogenizar se invirtieron los tubos 3 veces y se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm durante 24 horas. Después de este tiempo se llevó acabo la lectura evaluando la turbidez del medio para determinar el crecimiento bacteriano, encontrando de esta manera la concentración mínima inhibitoria (basándose en el último tubo en el que no se observa turbidez). Se realizó este mismo procedimiento con las soluciones restantes en las diferentes cepas bacterianas.

#### **4.7 Aumento de solución de NaBH<sub>4</sub> para la síntesis de nanopartículas de plata.**

Se observó que las nanopartículas de plata de 50 ppm se revirtió su reducción, con base en la coloración de la solución (coloración clara y homogénea) y no presentaban actividad antibacteriana, razón por la cual se volvieron a sintetizar aumentando la cantidad de con un mayor volumen de NaBH<sub>4</sub> (de 250 µl a 300 µl) para tratar de mantener la reducción de las nanopartículas, con lo cual se observó que recuperaron su actividad antibacteriana y su coloración característica.

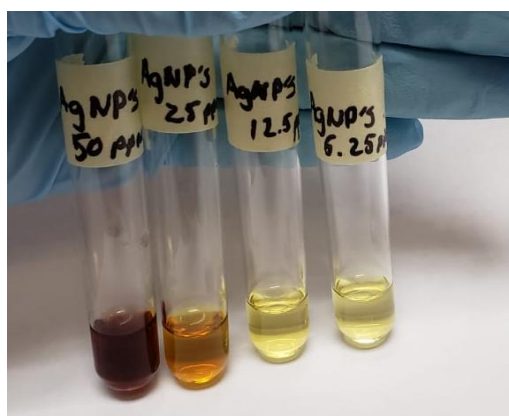
#### **4.8 Solución de nitrato de plata esterilizada.**

En las primeras pruebas de macrodilución se observó que cuando las soluciones de nitrato de plata de 50 ppm se esterilizaban en autoclave a 15 libras durante 10 minutos, la solución presentaba una reducción (observando cambio en su coloración) y un aumento en su actividad antibacteriana. Por esta razón en las siguientes pruebas se realizaron las pruebas utilizando tres soluciones de estudio las AgNP's de 50 ppm, AgNO<sub>3</sub> 50 ppm con esterilizar y AgNO<sub>3</sub> sin esterilizar para determinar si se observaba alguna diferencia bajo esta condición.

## 5. Resultados

### 5.1 Síntesis de nanopartículas de plata.

En el presente estudio, las nanopartículas de plata se sintetizaron con éxito por medio del método de reducción química de  $\text{AgNO}_3$  ya descrito. Como se comentó se necesitó agregar un mayor volumen de  $\text{NaBH}_4$  (300  $\mu\text{L}$ ) para mantener la reducción de la solución. La formación de nanopartículas de plata se indicó por el cambio de color de la mezcla de reacción, se observa en la figura 1.1 que para cada una de las soluciones de las diferentes concentraciones del precursor de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) corresponde una coloración característica, siendo marrón oscuro las  $\text{AgNP}$ 's que se sintetizaron con 50 mg de  $\text{AgNO}_3$ , pasando a ser una coloración más claras conforme disminuía la concentración del precursor de plata. Por otro lado, no se observó ningún cambio de color en los matraces de control que contenían las soluciones  $\text{AgNO}_3$  a las diferentes concentraciones. La formación de nanopartículas metálicas se determinó mediante mediciones UV-VIS.



**Figura 1.1 Coloración de las  $\text{AgNP}$ 's.** Se observa el color final de las distintas soluciones de nanopartículas de plata a diferentes concentraciones. De izquierda a derecha se encuentran las  $\text{AgNP}$ 's de 50 ppm,  $\text{AgNP}$ 's 25 ppm,  $\text{AgNP}$ 's 12.5 ppm y  $\text{AgNP}$ 's 6.25 ppm.

Abreviaturas:  $\text{AgNP}$ 's: Nanopartículas de plata. PPM: Partes por millón.

## 5.2 Antibiograma por el método de Kirby-Bauer.

Se puede observar en la tabla 2.1 que las nanopartículas sintetizadas con una mayor concentración del precursor de plata (50mg de AgNO<sub>3</sub>), presentaron una mayor actividad antibacteriana. Estas nanopartículas tuvieron actividad en todas las cepas bacterianas, con mayor inhibición en *S. flexneri* ATCC 9191, *P. aeruginosa* ATCC 25619, *S. aureus* ATCC 43300, *S. epidermidis* ATCC 35983, *E. coli* ATCC 10586 y *S. typhimurium* ATCC 14028 con un halo promedio de 11.5 mm, 11 mm, 8 mm, 11 mm, 9.5 mm y 8 mm. Así también, se observa que a menor concentración del precursor de plata las nanopartículas presentaron poca actividad antibacteriana, perdiendo la actividad casi por completo las nanopartículas de 6.26 PPM y 12.5 PPM.

**Tabla 1.1. Antibiograma por el método de Kirby Bauer.** Se realizó por duplicado la colocación de discos impregnados de las diferentes soluciones de estudio y se obtuvo el promedio de halos de inhibición. Los halos de inhibición están medido en milímetros. En la columna de la izquierda se encuentran las diferentes cepas bacterianas de estudio. En las columnas de color anaranjado se encuentran las de nanopartículas de plata a las diferentes partes por millón a las que se sintetizaron. Las columnas de color azul claro se encuentran las diferentes concentraciones de las soluciones de AgNO<sub>3</sub>.

Microorganismos.	Soluciones. (Zona de inhibición en mm)							
	1. AgNP's 50 ppm	2. AgNO <sub>3</sub> 50 ppm	3. AgNP's 25 ppm	4. AgNO <sub>3</sub> 25 ppm	5. AgNP's 12.5 ppm	6. AgNO <sub>3</sub> 12.5 ppm	7. AgNP's 6.25 ppm	8. AgNO <sub>3</sub> 6.25 ppm
<i>S. flexneri</i> ATCC 9191	11.5	12	7.5	11	9	9.5	8	8.5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25619	11	12	8	13.5	7	10	7	9.5
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	8	11	0	7	0	7	0	8
<i>S. aureus</i> NRS 643	7.5	11	0	12	0	8	0	7
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	7	9	0	8.5	0	7	0	6.5
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35983	11	13.5	7.5	11	0	9	9	9.5
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	10	11.5	0	10	0	9	0	7.5
<i>E. coli</i> ATCC 10586	9.5	8.5	0	8.5	0	8	0	7.5
<i>K. pneumonia</i> ATCC 10031	8.5	9	7	8.5	0	7.5	0	7.5
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	8	9.5	0	7	0	8	0	7
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	8	8.5	0	8.5	0	8	0	7

Así también, se observó que las nanopartículas de plata de 25 ppm solo presentaron actividad en las cepas *S. flexneri*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* y *K. pneumoniae*. Las nanopartículas de 12.5 ppm solo presentaron actividad en *P. aeruginosa*, halo de 7mm promedio. Siendo resistente en el resto de las cepas. Las nanopartículas de 6.25 ppm solo presentaron actividad en *S. flexneri* y *P. aeruginosa* con un halo de inhibición menor en comparación con las nanopartículas de 50 ppm. Las cuatro concentraciones de nanopartículas de plata coincidieron en presentar actividad contra *P. aeruginosa* ATCC 25619 con un halo mayor en las nanopartículas de 50 PPM y 25 PPM con un halo promedio de 11mm y 8 mm respectivamente.

Se determinó que las cuatro concentraciones de nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub> de 50 ppm, 25 ppm, 12.5 ppm y 6.25 ppm) presentaron una mayor actividad antibacteriana en

todas las cepas bacteriana en comparación con las AgNP's. Se observó que la actividad decreció con respecto a la concentración de AgNO<sub>3</sub>. La solución de AgNO<sub>3</sub> de 50 ppm presentó los halos de inhibición con mayor diámetro en todas las bacterias.

En las figuras 2.1 a la 2.4 se puede observar algunos de los antibiogramas realizados por el método Kirby Bauer. En los números pares se encuentran las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata y los números impares hacen referencia a las distintas soluciones de AgNO<sub>3</sub>.



Figura 2.1 Cepa *S. flexneri* ATCC 9191. El círculo rojo engloba el halo de inhibición que fue medido de borde a borde, pasando por el centro, para determinar si las diferentes soluciones presentaban actividad antibacteriana.



Figura 2.2. Cepa *K. pneumoniae* ATCC 10031. Se puede observar que de las nanopartículas de plata (asignadas con los números pares) solamente las nanopartículas de 50 ppm presentaban un pequeño halo de inhibición de 8.5 mm en promedio.



Figura 2.3. Cepa *S. epidermidis* ATCC 35983. Observe que el halo de inhibición de las AgNP's 50 ppm (número 2) es similar en diámetro a las AgNO<sub>3</sub> 50 ppm (Número 1)

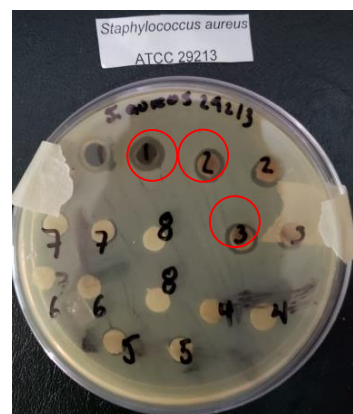
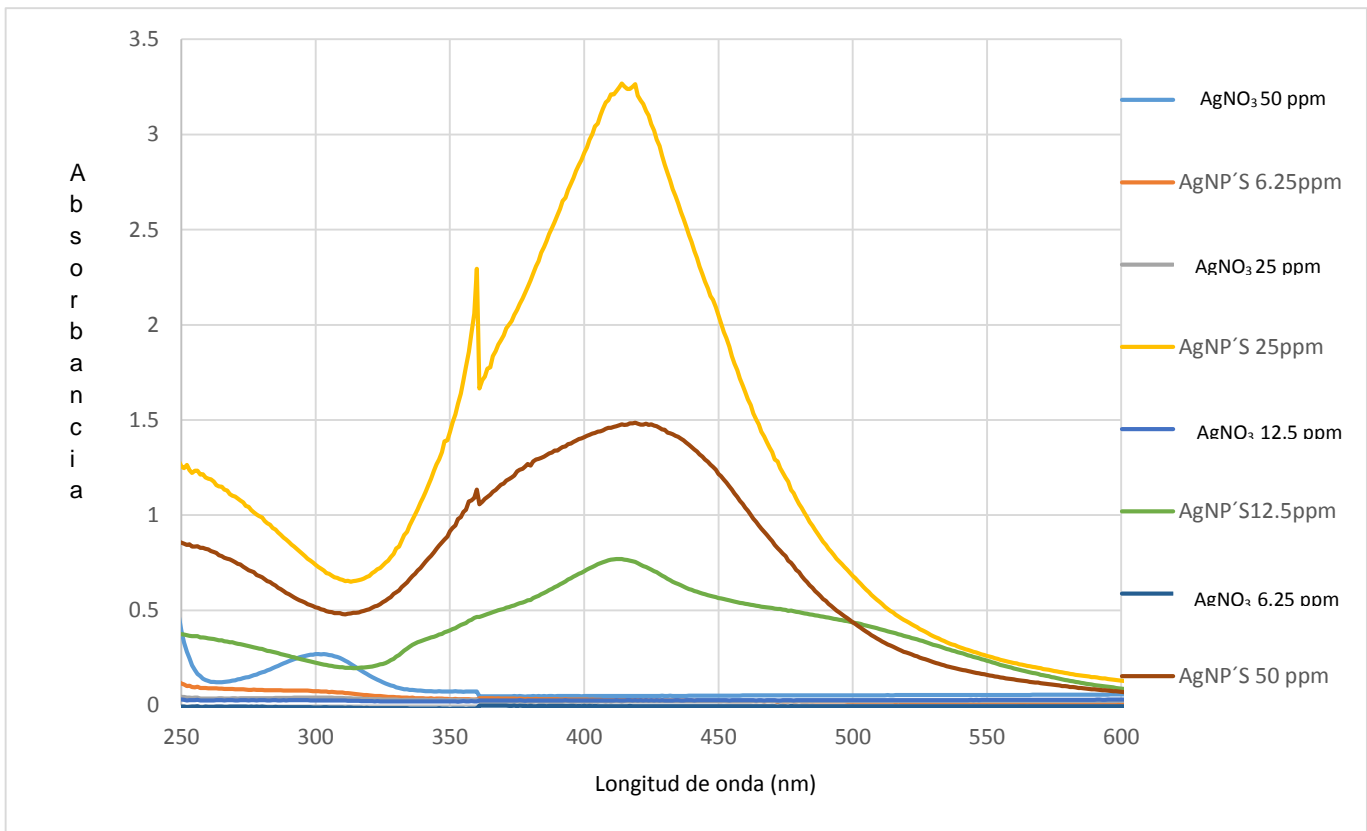


Figura 2.4. Cepa *S. aureus* ATCC 29213. Se puede observar que al igual que en las demás figuras las AgNP's 50 ppm son las que mostraron los mayores halos de inhibición.

### 5.3 Análisis de Espectro UV.

En la gráfica 1.1 se observa el pico de absorbancia de las nanopartículas de plata, encontrando que las nanopartículas de plata de 50 ppm presentaba un pico de absorbancia a una longitud de onda de 419 nm. Las nanopartículas de plata de 25 ppm presentaban dos picos de absorbancia con muy poca variación entre ambos, a una longitud de onda de 414 nm y 419nm. En cuanto a las nanopartículas de plata de 12.5 ppm se encontró un pico de absorbancia de 414 nm y en las nanopartículas de plata de 6.25 ppm se encontró un solo pico en a una longitud de onda de 301 nm.



Gráfica 3.1. Espectros UV-Vis de las nanopartículas de plata (AgNP's) en un rango de absorción de luz de 250 a 600 nm. En el eje de las Y se encuentra la absorbancia de la luz, en el eje de las X se encuentra la longitud de onda expresada en nanómetros. El color amarillo corresponde a las AgNP's 25 ppm, el color rojo a las AgNP's 50ppm, el color verde a las AgNP's de 12.5 ppm y el color anaranjado a las AgNP's de 6.25 ppm. El resto de los colores pertenece a las soluciones de nitrato de plata a las diferentes concentraciones en los cuales se observa que no presentaron pico de absorción.

## 5.4. Método de macrodilución.

### 5.4.1 Nanopartículas de plata de 50 ppm.

Como se puede observar en el recuadro 4.1 La concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas de plata de 50 ppm en *S. aureus* se encontró a 55 µg /mL. En *S. flexneri*, se volvió a observa que las nanopartículas de plata de 50 ppm su CMI se encontró a 27 µg /mL. En las cepas de *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* y en *E. coli* se observó la menor CMI de todas las bacterias encontrándose en 13 µg /mL. En la cepa de *S. typhimurium* estas nanopartículas presentaron una CMI de 27 µg /mL.

Microorganismo probado.	CMI AgNP's 50ppm
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	55 µg /mL
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35983	13 µg /mL
<i>S. flexneri</i> ATCC 9191	27 µg /mL
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25619	13 µg /mL
<i>E. coli</i> ATCC 10586	13 µg /mL
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	27 µg /mL

Cuadro 4.1 Concentración mínima inhibitoria de las AgNP's 50'ppm. En la columna de la izquierda se encuentran las 6 cepas bacterianas de estudio. En la columna de la derecha se encuentran las concentraciones mínima inhibitoria de las AgNP's 50 ppm que se encuentran en µg /mL.

### 5.4.2 Solución de nitrato de plata 50 ppm con esterilizar.

La solución de nitrato de plata de 50 ppm esterilizada presentó una CMI en *S. aureus* mucho más pequeña que las nanopartículas de plata y la solución de nitrato de plata de 50 ppm sin esterilizar, encontrándose a 1.9 µg /mL. En cuanto a *S. epidermidis* y *S. flexneri* se encontró su CMI en 0.195 mg/mL. En cuanto a *P. aeruginosa* no se pudo determinar la CMI, siendo insuficiente la macrodilución de 1:512, entendiéndose que su CMI es muy reducida. En *E. coli* lo CMI se encontró 3.9 µg /mL y en *S. typhimurium* su CMI se encontró en 1.9 µg /mL.

Microorganismo probado.	CMI AgNO <sub>3</sub> 50ppm C/E
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	1.9 µg /mL
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35983	0.97 µg /mL
<i>S. flexneri</i> ATCC 9191	0.97 µg /mL
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25619	< 0.48 µg /mL
<i>E. coli</i> ATCC 10586	3.9 µg /mL
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	1.9 µg /mL

Cuadro 4.2 Concentración mínima inhibitoria de la AgNO<sub>3</sub> 50 ppm con esterilizar. Se muestra la CMI de las AgNO<sub>3</sub> con esterilizar, observándose una menor CMI en comparación con las AgNP's 50 ppm. En la cepa de *P. aeruginosa* no se pudo encontrar la CMI en la dilución 1:512, siendo necesario mayor número de diluciones para conocer la CMI.



### 5.4.3 Solución de AgNO<sub>3</sub> 50 ppm sin esterilizar.

En *S. aureus* la solución de nitrato de plata de 50 ppm sin esterilizar, su concentración mínima inhibitoria se encontró en 3.9 µg /mL. En *S. epidermidis* y *S. flexneri* su CMI se hallaba en 7.8 µg /mL. En *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. typhimurium* su CMI se encontró en 0.97 µg /mL. Se observó que en *E. coli* y *S. typhimurium* la CMI fue menor en comparación a la solución de AgNO<sub>3</sub> con esterilizar.

Microorganismo probado.	CMI AgNO <sub>3</sub> 50ppm S/E
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	3.9 µg /mL
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35983	7.8 µg /mL
<i>S. flexneri</i> ATCC 9191	7.8 µg /mL
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25619	0.97 µg /mL
<i>E. coli</i> ATCC 10586	0.97 µg /mL
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	0.97 µg /mL

Cuadro 4.3 Solución AgNO<sub>3</sub> 50 ppm sin esterilizar. Observe que en a *E. coli* y *S. typhimurium* la CMI fue menor en comparación con la solución AgNO<sub>3</sub> 50 ppm con esterilizar.

En las figuras 4.1 a la 4.4 se observan ejemplos del método de macrodilución en la cepa de *P. aeruginosa* para las tres soluciones. En la figura 4.1 corresponde a las nanopartículas de plata de 50 ppm, se observa la coloración que presentaron al inicio de la dilución que indica la presencia de nanopartículas. En la figura 4.2 de igual manera corresponde a las AgNP's 50 ppm, se puede observar el cambio de coloración en comparación con las primeras diluciones y que a partir del quinto tubo el medio se torna turbio indicado de esta manera crecimiento bacteriano y la CMI en el tubo antecesor (correspondiente a dilución 1:16).

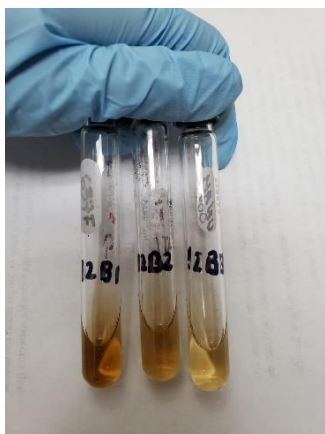


Figura 4.1. Método de macrodilución AgNP's 50 ppm. La cepa bacteriana *P. aeruginosa*. Observe la coloración amarillo marrón que presenta la solución al inicio de la dilución y que no se presenta turbidez del medio, indicando ausencia de crecimiento bacteriano.

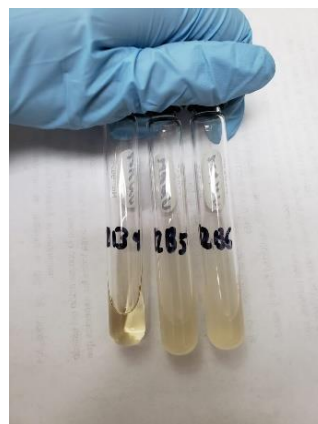


Figura 4.2. Método de macrodilución AgNP's 50 ppm. Cepa bacteriana *P. aeruginosa*. Se observe un cambio en la coloración conforme se realizó la dilución. Se aprecia la turbidez del medio a partir del tubo con la numeración 12B5. Determinando de esa manera la CMI en un tubo antecesor (12.B.4).



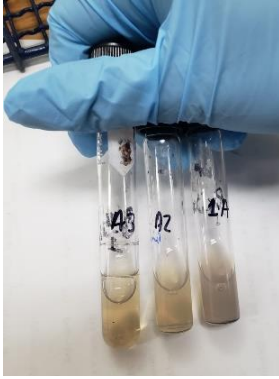


Figura 4.3. Método de macrodilución,  $\text{AgNO}_3$  50 ppm con esterilizar; Cepa bacteriana *P. aeruginosa*. Se observe una coloración no homogénea pero sin presentar turbidez del medio, lo que indica ausencia crecimiento bacteriano.



Figura 4.4. Método de macrodilución,  $\text{AgNO}_3$  50 ppm sin esterilizar; Cepa bacteriana *P. aeruginosa*. Observe que existe diferencias del medio en comparación con la solución  $\text{AgNO}_3$  50ppm con esterilizar. De la misma manera no se observa crecimiento bacteriano en esas macrodiluciones.

#### 5.4.4 Diferencias entre $\text{AgNO}_3$ con esterilizar y $\text{AgNO}_3$ sin esterilizar.

Se pudo determinar que la solución de  $\text{AgNO}_3$  50 ppm con esterilizar presentó una mayor actividad antibacteriana y una CMI más reducida en comparación con la solución de  $\text{AgNO}_3$  sin esterilizar en la mayoría de las cepas bacterianas, a excepción de en la cepa *E. coli* y *S. typhimurium* en la que las CMI fueron menores que en la solución  $\text{AgNO}_3$  50ppm con esterilizar.

## 6. Discusión

Debido a la creciente resistencia que muestran ciertas bacterias que causan enfermedades oportunistas y asociadas a la atención de la salud a diferentes antibióticos, es la importancia de conocer la actividad antibacteriana que pueden presentar las nanopartículas de plata contra estos agentes y determinar si en un futuro pueden servir como tratamiento alternativo o complementario a estas afecciones. De los distintos métodos de síntesis que existen para la producción de nanopartículas de plata el método propuesto por Métrauz et, al., 2005, permite la formación de nanoprimas. Entre las diferentes formas de nanopartículas metálicas, los nanoprismas triangulares de plata (TAgNPrs) son particularmente interesantes porque exhiben propiedades únicas de resonancia de plasmón superficial (SPR) y permiten una mayor interacción de su superficie (Xu, et, al., 2017).

En un estudio realizado por Nour, et al., 2016, se informó sobre la actividad antibacteriana que presentaron las nanopartículas plata sintetizadas por el mismo método de reducción química, en combinación con luz azul visible contra un aislado clínico resistente a múltiples fármacos de *Pseudomona aeruginosa in vitro e in vivo* en una herida crónica en un caballo, en el cual se observó inhibición de la bacteria y pronta resolución de la afección.

Como se comenta en el estudio de Nour El Din, et, al 2016, en este trabajo se observó la síntesis de nanopartículas de plata, a diferentes concentraciones del precursor de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), por medio del cambio de coloración de la solución (de una solución transparente a marrón oscuro) gracias a la concentración de  $\text{NaBH}_4$ , la cual influye en la formación de nanopartículas y en el mantenimiento de la reducción del nitrato de plata. En el estudio realizado por Xu, et, al., 2017, en la síntesis de nanopartículas de plata, la concentración de  $\text{NaBH}_4$  presentó un efecto importante, observándose cambio de coloración de la solución dependiendo de su concentración; en 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaBH}_4$  la coloración fue purpura y a 250  $\mu\text{L}$ , la solución fue azul turquesa y siendo el determinante para la forma de las nanopartículas. En un principio sintetizamos las nanopartículas con una concentración de 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaBH}_4$ , pero se observó que al paso de los días la solución revertía su reducción pasando a ser una solución transparente homogénea y disminuyendo su actividad antibacteriana. Debido a esto, se volvieron a sintetizar las nanopartículas de plata, agregando 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaBH}_4$  a la solución, observándose que la reducción de las nanopartículas se mantuvo y recuperaron su actividad antibacteriana.

En estudios de Bindhu, et, al., 2014, las nanopartículas de plata exhiben un pico de absorción intenso en la región visible de 400-440 nm en espectroscopia UV-VIS debido a la excitación del plasmón superficial (SPR). Esta banda de absorción se observa mediante la oscilación combinada de electrones de conducción libre de

nanopartículas metálicas en resonancia con la onda de luz. En nuestros resultados, se confirmó la síntesis de nanopartículas de plata por medio de espectroscopia UV-VIS, que reveló el pico de absorción a la longitud de onda de 419 nm para las nanopartículas de 50 ppm, en las AgNP's de 25 ppm un pico promedio de absorbancia de 416 nm, en cuanto a las AgNP's de 12.5 ppm mostraron un pico de 414 nm y en las nanopartículas de 6.25 ppm su pico de absorbancia se mostró en 301 nm. En un estudio realizado por Składanowski, et al., 2016 informaron resultados similares de absorbancia, utilizando la cepa actinobacteriana NH28 para la síntesis de AgNP's, encontraron valores relacionados a aproximadamente 421 nm de absorbancia de longitud de onda de las nanopartículas. De la misma manera Singh, et al., 2015, mediante la cepa *Brevibacterium frigoritolerans* DC2 sintetizó de manera eficaz nanopartículas de plata que mostraron una absorbancia de luz de 420 nm con un tamaño promedio de 97 nm por medio de la dispersión dinámica de la luz.

Según Siddiqi, et, al., 2018 se ha demostrado que las AgNP's detienen el crecimiento y la multiplicación de muchas bacterias, como *B. cereus*, *S. aureus*, *C. koseri*, *S. typhii*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumonia*, *V. parahaemolyticus* y *C. albicans*. En nuestro estudio, como se puede observar en el cuadro 1.1, se registró una alta actividad antibacteriana de nanopartículas de plata de 50 ppm, en algunas bacterias similares a las mencionadas en este artículo. Las de AgNP's de 50 ppm tuvieron mayor actividad contra Gram-negativos (*S. flexneri*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. typhimurium*) y Gram-positivo (*S. aureus* y *S. epidermidis*). La actividad antibacteriana de nuestra investigación fue similar al estudio de Hu, et, al. 2019, en el cual se sintetizaron nanopartículas de plata biogénicas utilizando un extracto micelial del hongo endofítico *Talaromyces purpureogenus*, utilizando 30 mM del precursor AgNO<sub>3</sub> (en comparación con nuestro estudio 0.10 mM de AgNO<sub>3</sub>) evaluaron la actividad de las nanopartículas en cepas bacterianas similares a las de nuestro estudio, por medio del método de difusión de disco encontraron los siguientes halos de inhibición: *S. aureus* (9 mm), *P. aeruginosa* (13 mm) y *E. coli* (11 mm). En estas cepas, nuestros resultados muestran un halo promedio de 8 mm en *S. aureus*, 11 mm en *P. aeruginosa* y 9.5 mm en *E. coli*.

En la literatura se ha reportado la actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata pero los valores de CMI encontrados varían a través de un amplio rango. En varios trabajos que comparten ciertas cepas bacterias con esta investigación se observó que la CMI para una bacteria determina podría ser mayor o menor en comparación con otros estudios, por lo tanto se debe de tomar en cuenta la ruta de síntesis y las partes por millón del sustrato de plata para la formación de nanopartículas. Por ejemplo en el estudio realizado por Paredes, et, al., 2014, en donde sintetizó AgNP's usando cisteína como agente reductor y bromuro de

cetiltrimetilamonio como estabilizador, observó valores de CMI de 0.25 µg / mL para *S. aureus metil resistente* y 0.50 µg / mL para *E. coli* O157: H7. Comparando con nuestro estudio la CMI fue mucho menor. En otros estudios, Ansari, et al., 2011 estimó el valor de MIC en 12.5 µg / mL para la cepa de referencia *S. aureus* ATCC 25923. Comparándola con nuestro estudio la CMI fue mayor. Por otro lado Składanowski, et al., 2016 encontró un valor MIC de 1,25 µg/ml de AgNP's biosintetizados contra *S. aureus*, *K. pneumoniae*, y *E. coli*. Así también, Zarei, et, al., 2014 determinó un bajo valor de MIC de un producto comercial de nanosilver, NanoCid® L2000 (AgNP's biosintetizados) para *E. coli* O157: H7 y *S. typhimurium*, ambos a 3,12 µg / ml. Una concentración menor en comparación con nuestro estudio. Como se puede observar los valores de CMI para determinado agente pueden variar dependiendo del método de síntesis. Por último en el mismo estudio de Składanowski, et al., 2016, se reporta una CMI contra *Pseudomonas aeruginosa* 10 µg/mL siendo el único resultado similar al encontrado en este estudio.

Por lo tanto, existen diferencias entre la CMI, ya que la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata, depende de los diferentes métodos de síntesis y de las bacterias en cada estudio.

## **7. Conclusiones.**

Los resultados de esta investigación muestran que las nanopartículas de plata presentan actividad antibacteriana contra bacterias que ocasionan infecciones relacionadas con la atención sanitaria y enfermedades oportunistas, nos brinda información para determinar que podrían llegar a ser utilizadas para el tratamiento de estas enfermedades. También gracias a este estudio se pudo conocer y determinar la concentración mínima inhibitoria que, aunque es mayor en comparación con lo reportado en la literatura por los diferentes métodos de síntesis de nanopartículas, podría llegar a ser un tratamiento alternativo o complementario las nanopartículas sintetizadas por el método realizado en esta investigación para la resolución de las afecciones de salud ocasionadas por estas bacterias.

## **8. Recomendaciones.**

Estudios posteriores se podría indagar acerca de la reducción que se observó en la solución de nitrato de plata al ser esterilizada en autoclave en 15 libras por 10 minutos.

## Bibliografía.

- Alessandrini, F., Vennemann, A., Gschwendtner, S., Neumann, A. U., Rothballer, M., Seher, T., Schmidt-Weber, C. B. (2017). Pro-Inflammatory versus Immunomodulatory Effects of Silver Nanoparticles in the Lung: The Critical Role of Dose, Size and Surface Modification. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 7(10), 300.
- Andrade, V., Grupo de Resistencia Bacteriana, Silva, J. (2004). Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* productora de la  $\beta$ -lactamasa SHV-5, en una unidad de cuidados intensivos. *Salud Publica Mex*, 46, 524-528.
- Ansari MA, Khan HM, Khan AA, y col. Evaluación de la actividad antibacteriana de nanopartículas de plata contra MSSA y MRSA en aislamientos de infecciones de la piel. *Biol Med*. 2011, 3, 141-146.
- . Arenas, I., López, J. (2004). ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN. Universidad Nacional Autónoma De México. [Curso: Métodos de laboratorio]. Disponible en: [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/espectrometria\\_de\\_absorcion.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/espectrometria_de_absorcion.pdf)
- Ávalos, A., Haza, A., Mateo, D., y Morales, P. NANOPARTÍCULAS DE PLATA: APLICACIONES Y RIESGOS TÓXICOS PARA LA SALUD HUMANA Y EL MEDIO AMBIENTE. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 7(2), 1-23.
- Avilés, D., Delgado, K., Gómez, A. (2010) Correlación de suspensiones estandarizadas de microorganismos por el método turbidimétrico vs escala de Mcfarland. [Monografía]. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, 1-63.
- Bahlol, H. S., Foda, M. F., Ma, J., & Han, H. (2019). Robust Synthesis of Size-Dispersal Triangular Silver Nanoprisms via Chemical Reduction Route and Their Cytotoxicity. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 9(5), 674.
- Bedout, C., Gómez, B. (2010). *Candida* y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano. *Infectio*, 14(2), 159-171.
- Behera, S, Debata, A y Nayak PL. (2011). Biomedical applications of silver nanoparticles. *J Asian Sci Res*. 1: 27-56.
- Baos, E. (2017). Caracterización y seguimiento de la resistencia a linezolid en *staphylococcus epidermidis* en la unidad de cuidados intensivos del Hospital Clínico San Carlos tras la descripción del primer brote de *staphylococcus aureus* linezolid resistente. Universidad Complutense de Madrid. [Tesis doctoral]. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/41179/1/T38380.pdf>
- Benintende, S., Sánchez, C. (2000). Crecimiento Bacteriano. Unidad Temática 3, Cátedra Microbiología Agrícola. [Página de internet]. Accedido el 03 de enero de 2020. Disponible en: [http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/microbiologia/unidad\\_3\\_crecimiento\\_bacteriano](http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano)

- Bernal, M., Guzmán, M. (1984). El Antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirbybauer. *Biomédica*, 4(3,4), 112-121.
- Barreto, M., Castillo, M., Retamal, P. (2016). Salmonella entérica: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Rev Chilena Infectol*, 33(5), 547-557.
- Bindhu MR, Umadevi M. Sensor óptico de resonancia de plasmón superficial y actividades antibacterianas de nanopartículas de plata biosintetizadas. *Spectrochim Acta Parte A Mol Biomol Spectrosc*. 2014; 121: 596–604.
- Cantón, R., García, J., Gómez, L., Martínez, L., Rodríguez, C., Vila, J., García, J. (2000). Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos Básicos Para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos en Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editor Picazo J J. Disponible en: <http://www.seimc.org>.
- Canto, R. (2011). Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 28(6), 375–385.
- Casillas, E., Kenny, M.A., Minshew B.H., Schoenknecht, F. (1981). Effect of ionized calcium and soluble magnesium on the predictability of the performance of Mueller-Hinton agar susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* with Gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother*, 19, 987-992.
- Castro, C., Martín, E. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCION FÚNGICA POR LEVADURAS DEL GÉNERO *Candida*: *Candida dubliniensis*. Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica. Hospital Universitario de Valme, Sevilla. [Página de internet]. Consultado el 10 de enero del 2020. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/Cdublinien.pdf>
- Cardoso. P.C. (2016). Nanopartículas de plata: obtención, utilización como antimicrobiana e impacto en el área de la salud. *Rev. Hosp. Niños (B. Aires)*, 58(260), 19-28.
- CLSI. M2-A10. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. In: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, PA. 2010.
- Cervantes, E., García, R., Salazar, P. (2014). Características Generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*, 61(1), 28-40.
- Chernousova S., Epple M. (2013). Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal. *Angew. Chem. Int. Ed*; 52:1636–1653.
- Delgado, M., Saenz, C., Glasman, P., Juárez, X., Mónaco, A., Echave, C., Dondoglio, P., Baich, A., Molinari, C., Pereda, R., Cancellara, A. (2018). Bacteriemia por *Shigella flexneri* en dos lactantes. *Rev Chilena Infectol*, 35 (3), 317-320.

- Díaz, A., Ruiz, A., & Reyes, E. (Enero de 2009). Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Obtenido de [https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biolmol/pdfs/08\\_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf](https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biolmol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf)
- Díaz, R., Fernández, C., Cabrera, V., Hechevarría, Y. (2009). Una visión clínica sobre las enfermedades oportunistas y el SIDA. *Revista Médica Electrónica*, 31(2). Recuperado en 20 de enero de 2020, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1684-18242009000200010&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1684-18242009000200010&lng=es&tlng=es).
- Durán, N., Silveira, C. P., Durán, M., & Martínez, D. S. (2015). Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review. *Journal of nanobiotechnology*, 13, 55.
- Evanoff, D., & Chumanov, G. (2005). Synthesis and Optical properties of Silver Nanoparticles and Arrays. *ChemPhysChem*.
- Guía microbiológica para interpretar la concentración mínima inhibitoria (CMI). (2018). IDEXX. [Página de internet]. Consultado el 11 de enero del 2020. Disponible en: <https://www.idexx.es/files/mic-gui%CC%81a-microbiolo%CC%81gica-es.pdf>
- Gurunathan, S., Jeong, J. K., Han, J. W., Zhang, X. F., Park, J. H., & Kim, J. H. (2015). Multidimensional effects of biologically synthesized silver nanoparticles in *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and human lung (L132) and lung carcinoma A549 cells. *Nanoscale research letters*, 10, 35.
- Guzmán, R, Hernández, R., Contreras, Áraceli. (2016). *Vibrio fluvialis*. *Revista chilena de infectología*, 33(4), 455-456. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182016000400011>
- Hernández, R. (2013). Lectura interpretada del antibiograma. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 42(4), 502-506. Recuperado en 12 de enero de 2020, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0138-65572013000400012&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572013000400012&lng=es&tlng=es).
- Hiteguy, P., Caiata, L., Mota, M., Bazet, C., Varela, G. (2013). Bacteriemia por *Shigella flexneri* serotipo 6 en pacientes con SIDA. Presentación de dos casos clínicos. *Rev Chilena Infectol*, 30 (1), 94-97.
- Khanna, P., Singh, N., K. D., Deshmukh, S., Charan, S., & Adhyapak, P. (2007). Khanna, P.K., Singh, N., Kulkarni, D., Deshmukh, S., Water based simple synthesis of re-dispersible silver nano-particles. *Materials Letters*, 61(16), 3366-3370.
- Leyva, G. (2013). Nanopartículas de plata: tecnología para su obtención, caracterización y actividad biológica. *Investigación en discapacidad*, 2(1), 18-22.
- Liao, C., Li, Y., & Tjong, S. C. (2019). Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. *International journal of molecular sciences*, 20(2), 449.
- López, J., Echeverri, L., K. (2010). *K. pneumoniae*: ¿la nueva “superbacteria”? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. *IATREIA*, 23(2), 157-165.



- Monge, M. (2009). Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, 1, 33-41.
- Moreno, M., Ruíz, E. (2007). Staphylococcus epidermidis formador de biofilm en blefaroconjuntivitis. *REVISTA MEDICA DEL HOSPITAL GENERAL DE MEXICO*, 70 (1), 24 – 29.
- Métrauz, G., Mirkin, C. (2005). Rapid Thermal Synthesis of Silver Nanoprisms with Chemically Tailorable Thickness. *Advanced Materials*, 17(4), 412-415.
- Nour El Din, S., El-Tayeb, TA, Abou-Aisha, K. y El-Azizi, M. (2016). Actividad antimicrobiana in vitro e in vivo de la terapia combinada de nanopartículas de plata y luz azul visible contra Pseudomonas aeruginosa. *Revista internacional de nanomedicina*, 11, 1749-1758.
- Ochoa, S., López, F., Escalona, G., Cruz, A., Dávila, L., López, B., Jiménez, Y., Giono, S., Eslava, C., Hernández, R., Xicohtencatl, J. (2013). Características patogénicas de cepas de Pseudomonas aeruginosa resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 70(2), 136-150.
- Paz, V., Mangwan, S., Martínez, A., Álvarez, D., Solano, S., Vázquez, R. (2019). Pseudomonas aeruginosa: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Rev Chilena Infectol*, 36 (2), 180-189.
- Pineda, J., Cortés, A., Uribarren, T., Castañón, Laura. (2017). Candidosis vaginal. Revisión de la literatura y situación de México y otros países latinoamericanos. *Rev. Méd. Risaralda*, 23(1), 38 – 44.
- Piréz M., Mota M. (2000). Morfología y estructura bacteriana. *Temas de bacteriología y virología médica*. [Revista en internet], 3(2):23-42. URL disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>. Accedido en fecha 03 de enero de 2020.
- Ramamurthy, T., Chowdhury, G., Pazhani, G., Shinoda, S. (2014). Vibrio fluvialis: an emerging human pathogen. *Front Microbiol*, 5(91), 1-8.
- Rónavári, A., Igaz, N., Gopisetty, M. K., Szerencsés, B., Kovács, D., Papp, C., Vágvölgyi, C., Miklós, I., Kónya, Z., Pfeiffer, I. (2018). Biosynthesized silver and gold nanoparticles are potent antimycotics against opportunistic pathogenic yeasts and dermatophytes. *International journal of nanomedicine*, 13, 695–703.
- Ruíz, E., Martínez, C., López, R. (2010). Caracterización fenotípica de Staphylococcus epidermidis aislado de pacientes con endoftalmítis. *Gaceta Médica México*, 146(2), 112-117.

- Salem, W., Leitner, D., Zingl, F., Schratte, G., Prassl, R., Goessler, W., Goessler, W., Reidl, J., Schild, S. (2015). Antibacterial activity of silver and zinc nanoparticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 305(1), 85–95.
- Sánchez, M. (2007). Nanopartículas de plata: Preparación, caracterización y propiedades con aplicación en inocuidad de los alimentos. Trabajo de fin de máster.
- Siddiqi, K., Husen, A., Rao, R. (2018). A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *Journal of nanobiotechnology*, 16(14).
- Singh, P., Kim, Y. J., Singh, H., Wang, C., Hwang, K. H., Farh, M., & Yang, D. C. (2015). Biosynthesis, characterization, and antimicrobial applications of silver nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 10, 2567–2577.
- Shannahan, H., Xianyin, L., Chen, P. (2013). Silver Nanoparticle Protein Corona Composition in Cell Culture Media. *PLOS one*.
- Składanowski, M., Golinska, P., Rudnicka, K., Dahm, H., & Rai, M. (2016). Evaluation of cytotoxicity, immune compatibility and antibacterial activity of biogenic silver nanoparticles. *Medical microbiology and immunology*, 205(6), 603–613.
- Tacchini, M., Carraffini, A., Montamat, M., Spitale, N., Bosio, Y., Minguez, A. (2010). Empiema causado por *Salmonella typhimurium*. *Rev Chil Enf Respir*, 26, 91-94.
- Wei, L., Lu, J., Xu, H., Patel, A., Chen, Z. S., & Chen, G. (2015). Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug discovery today*, 20(5), 595–601.
- Xu, X.; Du, Z.; Wu, W.; Wang, Y.; Zhang, B.; Mao, X.; Jiang, L.; Yang, J.; Hou, S. (2017). Synthesis of triangular silver nanoprisms and spectroscopic analysis on the interaction with bovine serum albumin. *Anal. Bioanal. Chem*, 409, 5327–5336.
- Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications and Therapeutic Approaches. *International journal of molecular sciences*, 17(9), 1534.
- Zhang, X. F., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver Nanoparticle-Mediated Cellular Responses in Various Cell Lines: An in Vitro Model. *International journal of molecular sciences*, 17(10), 1603.

## 10. Anexos

Entre otras actividades que realice durante mi servicio social fue el apoyar a la Dra. Aida Hamdan en el laboratorio de farmacología. Las prácticas en el laboratorio fueron 7 durante todo el trimestre, en donde los alumnos aprendían desde el cómo elaborar una receta médica, hasta el tratamiento farmacológico de un paciente con infarto agudo al miocardio sin elevación del segmento ST. Gracias a la Dra. Aida fue posible la incorporación de 3 prácticas del laboratorio de farmacología llevadas



**Fotografía 10.1** Alumnos trabajando con el simulador Ha durante la práctica.

a cabo con el simulador médico Hal con el que cuenta la escuela, que se encuentra en el laboratorio de propedéutica. Estas prácticas son: *Hipoglucemiantes orales: Control de paciente diabético, Estimulantes del SNC: Tratamiento de intoxicación por cafeína y Medicamentos aplicados en infarto agudo al miocardio sin elevación del segmento ST.* En las cuales los alumnos tenían que interactuar con el simulador médico para atender la situación clínica que se presentaba en el Hal, que estaba fungiendo como paciente. Me di a la tarea de aprender a utilizar el simulador médico, por medio de manuales, videos tutoriales y una explicación de su funcionamiento por parte del Dr. López Ávila, quien me asesoró durante mi aprendizaje para el uso del Hal.



**Fotografía 10.2** Artículo de la revista enlace acerca de las actividades que se realizaban en el laboratorio de farmacología.

Por estas prácticas, la licenciada Martha González, de la revista Enlace Xochimilco, nos entrevistó para dar a conocer las actividades que se estaban realizando con el simulador médico Hal, en el laboratorio de farmacología, publicando un artículo acerca de esto en la Revista Enlace Xochimilco número 17.

Asistimos, en noviembre el 2019, al XXVI CONGRESO ESTUDIANTIL DE FARMACOLOGÍA y IX CONGRESO ESTUDIANTIL CIENCIAS SIN FRONTERA, donde los alumnos presentaron diferentes tipos de revisiones bibliográficas en las cuales, la Dra. Aida me permitió asesorar junto con ella. Se obtuvieron diferentes reconocimientos incluidos un tercer lugar en el congreso de farmacología con la revisión bibliográfica La edición del genoma mediado por CRISPR-Cas9 como alternativa de tratamiento en la enfermedad de Huntington. Una experiencia que me dejó muchas enseñanzas.



**Fotografía 10.3** Fotografía durante el XXVI CONGRESO ESTUDIANTIL DE FARMACOLOGÍA y IX CONGRESO ESTUDIANTIL CIENCIAS SIN FRONTERA.



**Fotografía 10.4** Evaluación de carteles durante el congreso.

En cuanto a las actividades en el laboratorio, se me brindó la oportunidad de aprender diferentes técnicas, desde la realización de antibiogramas, extracción de ADN, pruebas de concentración mínima inhibitorias, entre otras, gracias al personal que labora en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular, quienes fueron de lo más accesible y oportuno para apoyarme en mi aprendizaje, ya que por mi formación hacía tiempo que no me encontraba laborando en un laboratorio.



**Fotografía 10.5** Actividades que realicé en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular durante mi servicio social.

Durante este año de servicio social se me permitió apoyar a alumnos de primer año de la Licenciatura en Medicina en el laboratorio de farmacología, con la experiencia adquirida durante el proceso de enseñanza clínica que tuve durante toda licenciatura, estas actividades me han permitido reforzar y aprender nuevos conocimientos, fue muy grata la experiencia y no me queda más que agradecer a la Dra. Aida por esta oportunidad y por su enseñanza a lo largo de este año de servicio social.



**Fotografía 10.1** Alumnos trabajando con el simulador Ha durante la práctica.



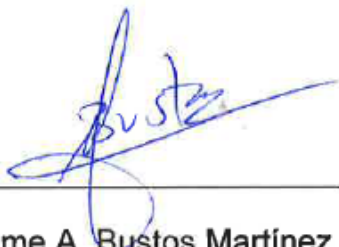
**Fotografía 10.1** Fotografía con los Alumno del grupo BC02MF.

**11. VO. BO DEL ASESOR:**



Dra. Aída Hamdan Partida

No. Eco. 26343



Dr. Jaime A. Bustos Martínez

No. Eco. 8758