

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



Actividad antibacteriana de nanopartículas de plata  
sintetizadas vía extracelular frente a *Pseudomonas aeruginosa*

Tesis para optar el Título de Profesional de Licenciado en  
Biología

Bryan André Canal Núñez

Asesor:  
Mg. Juan Carlos Ramos Gorbeña

Lima, Perú  
2019

## *DEDICATORIA*

En memoria de mi querida mamita América Yanque  
que partió y quien fue uno de los pilares en mi formación  
como persona y como profesional.

A mis mentores y padres:  
Sandra y Enrique por su cariño y apoyo  
,pero sobre todo gracias infinitas  
por la paciencia que me han tenido.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, agradezco a Dios por permitirme obsequiarme un día más de vida y brindarme la fuerza espiritual en momentos difíciles y guiarme por buen sendero y que todo se puede lograr mientras exista amor y paz.

A mis queridos padres, Sandra y Enrique y a mi hermana Viviana por darme la fortaleza en momentos difíciles, brindarme su inmenso amor, paciencia y comprensión, por enseñarme que en esta vida hay que ser fuertes y luchar a pesar de las adversidades y que siempre hay una esperanza. Mil gracias por su constante y continuo apoyo y todas sus críticas constructivas, que, aunque a veces drásticas y duras, sé que tienen el objetivo de ayudarme a crecer personal y profesionalmente.

Agradezco a mi director de tesis, Mg. Juan Carlos Ramos Gorbeña y a mi asesora Mg. Ana María Osorio Anaya, por guiarme académicamente durante toda mi investigación y por brindarme los ambientes necesarios para llevar a cabo esta tesis. Al Dr. Julio Santiago Contreras de la Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM por el apoyo brindado en particular por el préstamo de la cabina de bioseguridad.

Especial mención merece la Dra. Haydee Montoya Terreros de la Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM, por su amistad y consejos durante mis estudios académicos, considerándola mi mentora y mi modelo a seguir.

Agradezco al laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Universidad Ricardo Palma liderado por el Dr. Mauro Máximo Quiñones Aguilar, igualmente al Bach. Miguel Alfonso Montero Orozco por proporcionarme la cepa de *Pseudomonas sp* y brindarme su ambiente de Biotecnología ambiental durante la presente investigación.

Al grupo de investigación MATINTEC dirigido por la Mg. Ana María Osorio por brindarme su amistad y conocimientos necesarios para la realización de esta investigación.

Además, quisiera expresar mi más sincero agradecimiento al laboratorio de Bacteriología de Naval Medical Research Unit Six (NAMRU-6) por el apoyo brindado en los análisis de western - blot

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
1.2 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	14
1.3 OBJETIVOS.....	16
1.3.1. Objetivo General.....	16
1.3.2 Objetivos Específicos.....	16
2. MARCO TEORICO.....	17
2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	17
2.2 Epidemiología.....	18
2.3 Mecanismos de resistencia.....	19
2.4 Técnicas de identificación.....	20
2.4.1 La PCR múltiple.....	20
2.4.2 Espectrometría de masas (MALDI-TOF).....	21
2.5 Nanopartícula.....	23
2.5.1 Nanopartículas de plata.....	23
2.6. Síntesis empleando microorganismos.....	24
2.7 Técnicas empleadas en la caracterización de nanopartículas.....	25
2.7.1 Espectrofotometría UV-Vis.....	25
2.7.2 Dispersión de luz dinámica (Dynamic light scattering) (DLS).....	26
3. ANTECEDENTES.....	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
4.1 Lugar de ejecución.....	32
4.2 Tipo y diseño de la investigación.....	32
4.3 Variables.....	32
4.4 Operacionalización de las variables (OV).....	33
4.5 Metodología experimental.....	35
4.5.1 ETAPA I.....	35
4.5.1.1 Análisis taxonómico.....	36
4.5.2 ETAPA II.....	41
4.5.2.1 Síntesis de nanopartículas de plata.....	41
4.5.2.2 Caracterización de nanopartículas de plata.....	43

4.5.3 ETAPA III .....	43
4.5.3.1 Evaluación de la actividad antibacteriana por el método de difusión en agar .....	43
5. RESULTADOS Y ANALISIS RESULTADOS .....	47
5.1 Análisis MALDI-TOF .....	47
5.2 Análisis de los resultados de técnicas Uv-visible y DLS para muestras M1, M2, M3.....	49
5.3 Efecto de la cantidad de agente reductor .....	49
5.4 Tamaño hidrodinámico de las nanopartículas.....	50
5.5 Actividad antibacteriana .....	54
5.6 Análisis de datos para las muestras empleados .....	55
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	61
7. CONCLUSIONES .....	65
8. RECOMENDACIONES.....	66
9. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA .....	67
10. ANEXOS .....	76

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Versatilidad de ecológica del género pseudomonas (Silby M et al., 2011)	18
<b>Figura 2.</b> Esquema del equipo MALDI-TOF	22
<b>Figura 3.</b> Métodos convencionales y alternativos propuesto en la formación de nanopartículas	25
<b>Figura 4.</b> Descripción de la Etapa 1 (plantilla creada en <a href="https://biorender.com/">https://biorender.com/</a> )	36
<b>Figura 5.</b> Ambientes de trabajo durante la investigación, caracterización y actividad antibacteriana	40
<b>Figura 6.</b> Descripción del proceso de síntesis (plantilla creada en <a href="https://biorender.com/">https://biorender.com/</a> )	42
<b>Figura 7.</b> Gel de electroforesis correspondiente al PCR múltiple.	48
<b>Figura 8.</b> Resumen de los espectros obtenidos de las 3 muestras analizadas M1, M2 y M3.	50
<b>Figura 9.</b> Proceso de síntesis de nanopartículas de plata después de 44 horas de incubación	50
<b>Figura 10.</b> Margen derecho lectura del Uv-vis de la muestra 1. Margen izquierdo lecturas por DLS distribución de tamaño acorde a intensidad, volumen y numero.	52
<b>Figura 11.</b> Margen derecho lectura del Uv-vis de la muestra 2. Margen izquierdo lecturas por DLS distribución de tamaño acorde a intensidad, volumen y numero.	53
<b>Figura 12.</b> Margen derecho lectura del Uv-vis de la muestra 3. Margen izquierdo lecturas por DLS distribución de tamaño acorde a intensidad, volumen y número.	54
<b>Figura 13.</b> Resultado del antibiograma al emplear nanoparticulas de plata(NPs-Ag)	55
<b>Figura 14.</b> Media del diámetro del halo de inhibición, según la cantidad de volumen utilizado por cada muestra con el control positivo frente a P. aeruginosa	59
<b>Figura 15.</b> Media del diámetro del halo de inhibición comparado acorde al volumen utilizado por cada diferente muestra.	59
<b>Figura 16.</b> Promedio establecido por las medias en cada muestra evaluada.	60
<b>Figura 17.</b> Eficacia de actividad inhibitoria entre muestras frente a una cepa de P.aeruginosa	60
<b>Figura 18.</b> Prueba de susceptibilidad frente 12 antibióticos (Acorde a la CLSI)	84

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Resumen de variables	33
<b>Tabla 2.</b> Resumen de Etapas	35
<b>Tabla 3.</b> Cebadores utilizados en la detección de genes codificantes de MBL y condiciones de amplificación	38
<b>Tabla 4.</b> Reactivos utilizados en la PCR múltiple para detectar carbapenemasas de clase B	39
<b>Tabla 5.</b> Resumen de las muestras empleadas	42
<b>Tabla 6.</b> Descripción esquemática de la Etapa 3.	45
<b>Tabla 8.</b> Sistema de clasificación del sistema MALDI-TOF.	47
<b>Tabla 7.</b> Descripción de los genes utilizados en la determinación patogénica de <i>P. aeruginosa</i> .	49
<b>Tabla 9.</b> Resumen de los nanomateriales caracterizados por Dispersión de luz dinámica (DLS) después de 44 horas de síntesis.	51
<b>Tabla 13.</b> Resultado del antibiograma con 12 antibióticos acorde a CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).	85

## RESUMEN

La finalidad del presente trabajo consistió en sintetizar nanopartículas de plata empleando una vía de síntesis de bajo costo y amigable con el medio ambiente. Las nanopartículas de plata (NPs-Ag) se obtuvieron a partir de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) 0.01M y se empleó como reductor el sobrenadante de *P. aeruginosa* denominada fracción extracelular (FE). La cepa bacteriana de la *Pseudomonas aeruginosa* y la patogenicidad de ella, se determinó a través de MALDI-TOF, encontrándose que eran las correspondientes. Se trabajó con 3 muestras con volúmenes diferenciados [ $\text{AgNO}_3$ (9ml)- FE (1mL),  $\text{AgNO}_3$ (7ml)- FE (3mL),  $\text{AgNO}_3$ (5ml)- FE (5mL)], denominados M1, M2 y M3, respectivamente. La solución de nitrato de plata se introdujo en tubos de ensayo en diferentes volúmenes (9; 7 y 5 mL) y se puso en contacto con el sobrenadante (FE) durante 44 horas. Las nanopartículas de plata sintetizadas se caracterizaron en cuanto al tamaño hidrodinámico y espectro de absorción, mediante el uso de las técnicas, Dispersión de luz modo dinámico (DLS) y Espectroscopia UV-Visible, respectivamente. Para la evaluación de la actividad antibacteriana se empleó el método de difusión en disco en agar (Técnica Kirby - Bauer), para ello se inocularon, en las placas en las que se cultivó *P.aeruginosa*; volúmenes de 10,20,30  $\mu\text{L}$  de M1,M2 y M3 respectivamente. Se observó que la actividad promedio de la M3 mostro ser la más efectiva frente *P. aeruginosa*. Por lo anteriormente descrito se concluye que las nanopartículas de plata obtenidas mostraron estabilidad durante el proceso de síntesis y una elevada actividad antibacteriana

Palabras claves: Nanopartículas de plata, MALDI-TOF, UV-vis, DLS, *Pseudomonas aeruginosa*, actividad antibacteriana de *P.aeruginosa*.



## ABSTRACT

The purpose of the present work consisted of synthesizing silver nanoparticles using a synthetic and inexpensive pathway that is environmentally friendly, the bacterial strain of *Pseudomonas aeruginosa* and its pathogenicity, was determined through MALDI-TOF, being found They were the corresponding ones. Silver nanoparticles (NPs-Ag) were obtained from 0.01M silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ) and the supernatant of *P. aeruginosa* called extracellular fraction (FE) was used as a reducer. We worked with 3 samples in which the synthesis was performed with differentiated volumes [ $\text{AgNO}_3$  (9ml) - FE (1mL),  $\text{AgNO}_3$  (7ml) - FE (3mL),  $\text{AgNO}_3$  (5ml) - FE (5mL)], called M1, M2 and M3, respectively. The silver nitrate solution was introduced into test tubes in different volumes (9; 7 and 5 mL) and was contacted with the supernatant for 44 hours. The synthesized silver nanoparticles were characterized in terms of hydrodynamic size and absorption spectrum, using the techniques, Dynamic Mode Light Dispersion (DLS) and UV-Visible Spectroscopy, respectively. When determining the antibacterial activity of the effect of M1, M2 and M3 exposed to different volumes 10, 20 and 30 $\mu\text{L}$  against *P. aeruginosa*, by the method of diffusion in agar disk (Kirby - Bauer Technique), it was observed that the average activity of the M3 showed to be the most effective against *P. aeruginosa*. From the above described it is concluded that the silver nanoparticles obtained showed stability during the synthesis process and a high antibacterial activity

Keywords: Silver nanoparticles, UV-vis, DLS, MALDI-TOF *Pseudomonas aeruginosa*, antibacterial activity of *P.aeruginosa*.

## 1. INTRODUCCIÓN

La presencia de materiales en escala nanométrica no fue descrita sino hasta finales del siglo XX con la fabricación del microscopio electrónico de barrido, de transmisión y de fuerza atómica lo cual desencadenó el desarrollo de una nueva disciplina: la nanotecnología, encargada del estudio, diseño, creación, síntesis a través del control de la materia a nivel de átomos y moléculas, siendo fundamental para aplicaciones en diversos campos e influir en mejorar la calidad de vida y promoviendo el desarrollo de la ciencia y la tecnología.

Las nanopartículas o nanosistemas exhiben tamaños entre 1-100 nm como consecuencia de ello presentan propiedades únicas como una gran área superficial que genera efectividad a nivel electrónico, energético, magnético dichas características están asociados a su variedad tamaños, morfología y distribución diferente, lo cual les permite crear y mejorar nuevos productos desde polímeros naturales, artificiales y nuevas nanomoléculas con nuevas características (Hosokan *et al.*, 2007). Para una eficiente aplicación los proyectos de investigación en este campo son multidisciplinarios que requiere la participación de diferentes especialidades como la física, la química, matemática, biología, ingeniería, medicina entre otros.

La síntesis de nanopartículas de plata puede llevarse a cabo mediante métodos biológicos, físicos y químicos; sin embargo, en el método químico se emplean reactivos que generan contaminación al ambiente, para disminuir o evitar la contaminación a través de este proceso que involucra procesos químicos agresivos principalmente al emplear reactivos de naturaleza dañina. Para combatir este problema actualmente se recurre a los métodos biológicos considerados como una síntesis verde empleando como reductores diferentes compuestos orgánicos producidos por plantas, vegetales, hongos, algas y bacterias.

A menudo los microorganismos como las bacterias son consideradas por muchos autores como biofabricas debido a su capacidad tanto de producir como asimilar una amplia gama de sustancias químicas (Iravani, S *et al.*, 2014) produciendo nanopartículas más estables y funcionales en contraste con los métodos tradicionales; asimismo, convirtiéndose en herramientas promisorias en el tratamiento de enfermedades; no obstante, el aumento de mortalidad en los últimos años es a consecuencia de un precario sistema de salud principalmente en ambientes hospitalarios del país que es causada por microorganismos patógenos resistentes y multirresistentes a los antibióticos que son generalmente ocasionados

por una mala praxis, poca regulación en su distribución y desinformación por tales razones se prevé que en los próximos años, la utilidad de los antibióticos para combatir infecciones bacterianas nos conduzcan a la misma situación que hace más de 50 años, cuando la gente moría por infecciones por no disponer de tratamientos eficaces.

Los primeros indicios, del uso de plata datan de la edad media ya que fue utilizada principalmente en el tratamiento de heridas, como inhibidor en el desarrollo bacteriano, en la preservación de alimentos principalmente carnes y tratamiento del agua (Camacho J, 2013).

La síntesis de nanopartículas de plata se está tomando como opción aceptable a nivel laboratorio debido al comportamiento que muestra a bajas concentraciones, por lo que, es frecuentemente utilizado en el tratamiento contra bacterias e incluso virus, este fenómeno es atribuido a la naturaleza de la plata por su baja probabilidad de generar resistencia, a pesar de ello aún no ha sido totalmente aceptada dentro de la comunidad médica dado a que no hay suficientes estudios enfocados en la citotoxicidad y genotoxicidad. (Rai, M *et al.*, 2009). En contraste, la industria nanotecnológica en el 2015 generó 3 billones de dólares principalmente productos de uso médico.

Del contexto anteriormente expuesto, la presente tesis trata sobre el efecto antibacteriano de nanopartículas sintetizadas vía extracelular de *Pseudomonas aeruginosa* frente a *Pseudomonas aeruginosa*

## 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El campo de la nanotecnología ha revolucionado todos los ámbitos de la ciencia en estos últimos años. Dentro de este campo, el uso de nanopartículas metálicas tiene un futuro prometedor en las áreas de la medicina, electrónica, cosmética, revestimientos, embalaje y biotecnología por las peculiares características que poseen estos materiales a escala nanométrica (p. ej. bactericida, transparencia, acoplamiento no destructivo con el ADN). No obstante, la síntesis de estos compuestos es uno de los puntos críticos que deben ser resueltos antes de su uso a gran escala. Actualmente, los métodos por los cuales se obtienen nanopartículas son de dos tipos: 1) físicos, los cuales incluyen la atrición y pirolisis; y 2) químicos, que involucra el uso de agentes oxidantes y estabilizantes. Los métodos físicos son generalmente muy costosos debido a que requieren condiciones especiales para llevarse a cabo (altas presiones y temperaturas). Por otro lado, los procesos químicos de síntesis son de bajo costo a gran escala, pero poseen la desventaja de utilizar solventes tóxicos o generar subproductos que tengan impactos negativos en el ambiente. En este sentido, es necesario desarrollar tecnologías limpias, no tóxicas y ecoamigables en la síntesis de nanopartículas para su aplicación a una escala mayor (McNeil *et al* 2005).

El crecimiento y desarrollo de la población a nivel mundial, como consecuencia de la globalización, ha permitido que diferentes agentes infecciosos, incluyendo a aquellos que han logrado desarrollar diferentes mecanismos de evasión frente agentes de origen farmacológico ocasionando su rápida propagación, convirtiéndose en un problema de salud pública latente. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado la presencia generalizada de resistencia a los antibióticos en muestras de 500 000 personas de 22 países en las que se sospechaban infecciones bacterianas asociadas principalmente. Dado que el origen de la resistencia a antibióticos comprende diversos factores siendo probablemente el más significativo su uso excesivo e inapropiado, en países como el nuestro, donde los antibióticos se comercializan sin prescripción médica y la ausencia de un continuo monitoreo por parte del prescriptor aumentan el riesgo. Esta situación es más frecuente en pacientes inmunocomprometidos. (Cars y Norberg, 2004).

Es difícil precisar el impacto global que ha ocasionado la resistencia a los antibióticos en términos de morbilidad y mortalidad puesto que la resistencia está asociada a un problema

adicional a la infección inicial. Dentro de un contexto universalmente aceptado la resistencia de los antibióticos incrementa la probabilidad de fallecimiento, el coste de la terapia, la duración de la enfermedad y la probabilidad de requerir hospitalización.

Además, en países en vías de desarrollo se exhiben un déficit en las instituciones de salud, como la ausencia de políticas que contribuyan en el control que evite la automedicación y la desinformación como consecuencia de bajo presupuesto que se invierten los gobiernos locales en el área de salud, sumando a ello la falta de apoyo a desarrollo de la investigación y la poca funcionalidad en muchos hospitales y un adecuado monitoreo.

¿Como las nanoparticulas de plata pueden contribuir en eliminar a las bacterias de tipo *P.aeruginosa*?

## 1.2 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación en el campo de las nanopartículas metálicas obtenidas y empleadas en sistemas Biológicos es creciente y se evidencia a través de numerosos artículos publicados desde 1991. Lo interesante de trabajar a nanoescala es que las características propias de los materiales con los que se sintetizan estas nanopartículas presentan propiedades físicas diferentes (y en muchos casos más interesantes) que aquellas que poseen sus pares a una escala mayor, esto basado en la ratio área/volumen que les permiten interactuar fácilmente con otras partículas (Narayanan y Sakthivel, 2010 y Thakkar *et al.*, 2010).

Entre las propiedades más resaltantes encontramos: 1) transparencia, útil para su aplicación en cosmética, revestimientos y embalaje; 2) acoplamiento no destructivo con el ADN, vital para el desarrollo de nanomarcadores ; 3) actividad antibacteriana contra cepas resistentes a fármacos convencionales; biocompatibilidad, especificidad celular y liberación controlada de fármacos, requerimientos básicos para su potencial uso en terapias de diversas enfermedades (p. ej. cáncer) como transportadores de principios activos; 4) su similaridad en tamaño con biomoléculas como proteínas y ácidos polinucleicos lo cual le da un enfoque atractivo para su estudio a nivel molecular (Thakkar *et al.*, 2010; Pantidos y Horsfall, 2014).

El término "nanotecnología verde" ha generado mucho interés. El uso creciente de las nanopartículas (NP), exige su preparación en forma limpia y económicamente viable para la síntesis de las NP. La biosíntesis de nanopartículas metálicas debe involucrar la participación de procesos metabólicos que generen sustancias reductoras de los precursores metálicos y la interacción con biomoléculas que restrinjan el crecimiento de las partículas. La capacidad biosintética que puedan tener para transformar estos nanomateriales en otras que resulten inocuos (reducción o precipitación) requiere una concentración límite a partir de la cual las células pierden su actividad parcial o total.

El mecanismo de acción de las nanopartículas de plata frente a diferentes microorganismos desencadena diferentes reacciones a nivel de la membrana celular, dado que esta es la primera barrera de defensa, como consecuencia de esta interacción se produce la pérdida de la permeabilidad de la misma, ya en el interior de la célula los nanomateriales pueden alterar el metabolismo e incluso logrando modificar su material genético. Asimismo, las nanopartículas de plata también pueden reaccionar con el grupo de tiol de las proteínas seguido por la condensación del DNA resultando en la muerte celular (Hu *et al* 2008). Existen varios tipos compuestos de plata que son usados como antimicrobianos los cuales incluyen: nitrato de plata,

sulfadiazina de plata, zeolita de plata, polvo de plata, óxido de plata, cloruro de plata y polvo de plata.

Por todo ello, el presente estudio no solamente resulta viable en su ejecución sino también estaría acorde a investigaciones actuales que contribuyan en un futuro promisorio para aplicaciones innovadoras.

## 1.3 OBJETIVOS

### 1.3.1. Objetivo General

Evaluar el efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata (NPs-Ag) sintetizadas vía extracelular enfrentados a una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*

### 1.3.2 Objetivos Específicos

- Identificar la cepa bacteriana y determinar su patogenicidad mediante espectrómetro de masas por tiempo de migración (tiempo de vuelo) MALDI-TOF y Reacción de la polimerasa en cadena (PCR múltiple).
- Sintetizar nanopartículas de plata empleando como agente reductor el líquido extracelular de *P.aeruginosa*.
- Caracterizar el tamaño hidrodinámico y la banda de absorción de las nanopartículas de plata mediante dispersión de luz dinámica (DLS) y espectrofotometría UV-vis.
- Determinar la actividad antimicrobiana de nanopartículas de plata, frente *Pseudomonas aeruginosa*, mediante prueba de difusión en discos.



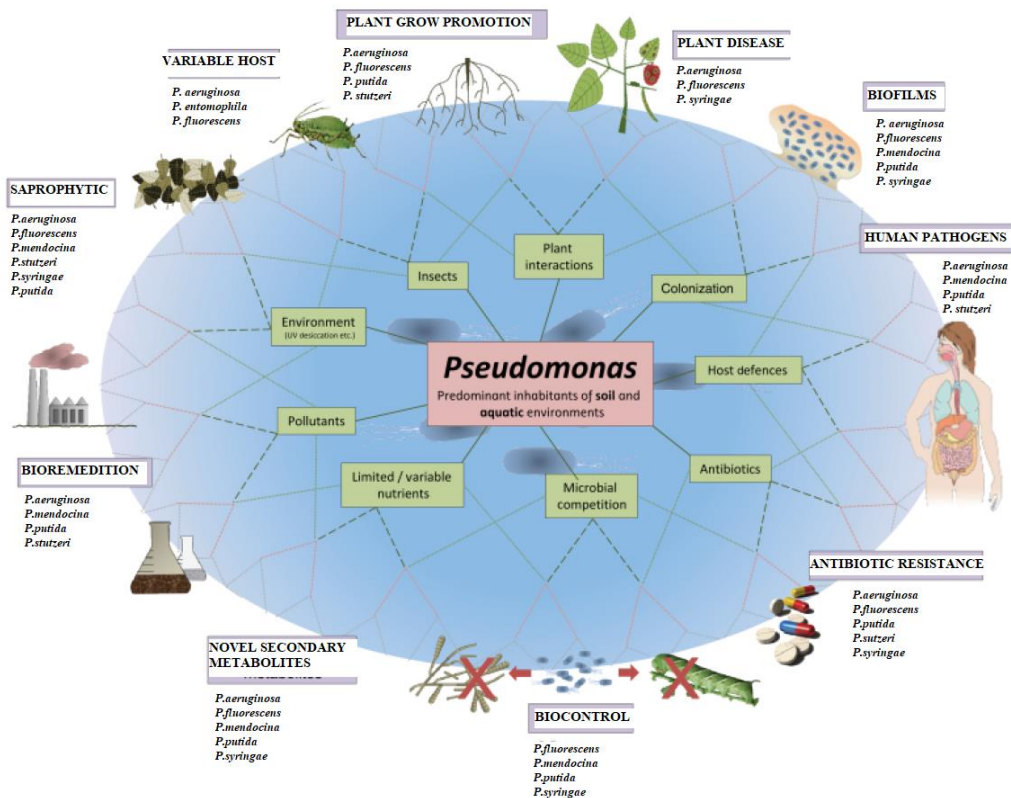
## 2. MARCO TEORICO

### 2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

En microbiología el género *Pseudomonas* significa “falsa unidad”, del griego pseudo, que significa “falso”, y monas, que significa unidad simple (Montero M 2012, Ríos P 2013). El género *Pseudomonas* pertenece al dominio Bacteria, phylum Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria, orden Pseudomonadales y familia Pseudomonaceae; compuesto de unas 60 especies (Palleroni *et al* 2010 y Ríos P, 2013). A principios de 1970 Palleroni *et al* 2005, describió cinco grupos de *Pseudomonas* basado en su rRNA-DNA. Hoy en día solamente el grupo I de rRNA-DNA corresponde a este género (Boone D R *et al* 2001, Palleroni *et al* 1972, Ríos P 2013).

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo móvil Gram negativo, flagelado, con forma de bastón o moderadamente curvado cuyo tamaño promedio es reportado de 1.5µm de largo y, un diámetro variable de 0.5-10 µm, móvil, con presencia de flagelos polares (uno o varios) (Ríos P 2013, Palleroni *et al* 2005). Su metabolismo es netamente aeróbico con oxígeno como aceptor final de electrones, sin embargo, algunos casos se ha reportado su habilidad de usar nitrato como aceptor de electrones lo que le permite un crecimiento anaerobio (Ríos P 2013, Palleroni *et al* 2010). Asimismo, tiene la capacidad de producir un pigmento verde hidrosoluble fluorescente bajo luz UV, la pioverdina, y un pigmento fenazínico hidrosoluble verde-azulado, la piocianina. (Koneman 1997, Murray *et al* 2009, Ríos P 2013)

*Pseudomonas aeruginosa* posee la particularidad de emplear diferentes variedades de nutrientes además de ser hidrofílica por lo que puede residir en una variedad de ambientes naturales y domésticos como: plantas, bañeras, soluciones de lentes de contacto; ambientes hospitalarios duchas, lava manos, sanitarios, desinfectantes, equipos de terapia respiratoria, endoscopios, batas, piscinas de hidroterapia, equipos de limpieza, entre otros; además raramente coloniza la flora normal de personas saludables ( Koneman 1997, Murray y Baron 2007, Ríos P 2013)



**Figura 1.** Versatilidad ecológica del género pseudomonas (Silby M *et al.*, 2011)

## 2.2 Epidemiología

Es considerada como la especie que presenta actividad clínica reconocida, ya que esta especie puede producir diferentes infecciones nosocomiales. Esta especie produce dos hemolisinas, una es una proteína termolábil denominada fosfolipasa C y el otro un ramnolípido termoestable. Se ha reportado que estas pueden actuar de forma sinérgica en la degradación de lípidos y la lectina. Presentan un mecanismo similar a las proteasas, al contribuir a la invasión tisular mediante efectos citotóxicos sobre los tejidos del huésped. Además, la fosfolipasa C produce un efecto patológico en las infecciones del aparato respiratorio mediante la degradación enzimática fosfatidilcolina del surfactante pulmonar (Gessard, 1984). Los derivados de la fosfatidilcolina promueven la formación de la Fosfolipasa C involucrada en la inflamación asociada con la infección producida por *P. aeruginosa* al aumentar la síntesis y liberación del

ácido araquidónico. Así también el ramnolipido puede ejercer un efecto patogénico en las infecciones agudas y crónicas en el tracto respiratorio a inhibir el transporte mucociliar y las funciones del epitelio respiratorio. Para resumir, estos dos factores de virulencia pueden condicionar la patogenicidad de esta especie, incluyendo la expresión y formación de adenina, endotoxinas y exotoxinas hidrolíticas implicadas en la destrucción de los tejidos.

El primer reporte sobre esta especie fue aislado de muestras ambientales por Schroeter en 1872, a consecuencia de su naturaleza pigmentada de las colonias, a pesar de ello diversos autores aún no han llegado a un consenso en cuanto a la estructura de su población debido a que estas presentan estructura desde la panmixia, descrita como la no relación entre alelos, hasta poblaciones clonales, donde la interacción entre alelos es más frecuente. Existen diferentes clasificaciones en función a sus variantes fenotípicas y a su morfología colonial asociada a la estructura de su población, a la resistencia de antibióticos, a la movilidad, expresión de genes de virulencia y formación de biofilms (Palleroni *et al* 2005).

Asimismo, *Pseudomonas aeruginosa* ha sido reportado como el patógeno humano más importante relacionado a infecciones intrahospitalarias y está asociada con una significativa morbilidad y mortalidad (Ríos P 2013). El riesgo de una persona con un sistema inmune saludable no supone riesgo significativo, sin embargo, aquellos con sistema inmune comprometido, en especial aquellos que fueron sometidos a terapias de larga duración como quimioterapias pueden ser infectados dado que este patógeno es oportunista.

Las tasas de colonización en humanos son 0 a 2% en piel, 0 a 3,3% en la mucosa nasal, 0 a 6,6% en la faringe y 2,6 a 24% en muestras de heces, sin embargo, las tasas de colonización pueden exceder hasta en 50% durante la hospitalización (Murray *et al* 2009, Mandell *et al* 2010, Ríos P 2013).

### **2.3 Mecanismos de resistencia**

Se ha reportado la existencia de dos mecanismos de resistencia intrínseca y mecanismo de resistencia adquirida en *Pseudomonas aeruginosa*: la primera está asociada a  $\beta$ -lactamasa AmpC ya sea de tipo cromosómico o generado a diferentes sistemas de bombas de expulsión (Breidenstein *et al* 2011, Ríos 2013). Los mecanismos involucrados en los sistemas de bombas de expulsión de *Pseudomonas aeruginosa* como MexAB-OprM y MexCD-OprJ, como consecuencia de las mutaciones producidas en los genes reguladores *mexR* y *nfxB* produce la hiper expresión en el sistema MexAB-OprM por la mutación en el gen *mexZ* ocasionando una

resistencia a aminoglicosidos, fluoroquinolonas y cefepime. Asimismo, la mutación producida en la porina OprD (considerado la principal fuente de entrada de carbapenemes) produce la alteración de la permeabilidad y la reducción en la concentración de imipenem lo conduce a la resistencia de este antibiotico y es el mecanismo de resistencia más común a carbapenemes (Breidenstein *et al* 2011, Ríos 2013).

Respecto a los mecanismos de resistencia adquirida en *Pseudomonas aeruginosa* este presenta una transferencia horizontal de elementos genéticos y una resistencia mutacional (Breidenstein *et al* 2011, Ríos 2013). En aquella que implica la transferencia de elementos genéticos, los elementos de ADN como plástidos transposones e integrones llevan genes de resistencia a antibióticos pudiendo ser adquiridos por conjugación, transformación o transducción lo cual les proporciona resistencia afectando de manera directa a aminoglucósidos y  $\beta$ -lactámicos (Breidenstein *et al* 2011, Ríos 2013).

#### **2.4.1 Técnicas actuales en la identificación bacteriana**

En la actualidad es necesario el empleo de técnicas de caracterización por su rápidas, confiabilidad y capacidad discriminatorias características que han reemplazado los métodos fenotípicos. Dentro de las técnicas incorporadas en la detección de microorganismos y tipificación se encuentran: la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR múltiple y la técnica de espectrometría de masas (MALDI-TOF).

#### **2.4.2 PCR-PCR múltiple**

Esta técnica se caracteriza por el uso más de un par de cebadores, cuyo objetivo es la de amplificar varios segmentos del ADN blanco en simultaneo y asimismo conservar el ADN molde de modo que se minimiza el tiempo y los costos. Sin embargo, el proceso podría tener algunas dificultades para establecer un protocolo adecuado tomando en consideración que los cebadores en la reacción tengan la misma temperatura de fusión, que no interactúen entre ellos, y que los productos amplificados tengan aproximadamente el mismo tamaño para conferirle poder de discriminación en el gel de electroforesis. (Sambrook y Russell, 2001).

### 2.4.3 Espectrometría de masas (MALDI-TOF)

El sistema MALDI-TOF es una herramienta basada en la espectrometría de masas permitiendo en un corto tiempo la identificación de microorganismos tales como bacterias (incluyendo micobacterias), levaduras y hongos (Giebel R *et al* 2010, March 2014). La denominación “MALDI” proviene de Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization y “TOF” está asociada con el analizador de iones que se acopla al MALDI, que es del tipo de tiempo de vuelo (Time of Flight) (March G, 2014).

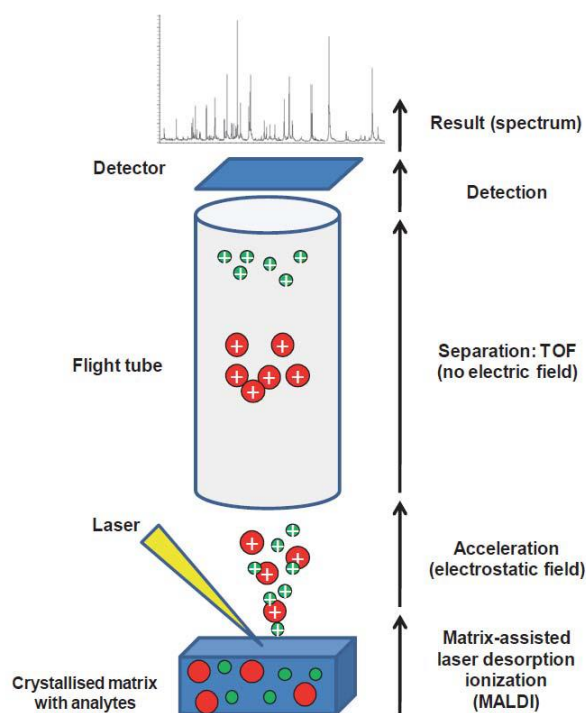
De forma general el espectrofotómetro de masas está formado por tres elementos básicos, la fuente de iones, donde a partir de la muestra se forma un haz de iones en estado gaseoso, el analizador de masas o tubo de vuelo, que separa los iones formados en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ) y el detector de los iones previamente separados (Clark A *et al* 2013, March G 2014).

En el desarrollo de esta técnica se requiere que las proteínas de los microorganismos en evaluación sean ionizadas para lo cual las colonias obtenidas de un cultivo fresco en agar Macconkey serán depositadas sobre una placa y enseguida se combinara con una disolución matriz, la cual contendrá moléculas con anillos aromáticos en su estructura. Es necesario dejar evaporar el disolvente para que las moléculas a analizar queden incorporadas en la matriz. Como siguiente paso, la placa se introduce en la cámara de alto vacío, donde la muestra co-cristalizada es expuesta a disparos un láser de longitud de onda, las moléculas orgánicas aromática empleadas podrán absorber una gran cantidad de energía de los electrones  $\pi$  (electrones de dobles ) produciéndose la sublimación del analito y de la matriz previamente depositados sobre la placa. La estabilización de la molécula aromática (fase gaseosa) es a consecuencia de la liberación de protones los cuales son captadas por la proteína de la bacteria generándose fragmentos de proteínas con carga positiva .

La formación de un campo eléctrico es generada por el electrodo cercano a la placa portamuestra el cual acelera los iones formados desde la muestra hacia el analizador de masas. De esta forma, los iones ingresan por un tubo con la misma energía y siguen una trayectoria lineal. Por lo tanto, el tiempo que tardan los iones en recorrer el tubo es proporcional a la relación masa/carga ( $m/z$ ) de los mismos; es decir, a menor relación  $m/z$  de los iones, menor es el tiempo necesario para recorrer la longitud del tubo, o lo que es lo mismo, los iones de

menor  $m/z$  "vuelan" más rápido hacia la salida del tubo. En última instancia está el detector de los iones previamente separados. Si la carga ( $z$ ) es igual a uno, como es habitual en la ionización blanda de la técnica MALDI-TOF, el espectro de masas es la representación de la intensidad frente a la masa de los iones formados (March G 2014, Croxatto *et al* 2012 Fenselau *et al.*, 2001).

La vía por la cual el sistema MALDI-TOF permite la identificación de manera rápida y precisa es por la denominada 'huella peptídica'. Para lo cual las proteínas del microorganismo de interés son hidrolizadas en pequeños péptidos, obteniéndose el respectivo espectro de masa hidrolizado, este se conoce con el nombre de huella peptídica. Esta huella, que es única para cada microorganismo es comparada con las huellas de microorganismos conocidos a través de una base de datos, con el propósito de que esta huella problema pueda estar asociada con alguna de mayor semejanza y de esta forma obtener la identificación más cercana con la del microorganismo. Además, las proteínas que conforman la huella peptídica de cada microorganismo son ribosomales por lo tanto mantiene su estructura altamente conservada a lo largo del tiempo (Conway C *et al* 2001).



**Figura 2.** Esquema del equipo MALDI-TOF. (Croxatto *et al.*, 2012)

### **2.5.1 Nanopartícula**

Al hablar de nanopartículas (NPs) nos referimos a partículas que están compuestas por átomos y moléculas cuya característica principal es su tamaño menor a 100 nm (Mohanraj y Chen, 2006; Thakkar *et al*, 2010) también es descrita por la organización internacional de estandarización (ISO), como un objeto que posee al menos una dimensión dentro de la nano escala. Poseen propiedades únicas descritas a continuación:

- Como consecuencia de la reducción de tamaño presentan una relación entre superficie y volumen, lo que implica una mayor cantidad de átomos o moléculas en la superficie
- La forma de distribución aleatoria de las moléculas permite diferencias significativas en relación a las propiedades mecánicas.
- Al contrario de los materiales macroscópicos los materiales, en escala nanométrica presentan una mayor área superficial debido, a esta característica pueden tomar diferentes formas al disminuir en tamaño y pueden llegar a ser más reactivos.

Estos nanomateriales pueden dividirse en dos grupos acorde a su naturaleza: nanopartículas orgánicas, las que involucran nanopartículas de carbono y nanopartículas inorgánicas; las cuales pueden ser de metales nobles (como oro y plata), semiconductoras (óxido de titanio, zinc).

### **2.5.2 Nanopartículas de plata**

La plata se ha descrito como un metal lustroso, blanco y suave, insoluble en agua; sin embargo, las sales metálicas como nitrato de plata y cloruro de plata presentan propiedades contrarias a las mencionadas en su fase metálica. La plata metálica en su forma dispersa presenta propiedades inherentes a los metales nobles, como estabilidad química, buena conductividad eléctrica, actividad catalítica y actividad anti bacteriostática. (Henglein, 1989; Mulvaney, 1996). Los nanomateriales de este tipo tienen un efecto muy significativo como agente antimicrobiano por la mayor área superficial en relación al volumen. Sin embargo, el mecanismo exacto que conlleva a su formación aún no ha quedado bien definido debido a las

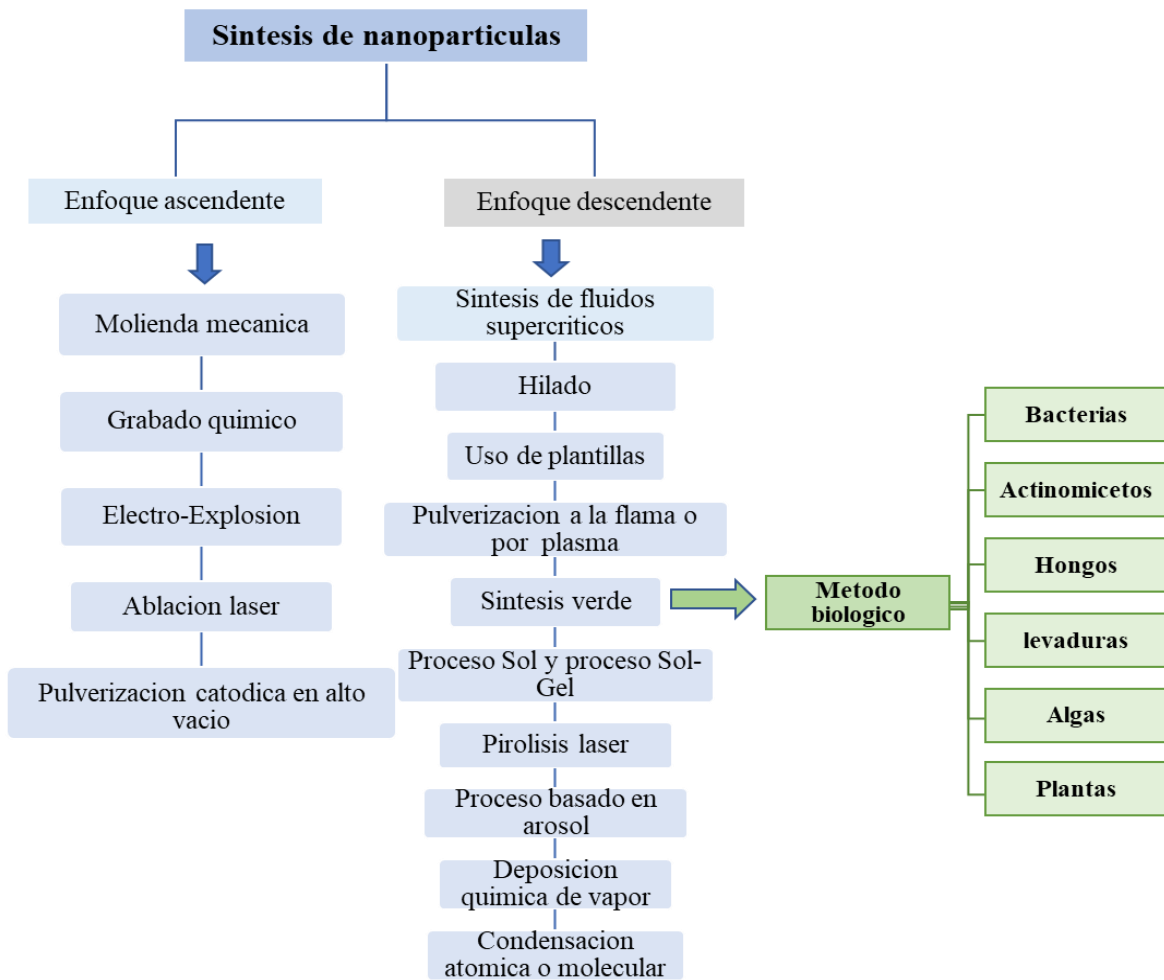
diferentes rutas que pueden tomar la interacción de los compuestos orgánicos producidos por los microorganismos y el metal precursor. (Salahuddin *et al* 2018).

## **2.6. Síntesis empleando microorganismos**

Como una nueva alternativa eco-amigable se encuentra aquellos que emplean la ‘síntesis verde’, denominada así por el uso de agentes reductores de origen biológico, y la cual es guiada por plantas y microorganismos presentándose como una alternativa eco-amigable en donde un consorcio de diversos microorganismos procariotas o eucariotas son los encargados mediante diferentes reacciones redox los cuales llevan a cabo la formación de nanopartículas de diferente naturaleza. La síntesis guiada por estos diminutos organismos ha sido reportada como intracelular y extracelular. Con respecto a la vía extracelular esta se realiza a través de la reproducción de bacterias, hongos o actinomicetos durante 24 a 48 horas, dependiendo de la especie, en un medio de cultivo, pudiendo emplear un agitador. Asimismo, se controla parámetros como, pH, temperatura, tiempo de agitación y posteriormente se aísla por centrifugación moderada el sobrenadante, dicho sobrenadante se pone en contacto con la solución salina de plata durante un tiempo para generar la reacción, el agente reductor del sobrenadante, permitirá la reducción los iones  $Ag^{+1}$  a  $Ag^0$ . El primer indicio de la formación de nanopartículas es el cambio de color de medio y, luego siendo se caracteriza por técnicas como espectrofotometría Uv-Vis, dispersión de la luz dinámica, microscopía electrónica de barrido, entre otros. Se conoce que existe una relación entre la superficie externa de los microorganismos y biomoléculas o enzimas como nitrato reductasa dependiente (NADH) como los responsables en formación de nanopartículas (Singh *et al*, 2016).

Sin embargo, el mecanismo exacto involucrado en la formación de los nanomateriales empleando agentes reductores de naturaleza biológica, hoy en día no es muy claro como consecuencia de los diferentes agentes biológicos que reaccionan de forma diferente con los iones metálicos. Diversos microorganismos producen materiales a escala nanométrica por vía extra o intracelular; sin embargo, el mecanismo en estas vías difiere. La síntesis intracelular involucra el transporte de iones en la célula microbiana, donde la pared celular desempeña un rol importante (Singh *et al*, 2016).





**Figura 3.** Métodos convencionales y alternativos propuesto en la formación de nanopartículas (Camacho ,J )

## 2.7 Técnicas empleadas en la caracterización de nanopartículas

### 2.7.1 Espectrofotometría UV-Vis

Técnica efectiva y sencilla que permite la identificación de diferentes compuestos de naturaleza orgánica e inorgánica. Está asociada al principio de absorción de fotones, los cuales promueven a las moléculas a estados excitados. En general cada espectrofotómetro se caracteriza por un diseño sencillo de fácil manejo y mantenimiento. Los análisis más comunes que se lleva a cabo es la determinación y en algunos casos la cuantificación de nanopartículas de cualquier naturaleza siempre y cuando estén dispersas en un solvente o en una matriz aislante debido a que se requiere una radiación incidente en la resonancia

superficial del plasmon (RSP). Debido a que la naturaleza del plasmon son ondas y por lo tanto existe una banda característica para cada longitud de onda y para cada tipo de nanopartícula, también está asociada a la naturaleza del metal precursor, la matriz, el tamaño y su distribución en soluciones acuosas. Cabe resaltar que la absorción máxima desplaza hacia longitudes de onda mayores como consecuencia en la variación de tamaño de las nanopartículas (Kumar, C 2013).

### **2.7.2 Dispersión de luz dinámica (Dynamic Light Scattering) (DLS)**

Se define como una técnica empleada en la búsqueda de perfiles correspondientes a la distribución de los tamaños nanométricos en suspensión. Se fundamenta en una alteración de fluctuaciones las cuales dependen del tiempo y de la intensidad de la luz dispersada por las partículas afectadas por el movimiento browniano (Grandez F, 2016). Las fluctuaciones generadas están asociadas a la velocidad de difusión de la molécula a través del disolvente, y los radios hidrodinámicos de las nanopartículas generadas (Malvern, 2017). Asimismo, mediante esta técnica es posible determinar el grado de la aglomeración de las nanopartículas en función del tiempo como también la evaluación de su monodispersidad o polidispersidad (Schmitz, 1990).

### 3. ANTECEDENTES

El inicio de la nanociencia como disciplina comenzó en el siglo XX, sin embargo los primeros estudios fueron abordados por Richard Feynman que en 1959 expone en su conferencia “Hay mucho espacio en el fondo” (*There is plenty of room at the bottom*) donde describe las infinitas posibilidades al fabricar instrumentos a partir de átomos y no es hasta 1974 donde el profesor Norio taniguchi acuña la definición de ‘nanotecnología’, la cual consiste en el proceso de separación, consolidación y deformación de materiales por un átomo o una molécula lo que desencadenó el desarrollo de nuevos equipos, en particular microscopios electrónicos, empleando principios cuánticos y a partir del siglo XXI se comenzó el uso de la nanotecnología en tratamientos médicos, aprovechando las propiedades físicas de los nanomateriales. (Poole, C. & Owens, F *et al.*, 2003).

Dentro del grupo de las nanopartículas metálicas destacan aquellas que han tomado protagonismo e interés como es el caso de las nanopartículas de plata (NPs Ag), cabe mencionar que las sales de este metal ya se venían empleando desde hace siglos, que se remontan desde la época del Imperio Romano para evaluar la calidad y tratamiento del agua lo cual hasta hoy en día se sigue empleando, asimismo en los años ‘40 se introdujo la plata para tratamiento de infecciones bacterianas. Dentro de este contexto el primer reporte sobre el uso de este metal se le es acreditado a Crede en 1881, quien lo empleo para la prevención de infecciones oculares en neonatos, en el año 1901 se reporta como antiséptico también se reporta la eficacia de nitrato de plata contra *Pseudomonas aeruginosa*, ya que estos microorganismos eran considerados la principal causa de muerte en paciente con heridas por quemaduras extensas (Hoyne, 1993, Feng *et al* 2000). En los años 60’ estudios realizados por Moyer refiere que el nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) empleado quemaduras no incrementaba la proliferación del tejido epidérmico y poseía propiedades antibacterianas contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*. En 1968, se fabricó una crema de naturaleza antibactericida contra *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella sp*, *Pseudomonas sp* la cual estaba compuesta por nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) y sulfamida (Baláz̃ *et al* 2017, Lansdow *et al* 2002, Moyer *et al* 1965).

Posteriormente estudios en microorganismos especialmente bacterias, han demostrado ser capaces de formar nanopartículas debido a su adaptabilidad asociado a mecanismos de resistencia, los cuales incluyen bombas trans-membranales, sistemas de expulsión o extrusión

de metales, impermeabilidad a metales, cambios en el sistema redox por la alteración en la solubilidad, precipitación extracelular de metales, entre otros, lo que les permitió desarrollar sistemas enzimáticos y no enzimáticos que conducen a la síntesis de nanopartículas sobre todo al estar en contacto con soluciones salinas de metales (Rouch *et al* 1995 & Beveridge *et al* 1997 y Li *et al* 2011).

Los primeros reportes sobre la síntesis empleando microorganismos como agentes reductores inició desde el siglo pasado, siendo las nanopartículas de naturaleza metálica principalmente oro y plata las primeras en investigarse. El primer reporte fue descrito en 1980 por Murray y colaboradores al emplear cepas de *Bacillus subtilis* 168 en la formación de nanopartículas de oro, empleando ácido tetracloroaurico como precursor (Nasreen I y Taranath T, 2014, Murray y Beveridge 1980). Paralelamente diversos estudios han reportado que al utilizar la fracción extracelular de cultivos frescos de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Enterobacter cloacae* permitieron la formación de nanopartículas de plata por vía ecológica y amigable dado que no se empleó agentes reductores químicos ni estabilizadores durante la reacción, asimismo se evaluaron diferentes parámetros como temperatura, pH, concentración del metal precursor obteniendo diferentes tamaños y formas en las nanopartículas. (Gurunathan, S *et al* 2009, Mokhtari, N *et al* 2009).

En el panorama actual aún se desconoce el mecanismo exacto de biosíntesis de NPs. La complejidad del metabolismo de los microorganismos dificulta el análisis e identificación de las especies que participan activamente en los procesos de formación de NPs metálicas. Diversos estudios han reportado que algunos microorganismos poseen la capacidad de almacenar o reducir iones metálicos a los cuales son expuestos natural o artificialmente, asimismo dicho proceso tiene lugar debido a la presencia de biomoléculas proteínas/enzimas, aminoácidos, polisacáridos y vitaminas los cuales intervienen durante la reducción. Enzimas como nitrato reductasa tienen un rol importante en el ciclo de nitrato la conversión de nitrato en nitrito. Análisis *in vitro* han demostrado que al emplear una enzima específica  $\alpha$ -NADPH nitrato reductasa durante la síntesis de nanopartículas mejora su estabilidad y sus propiedades ópticas (Kim *et al* 2010, Bansal *et al* 2014, Kumar *et al* 2007).

La formación de nanopartículas de plata empleando métodos biológicos sugiere dos vías de formación: intracelular y extracelular, siendo esta última la técnica más utilizada por los investigadores, por ser más adaptable y menos costosa. Para ejemplificar ello, se reporta sintetizar nanopartículas de plata por vía extracelular al emplear una cepa de *Pseudomonas*

*stutzeri* AG259 aislada de minas de plata, algunas investigaciones afirman que algunos microorganismos podrían reducir los iones de plata donde los procesos de bio-reducción no depende de presencia de enzimas. La biomasa seca de *Bacillus megaterium* D01 y *Lactobacillus sp* A09 tiene capacidad bio-reductora por la interacción de los iones de plata con los grupos en la pared celular microbiana donde el carboxilo ionizado de los residuos de aminoácidos y la amida de las cadenas peptídicas fueron los principales grupos que atrapanon ( $\text{Ag}(\text{NH}_4)^{2+}$ ) y también algunos grupos reductores como el aldehído y la cetona estuvieron involucrados en la bio-reducción. En la mayoría de los casos los iones metálicos son tóxicos para las bacterias, y por lo tanto, la reducción de iones o la formación de complejos insolubles en agua es un mecanismo de defensa desarrollado por las bacterias para superar dicha toxicidad. (Mohanpuria *et al* 2007, Fu *et al* 2006, Fu *et al* 1999).

Para la síntesis de nanopartículas de plata es necesario controlar diversos parámetros para conseguir variación en sus tamaños y morfologías que se originan al modificar algunos de ellos estos incluyen: temperatura, pH, concentración del agente reductor y tiempo. Así las investigaciones realizadas por Gurunathan *et al* 2009, demostraron que al sintetizar nanomateriales a temperatura ambiente obtuvieron nanopartículas de 50 nm, por lo contrario al emplear 60 °C obtuvieron nanopartículas de 15 nm. Del mismo modo a pH ácido el tamaño de la nanopartícula osciló a 45 nm mientras que a pH 10 el tamaño fue de solo 15 nm. La relación entre el pH y la temperatura aumenta la dinámica de los iones y se forman más regiones de nucleación debido a la disponibilidad de iones -OH y al aumento de la temperatura; por el contrario se describe que, a pH ácido y temperaturas más bajas, habrá menos nucleación para la formación de nanopartículas de plata sobre la cual se depositan nuevos átomos de plata entrantes para formar partículas de mayor tamaño. (Sastry *et al.*, 2003).

En diversos estudios se han reportado las bondades de las nanopartículas de plata y su actividad antimicrobiana tanto en virus como en bacterias. Se ha determinado que las nanopartículas de plata tienen efecto en bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Vibrio cholera*, y *Pseudomonas aeruginosa* (Morones *et al.*, 2005; Sondi and Salopek-Sondi, 2004; Yoon *et al.*, 2008) y, Gram positivas como *Bacillus subtilis* (Yoon *et al.*, 2008), *Staphylococcus aureus* (Shrivastava *et al.*, 2007) y *Enterococcus faecalis* (Panacek *et al.*, 2006).

Las investigaciones dirigidas a la búsqueda de las alternativas viables para el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias y virus resistentes se incrementan cada día. Dentro de la gama de compuestos cuya actividad bactericida se está investigando, las nanopartículas de plata

surgen como un prometedor agente antibacteriano que podría ser utilizado para enfrentarnos a esta y otras bacterias resistentes a los antibióticos. Es por ello que diversos autores han reportado acorde al tamaño y forma de las nanopartículas de plata que influyen considerablemente en su potencial antimicrobiano; habiéndose reportado se indica que nanopartículas 25 nm poseen alta actividad antimicrobiana (Morones *et al* 2005 y Panaceck *et al* 2006). Por otro lado, se indica que nanopartículas de plata que presentan forma triangular tienen un mayor efecto antimicrobiano comparado con las de forma esféricas y cilíndricas; esto puede asociarse a que las nanopartículas triangulares presentan planos cristalinos preferentes, en los cuales se ha comprobado que existe una mayor densidad atómica lo que favorece su actividad antimicrobiana (Morones *et al* 2005 y Panaceck *et al* 2006).

Investigaciones realizadas por Sondi y Salopek-Sondi, evidenciaron que los nanomateriales con un tamaño promedio en diámetro de 12 nm poseen una fuerte influencia antibacteriana en la bacteria *Escherichia coli*, asimismo al emplear microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM) determinaron que las nanopartículas se encontraron acumuladas en la membrana celular bacteriana inhibiendo el crecimiento por la alteración metabólica (Sondi y Salopek-Sondi 2004, Hernandez M, 2013).

Kim y colaboradores evaluaron también la actividad antimicrobiana de nanopartículas de plata sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, donde el tamaño promedio de nanopartículas fue de 13,5 nm y la concentración del metal precursor empleado fue de 3 mM, evidenciando una inhibición en el crecimiento de la cepa *E.coli*, sin embargo los efectos no fueron tan significativos en la cepa *S. aureus*, lo cual sugiere que las nanopartículas obtenidas podrían ser empleadas como inhibidores en el desarrollo de microorganismos patógenos por lo que podrían ser empleados como complementos en los sistemas y dispositivos de carácter médico. (Kim *et al* 2004).

Es importante resaltar que a nivel industrial las nanopartículas de plata vienen desarrollando un importante papel, en especial el área textil, es por ello que se ha venido fabricando telas de algodón con la particularidad de presentar nanomateriales de plata con alta actividad antibacteriana, para lo cual se empleó una técnica por impregnación, donde las nanopartículas contemplaron un tamaño entre 10-30 nm, mostrando estabilidad después de 2 meses. Las pruebas frente a patógenos evidenciaron una efectividad del 99% en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* respectivamente (Zang *et al* 2009, Hernández 2013).

#### **4. HIPÓTESIS**

Nanopartículas de plata obtenidas por vía extracelular de *P.aeruginosa* presenta actividad bactericida frente a la cepa de *P.aeruginosa*.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Lugar de ejecución**

El desarrollo de esta investigación fue realizado durante el primer semestre del año 2019, en el laboratorio de Nanotecnología e innovación tecnológica de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (LabNanoIntec-FQ-IQ), ubicada en el distrito de Lima, Lima Perú; en coordinación con el Laboratorio de Parasitología (LA 79) de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma, Santiago de Surco-Lima.

### **4.2 Tipo y diseño de la investigación**

El carácter de esta investigación corresponde a un modelo cuantitativo con diseño experimental. Debido a esto se trabajó con 3 muestras (M1, M2 y M3) y un control (C4) con tres replicas cada uno; donde M1, M2 y M3 están representadas por las diferentes variaciones de volúmenes entre el sobrenadante con nitrato de plata (ver tabla 5). C4, se consideró como un patrón de medida representado por nitrato de plata en solución.

Para el análisis de las variables, se contrasto los grupos M1, M2 y M3 con C4 para contrastar el efecto inhibitorio de nanopartículas de plata sintetizadas y los iones plata frente a *P. aeruginosa* por el método de difusión en agar

### **4.3 Variables**

Durante esta investigación se consideraron 3 variables como indicadores en el desarrollo de la hipótesis



**Tabla 1.** Resumen de variables

<b>Variable</b>	<b>Etapa 2</b>	<b>Etapa 3</b>
<b>Dependiente</b>	Tamaño de nanopartícula	Efecto inhibitorio de Np-Ag sintetizadas por fracción extracelular sobre <i>P.aeruginosa</i>
<b>Independiente</b>	Concentración de nitrato de plata Relación volumen/fracción extracelular	Diámetro de los discos de papel
<b>Interviniente</b>	Tiempo de reacción Temperatura Volumen de fracción extracelular Concentración de AgNO <sub>3</sub>	

#### 4.4 Operacionalización de las variables (OV)

VARIABLE				
TIPO	NOMBRE	DEFINICIÓN	NATURALEZA	INDICADOR
Independiente	Tamaño de nanopartícula	Distribución de tamaño de AgNP mediante dispersión de luz dinámica (DLS)	Cuantitativa	Nanómetros (nm)
	Espectrofotometría de luz ultravioleta visible (Uv-Vis)	Observación del plasmón (pico más alto en la curva) y determinación de la formación de Np-Ag mediante la reducción con fracción extracelular entre 200nm y 600nm	Cuantitativa	Nanómetros (nm)
Dependiente	Efecto inhibitorio de AgNO <sub>3</sub> sintetizadas por fracción extracelular sobre <i>P.aeruginosa</i>	Medición de los milímetros que abarca la zona de inhibición producida por iones de plata	Cuantitativa	Milímetros (mL)
	Efecto inhibitorio de Np-Ag sintetizadas por fracción extracelular sobre <i>P.aeruginosa</i>	Medición de los milímetros que abarca la zona de inhibición producida por Np-Ag sintetizadas por fracción extracelular.	Cuantitativa	Milímetros (mm)
	Tamaño de nanopartículas	Radio hidrodinámico por interacción con laser (dls)	Cuantitativo	(nm)
Interviniente	Diámetro de los discos de papel	Tamaño de los discos que fueron embebidos con nanopartículas y Nitrato de plata.	Cuantitativa	Milímetros (mm)

## 4.5 Metodología experimental

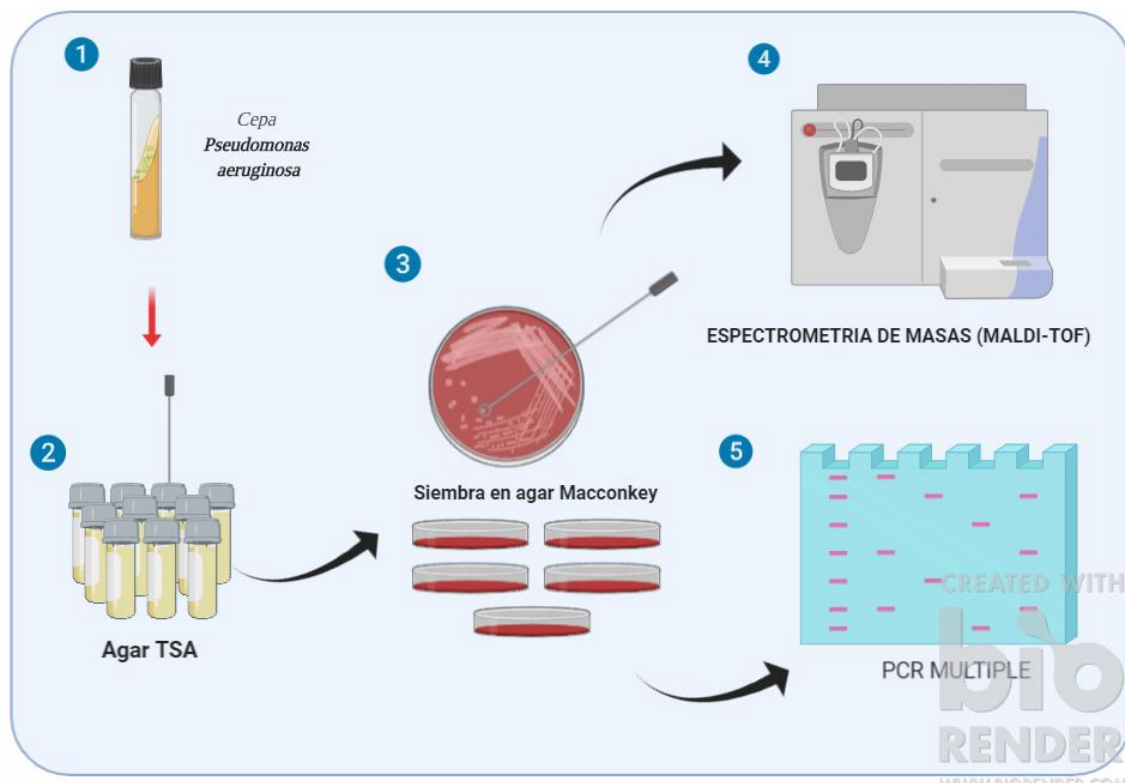
El desarrollo de esta investigación se dividió en 3 etapas descritas:

**Tabla 2.** Resumen de Etapas

ETAPA	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
I	Identificación taxonómica	- Espectrómetro de masas por tiempo de migración (tiempo de vuelo) con desorción/ionización laser asistida por una matriz (MALDI-TOF). - PCR múltiple
II	Síntesis y caracterización de nanopartículas	- 3 muestras entre fracción extracelular/AgNO <sub>3</sub> (M1,M2,M3) - Dispersión de luz dinámica (DLS) - Espectroscopia Uv-Vis
III	Actividad antibacteriana	- Antibiograma
ANEXO	Análisis de proteínas de la fracción extracelular	- Western-blot test

### 4.5.1 ETAPA I.

La cepa de *Pseudomonas sp* fue obtenida del Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Universidad Ricardo Palma, proporcionada en agar nutritivo en un tubo de 10 mL, posteriormente se realizó un cepario en agar tripticosa soya (TSA) en 10 tubos de 3mL los cuales fueron incubados a 37°C durante 24 horas. Finalmente se realizó una siembra en agar MacConkey (el cual es un medio selectivo y nos permite evaluar posible contaminación) del cual se tomaron 10 colonias, cada una de ellas fueron identificadas usando la espectrometría de masa MALDI-TOF, asimismo la misma colonia fue colocada en TSA para su conservación y uso posterior. Una vez identificadas fueron sembradas nuevamente en agar selectivo Mac Conkey para la extracción del ADN mediante shock Termico mediante la PCR para verificar si estas eran portadoras de genes de resistencia a los carbapemens.



**Figura 4.** Descripción de la Etapa 1 (plantilla creada en <https://biorender.com/>)

#### 4.5.1.1 Análisis taxonómico

##### Caracterización por espectrometría de masas (MALDI- TOF)

Se seleccionaron colonias frescas las cuales se desarrollaron en agar MacConkey y posteriormente fueron identificadas mediante espectrómetro de masas por tiempo de migración (tiempo de vuelo) con desorción/ionización laser asistida por una matriz (MALDI-TOF MS, por su sigla en inglés *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer*). A continuación, se describirá el proceso descrito por Vega (Vega S *et al* 2012):

- **Preparación de la muestra:** Se depositó una pequeña cantidad de una colonia (previamente aislada) directamente sobre la placa del espectrómetro de masas, formando una delgada película. Sobre ella se aplicó 1  $\mu$ l de la solución matriz (solución saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo al 50% y ácido trifluoroacético al 2,5%) y se dejó secar a temperatura ambiente.
- **Espectrometría de masas:** Las medidas se realizaron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Alemania). Se obtuvo el

espectro entre 2 y 20 kDa. Los espectros se calibraron externamente utilizando una mezcla de calibrantes comercial (extracto de *Escherichia coli* DH5 más 2 proteínas adicionales: RNasa A y mioglobina para cubrir un intervalo de 4 a 17 kDa).

- **Análisis de los espectros:** El espectro se obtuvo del microorganismo evaluado mediante el programa MALDI Biotyper 2.0 y los picos obtenidos serán comparados con la biblioteca de referencia del MALDI Biotyper 2.0.
- **Evaluación de resultados:** El sistema se clasifica como,
  - Fiable a nivel de especie (relación comparativa entre el perfil del microorganismo y la base de datos  $\geq 2$ ,
  - Fiable a nivel de género (puntuación  $\geq 1,7$  y  $< 2$ )
  - No fiable (puntuación  $< 1,7$ ). Las identificaciones que queden dentro en esta última categoría se consideraron fallidas.

**Tabla 4.** Categorización empleada en la determinación de la especie:

Rango	Descripción	Símbolo	Color
0,000-1,699	Identificación no confiable	-	
1,700 - 1,999	Probable identificación de género	+	
2,000 -2,299	Identificación probable de la especie, identificación segura del género	++	
2,300 - 3,000	Identificación de especie altamente probable	+++	

#### Detección de genes de resistencia mediante PCR múltiple

Se emplearon los genes bla<sub>IMP</sub>, bla<sub>VIM</sub>, bla<sub>NDM</sub>, bla<sub>KPC</sub> usando una mezcla de 25.0 uL , con los siguientes componentes: Agua destilada ultra pura libre de ADNasas y ARNasas (Invitrogen, Nueva York), Amplitaq Polimerasa de oro 250 U (Applied Biosystems, New York), primers: IMP-F, IMP-R, VIM-F, VIM-R, NDM-F, NDM-R, KPC-F, KPC-R y de 10µM (QUIAGEN, Lima),(Ellington M *et al* 2007, Ríos P 2013).

**Tabla 3.** Cebadores utilizados en la detección de genes codificantes de MBL y condiciones de amplificación

Cebadores y tamaño del amplicón (secuencia 5'→3')	Condiciones de amplificación	Referencia
<b>IMP: 232pb</b>		
IMP-F: 5'-GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC- 3'	PRE DENATURE 95°C-5min	
IMP-R: 3' -GGTTTAAAYAAAACAACCACC- 5'	PCR AMPLIFICATION 10 Cycles Denature→95°C-1 min Anneal→60°C-1 min Extension→72°C-1 min	Ellington <i>et al</i> , 2007
<b>VIM:390 pb</b>		
VIM-F: 5' -GATGGTGTGGTTCGCAT- 3'	25 Cycles Denature→95°C-1 min Anneal→57,5°C-1 min Extension→72°C-1 min	
VIM-R: 3' -CGAATGCGCAGCACCAG- 5'		
<b>NDM: 621pb</b>		
NDM-F: 5' -GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC- 3'	Denature→95°C-1 min Anneal→57,5°C-1 min Extension→72°C-1 min	
NDM-R: 3' -CGGAATGGCTCATCACGATC- 5'	FINAL EXTENTION 72°C-10 Minutes 4°C- ∞	

**Controles positivos:**

ATCCBAA2146-*Klebsiella pneumoniae* (NDM); ATCCBAA1705 *Klebsiella pneumoniae* (KPC); *Pseudomonas aeruginosa* (VIM); *Pseudomonas aeruginosa* (IMP) proporcionada por Unidad de investigación Medico Naval-6 (NAMRU-6).

**Control negativo:**

No template control (NTC).

**Tabla 4.** Reactivos utilizados en la PCR múltiple para detectar carbapenemasas de clase B

<b>REACTIVES</b>	<b>QUANTITY (<math>\mu</math>L)</b>	<b>FINAL CONCENTRATION(<math>\mu</math>M)</b>
<b>AmpliTaq Gold 360 Master Mix 2X</b>	12.5	1X
<b>Water</b>	3.3	-
<b>Primer bla IMP F [10<math>\mu</math>M]</b>	1	0.4
<b>Primer bla IMP R [10<math>\mu</math>M]</b>	1	0.4
<b>Primer bla VIM F [10<math>\mu</math>M]</b>	0.7	0.28
<b>Primer bla VIM R [10<math>\mu</math>M]</b>	0.7	0.28
<b>Primer bla NDM F [10<math>\mu</math>M]</b>	0.7	0.28
<b>Primer bla NDM R [10<math>\mu</math>M]</b>	0.7	0.28
<b>Primer bla KPC F [10<math>\mu</math>M]</b>	0.7	0.28
<b>Primer bla KPC R [10<math>\mu</math>M]</b>	0.7	0.28
<b>Total</b>	22	
<b>Template</b>	3	-
<b>FINAL</b>	25	



**Figura 5.** Ambientes de trabajo durante la investigación, caracterización y actividad antibacteriana; a) Laboratorio de Nanotecnología e Innovación Tecnológica ( primer nivel); b) Laboratorio de nanotecnología e innovación tecnología (segundo nivel); c) y d) Laboratorio de química orgánica; d) Laboratorio de Bacteriología (NAMRU-6).



#### **4.5.2 ETAPA II.**

En esta etapa se obtuvo en primer lugar la fracción extracelular, el cual se empleo como reductor durante la síntesis de nanopartículas.

Para la caracterización se empleó un espectrofotómetro modelo *T80 Uv-Vis Spectrophotometer* con el objetivo de determinar los picos de absorbancia característicos de la plata, donde la radiación UV- visible provoca una excitación de los electrones de orbitales de más baja energía a orbitales de más alta energía. Esta técnica nos permitirá determinar la longitud de onda característica del plasmón superficial de las nanopartículas de plata, el cual refleja la longitud de onda que hace que la nube de electrones que se encuentra alrededor de esta nanopartícula metálica se polarice por efecto de la luz incidente. La absorbancia de las nanopartículas de plata fueron medidas en el rango de 200-600 nm.

la determinación del tamaño hidrodinámico de las nanopartículas de plata fueron medidas con el equipo de dispersión de luz dinámica (DLS) modelo Nicomp 3000, el cual permitió la medición de la intensidad de luz dispersada en tiempos muy breves, el movimiento Browniano de las partículas o moléculas en suspensión hace que la luz láser se disperse en diferentes intensidades.

##### **4.5.2.1 Síntesis de nanopartículas de plata**

Se utilizó una sal precursora, nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), marca Sigma con un grado 99.8% de pureza. Se preparó una solución de nitrato de plata al 0,01 M de la siguiente manera: se agregaron 0,4247 gramos de nitrato de plata en 250 ml de agua desionizada a la cual se mantuvo en agitación, para obtener una buena homogenización.

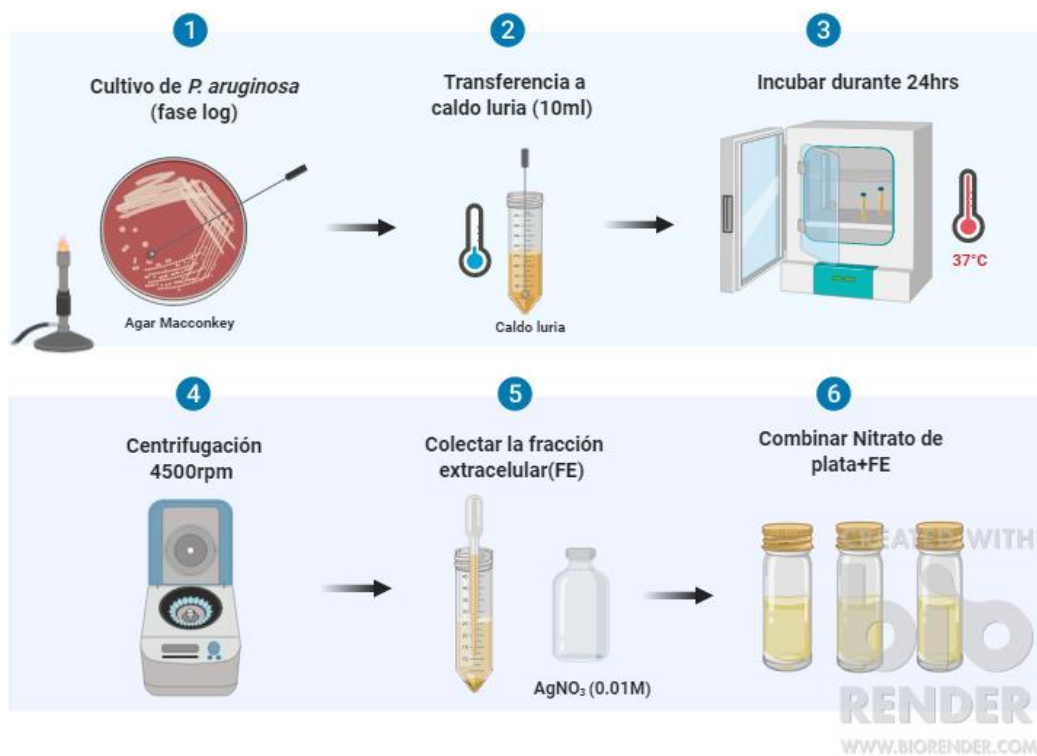
Se empleó como agente reductor la fracción extracelular (FE), el cual se partió desde un cultivo fresco en agar MacConkey del cual se tomó una colonia y fue depositada en un tubo de ensayo que contenía 10ml de caldo luria, se incubo a 37°C durante 24 horas. Finalmente se colecto el sobrenadante, transcurrido el tiempo de incubación, por centrifugación a 4500 rpm y se almaceno a 4 °C hasta su uso, ver referencia en figura 6.

La síntesis comenzó al combinar la FE (agente reductor) y  $\text{AgNO}_3$  durante este proceso se trabajó con 3 muestras descritas en la tabla 5. En el desarrollo de la síntesis se utilizó 3 tubos de 10 mL (tubos de reacción), en los cuales se colocó 9, 7 y 5 mL de nitrato de plata seguidamente y evitando el contacto directo con la luz, se transfirieron a cada tubo de reacción

1, 3, 5 mL de FE obteniendo un volumen total de 10ml, los cuales se incubaron durante 44 horas a temperatura ambiente.

**Tabla 5.** Resumen de las muestras empleadas

Muestra	FE+ Nitrato de plata	N.º de replicas
M1	Sobrenadante (9mL) +AgNO <sub>3</sub> (1ml)	3
M2	Sobrenadante (3mL) +AgNO <sub>3</sub> (7ml)	3
M3	Sobrenadante (5mL) +AgNO <sub>3</sub> (5ml)	3
Control	Nitrato de plata (AgNO <sub>3</sub> )	3



**Figura 6.** Descripción del proceso de síntesis (plantilla creada en <https://biorender.com/>)

#### **4.5.2.2 Caracterización de nanopartículas de plata**

Cada muestra M1, M2 y M3 después de 44 horas de incubación fueron caracterizadas mediante Espectroscopia UV-Vis y DLS respectivamente.

Se tomo 3ml de cada muestra (M1, M3 y M5) y se depositó en cubetas de cuarzo de 3mL y fue leído con el espectrofotómetro en un rango de 200-600nm, asimismo se tomó una alícuota de nanopartículas y se colocó en tubos de 12 milímetros de diámetro y se procedió a lectura con DLS.

#### **5.5.3 ETAPA III**

En esta última fase se expuso las muestras descritas anteriormente para evaluar su capacidad inhibitoria frente a *P. aeruginosa* empleando el método de difusión por discos. Por cada muestra preparada se realizaron 3 repeticiones.

##### **5.5.3.1 Evaluación de la actividad antibacteriana por el método de difusión en agar**

###### **Recuperación de cultivos conservados**

Se descongelo los tubos que contienen bacterias petrificadas a temperatura ambiente por un tiempo de una hora y media, para transferir una pequeña muestra (bacterias en estudio) con el asa bacteriológica, en los tubos que contenían caldo luria.

###### **Preparación del inóculo**

Se ajustó la densidad celular por espectrofotometría en el rango de 0.08-1.2 a 625 nm en un tubo con medio de cultivo previamente esterilizado el cual se mantuvo incubando durante 6 horas en estufa a 37 °C (Balourin *et al* 2015).

###### **Inoculación de las placas**

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la densidad celular, se procedió a extraer con una micropipeta 100 µL del inóculo, para luego verter en placas con Agar Mueller Hinton, que ya fueron preparadas para el ensayo (3 placas por bacteria) diseminando con un hisopo estéril en todas las direcciones de la superficie de cada placa, asegurando una distribución uniforme

del inóculo. Antes de colocar los discos se dejó secar las placas a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.

### **Aplicación de los discos**

Se colocaron los discos sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril que nos ayudó a presionar suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.

Se colocaron los discos uniformemente, de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm uno del otro. Los discos no fueron removidos una vez que tomó contacto con la superficie del agar debido a que difunden rápidamente en la superficie.










Los discos usados para el estudio fueron: Discos estándares marca Becton Dickinson para asegurar la credibilidad de los halos, cada frasco muestra la fecha de caducidad, en cada disco se dispuso con una micropipeta 10, 20 y 30  $\mu\text{L}$  de cada muestra descrita anteriormente (tabla 10) y el control positivo con el mismo volumen fue distribuido con nitrato de plata (0.01M).

Se incubaron las placas en posición invertida a 37°C dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos, durante 24 horas. Después del tiempo recomendado de incubación se examinó cada placa, para proseguir con la medición de los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco.

### **Preparación del control positivo:**

Se determinó emplear nitrato de plata a misma concentración de la cual se partió la síntesis de las nanopartículas 0.01M y a la misma cantidad de volumen para cada grupo 10, 20, 30  $\mu\text{L}$ .

**Tabla 6.** Descripción esquemática de la Etapa 3.

<p>Grupo 1 (10µL)</p>			
<p>Grupo 2 (20µL)</p>			
<p>Grupo 3 (30µL)</p>			
<p>Muestra</p>	<p>M1 → sobrenadante (1mL) / AgNO<sub>3</sub> (9mL)  M2 → sobrenadante (3mL) /AgNO<sub>3</sub> (7mL)  M3 → sobrenadante (5mL) /AgNO<sub>3</sub> (5mL)  C → Disco en blanco como grupo control con nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>)</p>		

## Susceptibilidad a antibióticos

- Con un asa de siembra en aro se tomó un pequeño volumen el cual fue depositado en tubo de vidrio de 100 x 13 mm conteniendo 10 mL de caldo luria y se ajustó a densidad celular mediante espectrofotometría dentro de un rango 0.08- 2 nm.
- Se introdujo un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada. Se giro y se hizo presion en la pared interior del tubo por encima del nivel de líquido para quitar el exceso de inóculo.
- Se estrió con el hisopo sobre la superficie seca del agar Mueller-Hinton en tres direcciones rotando la placa 60 grados para asegurar una completa distribución del inóculo. Al final se pasó el hisopo alrededor de los bordes de la placa con agar.
- Se coloco los discos de antibióticos sobre la superficie del agar con una pinza estéril a una distancia no menor a 24 mm desde un centro al otro. Se coloco las placas invertidas en una estufa a 37 °C por 16-18 horas.
- Transcurrido el tiempo de incubación, cada placa fue revisada. El crecimiento de las colonias debe ser confluyente; si hay colonias independientes, el inóculo fue bajo y por tanto se deberá repetir la prueba. La zona de inhibición debe ser uniformemente circular, se midió en la base de la placa Petri con un vernier el diámetro (en mm) de la zona de inhibición incluyendo el diámetro del disco. La lectura obtenida se aproximó al valor entero (en mm) más cercano. El tamaño de las zonas de inhibición fue interpretado de acuerdo a los puntos de corte establecidos por el documento M100-S22 “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing” (CLSI).

## 5. RESULTADOS Y EVALUACION DE RESULTADOS

### 5.1. Análisis MALDI-TOF

Los resultados presentados a continuación (tabla 8) nos muestra un valor de puntuación asignado por el sistema Buker anteriormente descrito, el cual nos resume la categorización numérica asignada de los 10 aislamientos realizados, considerando BTS como el control predeterminado durante la lectura.

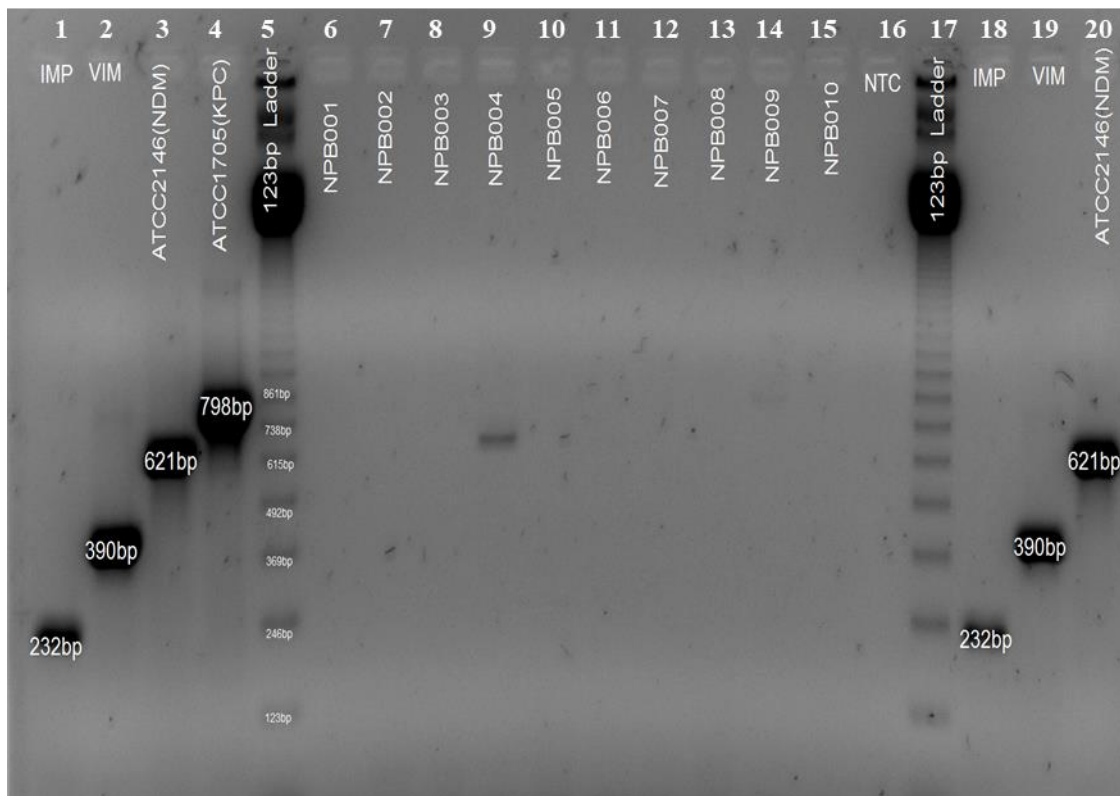
La puntuación obtenida en cada aislamiento varía entre 2.36-2.45 y 2.20 para el control negativo con *Escherichia coli*; acorde al sistema de clasificación BIOTYPER es interpretada por el software como una identificación altamente probable a nivel de especie (tabla 4).

**Tabla 7.** Sistema de clasificación del sistema MALDI-TOF.

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
<a href="#">E3</a> (++)(A)	BTS	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.204	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.213
<a href="#">E4</a> (+++)(A)	NPB001	Pseudomonas aeruginosa	2.47	Pseudomonas aeruginosa	2.216
<a href="#">E5</a> (+++)(A)	NPB002	Pseudomonas aeruginosa	2.4	Pseudomonas aeruginosa	2.212
<a href="#">E6</a> (+++)(A)	NPB003	Pseudomonas aeruginosa	2.357	Pseudomonas aeruginosa	2.237
<a href="#">E7</a> (+++)(A)	NPB004	Pseudomonas aeruginosa	2.41	Pseudomonas aeruginosa	2.244
<a href="#">E8</a> (+++)(A)	NPB005	Pseudomonas aeruginosa	2.413	Pseudomonas aeruginosa	2.26
<a href="#">E9</a> (+++)(A)	NPB006	Pseudomonas aeruginosa	2.434	Pseudomonas aeruginosa	2.267
<a href="#">E10</a> (+++)(A)	NPB007	Pseudomonas aeruginosa	2.407	Pseudomonas aeruginosa	2.217
<a href="#">E11</a> (+++)(A)	NPB008	Pseudomonas aeruginosa	2.337	Pseudomonas aeruginosa	2.241
<a href="#">E12</a> (+++)(A)	NPB009	Pseudomonas aeruginosa	2.324	Pseudomonas aeruginosa	2.227
<a href="#">E1</a> (+++)(A)	NPB010	Pseudomonas aeruginosa	2.433	Pseudomonas aeruginosa	2.212

## 5.2 PCR múltiple

Se estableció un PCR múltiple para el análisis de 10 aislamientos correspondiente a la cepa *P.aeruginosa*, para lo cual se trabajó con 4 genes IMP, VIM, NDM y KPC. Los Carriles del 6 al 15 representan los aislamientos empleados para la determinación de los amplicones generados, donde no se evidencia la expresión de algún gen patógeno, el carril 16 represento el control con agua; los carriles 5 y 17 representan el marcador 123 pb. Solo 4 (NPB004) se observa la expresión para *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (NDM).



**Figura 7.** Gel de electroforesis correspondiente al PCR múltiple. Los amplicones de las muestras (codificadas con las letras NPB #) corresponden al gen blaIMP de 232 pb. blaIMP, blaVIM y blaNDM: Controles positivos ATCCBAA2146-*Klebsiella pneumoniae* (NDM); ATCCBAA1705 *Klebsiella pneumoniae* (KPC); *Pseudomonas aeruginosa* (VIM); *Pseudomonas aeruginosa* (IMP). No template control (NTC) Ladder 123: Marcador de peso molecular de 123 pb.



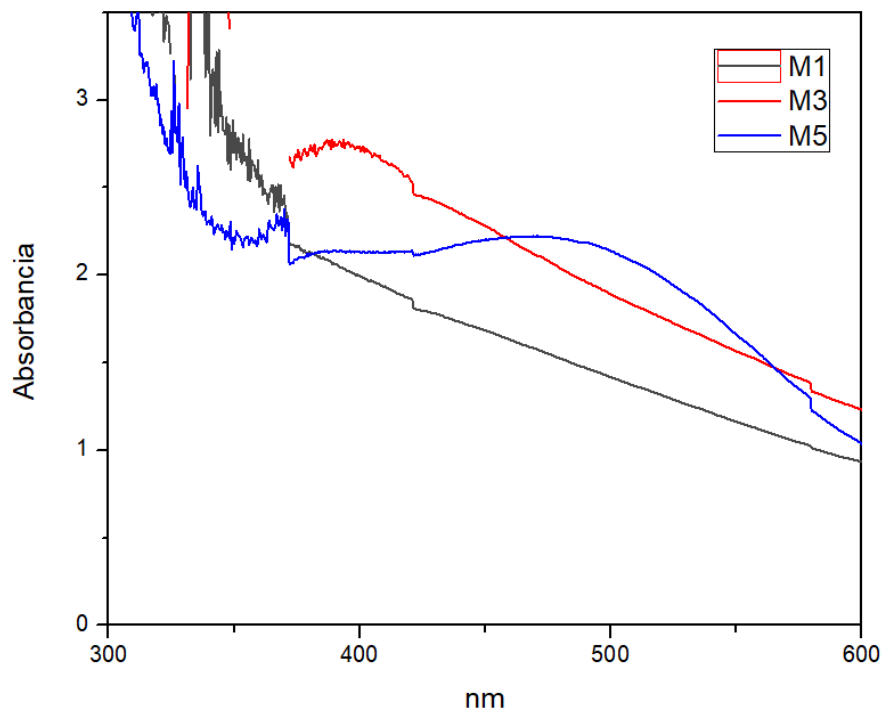
**Tabla 8.** Descripción de los genes utilizados en la determinación patogénica de *P. aeruginosa*.

<b>CODE</b>	<b>blaIMP (232bp)</b>	<b>blaVIM (390 bp)</b>	<b>blaNDM (621bp)</b>	<b>blaKPC (798bp)</b>	<b>Pathogen</b>
<b>NPB001</b>	NEGATIVE	NEGATIVE	NEGATIVE	NEGATIVE	<i>P. aeruginosa</i>
<b>NPB002</b>	NEGATIVE	NEGATIVE	NEGATIVE	NEGATIVE	<i>P. aeruginosa</i>
<b>NPB003</b>	NEGATIVE	NEGATIVE	NEGATIVE	NEGATIVE	<i>P. aeruginosa</i>
<b>NPB004</b>	NEGATIVE	NEGATIVE	<b>POSITIVE</b>	NEGATIVE	<i>P. aeruginosa</i>
<b>NPB005</b>	NEGATIVE	NEGATIVE	NEGATIVE	NEGATIVE	<i>P. aeruginosa</i>
<b>NPB006</b>	NEGATIVE	NEGATIVE	NEGATIVE	NEGATIVE	<i>P. aeruginosa</i>
<b>NPB007</b>	NEGATIVE	NEGATIVE	NEGATIVE	NEGATIVE	<i>P. aeruginosa</i>
<b>NPB008</b>	NEGATIVE	NEGATIVE	NEGATIVE	NEGATIVE	<i>P. aeruginosa</i>
<b>NPB009</b>	NEGATIVE	NEGATIVE	NEGATIVE	NEGATIVE	<i>P. aeruginosa</i>
<b>NPB010</b>	NEGATIVE	NEGATIVE	NEGATIVE	NEGATIVE	<i>P. aeruginosa</i>

### 5.3 Análisis de los resultados de técnicas Uv-visible y DLS para muestras M1, M2, M3

#### Efecto de la cantidad de agente reductor

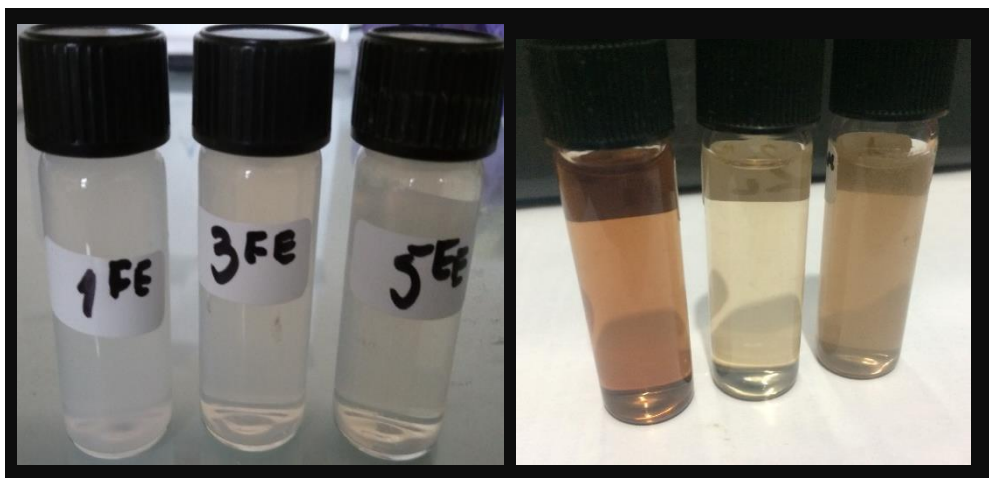
La cantidad de agente reductor, en esta investigación representado por la fracción extracelular bacteriana, es otro factor importante que afecta e interviene directamente la síntesis de las nanopartículas. En este caso se debe encontrar la cantidad del agente reductor (fracción extracelular) que provoque la completa reducción de los iones de plata de la sal precursora. En la figura 8 se reportan los espectros correspondientes a las 3 muestras empleadas las cuales se encuentran en el intervalo de 400 a 420 lo cual evidencia la presencia de nanopartículas de plata, así también se describen por separado los picos descritos en las figuras 10, 11 y 12 respectivamente de cada muestra.



**Figura 8.** Resumen de los espectros obtenidos de las 3 muestras analizadas M1, M2 y M3.

#### 5.4 Tamaño hidrodinámico de las nanopartículas

En la tabla 9 se muestran los resultados del tamaño hidrodinámico de las nanopartículas de plata obtenidos mediante la técnica de dispersión de luz modo dinámico (DLS). Cabe resaltar que se mantuvieron constantes las condiciones de síntesis como temperatura, pH y concentración del metal precursor (0.01M) en cada síntesis para cada muestra.



**Figura 9.** Proceso de síntesis de nanopartículas de plata después de 44 horas de incubación

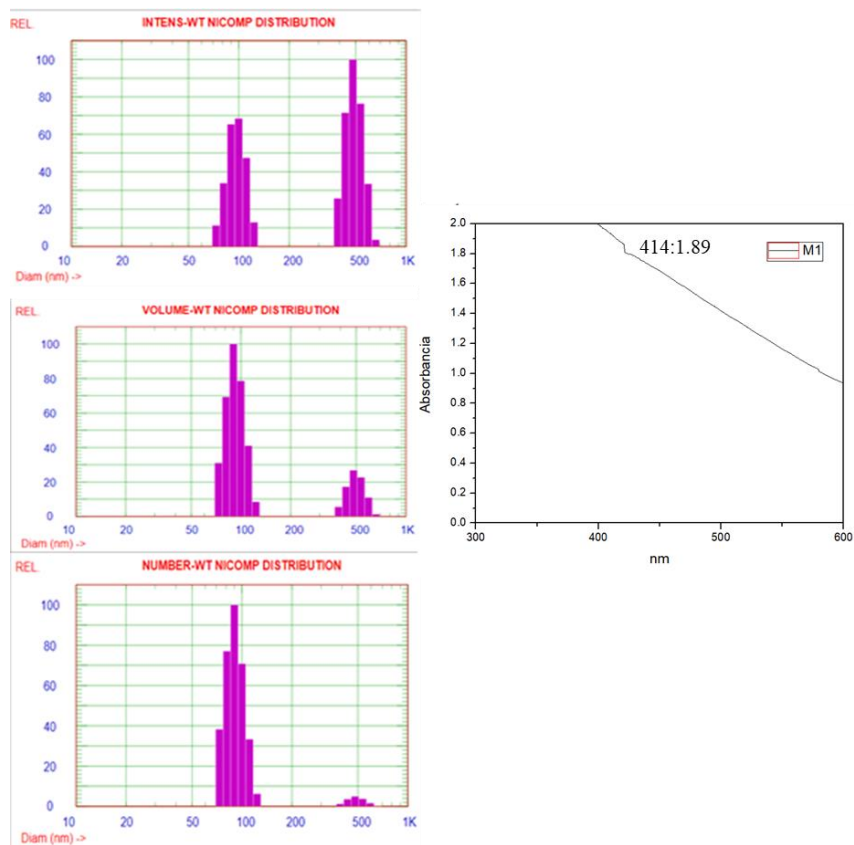
**Tabla 9.** Resumen de los nanomateriales caracterizados por Dispersión de luz dinámica (DLS) después de 44 horas de síntesis.

		MUESTRA					
		M1		M2		M3	
		Tamaño (nm)	%	Tamaño (nm)	%	Tamaño (nm)	%
INTENSIDAD	Población 1	98.0	40.65	50.0	17.97	60,9	34.68
	Población 2	487.3	59.35	191.2	82.03	190	34.68
VOLUMEN	Población 1	91.6	78.86	48.0	88.87	58.3	91.32
	Población 2	493.9	21.14	185.9	11.13	184.3	8.68
NUMERO	Población 1	90.3	95.22	47.3	96.89	57.4	97.08
	Población 2	487.3	4.78	183.2	3.11	181.4	2.92

### Síntesis en M1

En el margen derecho de la figura 9 se muestra la banda del plasmón cuya elevación máxima se encuentra a 414 nm, lo que sugiere que posiblemente se atribuya su forma y ubicación a la presencia de nanopartículas de plata, con una absorbancia de 1.89 sin embargo, la forma del acampanada y ensanchada del plasmón también puede sugerir que exista variedad de tamaños de nanopartículas de plata, a la izquierda en la se observa la representación mediante histograma del tamaño hidrodinámico de las nanopartículas (tamaño) y la intensidad (%) determinado por técnica DLS donde se analiza la distribución en cuanto a intensidad, volumen y numero. Los resultados se muestran a continuación:

La distribución según la intensidad muestra dos poblaciones, en la población 1 se observa nanopartículas de 98.0 nm con una intensidad de 40.65 % lo que sugiere que es la minoría, la población 2 representa a nanopartículas con tamaños de 487.3 nm con una intensidad de 59.35 % por lo que se podría definir como predominante, sin embargo, acorde al volumen y numero población 1 represento un porcentaje mayor (tabla resumen 4)



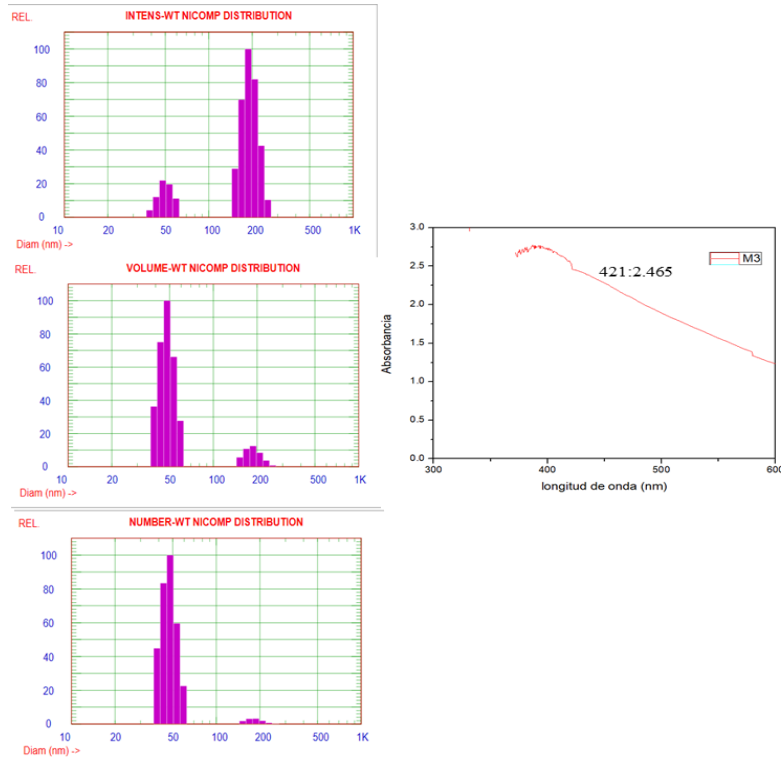
**Figura 10.** Margen derecho lectura del Uv-vis de la muestra 1. Margen izquierdo lecturas por DLS distribución de tamaño acorde a intensidad, volumen y numero.

### Síntesis en M2

En el margen derecho de la figura 10 se muestra la banda del plasmón cuya elevación máxima se encuentra a 421 nm, lo que sugiere que posiblemente se atribuya su forma y ubicación a la presencia de nanopartículas de plata, con una absorbancia de 2.47, nótese que existe la misma tendencia de formar picos en el rango de 400 nm que M1 y también se sugiere que la forma no acampanada y ensanchada del plasmón también puede sugerir que exista solo dos poblaciones nanopartículas donde predominan las poblaciones pequeñas; así también a la izquierda se observa la representación mediante histograma del tamaño hidrodinámico de las nanopartículas (tamaño) y la intensidad (%) determinado por técnica DLS donde se analiza la distribución en cuanto a intensidad, volumen y número.

La distribución según la intensidad muestra dos poblaciones, en la población 2 se observa nanopartículas de 191.2nm con una intensidad de 82.03 % lo que sugiere que es la mayoría, la

población 1 representa a nanopartículas con tamaños de 50.0 nm con una intensidad de 17.97% por lo que se podría definir como poco influyente, sin embargo, acorde al volumen y número población 1 represento un porcentaje mayor (tabla resumen 4)

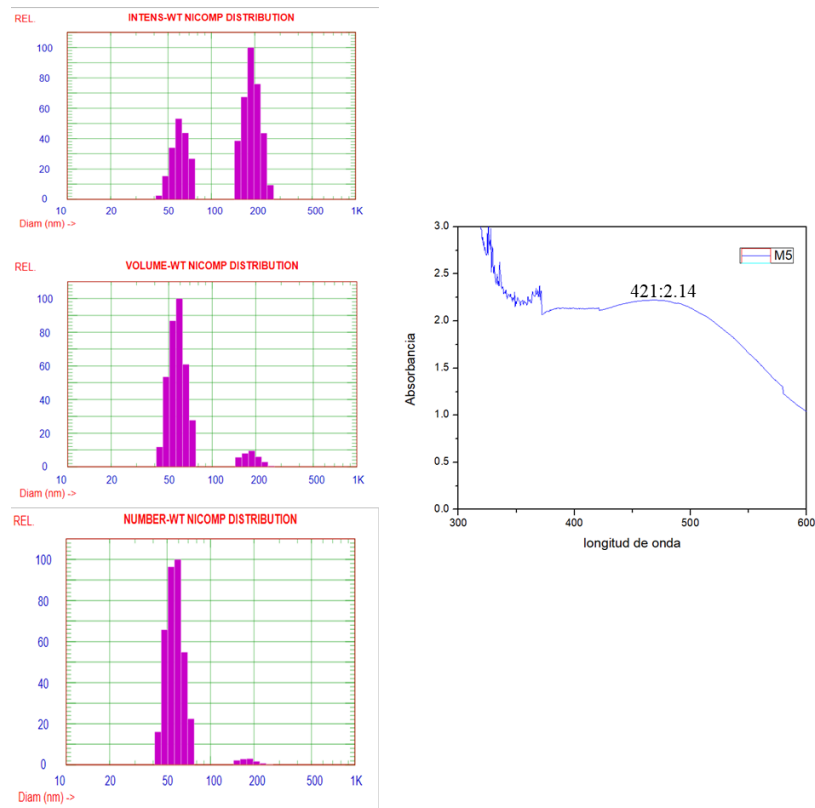


**Figura 11.** Margen derecho lectura del Uv-vis de la muestra 2. Margen izquierdo lecturas por DLS distribución de tamaño acorde a intensidad, volumen y numero.

### Síntesis en M3

En el margen derecho de la figura 11 se muestra la banda del plasmón cuya elevación máxima se encuentra a 421 nm, lo que sugiere que posiblemente se atribuya su forma y ubicación a la presencia de nanopartículas de plata, con una absorbancia de 2.47, nótese que existe la misma tendencia de formar picos en el rango de 400 nm que M1 y M3, el pico tiene forma acampanada y ensanchada del plasmón, pero es diferente al de los anteriores por tener un pico puntiagudo más definido por lo que puede atribuirse a la presencia de nanopartículas con tamaños uniformes; así también a la izquierda se observa la representación mediante histograma del tamaño hidrodinámico de las nanopartículas (tamaño) y la intensidad (%) determinado por técnica DLS donde se analiza la distribución en cuanto a intensidad, volumen y número.

La distribución según la intensidad muestra que las poblaciones 1 y 2 muestran el mismo valor de intensidad 34.68 %, sin embargo, el tamaño de la población (160,9nm) mostro un menor tamaño en comparación con la población 2, acorde al volumen y numero población 1 represento un porcentaje mayor (tabla resumen 4).



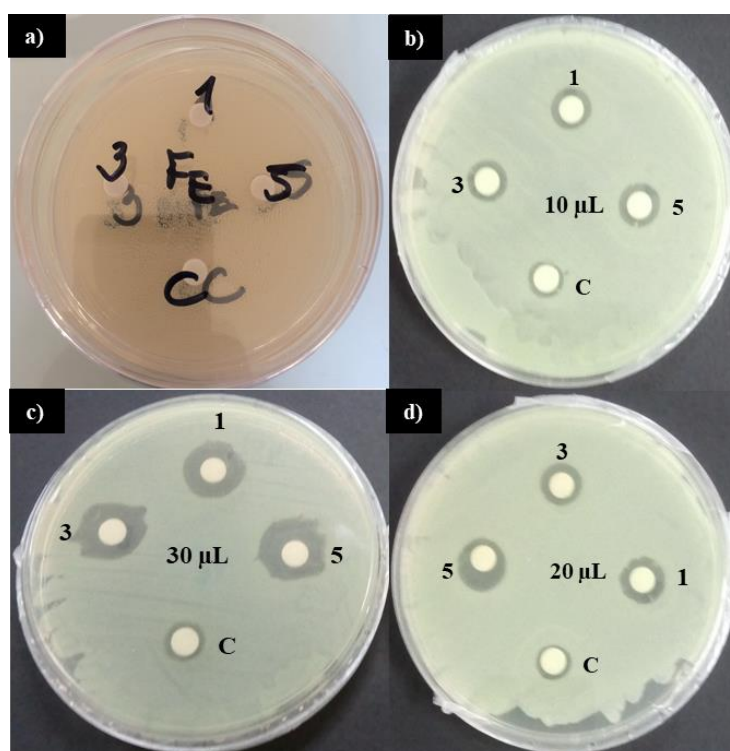
**Figura 12.** Margen derecho lectura del Uv-vis de la muestra 3. Margen izquierdo lecturas por DLS distribución de tamaño acorde a intensidad, volumen y número.

### Actividad antibacteriana

En la figura 13 se presentan los resultados de la etapa final, de los halos inhibitorios obtenidos mediante la evaluación in vitro del efecto antibacteriano de Nps-Ag. Se observan los halos inhibitorios de las Np-Ag sintetizadas por fracción extracelular al emplear las muestras 1, 2 y 3 los cuales muestran un efecto inhibitorio contra *Pseudomonas aeruginosa*

**Tabla 10.** Resultados de halos generados con cada muestra

MUESTRA	Concentración			
	N	10µl	20µl	30µL
	N	Media +D.Est	Media +D.Est	Media +D.Est
M1	3	9,1mm±0.15	12,1mm±0.3	14,3mm±0.09
M2	3	10,3mm±0.1	13,2mm±0.3	15mm±0.4
M3	3	11,7mm±0.5	13,4mm±0.5	14,7mm±0.2
Control	3	8,9mm±0.2	9,2mm±0.15	9,4mm±0.1



**Figura 13.** Resultado del antibiograma generado al emplear nanopartículas de plata (Nps-Ag)

#### **Análisis de datos para las muestras empleados**

La Tabla 11 están conformadas por: las fuentes de variabilidad (FV), la suma de cuadrados (SC), los grados de libertad (gl), los cuadrados medios (CM), el estadístico de prueba (F) y la significancia observada (p) asociados a cada estadístico F.

**Tabla 11.** Resultados estadísticos de la prueba de análisis de varianza (ANOVA) para la cepa *P. aeruginosa* al emplear 10µL; 20µL y 30µL de cada muestra.

### ANOVA de un factor

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Muestra	158,436	3	52,812	112,167	,000
Halos generados(mm)	15,067	32	,471		
Total	173,503	35			

La Tabla 11 nos muestran que los grupos definidos por el microorganismo, en este caso fue la cepa bacteriana y las diferentes muestras, poseen diferencia significativa de la actividad inhibitoria, el estadístico F, lleva asociado un valor  $p < 0,05$ , lo cual indica que las interacciones entre los factores poseen un efecto significativo sobre el diámetro del halo de inhibición.

Considerando la diferencia significativa que mostraron los factores evaluados: diferentes muestras M1, M2, M3 anteriormente ya descritos (tabla 10); la cepa bacteriana *P. aeruginosa*, previamente descrita e identificada; se realizó pruebas de comparaciones múltiples de medias de Tukey, cuyos resultados se muestran en las siguientes tablas.

**Tabla 12.** Subconjuntos homogéneos - DHS de Tukey generales (muestras frente a cepa bacteriana de *P. aeruginosa*).



	Muestras	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
			1	2	3	4
HSD Tukey <sup>a</sup>	Control-	9	9,2333			
	AgNO <sub>3</sub>	9		10,4111		
	1:9	9			12,8889	
	3:7	9				14,6111
	5:5		1,000	1,000	1,000	1,000
	Sig.					
Tukey B <sup>a</sup>	Control-	9	9,2333			
	AgNO <sub>3</sub>	9		10,4111		
	1:9	9			12,8889	
	3:7	9				14,6111
	5:5					

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 9,000.

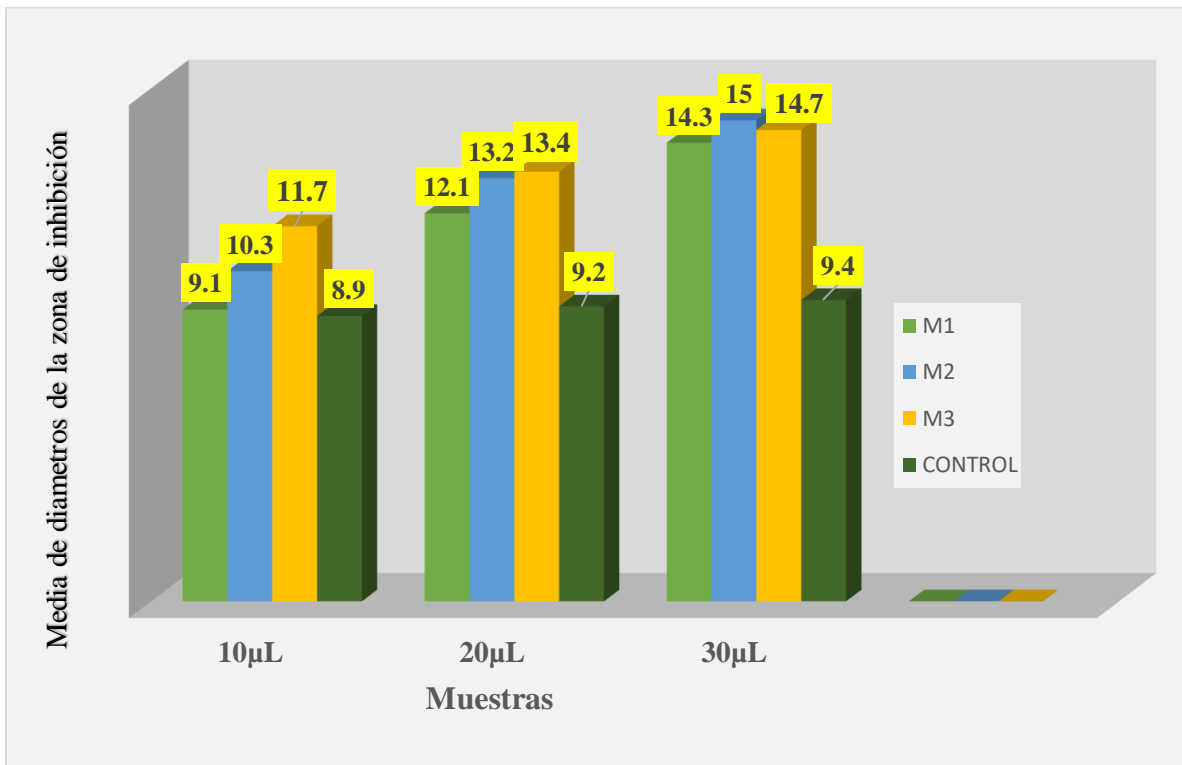
En la comparación de medias de los diferentes muestras utilizados , la Tabla 11, demuestra que M1 presenta la actividad inhibitoria más baja con respecto a sus medias (10,41 mm), seguida de M2 (12,89 mm), sin embargo en M3 presentó el mayor valor (14,61mm) en la media del diámetro del halo de inhibición en el crecimiento de las cepa bacteriana evaluada los cuales nos indican que este última muestra descrita fue la más representativa porque presenta mayor actividad inhibitoria con respecto a demás muestras de los subgrupos 1,2 ,3.

**Tabla 13.** Efecto de las muestras sobre el crecimiento de cepa bacteriana en evaluación.

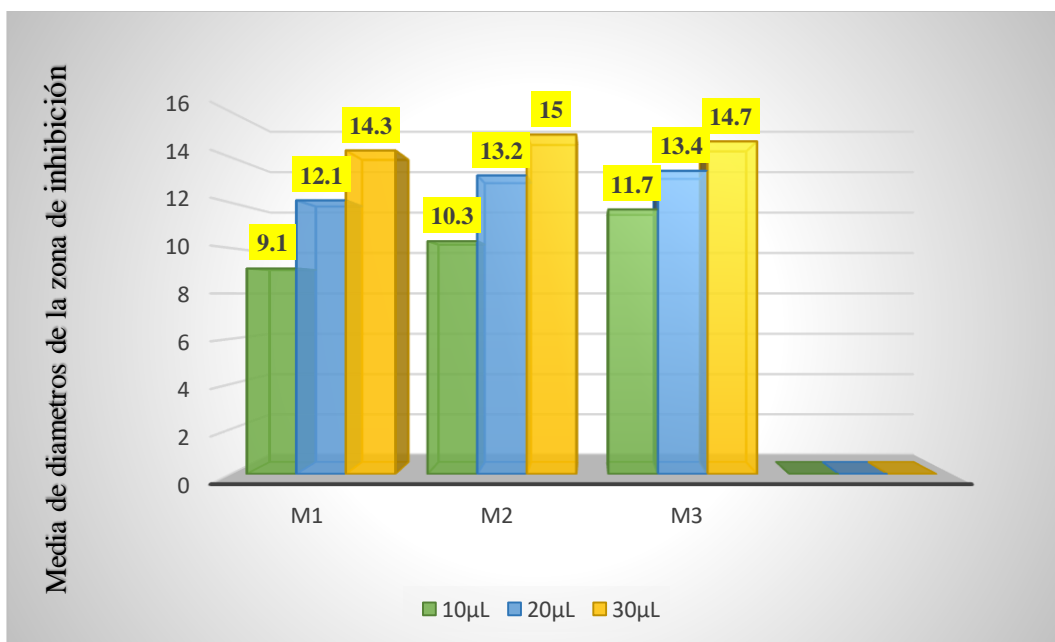
La Tabla 13. Presenta los resultados obtenidos al analizar el efecto de las muestras sobre el crecimiento de cepa bacteriana en evaluación, haciendo énfasis en la muestra 3 que presentó el mayor valor de la media del diámetro del halo de inhibición de 14,61 mm con límites entre  $14,223 \leq \mu \leq 14,98$  mm y el control positivo con nitrato de plata 0,01M (9,23mm) con límites entre  $9,03 \leq \mu \leq 9,42$  mm. Para todas las muestras evaluadas el intervalo de confianza al 95 % presenta límites entre los cuales los datos de los halos de inhibición se traslapan entre sí, es decir que comparten valores de diámetro de halos de inhibición.

Muestra	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1:9	9	10,4111	1,07290	,35763	9,5864	11,2358	9,10	12,20
3:7	9	12,8889	,65849	,21950	12,3827	13,3951	11,80	13,80
5:5	9	14,6111	,48333	,16111	14,2396	14,9826	13,80	15,30
Control	9	9,2333	,25495	,08498	9,0374	9,4293	8,80	9,50
Total	36	11,7861	2,22648	,37108	11,0328	12,5394	8,80	15,30

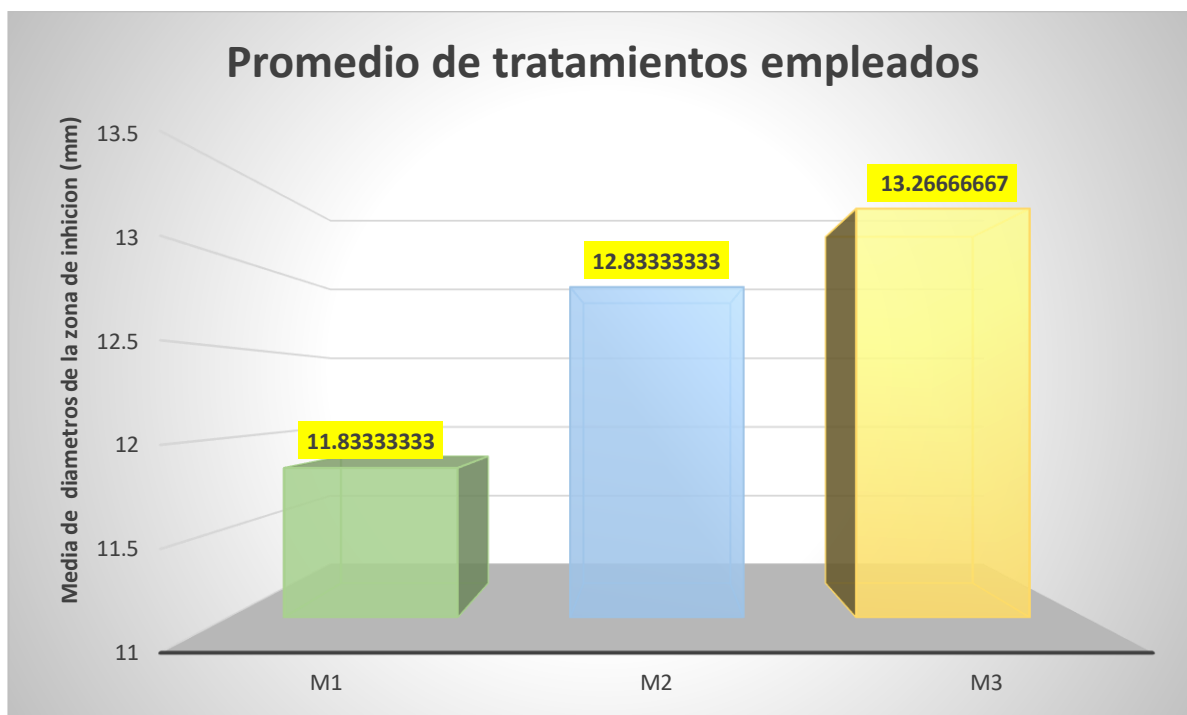
Con respecto a la relación entre el volumen y la muestra empleada en este ensayo experimental se representa en las Figuras 14 y 15 donde se evidencio que ambas variables intervienen significativamente en la formación de halo y donde se pudo determinar que la mayor sensibilidad producida fue lograda al emplear 30  $\mu$ L de cada muestra, siendo la muestra 3 el que presento la mayor la media del diámetro de halo con 15,0 mm, seguido del muestra 2 con 14,7mm y finalmente el muestra 1 con 14,3mm, asimismo el control el cual fue evaluado con nitrato de plata . Sin embargo, el nivel de eficacia inhibitoria entre muestras se presenta en M3 con 35% de eficacia, seguido de M2 con 34% y M1 con 31 %; como se muestra en la figura 17.



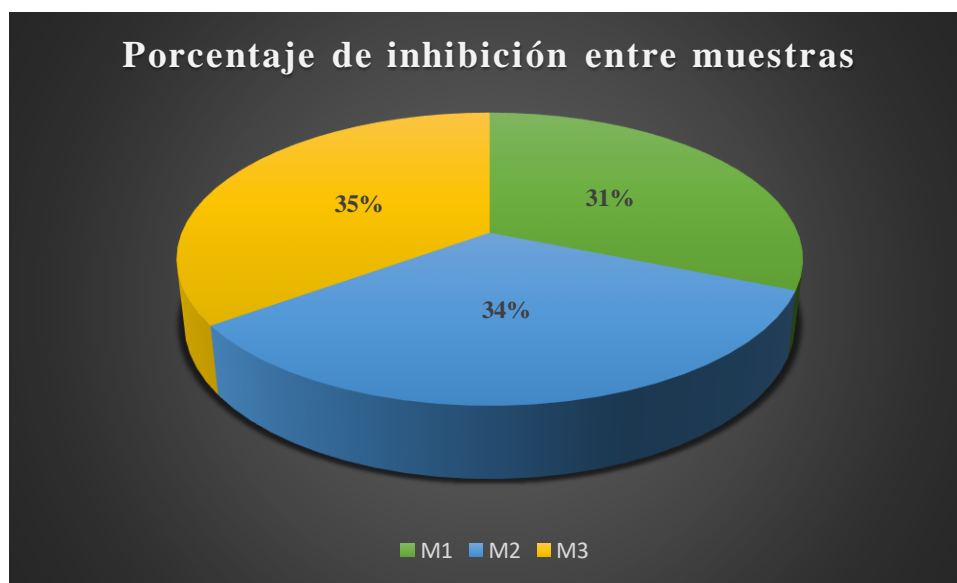
**Figura 14.** Media del diámetro del halo de inhibición, según la cantidad de volumen utilizado por cada muestra con el control positivo frente a *P. aeruginosa*



**Figura 15.** Media del diámetro del halo de inhibición comparado acorde al volumen utilizado por cada diferente muestra.



**Figura 16.** Promedio establecido por las medias en cada muestra evaluada.



**Figura 17.** Eficacia de actividad inhibitoria entre muestras frente a una cepa de *P.aeruginosa*

## 6. DISCUSIÓN

La importancia en la identificación taxonómica y en especial en *P.aeruginosa* es debido a la gran prevalencia y variabilidad de cada gen de MBLs (Metallo  $\beta$ -lactamasas) reportando que la prevalencia va del 2 % al 39 % en países como Japón, India, Polonia, Italia y Canadá y en países latinoamericanos represento 56% (Fritsche *et al* 2005). Dentro de las familias MBL de mayor distribución y diseminación son los tipos IMP Y VIM, sin embargo, un nuevo gen ha sido reportado denominado “New Delhi Metalobetalactamasa” (NDM), en una cepa de *K. pneumoniae*, convirtiéndose en la carbapenemasa más amenazante debido a ser extremadamente resistentes a los antibióticos: fluoroquinolonas, aminoglucósidos y aztreonam principalmente aislados de ambientes hospitalarios (OPS/OMS, 2011, Pagniez *et al.*, 2006). En nuestra investigación de 10 aislamientos realizados solo uno se reportó la presencia de gen nueva Delhi metalo-betalactamasa (NDM), esta muestra fue tomada para el desarrollo de la etapa 2.

En el presente estudio, fue confirmada la síntesis de nanopartículas vía extracelular mediante un cambio en el color en mezcla de reacción. El color del sobrenadante fue cambiando paulatinamente de blanquecino a un amarillo pálido al haber transcurrido 44 horas de exposición. Este comportamiento solo se observó en las muestras M2 y M3 en contraste con M1 en donde su coloración fue cambiando a una tonalidad lila; como un indicador de una probable exposición prolongada a la luz. Este fenómeno visible se considera como una detección prematura de nanopartículas y es a consecuencia de la excitación de la resonancia de la superficial del plasmón (RSP).

Investigaciones recientes han reportado que al emplear la cepa de *P. aeruginosa* como agente reductor (Singh *et al.*, 2018), donde la coloración fue progresivamente variando en el transcurso de 8 horas de incubación de una tonalidad amarillenta a marrón, este fenómeno podría atribuirse a factores como la temperatura (37° C) y modo de incubación con agitación constante (12 x g). En contraposición, la coloración obtenida en este trabajo solo es semejante en el en las muestras con menos volumen del agente precursor; la cual tiene proceso lento al interactuar con más contenido de biomoléculas procedentes del sobrenadante.

El proceso de caracterización de los nanomateriales sintetizados fue empleado dos técnicas: espectrofotometría ultravioleta-visible (Uv-vis) y dispersión de luz dinámica (DLS). Los espectros de NP Ag obtenidos mostraron una fuerte absorción (SPR) en el rango de 414-421 nm. La alta intensidad de la banda SPR probablemente se debió al aumento de la concentración de NP Ag en la mezcla de reacción.

Asimismo, estudios experimentales que evaluaron las variaciones en RSP (Ali *et al* 2019) bajo condiciones similares las cuales incluyen de concentración de agente precursor (0.01M) y relación en la mezcla de reacción entre el sobrenadante y nitrato de plata, el cual consistió en una relación proporcional entre ambos componentes, sobre estas condiciones obtuvieron bandas de absorción en el un rango entre 435-450 nm.

El tamaño hidrodinámico de las nanopartículas, para cada muestra presento una variación de tamaños de 60.9-191.2 nm, las cuales se obtuvieron a través de la optimización del método biológico. El método se basó en utilizar AgNO<sub>3</sub> como precursor metálico, fracción extracelular extraída por centrifugación de cepa de *Pseudomonas aeruginosa* como agente reductor sin ningún agente estabilizante que modifique el pH durante síntesis, tomando como referencia el método establecido por Ganesh *et al* 2011. Al método original, se le modificó principalmente la concentración de los reactantes, así como la temperatura y el tiempo de reacción. El método óptimo obtenido para la síntesis de nanopartículas de plata empleando una síntesis verde, consistió en hacer reaccionar nitrato de plata 10 mM (5 mL) con 5mL la fracción extracelular bacteriana. La reacción se realizó a una temperatura ambiente. El valor de polidispersidad significa la buena calidad de NPs-Ag sintetizados el cual es contemplado en estudios realizados (Punjabi *et al* 2017, Singh *et al* 2018) reportando que el tamaño promedio de las nanopartículas de plata sintetizadas por las bacterias fueron 41.0 nm, 228.7 nm.

La actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata, fue comparada con la misma cepa bacteriana, la cual fue empleada durante la etapa de síntesis, utilizando el diámetro de la zona de inhibición (dzi) que refleja la magnitud de susceptibilidad de los microorganismos. Los resultados semicuantitativos que se obtuvieron para este estudio evidenciaron una alta sensibilidad bacteriana proporcional al volumen utilizado con cada muestra (tabla 5). Se han reportado varios mecanismos probables involucrados en la actividad antimicrobiana de NPs Ag, pero el mecanismo exacto aún no ha sido establecido. El mecanismo ampliamente aceptado refiere a que los iones de plata cargados positivamente pueden interactuar con compuestos bio-

macromoleculares que contienen fósforo o azufre cargados negativamente causando cambios estructurales y deformación de la membrana y la pared celular bacteriana que conduce a la interrupción del proceso metabólico y a la muerte celular (Shankar, S *et al* 2015).

La generación de los halos de inhibición por muestra se describe en la tabla 10 en las cuales se observó que al emplear un volumen 30  $\mu\text{L}$  de cada muestra ( $11.2 \pm 0.2$ ;  $13.4 \pm 0.5$  y  $14.2 \pm 0.2$ ) se obtuvo mejores resultados, así mismo al comparar los grupos entre muestras se concluyó que al utilizar M5 se obtuvieron mejores resultados indistintamente del volumen que se utilizó. Un estudio realizado por Singh *et al* 2018 al emplear 7 diferentes cepas concluyen que *Pseudomonas aeruginosa* KACC 14021  $14.5 \pm 0.5$ , *Vibrio parahaemolyticus* KACC 15069  $16.5 \pm 0.5$  y *Candida tropicalis* KCTC 17762  $16.5 \pm 0.6$  presentaron mejores resultados durante el test antibacteriano realizado. Otro estudio Oza *et al* 2012, demostró que al emplear NPs-Ag en 3 cepas bacterianas se generaron halos *Pseudomonas aeruginosa* (23mm), *Staphylococcus aureus* (17mm), *Escherichia coli* (15mm), cuyas condiciones de síntesis evaluaron diferentes condiciones de temperatura (10, 30, 100°C), pH (2, 6, 8, 9, 10), y concentración de metal precursor 0.01M y cuyo tamaño estuvo en el rango de 20-50 nm. Por otro lado, Singh *et al* 2014 reportaron que al utilizar el sobrenadante de *Bacillus sp* como agente reductor en la formación de nanopartículas de selenio y plata, estas últimas lograron tener una mejor acción antibacteriana al ser enfrentadas a cepas *Escherichia coli* (9mm) *Staphylococcus aureus* (10mm) *Pseudomonas sp* (13mm). y *Klebsiella sp* (9mm), considerando que las nanopartículas formadas tuvieron un tamaño promedio 21.9 nm.

La síntesis de nanopartículas de plata podría atribuirse a la enzima nitrato reductasa. La cual es producida aerobiamente e inducida por el nitrato del medio. El nitrato es esencial para la formación de enzimas y la adición de la peptona al medio aumenta la producción de enzimas estimulando también el crecimiento bacteriano (Vaidyanathan *et al*, 2010). Por lo tanto, se determinó que el caldo luria como el medio de cultivo idóneo cuyos componentes son: peptona (10g/L), extracto de levadura(5g/L) y cloruro de sodio(10g/L). Se sabe que la glucosa es un inductor indirecto de la actividad de nitrato reductasa al desempeñar un papel en el aumento de la producción de biomasa, en lugar de la enzima misma. Los componentes propios medio elegidos podrían resultar determinantes en la producción y actividad de nitrato reductasa en comparación con otros medios empleados en diferentes artículos revisados.

A consecuencia de lo anteriormente expuesto y para comprender el mecanismo de síntesis de nanopartículas a partir de proteínas extracelulares secretadas por *P.aeruginosa* , el análisis de proteínas se llevó a cabo utilizando SDS-PAGE al 12% con gel de resolución , donde se compara nanopartículas sintetizadas con Nitrato de plata (0.01M y 0.001M) y volumen un 5mL del sobrenadante, como control se tomó en cuenta el sobrenadante. Los resultados obtenidos mostraron que solo en el sobrenadante se detectó la presencia de varias bandas de 95KDa, 80KDa, 75KDa, 50KDa. Punjabi *et al* 2017 llevaron a cabo un estudio que en muestras que contenían NPs Ag, la detección de proteínas mediante SDS-PAGE en combinación con el espectrofotómetro de masas (MALDI-TOF) e integrado a un software MASCOT detectaron las siguientes proteínas: en el sobrenadante: Cofactor de molibdeno guanililtransferasa (12KDa), endodesoxirribonucleasa (30KDa) , 3-fosfoshikimato 1- carboxiviniltransferasa (35 KDa), Difosfato reductasa (40KDa), Adenilato quinasa (43KDa), Quinasa shikimato (47KDa),NADH-quinoneoxidoreductase subunidad 1 (55 KDa), NADH-quinoneoxidoreductase subunidad B (60KDa), Enoyl- [acyl-carrier-protein] reductase [NADH] (65KDa, D-aminoácido deshidrogenasa (90 KDa). En contraste con las muestras que contenían nanopartículas se presentaron las siguientes proteínas: detectaron Quinasa shikimato(47KDa), Adenilato quinasa (43KDa), difosfato reductasa (40 KDa), endodesoxirribonucleasa (30KDa), donde las proteínas de tipo oxidoreductasa se presentaban con mayor frecuencia.

Otros estudios realizados por Ali *et al* 2019, reportaron la purificación de la enzima nitrato reductasa como el agente reductor que guía formación de nanopartículas y que está presente la fracción extracelular de una cepa *Pseudomonas aeruginosa*. La presencia de esta enzima se mediante SDS-PAGE se determinó mediante SDS-PAGE y las proteínas se visualizaron mediante tinción con azul brillante Coomassie R-250, el tamaño molecular del nitrato purificado la reductasa fue de 65 KDa.



## 7. CONCLUSIONES

De la presente investigación se concluye que:

- La cepa bacteriana fue caracterizada como *Pseudomonas aeruginosa* mediante PCR múltiple y espectrofotometría de masas en tiempo de vuelo (MALDI-TOF).
- La optimización de la síntesis de nanopartículas fue definida por un protocolo, obteniendo resultados óptimos con la muestra 3, la cual fue definida entre la interacción del agente reductor (fracción extracelular) y el agente precursor (nitrato de plata).
- las nanopartículas de plata sintetizadas con la fracción extracelular de *P. aeruginosa* produjeron plasmones entre los 414nm y 421nm, lo que indica que las nanopartículas de plata con este agente reductor son pequeñas, estables, de cantidad satisfactoria, de adecuada polidispersión.
- Mediante la técnica DLS se registró el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas sintetizadas exhibiendo como tamaño promedio: 90.3 nm, 47.3 nm y 57.4 nm para M1, M2, M3 respectivamente.
- Los resultados en cuanto a la inhibición del crecimiento bacteriano sugieren que las nanopartículas de plata presentaron un efecto antibacteriano importante y determinante al enfrentarlos frente a *P. aeruginosa*
- El método utilizado para síntesis es relativamente sencillo en contraste de otros en la literatura revisada, por la tanto no es necesario utilizar altas temperaturas para este proceso asimismo el tiempo de reacción fue muy breve, lo que permite que se convierta en un método rápido y práctico

## 8. RECOMENDACIONES

La principal limitación al ejecutar esta investigación involucro la disponibilidad y falta de capacitación de algunos centros donde los equipos microscopia principalmente aquellos involucrados la caracterización de materiales en escala nanométrica no están adecuadamente equipados o prescinde de personal que pueda dar uso y mantenimiento de los mismos, lo cual ocasiona un gran desventaja sobre todo en esta investigación, donde fue necesario conocer la morfología de estos nanomateriales con la finalidad de predecir y comprender como podrían intervenir los nanomateriales en el mecanismo de defensa bacteriano.

Es imprescindible replicar más ensayos donde se enfatice en el uso directo de enzimas de cepas bacterianas, realizando pruebas moleculares como zimografía, con el fin de detectar la actividad enzimática. Asimismo, para tener un mejor control en el tamaño de nanopartículas es necesario establecer condiciones que involucren la optimización de parámetros como: Temperatura, una adecuada relación entre el agente reductor (biomoléculas presentes plantas, hongos, algas y bacterias) y agente precursor (metales) y tiempo de reacción ya tienen gran influencia sobre el tamaño y la estabilidad

A pesar que el desarrollo de la nanotecnología y en especial en las áreas de salud comienza una batalla a grandes rasgos y sin contemplación, con la cual se podría en corto plazo solucionar los grandes problemas que presentan entorno a ella; así mismo la falta de colaboración del estado limita un desarrollo optimo con el cual se podría solucionar la resistencia antimicrobiana citando un ejemplo tan común la actualidad y principalmente en ambientes nosocomiales donde la protección y prevención deberían ser revisadas detenidamente.

## 9. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Ali, J., Ali, N., Wanga, L., Waseem, H., Pan, G. Revisiting the mechanistic pathways for bacterial mediated synthesis of noble metal nanoparticles. *Journal of Microbiological Methods* 159 (2019) 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.02.010>.
2. Baláz', M., Daneu, N., Baláz'ová, L., Dutková, E., Tkáč'íková, L., Brianc'in, J., Vargová, M., Baláz'ová, M., Zorkovská, A., Baláz', P. Bio-mechanochemical synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activity. *Advanced Powder Technology* xxx (2017) xxx–xxx. <https://doi.org/10.1016/j.apt.2017.09.028>
3. Balouirin, M., Sadiki, M., Ibsouda, S (2015). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
4. Bansal, P., Singh, J and Kumar, S (2014). Biogenesis of nanoparticles: A review. *African Journal of biotechnology*. Vol. 13(28), pp2778-2785.
5. Breidenstein EB, de la Fuente-Nunez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol*. 2011 Aug;19(8):419-26.
6. Brenner DJ., Staley JT., Krieg NR. Clasification of procaryotic organism and the concept of bacterial speciation. In: D.R Boone, R. W Castenholz, G.M Garrity (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Springer-Verlag. New York. 2001; 1:27-31.
7. Bruker. (2012). Bruker Guide to MALDI Sample Preparation. Obtenido de [www.carebdal.com](http://www.carebdal.com).
8. Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM. *Bergey's manual of systematic bacteriology* / George M. Garrity, editor-in-chief. 2nd ed. New York: Springer; 2001.
9. Camacho Jesús. 2013. Síntesis de nanopartículas de plata y modificación con pulpa de papel para aplicación antimicrobial. Tesis pregrado.

10. Cars, O & Nordberg, O. 2004. Antibiotic resistance-The faceless threat In: The global threat of antibiotic resistance: Exploring roads towards concerted action. A multidisciplinary meeting at the Dag Hammarskjöld Foundation Uppsala Sweden.
11. Clark, A., Kaleta, E., Arora, A., Wolk, D. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. July 2013 Vol 26 Number 3. *Clinical Microbiology Reviews* p. 547– 603.
12. Croxatto A., Prod'homme G., & Greub G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 36: 380-407.
13. Conway GC., Smole SC., Sarracino DA., Arbeit RD., & Leopold PE. (2001). Phyloproteomics: species identification of Enterobacteriaceae using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 3: 103-112.
14. Durán, N., Marcato, P., Durán, A., Yadav, A., Gade, A., Rai, M. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. *Appl Microbiol Biotechnol* (2011) 90:1609–1624.
15. Ealias, A and Saravanakumar, M. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *Materials Science and Engineering* 263 (2017) 032019.
16. Ellington, M. J., J. Kistler, D. M. Livermore, and N. Woodford, 2007. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases: *J Antimicrob Chemother*, v. 59, p. 321-2.
17. Escárcega, C., Garza, J., Vázquez, A., Morones, J. Bacterial Exopolysaccharides as Reducing and/or Stabilizing Agents during Synthesis of Metal Nanoparticles with Biomedical Applications. *International Journal of Polymer Science*. Volume 2018.

18. Feng, Q., Wu, J., Chen, G.Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., & Kim, J. O. (2000): A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52, 662-668. doi: 10.1002/1097-4636.
19. Ferrari, S.; Guzmán, G.; Silva, P.; Alcaráz, L.; Silva, H. y González, D. (2004). Captación de Cadmio por biomasa libre o inmovilizada de *Nostoc minutum* (Cianobacteria filamentosa); *Acta toxicologica Argentina*, 12 (1); 19-22. Recuperado de <http://www.toxicologia.org.ar/wpcontent/uploads/2016/05/Volumen-12-Nro.-1-Julio-2004.pdf>.
20. Ferreira, L., González-ávila, M., Sánchez-juanes, F., Vega-casta, S., García-garcía, M. I., García-sánchez, J. E., Mu, L. (2012). Eficacia de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias, 30(10), 597–601. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.03.002>
21. Fenselau, C and Demirev PA. 2001. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 20: 157-171.
22. Fritsche T, Sader H, Toleman M, Walsh T, Jones R. Emerging Metallo- $\beta$ -lactamase mediated resistances: a summary report from worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. *CID* 2005; 41: S276-S278.
23. Fu, J.K.; Zhang, W.D.; Liu, Y.Y.; Lin, Z.Y.; Yao, B.X. & Weng, S.Z. Characterization of adsorption and reduction of noble metal ions by bacteria. *Chem. J. Chinese Universities* 1999, 20(9).; 1452-1454.
24. Fu, M.; Li, Q.; Sun, D.; Lu, Y.; He, N.; Deng, X.; Wang, H. & Huang, J. Rapid preparation process of silver nanoparticles by bioreduction and their characterizations". *Chinese J. Chem. Eng.* 2006, 14(1).; 114 -117.
25. Ganesh, C and Kumar, S. Extracellular synthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 84 (2011) 462–466.

26. Gessard, C. Classic in infectious diseases: On the blue and green coloration that appears on the bandage. *Rev.Infect. Dis.*1984; Suppl.3:S775-S776. [https://doi.org/10.1093/clinids/6.Supplement\\_3.S775](https://doi.org/10.1093/clinids/6.Supplement_3.S775)
27. Giebel R, Worden C, Rust SM, Kleinheinz GT, Robbins M, and Sandrin TR. 2010. Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-offlight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. *Adv Appl Microbiol.* 71: 149-184.
28. Gurunathan S, Lee KJ, Kalishwaralal K, Sheikpranbabu S, Vaidyanathan R, Eom SH (2009a) Antiangiogenic properties of silver nanoparticles. *Biomaterials* 30:6341–6350.
29. Hirakata, Y., R. Srikumar, et al. (2002). "Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*." *J Exp Med* 196: 109-118.
30. Horton, M. A. and Khan, A. (2006): *Medica nanotechnology in the UK: a perspective from the London Centre for Nanotechnology. Nanomedicine*, 2: 42– 48.
31. Hosokam, M., Noyi, K., Naito, M., & Yokoyama, T. (2007). *Nanoparticle Technology Handbook*. Recuperado: <https://books.google.com.pe/books?hl=en&lr=&id=3084DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Nanoparticle+Technology+Handbook&ots=AjR7K8rLew&sig=jEh8CviLwhzefZGNggx6LlvBcHo#v=onepage&q=Nanoparticle%20Technology%20Handbook&f=false>
32. Hu, B., Wang, S., Wang, K., Zhang, M, Yu, S. “Microwave-assisted rapid facile “green” synthesis of uniform silver nanoparticles: self-assembly into multilayered films and their optical properties” . *J. Phys. Chem. C.* 2008, Vol. 112, pp. 11169-11174.
33. Huang, H., Jenateur, D., Pattus, F., Hancock, R. Membrane topology and site-specific mutagénesis of *Pseudomonas aeruginosa* porin OprD. *Mol Microbiol* 1995;16(5):993-941.

34. Iravani, S. (2011) Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem.*, 13, 2638–2650.
35. Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V., & Zolfaghari, B. (2014) Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Res. Pharm. Sci.*, 9(6), 385-406.
36. Kim, J., Kuk, E., Yu, K., Kim, J., Park, S., Lee, H., Kim, S., Park, K., Park, J., D.H.Hwang, C., Cho, M. “Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*”. 2007, Vol. 1, pp. 95-101. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>.
37. Kim, J., Rheem, Y., Yoo, B., Chong, Y., Bozhilov, K.N., Kim, D., Sadowsky, M.J., Hur, H.G., Myung, N.V. (2005) Peptide-mediated shape- and size-tunable synthesis of gold nanostructures. *Acta Biomaterialia*, 6(7), 2681-2689. doi: [10.1016/j.actbio.2010.01.019](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.01.019).
38. Koneman EW. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott; 1997.
39. Kumar, C. S. (Ed.). UV-VIS and Photoluminescence Spectroscopy for Nanomaterials Characterization. Springer, 2013; pp 5-7.
40. Kumar, S.A., Abyaneh, M.K., Gosavi, S.W., Kulkarni, S.K., Pasricha, R., Ahmad, A., & Khan, M.I. (2007). Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO<sub>3</sub>. *Biotechnol Lett.* 29(3), 439–445. doi: [10.1007/s10529-006-9256-7](https://doi.org/10.1007/s10529-006-9256-7)
41. Li, X., Xu, H., Chen. Z.S., & Chen G. (2011). Biosynthesis of Nanoparticles by Microorganisms and Their Applications. *Journal of Nanomaterials*, 2011, 1-16. doi: [10.1155/2011/270974](https://doi.org/10.1155/2011/270974).
42. Livermore, D. (2001). "Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems." *J Antimicrob Chemother* 47: 247-250.
43. Livermore, D. (1995). B-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*; 8:557-84.

44. Mandell, GL., Bennett JE., Dolin R. Mandell, Douglas., & Bennett's. (2010). Principles and practice of infectious diseases. 7th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier.
45. Malvern (2017). *Intensity - Volume - Number*. (2017). Recuperado 29 septiembre 2019, de: <https://www.malvern.com/en/support/resource-center/technicalnotes/>
46. March G. 2014. Nuevos protocolos basados en espectrometría de masas y citometría de flujo para un diagnóstico microbiológico rápido. Tesis doctoral.
47. McNeil, S. E. (2005). Nanotechnology for the biologist. *Journal of Leukocyte Biology*. 78, 585-594, doi: [10.1189/jlb.0205074](https://doi.org/10.1189/jlb.0205074).
48. Mohanraj, V., & Chen, Y. (2006). Nanoparticles – A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5, 561-573.
49. Morones J, Elechiguerra J, Camacho A, Holt K, Kouri J, Ramirez J, Yacaman M. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16 (2005) 2346–2353. doi:10.1088
50. Murray, R & Beveridge, T. Sites of Metal Deposition in the Cell Wall of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, Feb. 1980, p. 876-887.
51. Murray PR, Baron EJ. *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. Washington, D.C.: ASM Press; 2007.
52. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical microbiology*. 6th ed. Philadelphia: Mosby/Elsevier; 2009.
53. Mohanpuria P, Rana N & Kumar S. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *J Nanopart Res* (2008) 10:507–517.
54. Moyer C, Brentano L, Gravens D, Margraf H, Monafó W. Treatment of Large Human Burns With 0.5% Silver Nitrate Solution. 1965. *Arch Surg*. Vol 90



55. Nasreen, H & Taranath, T. Biosynthesis of nanoparticles using microbes—A review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 121 (2014) 474–483.
56. Narayanan KB, Sakthivel N. (2010). Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 156(1-2), 1-13.doi: [10.1016/j.cis.2010.02.001](https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.02.001).
57. OPS/OMS. (8 de junio de 2019). Enterobacterias con resistencia transferible a colistina, implicaciones para la salud pública en las Américas. Alerta Epidemiológica. Washington, Estados Unidos. 67 Recuperado <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wpcontent/uploads/2016/06/Enterobacterias-con-resistencia-transferiblea-colistina.pdf>.
58. Pagniez, G., Radice, M., Cuirolo, A., Rodríguez, O., Rodríguez, H., Vay, C., Gutkind, G. (2006). Prevalencia de metalo- $\beta$ -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes en un Hospital Universitario de Buenos Aires. *Revista Argentina de Microbiología*, 38(1), 33-37.
59. Palleroni NJ, Ballard RW, Ralston E, Doudoroff M. Deoxyribonucleic acid homologies among some *Pseudomonas* species. *J Bacteriol.* 1972 Apr;110(1):1-11.
60. Palleroni, N., Brenner, D., Krieg, N., Staley, J., & Garrity, M. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. doi: 10.1007/0-387-28022-7.
61. Palleroni NJ. The *Pseudomonas* story. *Environ Microbiol.* 2010 Jun;12(6):1377-83.
62. Palleroni, N., Brenner, D., Krieg, N., Staley, J., & Garrity, M. (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. doi: 10.1007/978-0-387-68233-4.
63. Panacek, A., Kvitek, L., Prucek, R., Kolar, M., Vecerova, R., Pizurova, N., Sharma, V. K., Nevecna, T., and Zboril, R. 2006. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J. Phys. Chem. B* 110:16248- 16253.

64. Pantidos, N., & Horsfall L.E. (2014). Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles by Bacteria, Fungi and Plants. *Journal Nanomed Nanotechnol* 5(5). doi: 10.4172/2157-7439.1000233.
65. Poole, C. & Owens, F. (2003). Introduction to Nanotecnología. Recuperado de <https://startinnovationblog.files.wordpress.com/2015/12/nanotechnology-by>.
66. Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009) Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27(1), 76-83. doi: [10.1016/j.biotechadv.2008.09.002](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002).
67. Salahuddin, K., Husen, A., Rao, R. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J Nanobiotechnol* (2018) 16:14.
68. Sambrook J, Russell D. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 3° Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboartory Press.
69. Sastry M, Rao M, & Ganesh K. Electrostatic Assembly of Nanoparticles and Biomacromolecules *Acc. Chem2002. Res.*, **35** (10), 847 -855.
70. Schmitz, S. *An introduction to dynamic light scattering of macromolecules*. Academic Press Inc: San Diego, CA (USA), 1990.
71. Shankar S y Rhim J. Amino acid mediated synthesis of silver nanoparticles and preparation of antimicrobialagar/silver nanoparticles composite films, *Carbohydr. Polym.* 130 (2015) 353-363.
72. Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P., and Dash, D. 2007. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology* 18:1-9. doi:10.1088/0957-4484/18/22/225103.
73. Silby, M. W., C. Winstanley, S. A. Godfrey, S. B. Levy, and R. W. Jackson, 2011, *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable: *FEMS Microbiol Rev*, V. 35, p. 652-80.
74. Singh, P., Kim, Y.J., Zhang, D., Yang, D.C. Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. *Trends Biotechnol.* 2016; 34: 588–599.

75. Singh, H; Du, J; Singh, P; Yi, J. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by *Pseudomonas sp.* THG-LS1.4 and their antimicrobial application. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2018.
76. Sondi, I. & Salopek-Sondi, B. 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J.Colloid Interface Sci.* 275:177-182.
77. Thakkar, KN., Mhatre, SS & Parikh, RY. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine*, 6(2), 257-262. doi: [10.1016/j.nano.2009.07.002](https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.07.002).
78. Vaidyanathan, R.; Gopalram, S.; Kalishwaralal, K.; Deepak; V.; Pandian, S. R. K. and Gurunathan, S. (2010): Enhanced silver nanoparticle synthesis by optimization of nitrate reductase activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 75: 335–341.
79. Yoon, K. Y., Byeon, J. H., Park, J. H., Hi, J. H., Bae, G. N., and Hwang, J. 2008. Antimicrobial Characteristics of Silver Aerosol Nanoparticles against *Bacillus subtilis* Bioaerosols. *Environmental Engineering Science* 25:289-294.pall.
80. Zhang, F., Wu, X., Chen, Y., Lin, H. “Application of Silver Nanoparticles to Cotton Fabric as an Antibacterial Textile Finish”. *Fibers and Polymers*. 2009, Vol. 10, 4, pp. 496-501. [10.1007/s12221-009-0496-8](https://doi.org/10.1007/s12221-009-0496-8)

## 10. ANEXOS

Ficha de resultados al utilizar dispersión de luz dinámica para cada muestra

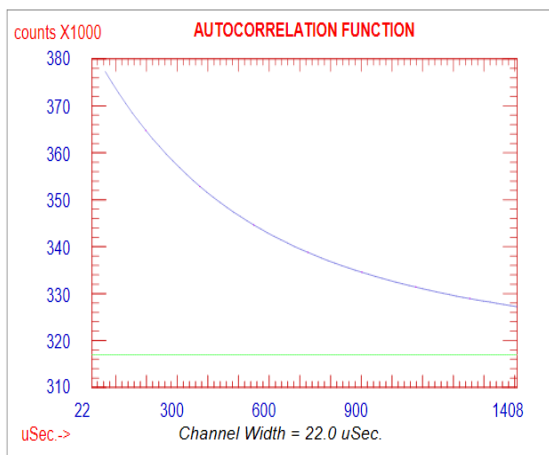
Particle Sizing Systems, Inc.  
Santa Barbara, Calif., USA

Sample  
Data File: C:\2019\BRYAN\AgNPs-L-44h-1FE-9AgNO3 12:54:2 4/26/2019

### Autocorrelation Function

#### GAUSSIAN SUMMARY:

Mean Diameter = 183.1 nm	Variance (P.I.) = 0.410
Std. Deviation = 117.2 nm (64.0%)	Chi Squared = 16.653
Norm. Std. Dev. = 0.640	Baseline Adj. = 0.000 %
(Coeff. of Var'n)	Z-Avg. Diff. Coeff. = 2.54E-008 cm2/s
Run Time = 0 Hr 5 Min 12 Sec	Wavelength = 632.8 nm
Count Rate = 311 KHz	Temperature = 23 deg C
Channel #1 = 382.4 K	Viscosity = 0.933 cp
Channel Width = 22.0 uSec	Index of Ref. = 1.333



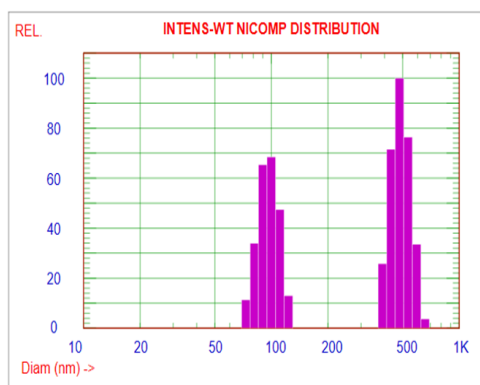
Particle Sizing Systems, Inc.  
Santa Barbara, Calif., USA

Sample  
Data File: C:\2019\BRYAN\AgNPs-L-44h-1FE-9AgNO3 12:54:2 4/26/2019

### INTENSITY-Weighted NICOMP DISTRIBUTION Analysis (Solid Particle)

#### NICOMP SUMMARY:

Peak #1: Mean Diam. = 98.0 nm, S.Dev. = 11.1 nm (11.30%) Intens. = 40.65 %  
Peak #2: Mean Diam. = 487.3 nm, S.Dev. = 65.2 nm (13.38%) Intens. = 59.35 %



AgNPs-L-44h-1FE-9AgNO3

Mean Diameter = 318.5 nm Fit Error = 3.603 Residual = 0.000

#### NICOMP SCALE PARAMETERS:

Min. Diam. = 10 nm Plot Size = 45  
Smoothing = 3 Plot Range = 100

#### GAUSSIAN SUMMARY:

Mean Diameter = 183.1 nm	Variance (P.I.) = 0.410
Std. Deviation = 117.2 nm (64.0%)	Chi Squared = 16.653
Norm. Std. Dev. = 0.640	Baseline Adj. = 0.000 %
(Coeff. of Var'n)	Z-Avg. Diff. Coeff. = 2.54E-008 cm2/s
Run Time = 0 Hr 5 Min 12 Sec	Wavelength = 632.8 nm
Count Rate = 311 KHz	Temperature = 23 deg C
Channel #1 = 382.4 K	Viscosity = 0.933 cp
Channel Width = 22.0 uSec	Index of Ref. = 1.333

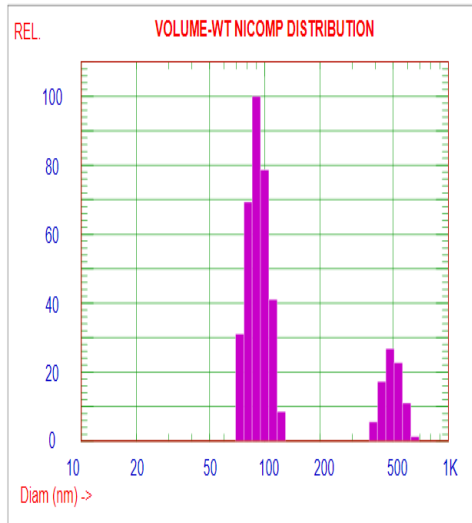
Sample

Data File: C:\2019\BRYAN\AgNPs-L-44h-1FE-9AgNO3 12:54:2 4/26/2019

**VOLUME-Weighted NICOMP DISTRIBUTION Analysis (Solid Particle)**

**NICOMP SUMMARY:**

Peak #1: Mean Diam. = 91.6 nm, S.Dev. = 13.0 nm (14.24%) Vol= 78.86 %  
Peak #2: Mean Diam. = 493.9 nm, S.Dev. = 61.1 nm (12.36%) Vol= 21.14 %



AgNPs-L-44h-1FE-9AgNO3

Mean Diameter = 175.3 nm Fit Error = 3.603 Residual = 0.000

**NICOMP SCALE PARAMETERS:**

Min. Diam. = 10 nm Plot Size = 45  
Smoothing = 3 Plot Range = 100

**GAUSSIAN SUMMARY:**

Mean Diameter = 72.9 nm	Variance (P.I.) = 0.410
Std. Deviation = 46.6 nm (64.0%)	Chi Squared = 16.653
Norm. Std. Dev. = 0.640	Baseline Adj. = 0.000 %
(Coeff. of Var'n)	Z-Avg. Diff. Coeff. = 2.54E-008 cm2/s
Run Time = 0 Hr 5 Min 12 Sec	Wavelength = 632.8 nm
Count Rate = 311 KHz	Temperature = 23 deg C
Channel #1 = 382.4 K	Viscosity = 0.933 cp
Channel Width = 22.0 uSec	Index of Ref. = 1.333

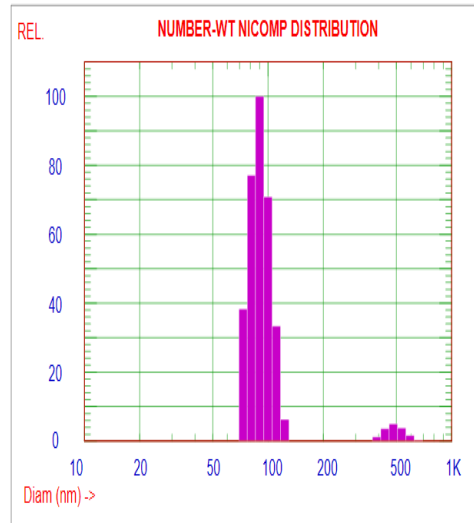
Sample

Data File: C:\2019\BRYAN\AgNPs-L-44h-1FE-9AgNO3 12:54:2 4/26/2019

**NUMBER-Weighted NICOMP DISTRIBUTION Analysis (Solid Particle)**

**NICOMP SUMMARY:**

Peak #1: Mean Diam. = 90.3 nm, S.Dev. = 13.8 nm (15.33%) Num= 95.22 %  
Peak #2: Mean Diam. = 487.3 nm, S.Dev. = 65.2 nm (13.38%) Num= 4.78 %



AgNPs-L-44h-1FE-9AgNO3

Mean Diameter = 109.1 nm Fit Error = 3.603 Residual = 0.000

**NICOMP SCALE PARAMETERS:**

Min. Diam. = 10 nm Plot Size = 45  
Smoothing = 3 Plot Range = 100

**GAUSSIAN SUMMARY:**

Mean Diameter = 27.9 nm	Variance (P.I.) = 0.410
Std. Deviation = 17.9 nm (64.0%)	Chi Squared = 16.653
Norm. Std. Dev. = 0.640	Baseline Adj. = 0.000 %
(Coeff. of Var'n)	Z-Avg. Diff. Coeff. = 2.54E-008 cm2/s
Run Time = 0 Hr 5 Min 12 Sec	Wavelength = 632.8 nm
Count Rate = 311 KHz	Temperature = 23 deg C
Channel #1 = 382.4 K	Viscosity = 0.933 cp
Channel Width = 22.0 uSec	Index of Ref. = 1.333

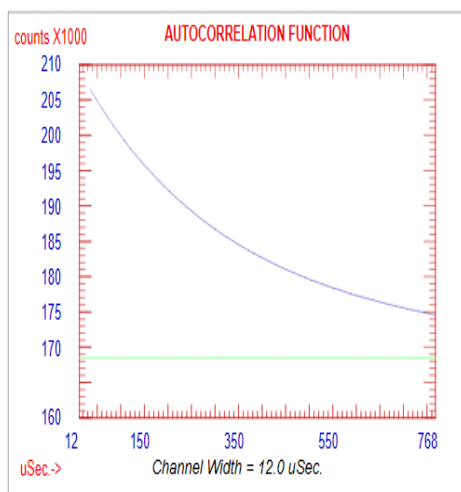
Particle Sizing Systems, Inc.  
Santa Barbara, Calif., USA

Sample  
Data File: C:\2019\BRYAN\AgNPs-L-44h-5FE-5AgNO3 13:11:29 4/26/2019

**Autocorrelation Function**

**GAUSSIAN SUMMARY:**

Mean Diameter = 110.8 nm	Variance (P.I.) = 0.264
Std. Deviation = 57.0 nm (51.4%)	Chi Squared = 5.313
Norm. Std. Dev. = 0.514	Baseline Adj. = 0.000 %
(Coeff. of Var'n)	Z-Avg. Diff. Coeff. = 4.19E-008 cm2/s
Run Time = 0 Hr 5 Min 11 Sec	Wavelength = 632.8 nm
Count Rate = 297 KHz	Temperature = 23 deg C
Channel #1 = 209.3 K	Viscosity = 0.933 cp
Channel Width = 12.0 uSec	Index of Ref. = 1.333



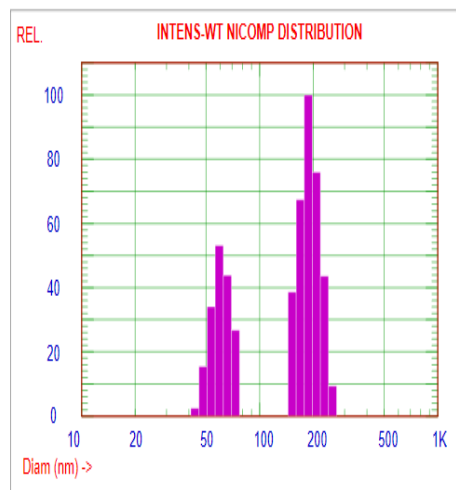
Particle Sizing Systems, Inc.  
Santa Barbara, Calif., USA

Sample  
Data File: C:\2019\BRYAN\AgNPs-L-44h-5FE-5AgNO3 13:11:29 4/26/2019

**INTENSITY-Weighted NICOMP DISTRIBUTION Analysis (Solid Particle)**

**NICOMP SUMMARY:**

Peak #1: Mean Diam. = 60.9 nm, S.Dev. = 7.3 nm (11.96%) Intens. = 34.68 %  
Peak #2: Mean Diam. = 190.0 nm, S.Dev. = 28.3 nm (14.91%) Intens. = 65.32 %



AgNPs-L-44h-5FE-5AgNO3

Mean Diameter = 146.7 nm Fit Error = 3.994 Residual = 0.000

**NICOMP SCALE PARAMETERS:**

Min. Diam. = 10 nm Plot Size = 45  
Smoothing = 3 Plot Range = 100

**GAUSSIAN SUMMARY:**

Mean Diameter = 110.8 nm	Variance (P.I.) = 0.264
Std. Deviation = 57.0 nm (51.4%)	Chi Squared = 5.313
Norm. Std. Dev. = 0.514	Baseline Adj. = 0.000 %
(Coeff. of Var'n)	Z-Avg. Diff. Coeff. = 4.19E-008 cm2/s
Run Time = 0 Hr 5 Min 11 Sec	Wavelength = 632.8 nm
Count Rate = 297 KHz	Temperature = 23 deg C
Channel #1 = 209.3 K	Viscosity = 0.933 cp
Channel Width = 12.0 uSec	Index of Ref. = 1.333

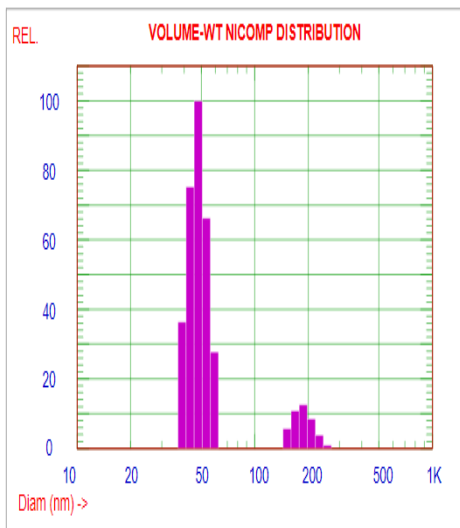
Sample

Data File: C:\2019\BRYAN\AgNPs-L-44h-3FE-7AgNO3 13:2:11 4/26/2019

**VOLUME-Weighted NICOMP DISTRIBUTION Analysis (Solid Particle)**

**NICOMP SUMMARY:**

Peak #1: Mean Diam. = 48.0 nm, S.Dev. = 5.0 nm (10.38%) Vol= 88.87 %  
Peak #2: Mean Diam. = 185.9 nm, S.Dev. = 21.7 nm (11.68%) Vol= 11.13 %



AgNPs-L-44h-3FE-7AgNO3

Mean Diameter = 64.9 nm Fit Error = 6.354 Residual = 0.000

**NICOMP SCALE PARAMETERS:**

Min. Diam. = 10 nm Plot Size = 45  
Smoothing = 3 Plot Range = 100

**GAUSSIAN SUMMARY:**

Mean Diameter = 69.6 nm	Variance (P.I.) = 0.256
Strnd. Deviation = 35.2 nm (50.6%)	Chi Squared = 16.711
Norm. Strnd. Dev. = 0.506	Baseline Adj. = 0.010 %
(Coeff. of Var'n)	Z-Avg. Diff. Coeff. = 3.41E-008 cm2/s
Run Time = 0 Hr 5 Min 12 Sec	Wavelength = 632.8 nm
Count Rate = 329 KHz	Temperature = 23 deg C
Channel #1 = 289.2 K	Viscosity = 0.933 cp
Channel Width = 15.0 uSec	Index of Ref. = 1.333

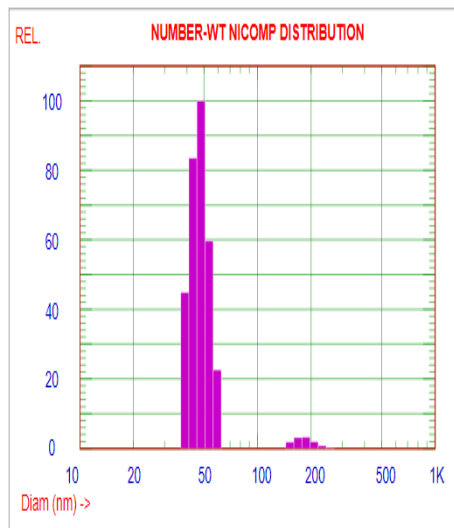
Sample

Data File: C:\2019\BRYAN\AgNPs-L-44h-3FE-7AgNO3 13:2:11 4/26/2019

**NUMBER-Weighted NICOMP DISTRIBUTION Analysis (Solid Particle)**

**NICOMP SUMMARY:**

Peak #1: Mean Diam. = 47.3 nm, S.Dev. = 4.9 nm (10.42%) Num= 96.89 %  
Peak #2: Mean Diam. = 183.2 nm, S.Dev. = 21.1 nm (11.55%) Num= 3.11 %



AgNPs-L-44h-3FE-7AgNO3

Mean Diameter = 52.0 nm Fit Error = 6.354 Residual = 0.000

**NICOMP SCALE PARAMETERS:**

Min. Diam. = 10 nm Plot Size = 45  
Smoothing = 3 Plot Range = 100

**GAUSSIAN SUMMARY:**

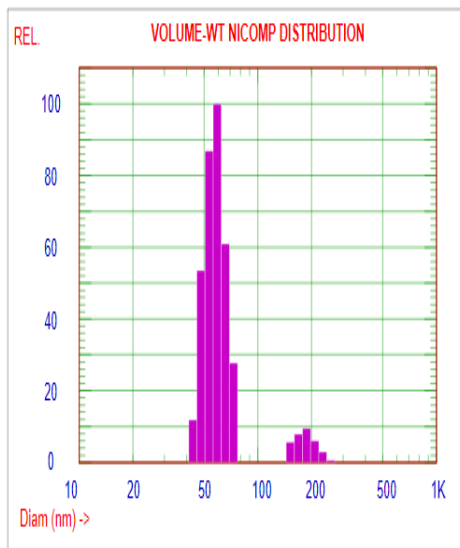
Mean Diameter = 31.3 nm	Variance (P.I.) = 0.256
Strnd. Deviation = 15.9 nm (50.6%)	Chi Squared = 16.711
Norm. Strnd. Dev. = 0.506	Baseline Adj. = 0.010 %
(Coeff. of Var'n)	Z-Avg. Diff. Coeff. = 3.41E-008 cm2/s
Run Time = 0 Hr 5 Min 12 Sec	Wavelength = 632.8 nm
Count Rate = 329 KHz	Temperature = 23 deg C
Channel #1 = 289.2 K	Viscosity = 0.933 cp
Channel Width = 15.0 uSec	Index of Ref. = 1.333

Sample  
Data File: C:\2019\BRYAN\AgNPs-L-44h-5FE-5AgNO3 13:11:29 4/26/2019

**VOLUME-Weighted NICOMP DISTRIBUTION Analysis (Solid Particle)**

**NICOMP SUMMARY:**

Peak #1: Mean Diam. = 58.3 nm, S.Dev. = 6.7 nm (11.56%) Vol = 91.32 %  
Peak #2: Mean Diam. = 184.3 nm, S.Dev. = 22.2 nm (12.06%) Vol = 8.68 %



AgNPs-L-44h-5FE-5AgNO3

Mean Diameter = 68.9 nm Fit Error = 3.994 Residual = 0.000

**NICOMP SCALE PARAMETERS:**

Min. Diam. = 10 nm Plot Size = 45  
Smoothing = 3 Plot Range = 100

**GAUSSIAN SUMMARY:**

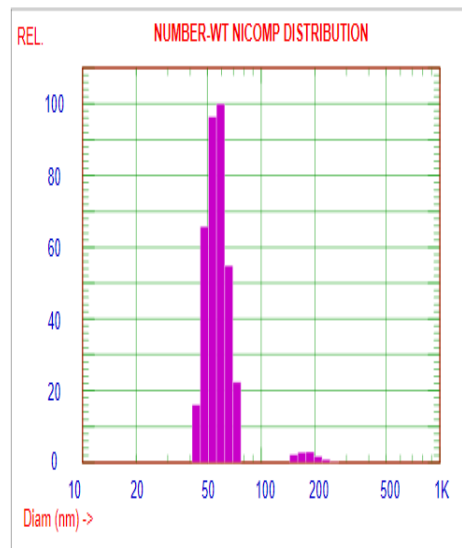
Mean Diameter	= 53.0 nm	Variance (P.I.)	= 0.264
Std. Deviation	= 27.2 nm (51.4%)	Chi Squared	= 5.313
Norm. Std. Dev.	= 0.514	Baseline Adj.	= 0.000 %
(Coeff. of Var'n)		Z-Avg. Diff. Coeff.	= 4.19E-008 cm2/s
Run Time	= 0 Hr 5 Min 11 Sec	Wavelength	= 632.8 nm
Count Rate	= 297 KHz	Temperature	= 23 deg C
Channel #1	= 209.3 K	Viscosity	= 0.933 cp
Channel Width	= 12.0 uSec	Index of Ref.	= 1.333

Sample  
Data File: C:\2019\BRYAN\AgNPs-L-44h-5FE-5AgNO3 13:11:29 4/26/2019

**NUMBER-Weighted NICOMP DISTRIBUTION Analysis (Solid Particle)**

**NICOMP SUMMARY:**

Peak #1: Mean Diam. = 57.4 nm, S.Dev. = 6.7 nm (11.71%) Num = 97.08 %  
Peak #2: Mean Diam. = 181.4 nm, S.Dev. = 21.7 nm (11.95%) Num = 2.92 %



AgNPs-L-44h-5FE-5AgNO3

Mean Diameter = 60.4 nm Fit Error = 3.994 Residual = 0.000

**NICOMP SCALE PARAMETERS:**

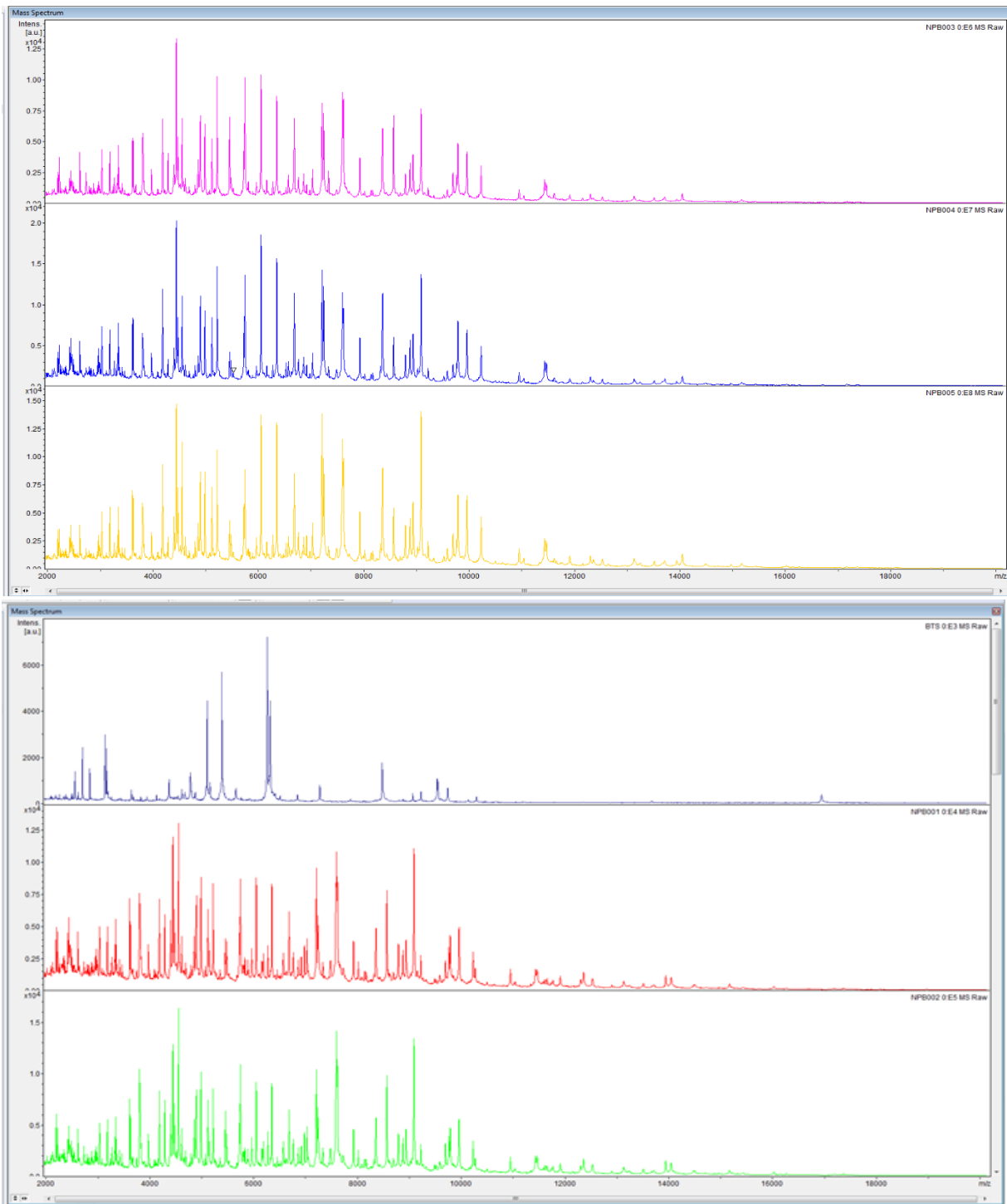
Min. Diam. = 10 nm Plot Size = 45  
Smoothing = 3 Plot Range = 100

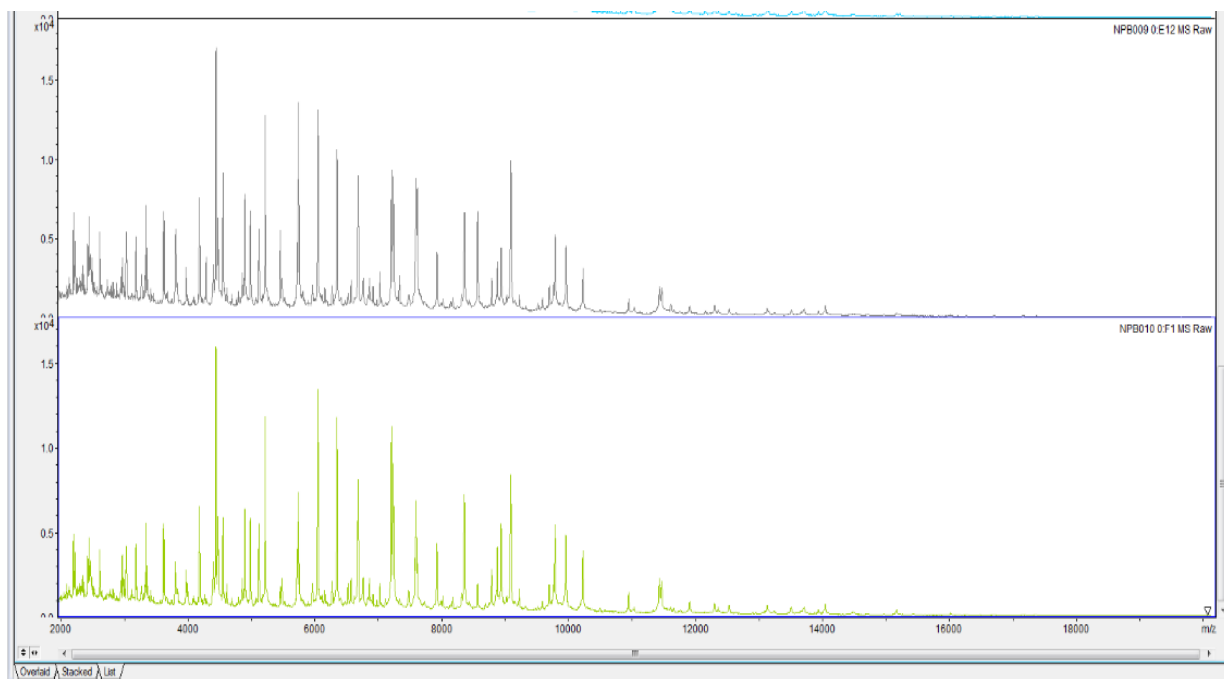
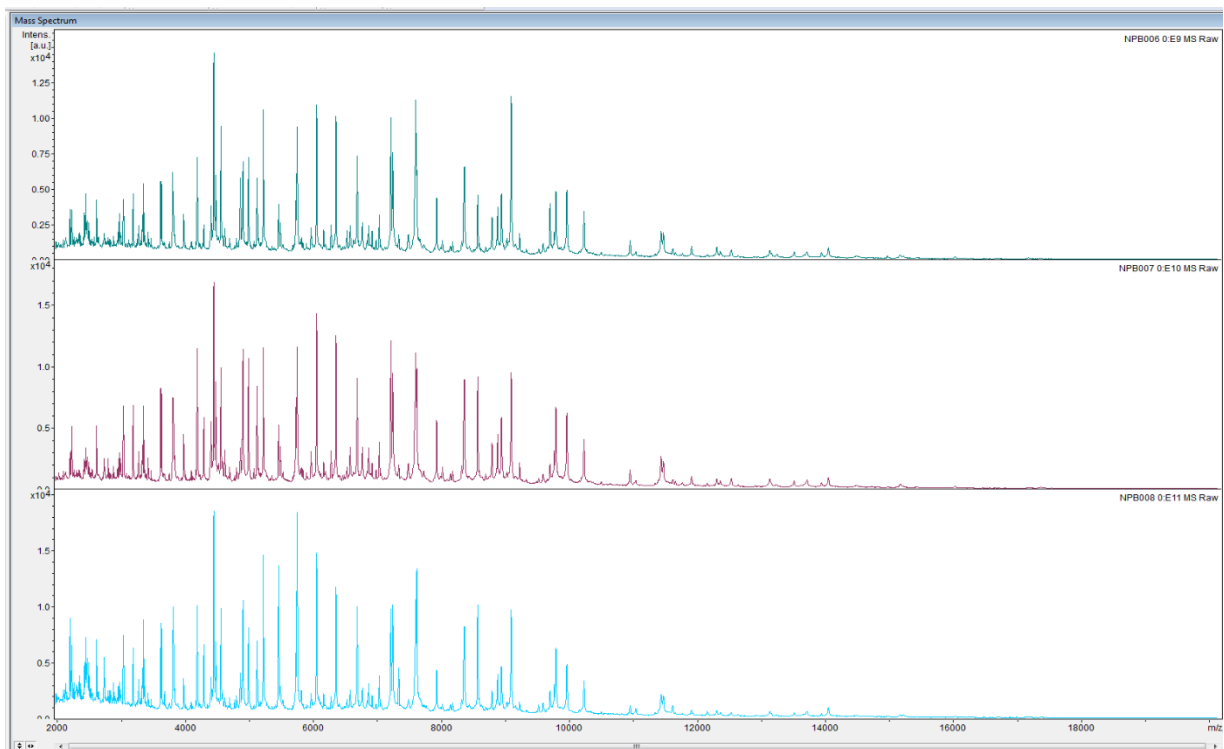
**GAUSSIAN SUMMARY:**

Mean Diameter	= 24.5 nm	Variance (P.I.)	= 0.264
Std. Deviation	= 12.6 nm (51.4%)	Chi Squared	= 5.313
Norm. Std. Dev.	= 0.514	Baseline Adj.	= 0.000 %
(Coeff. of Var'n)		Z-Avg. Diff. Coeff.	= 4.19E-008 cm2/s
Run Time	= 0 Hr 5 Min 11 Sec	Wavelength	= 632.8 nm
Count Rate	= 297 KHz	Temperature	= 23 deg C
Channel #1	= 209.3 K	Viscosity	= 0.933 cp
Channel Width	= 12.0 uSec	Index of Ref.	= 1.333

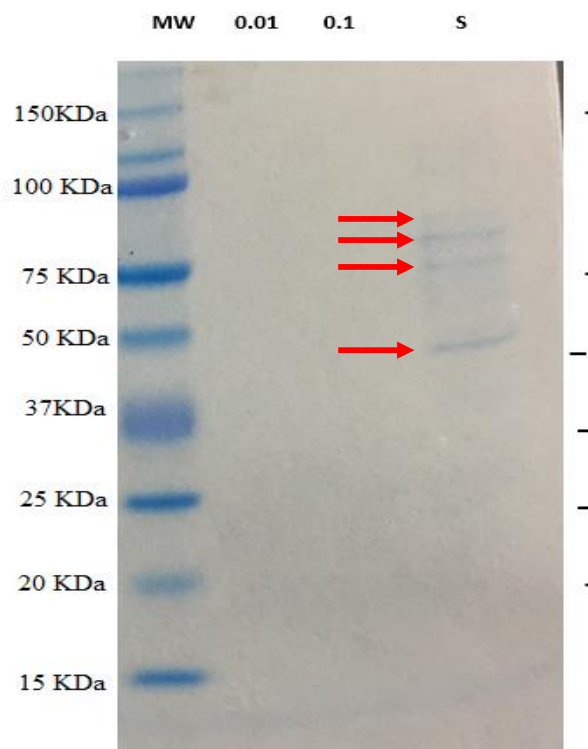


## Diferentes perfiles de proteínas obtenidas para diferentes aislamientos por MALDI-TOF

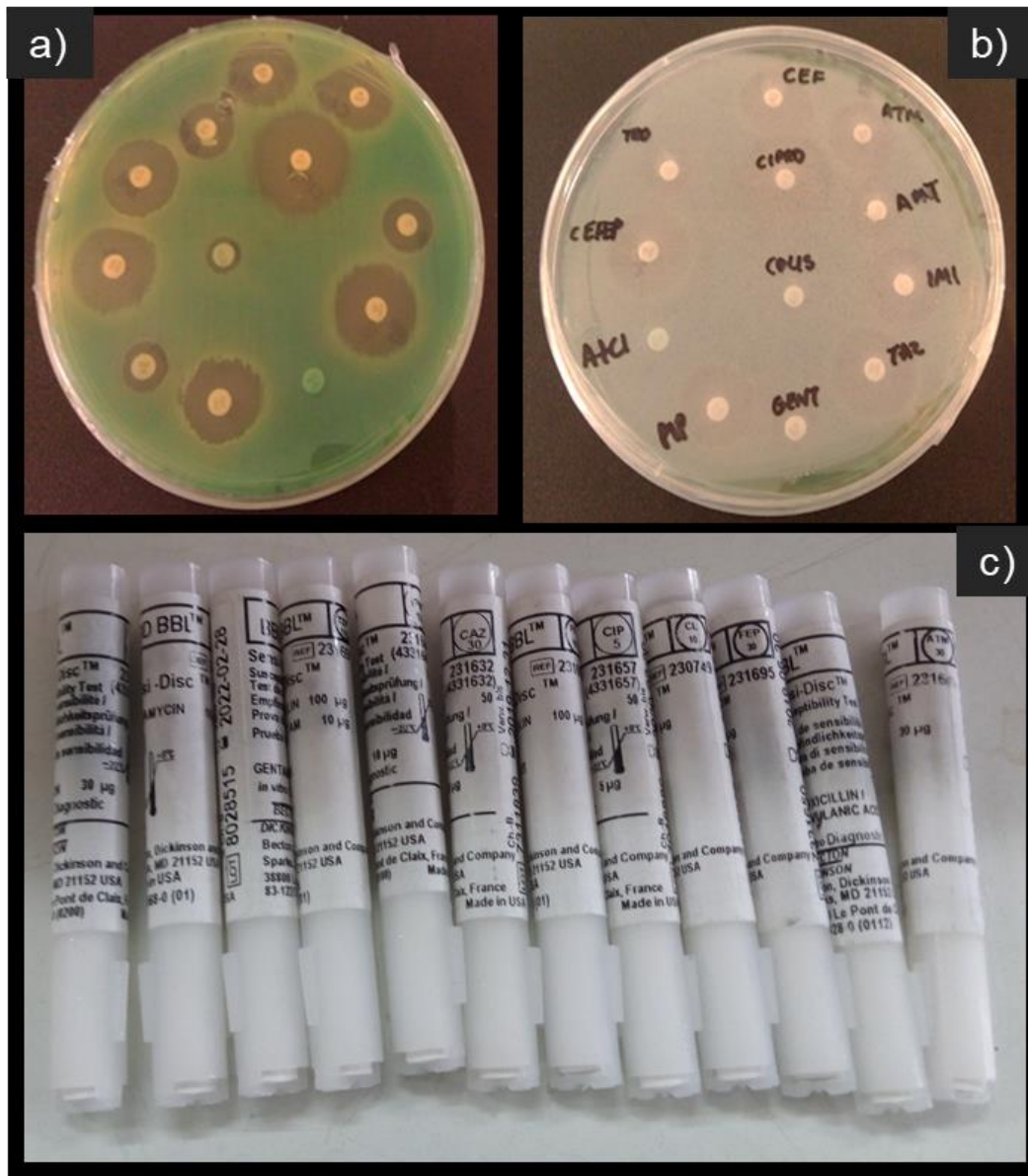




## 12% SDS-PAGE ANALYSIS PROTEINS WITH SIMPLE BLUE SAFE STAIN



SDS-PAGE de nanopartículas sintetizadas con 0.01M y 0.001M de nitrato de plata y sobrenadante. SDS-PAGE se llevó a cabo utilizando 12% de geles de poliacrilamida que contienen SDS al 0,1% y teñidos con 0.1% de azul de Coomassie R-250 después de la electroforesis. Carril 1: marcador de peso molecular MW, carriles 2-3 no hubo presencia de proteínas en el filtrado de hongos y carril 4 proteínas NP presentes del sobrenadante.



**Figura 18.** Prueba de susceptibilidad frente 12 antibióticos (Acorde a la CLSI)

**Tabla 10.** Resultado del antibiograma con 12 antibióticos acorde a CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Contenido del disco</b>	<b>Tamaño</b>
<b>Amoxicilina-ácido clavulanico</b>	20µg-10µg	0 mm
<b>Piperacilina</b>	100 µg	22 mm
<b>Piperacillin-tazobactam (TZP)</b>	100 -10µg	20 mm
<b>Ceftazidima (CAZ)</b>	30 µg	23 mm
<b>Cefepime (FEP)</b>	30 µg	21 mm
<b>Aztreonam (ATM)</b>	30 µg	19 mm
<b>Gentamicina (GM)</b>	30 µg	16 mm
<b>Amikacina (AN)</b>	30 µg	12 mm
<b>Tobramicina</b>	10µg	14 mm
<b>Ciprofloxacina</b>	5 µg	32mm
<b>Colistina (CL)</b>	10µg	12 mm
<b>Imipenem (IPM)</b>	10 µg	23 mm