

# Evaluación del efecto de las nanopartículas de plata sobre microorganismos patógenos

Evaluation of effect of silver nanoparticles on pathogenic microorganisms

Karen Lorena Bolívar-Rodríguez<sup>1</sup>, Felipe Agudelo-Amaya<sup>2</sup> y Yaneth Vásquez-Ochoa<sup>3</sup>

---

---

## Cómo citar:

Bolívar-Rodríguez, K. L., Agudelo-Amaya, F., & Vásquez-Ochoa, Y. (2021). Evaluación del efecto de las nanopartículas de plata sobre microorganismos patógenos. *Ingeciencia*, 6, 91-111

- <sup>1</sup> Bióloga e investigadora de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Básicas de la Universidad Central. Correo: bolivarrodriguez@gmail.com
- <sup>2</sup> Ingeniero químico y M.Sc. en Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Colombia. Profesor asociado de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Básicas de la Universidad Central. Correo: iagudelo@ucentral.edu.co
- <sup>3</sup> Licenciada en Química y Biología de la Universidad Libre de Colombia, M.Sc. en Ciencias Biológicas y Ph.D. en Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Javeriana. Profesora asociada de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Básicas de la Universidad Central. Correo: ovasquezo@ucentral.edu.co

## Resumen

Este estudio evalúa el efecto antimicrobiano *in vitro* de nanopartículas de plata (AgNPs) sobre los microorganismos patógenos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Para esto se sintetizaron AgNPs por reducción de sales de plata y se caracterizaron mediante espectrofotometría UV-Vis, dispersión dinámica de la luz (DLS) y microscopia de fuerza atómica (AFM). Las AgNPs tuvieron forma esférica, con tamaños entre 10 y 32 nm. La eficiencia de las AgNPs se evaluó por el método modificado de Kirby-Bauer con microgotas y usando agar Mueller-Hinton, comparándolas con un control de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ). Se determinó que *E. coli* resistente a ampicilina y *S. aureus* fueron sensibles al uso de AgNPs, con valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de 3,74  $\mu\text{g/mL}$  y 1  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. *C. albicans* no presentó actividad antimicrobiana por las AgNPs, pero sí fue sensible a  $\text{AgNO}_3$  (4250  $\mu\text{g/mL}$ , concentración de plata 2675  $\mu\text{g/mL}$ ).

**Palabras clave:** AgNPs, *Candida albicans*, efecto antimicrobiano, resistencia antimicrobiana, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

## Abstract

This study evaluated the *in vitro* antimicrobial effect of silver nanoparticles (AgNPs) on the pathogenic microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. For this purpose, AgNPs were synthesized by reduction of silver salts and characterized by UV-Vis spectrophotometry, dynamic light scattering (DLS) and atomic force microscopy (AFM). The AgNPs were spherical in shape with sizes between 10 and 32 nm. The efficiency of AgNPs was evaluated by the modified Kirby-Bauer method with microdroplets and using Mueller-Hinton agar, compared to a silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ) control. Ampicillin-resistant *E. coli* and *S. aureus* were found to be sensitive to the use of AgNPs, with MIC values of 3.74  $\mu\text{g/mL}$  and 1  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. *C. albicans* did not show antimicrobial activity for AgNPs, but was sensitive to  $\text{AgNO}_3$  (4,250  $\mu\text{g/mL}$ , silver concentration 2675  $\mu\text{g/mL}$ ).

**Keywords:** AgNPs, antimicrobial effect, antimicrobial resistance, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

## Introducción

Los microorganismos con resistencia a antimicrobianos, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*, son de importancia clínica, pues las enfermedades que provocan se catalogan como crónicas, debido a sus capacidades de infección, tratamiento complejo y fácil propagación (Liao *et al.*, 2019). Por esto se requiere con urgencia producir nuevos compuestos con capacidad antimicrobiana que sean eficaces, seguros y de amplio espectro (Liao *et al.*, 2019).

La *resistencia antimicrobiana* es la capacidad de los microorganismos de contrarrestar el efecto del antibiótico y que su crecimiento no sea inhibido (CLSI, 2012). Por su parte, la *sensibilidad a antimicrobianos* es la efectividad de estos frente a los microorganismos para inhibir su crecimiento (CLSI, 2012). A nivel clínico se realizan pruebas cualitativas y cuantitativas para determinar el nivel de sensibilidad del microorganismo (sensible, intermedio o resistente), clasificaciones estandarizadas por comités internacionales, como el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI), que tienen en cuenta las propiedades microbiológicas, farmacocinéticas y de eficacia clínica (CLSI, 2021). También se evalúa la concentración mínima inhibitoria (CMI), que se define como la concentración más baja del antimicrobiano, en donde se inhibe el crecimiento bacteriano por completo (CLSI, 2012).

*S. aureus* es un coco grampositivo resistente principalmente a la meticilina, que provoca lesiones cutáneas, neumonía o infecciones del tracto urinario, teniendo entre un 25 % y 63 % de mortalidad en personas infectadas (Chirayath *et al.*, 2019), mientras que *E. coli* es un bacilo gramnegativo resistente a la ampicilina y que causa el síndrome urémico hemolítico e infecciones asintomáticas acompañadas de diarreas hemorrágicas; además, presenta las tasas de letalidad y hospitalización más altas en comparación a los demás patógenos de la familia *Enterobacteriaceae* (Rani *et al.*, 2021). Por otro lado, *C. albicans* es un hongo polimórfico resistente a la mayoría de antifúngicos: provoca candidiasis, candidemia y micosis sistémica y es el responsable del 90 % de infecciones fúngicas invasivas en el mundo con tasas de mortalidad del 50 % (D'Enfert *et al.*, 2021).

Estos microorganismos se encuentran frecuentemente en áreas hospitalarias, hecho que aumenta las tasas de infección y morbilidad (Stewardson *et al.*, 2016). Se ha reportado una mayor incidencia de infecciones ocasionadas por *S. aureus* resistente a meticilina (84 %) y de enterobacterias (*Enterobacteriaceae*) resistentes a cefalosporinas de tercera generación (85 %) en hospitales europeos, con el aumento de la mortalidad hospitalaria del 22 % y 16 % en comparación con 1,7 % de pacientes no infectados, una mayor duración en el hospital y altos costos anuales de tratamientos (Stewardson *et al.*, 2016). También se ha encontrado que pacientes con comorbilidades o en tratamiento son más susceptibles a la infección por *C. albicans*, con tasas de mortalidad del 49 % en UCI (D'Enfert *et al.*, 2021).

Esta amenaza a la salud mundial, causada por microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos tradicionales, hace urgente la búsqueda de alternativas a las que los microorganismos sean sensibles. Una posible solución puede ser el uso de nanopartículas de plata (AgNPs) (Liao *et al.*, 2019). La plata se ha usado desde la antigüedad por sus efectos antimicrobianos contra patógenos humanos y animales, como bacterias, hongos, virus, protozoos y artrópodos (Almatroudi, 2020). Generalmente se usa en forma de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) y AgNPs (Almatroudi, 2020). Aunque la composición química de los AgNPs es

idéntica a la de la plata, su tamaño le brinda propiedades físicas distintas, como una mayor capacidad antimicrobiana, así como menos costos en su fabricación (Almatroudi, 2020).

La efectividad antimicrobiana de las AgNPs depende principalmente de su concentración, forma o estructura (por ejemplo, esféricas, triangulares, entre otras), carga superficial y tamaño (Abbaszadegan *et al.*, 2015). En donde nanopartículas de entre 1 y 10 nm presentan mayor actividad bactericida, en comparación con las de tamaños de 100 nm (Agnihotri *et al.*, 2014). Esto se debe a que su gran área superficial les permite unirse desde la pared y membrana celular hasta el ADN microbiano (Abbaszadegan *et al.*, 2015). Agnihotri *et al.* (2014) reportan una efectividad antibacteriana que depende del tamaño y concentración de AgNPs, en comparación con *E. coli* y *S. aureus*, que tienen tamaños entre 5 y 100 nm; de estas, son más eficaces las que tienen un tamaño de 5 nm.

Por otro lado, el estudio de Jalal *et al.* (2018) evaluó AgNPs frente a *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*, con tamaños de entre 2 y 15 nm: se encontró un valor de CMI de 31  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para las bacterias y de 62  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para el hongo. La capacidad antimicrobiana de las AgNPs permite que tengan un alto efecto desinfectante, capaz de eliminar distintos tipos de microorganismos, siendo frecuente la aplicación de AgNPs en medicina, por ejemplo, en recubrimientos de dispositivos médicos, filtros desinfectantes o apósitos (Almatroudi, 2020).

El estudio de AgNPs con efecto antimicrobiano ha ido en aumento desde el 2010, teniendo especial interés los últimos años (2019 y 2020) con estudios realizados principalmente en países de Europa y Asia. Los estudios realizados en Colombia indican sus aplicaciones en hidrogeles y dispositivos ortopédicos (Quintero *et al.*, 2020).

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* de AgNPs sobre los tres microorganismos patógenos *S. aureus*, *E. coli* resistente a ampicilina y *C. albicans*, pues, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se encuentran en la lista prioritaria de microorganismos que requieren el desarrollo de nuevos antimicrobianos (Tacconelli *et al.*, 2018). Para este fin, primero fue necesario identificar las condiciones que podían afectar la actividad antimicrobiana de las AgNPs.

Se sintetizaron y caracterizaron AgNPs. Para ello, se indicaron las características de síntesis para obtener AgNPs funcionales con actividad antimicrobiana. Se establecieron las condiciones de sensibilidad de los microorganismos frente a las AgNPs, donde se evaluó el efecto del medio de cultivo y de la técnica de siembra sobre la efectividad antimicrobiana de las AgNPs. Por último, se estableció la CMI, evaluando la sensibilidad de los microorganismos frente a las AgNPs. Esta información es de gran importancia para futuros estudios, donde se puedan usar AgNPs como desinfectantes de áreas hospitalarias.

## Materiales y métodos

### Síntesis y caracterización de AgNPs

La síntesis química de AgNPs se realizó en oscuridad y con luz solar, por reducción de  $\text{AgNO}_3$ . Inicialmente una solución de 100 mL de borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) y citrato de sodio dihidratado ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 0,001 M (38 mg y 100 mg) se puso en agitación magnética a 70 °C durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se adicionaron 100 mL de  $\text{AgNO}_3$  0,001 M, manteniendo la agitación y el calentamiento durante otros 20 minutos, siguiendo el protocolo planteado por Agnihotri *et al.* (2014).

En esta reacción el borohidruro de sodio fue el reductor predominante para obtener AgNPs con tamaños entre 5 y 20 nm, mientras que el citrato de sodio actuó como reductor secundario y estabilizador, que produce tamaños entre 60 y 100 nm, según reportan Agnihotri *et al.* (2014). Se realizaron lavados en centrífuga a 18 000 rpm por 20 minutos para retirar reactivos que no reaccionaron, como sales de  $\text{AgNO}_3$  (Abbaszadegan *et al.*, 2015).

Una parte de la solución de AgNPs y de la solución control de  $\text{AgNO}_3$  se oxigenó durante 30 minutos mediante una bomba de oxígeno, con el fin de incrementar su eficiencia antimicrobiana, pues aumenta la relación  $\text{Ag}^+$  por cada AgNPs (Lok *et al.*, 2007). Por tanto, para los ensayos antimicrobianos se cuenta con AgNPs sin oxigenar (AgNPs) y AgNPs oxigenadas (AgNPs (Oxi)), junto con el control de solución de  $\text{AgNO}_3$  (4250  $\mu\text{g/mL}$ ), que presenta una concentración total de plata de 2675  $\mu\text{g/mL}$  y que también se trabajó sin oxigenar ( $\text{AgNO}_3$ ) y después de oxigenar ( $\text{AgNO}_3$ (Oxi)). Se evaluaron distintas concentraciones de AgNPs, obtenidas a partir de diluciones seriadas de 1:2, desde la concentración inicial más alta obtenida en la síntesis, hasta alcanzar una concentración mínima de 0,5  $\mu\text{g/mL}$ .

La caracterización de las AgNPs se llevó a cabo por medio de un barrido espectral en un espectrofotómetro UV-Vis (Genesys 10UV ThermoScientific), entre 200 y 800 nm, utilizando una suspensión acuosa en dilución 1:10 (Almatroudi, 2020). Posteriormente, se verificó el tamaño de las AgNPs por dispersión dinámica de la luz (DLS, por sus siglas en inglés; marca Malvern ZS90), en celdas de poliestireno y ángulo de medición de  $90^\circ$  (Almatroudi, 2020). Con el tamaño (nm) de las AgNPs se determinó el coeficiente de extinción ( $\epsilon$ ), según los datos reportados por Paramelle *et al.* (2014). Para determinar la concentración inicial aproximada, se utilizó la ecuación modificada de la Ley de Beer-Lambert, propuesta por Sikder *et al.*, que se presenta en la ecuación 1:

$$C_{\text{NP}} = \frac{\pi d^3 \rho A N_A}{6L\epsilon} \quad (1)$$

Allí,  $d$  es el tamaño o diámetro (nm),  $\rho$  es la densidad de la plata (10,49 g/mL),  $A$  es la absorbancia máxima (Abs),  $N_A$  es el número de Avogadro ( $6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ),  $L$  es la longitud de la trayectoria de la luz a través de la muestra (1 cm) y  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} \times 10^8$ ). Finalmente, las AgNPs se observaron en un microscopio de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés; marca Asylum Research Cypher ES), corroborando el tamaño y la forma. Se midió en modo AC (no contacto) con una sonda de silicio AC240TSA-R3, con constante de resorte de  $k = 2,72 \text{ N/m}$ , frecuencia de resonancia de 69,2 KHz y punta con un radio aproximado de 7nm (Sikder *et al.*, 2018).

### Condiciones de sensibilidad de los microorganismos patógenos frente a las AgNPs

Las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) sensible a antibióticos y *Escherichia coli* (ATCC 25022) resistente a ampicilina (1  $\mu\text{L}$  de ampicilina concentrada a 100 mg/mL, por 1 mL de medio) fueron proporcionadas por la Corporación CorpoGen

y preservadas en agar nutritivo. La levadura *Candida albicans* fue donada por la Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud (FUCS) y se preservó en agar Sabouraud.

Para la preparación de los inóculos microbianos, en las cepas bacterianas se empleó el método de crecimiento en caldo Luria-Bertani, hasta alcanzar una turbidez de 0,5 de la escala McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC), ajustada con un espectrofotómetro UV-Vis (625 nm) (CLSI, 2012). Por su parte, para el inóculo de la levadura se empleó el método de suspensión directa de colonia en agua estéril (CLSI, 2012). Para evaluar las condiciones de sensibilidad de los microorganismos frente a las AgNPs y AgNPs (Oxi), se compararon con controles negativos ( $\text{AgNO}_3$  con  $\text{AgNO}_3$ (Oxi) y ampicilina para *S. aureus*) y positivos (agua estéril y medios con inóculo sin AgNPs), incubándolos a 37 °C por 24 horas. Con el fin de determinar la mejor técnica de siembra y el medio de cultivo óptimo que permitió evaluar el efecto antimicrobiano de las AgNPs frente a los microorganismos, se realizaron por triplicado diferentes ensayos:

- Método de macrodilución (a tubos con 1 mL de inóculo y 1 mL de AgNPs suspendidas en caldo Luria-Bertani): se midió su absorbancia inicial, se incubaron inclinados a 110 rpm y se midió su absorbancia final para determinar crecimiento bacteriano (CLSI, 2012).
- Método modificado de Kirby-Bauer: se hizo una siembra masiva de los microorganismos sobre agar nutritivo. Se perforó creando pozos de 5 mm que se llenaron con 20  $\mu\text{L}$  de agar y 20  $\mu\text{L}$  de AgNPs, una vez secos se incubaron (Abbaszadegan *et al.*, 2015).
- Método de Kirby-Bauer (discos de difusión): se hizo una siembra masiva de los microorganismos sobre agar nutritivo y sabouraud, posicionando discos de papel filtro (6 mm) con tamaño de poro de 0,25  $\mu\text{m}$  y 2,5  $\mu\text{m}$ , impregnados con AgNPs filtrados al vacío y secados al horno (60 °C) (Ortiz, 2019).
- Método modificado de Kirby-Bauer: se hizo una siembra masiva de AgNPs sobre agar nutritivo, Mueller-Hinton y sabouraud, colocando gotas de 20  $\mu\text{L}$  de los microorganismos (Mohammadzadeh *et al.*, 2012).
- Método modificado de Kirby-Bauer, haciendo siembra masiva de los microorganismos sobre agar nutritivo, Mueller-Hinton y sabouraud, colocando gotas de 10  $\mu\text{L}$  de forma equidistante de AgNPs (Mohammadzadeh *et al.*, 2012).

### Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

En el ensayo anterior se encontró que la mejor técnica de cultivo fue el método de Kirby-Bauer modificado de microgotas, el cual se utilizó para determinar la CMI. Para este ensayo se plaquearon masivamente 100  $\mu\text{L}$  de los microorganismos sobre el medio de cultivo, usando agar Mueller-Hinton en bacterias y agar sabouraud en el hongo, los cuales se extendieron sobre la superficie del agar de manera uniforme con ayuda de un rastro de vidrio (siembra masiva) (Abbaszadegan *et al.*, 2015). Una vez absorbido el líquido, sobre el agar se dispusieron gotas de 10  $\mu\text{L}$  de la solución con AgNPs a distintas concentraciones por triplicado (8 diluciones seriadas de 1:2) y de los controles por duplicado (Mohammadzadeh *et al.*, 2012). Las gotas estaban ubicadas de forma equidistante en la caja, donde una vez secas, las cajas se incubaron a 37 °C por 24 horas. En los ensayos donde se observaron halos de inhibición, se realizó el correspondiente registro fotográfico y se midieron los halos mediante el programa ImageJ (Ortiz, 2019). La CMI se determinó

como la concentración más baja de AgNPs evaluada; allí se observó un halo de inhibición de crecimiento (CLSI, 2012).

## Caracterización de posible mecanismo de acción AgNPs sobre los microorganismos

A partir de los ensayos de sensibilidad se evaluó el posible mecanismo de acción de las AgNPs sobre los microorganismos. De los halos de inhibición de crecimiento obtenidos en la evaluación de sensibilidad a las AgNPs, se tomó una muestra que se tiñó por tinción de Gram para verificar en un microscopio óptico la presencia de restos celulares y medirla en el AFM, para observar el posible mecanismo de acción de las AgNPs sobre los microorganismos, su estado e integridad (Rolim *et al.*, 2019).

## Análisis estadísticos

Las distintas concentraciones de AgNPs evaluadas se realizaron por duplicado o por triplicado, según los distintos métodos de siembra evaluados y la disponibilidad de medios, con el fin de obtener un valor de media  $\pm$  desviación estándar de cada prueba (Rao *et al.*, 2020). En cada conjunto de datos se realizaron pruebas del supuesto de normalidad (Shapiro-Wilk), el supuesto de autocorrelación (Durbin-Watson) y del supuesto de homocedasticidad (Breusch-Pagan), con un nivel de significancia de  $\alpha=0,05$ , para indicar la distribución de los datos y qué pruebas estadísticas realizar (paramétricas o no paramétricas).

Como pruebas paramétricas se usaron análisis de varianza (ANOVA) y un test de Tukey; para no paramétricas, Kruskal-Wallis y el test de Dunn. Ambos conjuntos de pruebas se hicieron para encontrar diferencias estadísticamente significativas, usando el programa RStudio. Adicionalmente, se realizaron *boxplots* para visualizar y comparar los resultados (Liao *et al.*, 2019).

## Resultados y discusión

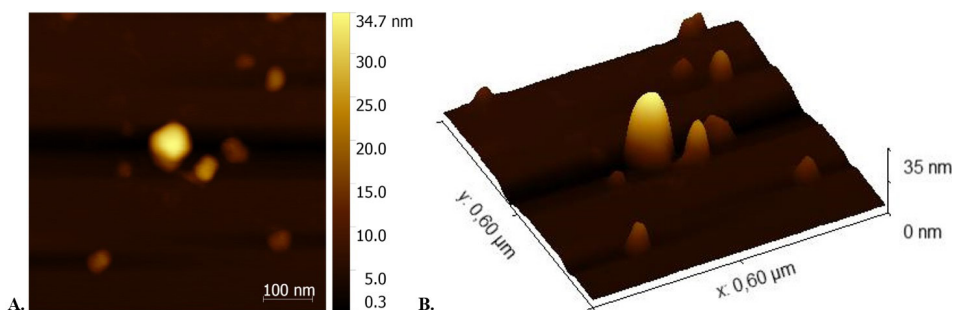
### Caracterización de AgNPs

En el barrido espectral realizado a las AgNPs, se observaron dos picos de absorción, uno a 212 nm ( $Abs=0,422$ ) y otro a 390 nm ( $Abs=0,481$ ), indicando la posible presencia de dos clases de AgNPs. Sin embargo, el pico de absorbancia de 212 nm también puede corresponder a  $AgNO_3$ , que no reaccionó, pues, según Šileikaitė *et al.* (2009), el nitrato presenta longitudes de onda más cortas, generalmente desde 225 nm hasta 275 nm. Mientras que el pico de absorbancia de 390 nm corresponde a las AgNPs, pues la resonancia de plasmón superficial localizada (SPR, por sus siglas en inglés), está bien definida para la plata, con longitudes de onda entre 400 nm y 450 nm (Palencia *et al.*, 2019).

El barrido espectral es una técnica simple para inferir tamaños de AgNPs, pero que puede verse afectada por la agregación de AgNPs (Sikder *et al.*, 2018), por lo que es importante corroborar con otra técnica. Este barrido se basa en el principio de SPR, que depende del tamaño, forma y propiedades dieléctricas de la partícula y de su entorno (Šileikaitė *et al.*, 2009). Según Palencia *et al.* (2019), la SPR se produce por oscilaciones colectivas de los electrones en la superficie de AgNPs y la característica especial de las nanopartículas es que sus oscilaciones están localizadas en una pequeña región.

Para corroborar los resultados del barrido espectral se midieron en el DLS las AgNPs preparadas para las 5 réplicas del método modificado de Kirby-Bauer con microgotas, encontrando tamaños entre 10 y 61 nm, con concentraciones entre 14,9 y 46,9  $\mu\text{g/mL}$ . Las AgNPs presentaron un índice de polidispersión (PDI) de 0,19, indicando monodispersidad (Yadav *et al.*, 2019).

Sin embargo, a pesar de conocer el tamaño aproximado, con el DLS se desconocen las formas de las AgNPs, y existe la posibilidad de que el equipo detecte partículas con dimensiones diferentes, que no sean esféricas, de un mismo tamaño de partícula. Por ello se realizó la medición en AFM. En la figura 1 (A y B) se observan las imágenes obtenidas. Se pudo confirmar que estas tenían forma esférica y que sus tamaños eran similares a los reportados por el DLS. Es importante considerar que las mediciones en AFM pueden verse sesgadas por precipitados de sal de  $\text{AgNO}_3$ , de ahí la importancia de realizar los lavados en la centrífuga antes de su medición (Sikder *et al.*, 2018). El tamaño y forma de las AgNPs son de gran importancia en sus capacidades antimicrobianas, donde se reporta que AgNPs pequeñas ( $\leq 10$  nm) y esféricas presentan mejor actividad antimicrobiana, en comparación de tamaños grandes o formas triangulares (Agnihotri *et al.*, 2014).



**Figura 1.** Imágenes de AgNPs en AFM analizadas con el software Gwyddion, de la muestra inmovilizada, con tamaño de  $0,60 \times 0,60 \mu\text{m}$  y una escala de 100 nm. A: HeightRetrace. B: HeightRetrace 3D.

Fuente: elaboración propia.

Con el método de síntesis química se buscaba realizar una reducción de la  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$  y formar AgNPs (Mapara *et al.*, 2015). Las AgNPs se componen en su mayoría de  $\text{Ag}^0$ , que se oxida lentamente a  $\text{Ag}^+$ , por lo que la oxigenación por 30 minutos promovió una rápida oxidación (Xiu *et al.*, 2011), así como la formación de una delgada capa de óxido de plata sobre las AgNPs, que libera más  $\text{Ag}^+$  (Grillet *et al.*, 2013). Se considera que la capacidad antimicrobiana de las AgNPs se debe a la liberación de  $\text{Ag}^+$  y a la interacción directa de las AgNPs con las envolturas de los microorganismos (Palencia *et al.*, 2019). Xiu *et al.* (2011) comprobaron que la interacción de las AgNPs con las bacterias se dificulta más por su tamaño (35,4 nm) en comparación con los tamaños pequeños de los iones  $\text{Ag}^+$  (0,26 nm). Los iones  $\text{Ag}^+$  han demostrado tener una mayor toxicidad, debido a mecanismos como su unión a los grupos tiol de las proteínas (lo cual altera su funcionamiento), afectación en la permeabilidad de la membrana, que provoca muerte celular y estrés oxidativo por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Xiu *et al.*, 2011).



Las AgNPs recién sintetizadas presentaban un color amarillo-anaranjado, que indica la formación de AgNPs en la solución (Agnihotri *et al.*, 2014). Después de oxigenadas, cambiaron a una coloración un poco más oscura, de amarillo a café rojizo, un cambio normal con el aumento del tiempo, pues indica el aumento de la relación  $\text{Ag}^+$  por cada AgNPs (Mapara *et al.*, 2015). Entre 2 y 5 horas después las AgNPs tenían un color negro, como producto de una reducción de  $\text{Ag}^+$  en las AgNPs (Jalal *et al.*, 2018) y de la completa oxidación de la superficie de las AgNPs, que impide la liberación de iones  $\text{Ag}^+$  (Xiu *et al.*, 2011).

Las AgNPs sintetizadas en condiciones de luz solar no presentaron efecto antimicrobiano, pues la luz solar y el tiempo hacen que se forme una capa de óxido gruesa sobre las AgNPs. La plata es altamente fotosensible: la parte azul UV de la luz causa la fototransformación de las AgNPs y su oxidación en pocas horas (fotoenvejecimiento) (Grillet *et al.*, 2013). Por ejemplo, el estudio realizado por Ivanova y Zamborini (2010) demostró que AgNPs de tamaños pequeños (8-12 nm) se oxidan más rápido y completamente en 20 horas, en comparación de tamaños grandes (35 nm), por su relación superficie/volumen, que, al ser mayor en las AgNPs pequeñas, causa que se oxiden más rápido.

### **Determinación del efecto del medio de cultivo en la sensibilidad de los microorganismos patógenos frente a las AgNPs**

Se usaron distintas técnicas de cultivo y medios:

- El primero en ser evaluado fue el método de macrodilución, con una curva de calibración de McFarland ( $r^2 = 0,9915$ ) usando caldo Luria-Bertani y dos réplicas (CLSI, 2021). Ambas réplicas con AgNPs sintetizadas en luz solar, días antes y disueltas en el medio, no generaron inhibición del crecimiento.
- El segundo método evaluado fue la modificación de Kirby-Bauer, realizando pozos en agar nutritivo, usando AgNPs sintetizadas días antes con dos réplicas, que presentaron halos de inhibición de crecimiento inferiores a 1 mm.
- El tercer método evaluado fue el de discos, con dos réplicas con AgNPs sintetizadas días antes y crema de sulfadiazina de plata sobre agar nutritivo y sabouraud; no presentó halos de inhibición superiores a 1mm.
- El cuarto método evaluado fue la modificación de Kirby-Bauer con microgotas y dos réplicas. La réplica 1 con frotis de AgNPs sintetizadas días antes sobre agar nutritivo y microgotas de microorganismo no presentó inhibición del crecimiento. En la réplica 2 con  $\text{AgNO}_3$  en suspensión se encontró que sí inhibió el crecimiento de los tres microorganismos en el medio Mueller-Hinton y sabouraud, pero su efectividad disminuía en agar nutritivo.

También se determinó que cuando se hacía un frotis del nitrato sobre el medio, este no se absorbía de forma homogénea sobre la superficie, permitiendo el crecimiento microbiano en algunas zonas. Así como que los discos presentaron la menor inhibición en comparación de las microgotas.

Según estos resultados, las AgNPs sintetizadas días antes probablemente se vieron afectadas por el tiempo, que formó una capa de óxido que, por una parte, impidió la liberación de  $\text{Ag}^+$  y el contacto directo con los microorganismos y, por otra, permitió la agregación entre AgNPs (Xiu *et al.*, 2011). También fue posible determinar que el método y medios

de cultivo más efectivos fue la modificación de Kirby-Bauer con microgotas, realizando un frotis de los microorganismos sobre agar Mueller-Hinton y sabouraud, posicionando gotas de 10  $\mu$ L de AgNPs, pues gotas de 20  $\mu$ L pierden la forma circular. Las guías del CLSI también sugieren el uso de agar o caldo Mueller-Hinton cuando se realizan pruebas de sensibilidad a antimicrobianos en bacterias (CLSI, 2012, 2021).

El efecto del medio de cultivo sobre la efectividad antimicrobiana de las AgNPs se ha evaluado con anterioridad, como el estudio de Gharpure *et al.* (2019) con *S. aureus* y *E. coli* en agar Mueller-Hinton, nutritivo y Luria-Bertani, que no encontró actividad antibacteriana en ninguno de los medios. Por otro lado, Kirtiwar *et al.* (2019) hallaron un efecto antibacteriano más efectivo con agar nutritivo y Luria-Bertani, en comparación con el de Mueller-Hinton. En el caso de *C. albicans*, también se han reportado medios más efectivos para evaluar la capacidad antimicrobiana de AgNPs, como en el estudio de Kim *et al.* (2012), que indicaron una inhibición más significativa con agar papa dextrosa (PDA), en comparación de agar extracto de malta (MEA) y agar harina de maíz (CMA). También se ha reportado la efectividad de las AgNPs frente a este hongo usando agar sabouraud (Vinh *et al.*, 2010). Esto nos indica que las distintas características de las AgNPs usadas en distintos estudios requieren el uso de medios distintos a pesar de evaluar los mismos microorganismos.

La efectividad antimicrobiana de las AgNPs se ve afectada por su solubilidad y velocidad de difusión en medio, la composición química del medio y sus concentraciones, la fase de crecimiento del microorganismo, la concentración bacteriana y su estado metabólico (Kirtiwar *et al.*, 2019). La presencia de cloruro de sodio (NaCl) en el medio afecta la actividad antibacteriana de las AgNPs, alterando la estabilidad coloidal de las AgNPs y promoviendo su agregación, impidiendo la interacción de las cargas de AgNPs con las membranas de los microorganismos (Bélteky *et al.*, 2019). Además, el cloro induce su precipitación (Xiu *et al.*, 2011). Esto también explica la mayor efectividad en este estudio del agar Mueller-Hinton, pues no contiene NaCl.

### **Determinación de la concentración mínima inhibitoria**

Los principales resultados del diámetro de los halos de inhibición del crecimiento de los microorganismos se presentan en la tabla 1. Al evaluar  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{AgNO}_3(\text{Oxi})$ , control de ampicilina para *S. aureus* y AgNPs con AgNPs(Oxi), se encontró que, de estos últimos dos, solo se presenta la menor dilución y concentración que presentó halos de inhibición significativos. Se encontró que tanto las AgNPs como el  $\text{AgNO}_3$  tuvieron un efecto antimicrobiano sobre las cepas bacterianas, mientras que para la levadura solo funcionó el  $\text{AgNO}_3$ .

Tabla 1. Resultados de la inhibición por el método modificado de Kirby-Bauer de microgotas

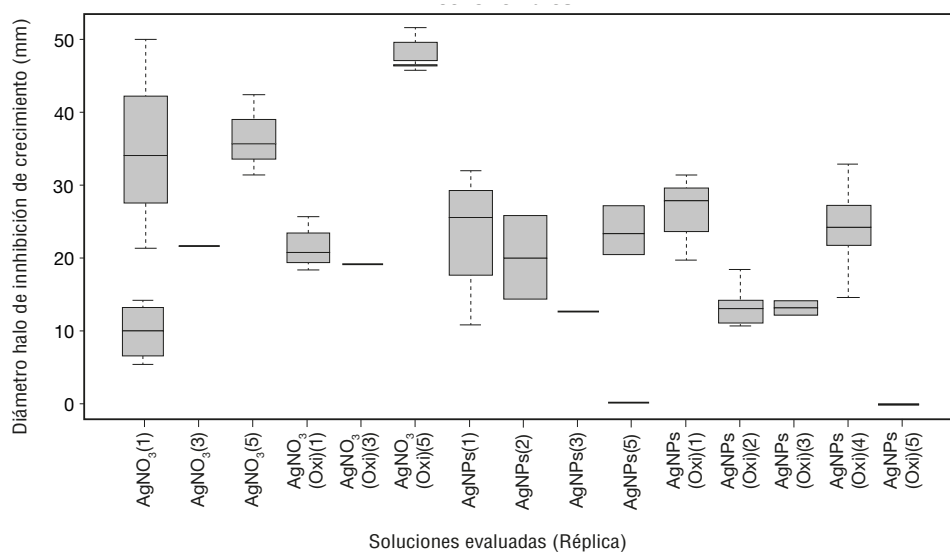
Microorganismo	Réplica	Agente antimicrobiano	Diámetro zona de inhibición (mm) (X±SD)	Concentración de plata (µg/mL)	Tamaño (nm)	
<i>E. coli</i>	1	AgNO <sub>3</sub>	33,32±11,71	2675	NA	
		AgNO <sub>3</sub> (Oxi)	21,22±3,08	2675	NA	
		AgNPs	21,74±9,01	46,9	61	
		AgNPs(Oxi)	26,27±4,93	46,9	61	
	2	AgNPs(Oxi) (3)	13,10±9,27	4,89	37	
		AgNPs	19,21±8,08	19,6	37	
		AgNPs	12,54±0,25	16,5	37	
	3	AgNPs(Oxi) (1)	13,15±1,33	16,5	37	
		AgNO <sub>3</sub>	21,72	2675	NA	
	4	AgNO <sub>3</sub> (Oxi)	19,22	2675	NA	
		AgNPs(Oxi) (3)	24,20	3,74	32	
	5	AgNO <sub>3</sub>	36,22±5,56	2675	NA	
		AgNO <sub>3</sub> (Oxi)	48,51±2,63	2675	NA	
	<i>S. aureus</i>	1	AgNO <sub>3</sub>	18,58±3,26	2675	NA
			AgNO <sub>3</sub> (Oxi)	43,91±6,98	2675	NA
AgNPs			13,60±3,26	46,9	61	
AgNPs(Oxi)			15,90±0,83	46,9	61	
2		Camp	24,49±3,58	10	NA	
		AgNPs(Oxi) (3)	17,99±2,11	4,89	37	
		AgNPs	18,54±6,70	19,6	37	
3		Camp	25,71±17,26	10	NA	
		AgNPs	11,11±0,21	16,5	37	
		AgNPs(Oxi) (4,5)	20,84±1,24	1,55	37	
		AgNO <sub>3</sub>	18,42	2675	NA	
4		AgNO <sub>3</sub> (Oxi)	16,25	2675	NA	
		Camp	41,90±0,97	10	NA	
		AgNPs(Oxi) (3)	24,98	3,74	32	
5		Camp	15,90	10	NA	
	AgNPs(Oxi) (12)	21,95±12,75	1	10		
	AgNPs	31,97±18,72	29	10		
	AgNO <sub>3</sub>	39,12±4,43	2675	NA		
	AgNO <sub>3</sub> (Oxi)	39,16±4,69	2675	NA		
<i>C. albicans</i>	1	Camp	24,95±1,86	10	NA	
		AgNO <sub>3</sub>	13,10±1,75	2675	NA	
	3	AgNO <sub>3</sub> (Oxi)	11,35±1,02	2675	NA	
		AgNO <sub>3</sub>	15,43±4,73	2675	NA	
	5	AgNO <sub>3</sub> (Oxi)	13,80±3,08	2675	NA	
AgNO <sub>3</sub>		26,86±1,44	2675	NA		
		AgNO <sub>3</sub> (Oxi)	35,94±8,50	2675	NA	

CAmp: control ampicilina. NA: no aplica.

Fuente: elaboración propia.

Como se observa en la tabla 1, la CMI de AgNPs(Oxi) de *E. coli* resistente a ampicilina, en comparación de los controles negativos, fue 3,74  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con tamaños de 32 nm y formas esféricas. Sin embargo, como se muestra en la figura 2, no se encontró una diferencia significativa entre las AgNPs y AgNPs (Oxi) (Kruskal-Wallis;  $p = 0,854$ ), pero sí se presentaron diferencias significativas entre  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{AgNO}_3$  (Oxi) (Kruskal-Wallis;  $p = 0,045$ ), siendo mayor en los oxigenados generalmente.

Se presentaron diferencias significativas (ANOVA;  $p = 9,9 \times 10^{-10}$ ) entre las soluciones de nitrato con las de nanopartículas, siendo mayores los halos de inhibición en el nitrato. Este mayor efecto del nitrato puede deberse a sus mecanismos de acción y a la alta concentración que se evaluó en este estudio (2675  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), en comparación con las AgNPs, cuya mayor concentración evaluada fue 46,9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Probablemente la réplica 5 de AgNPs no inhibió el crecimiento de esta bacteria gramnegativa, debido a que la solución de AgNPs se había preparado cinco horas antes, lo que ocasionó que ya estuviera oxidada al momento de su uso.



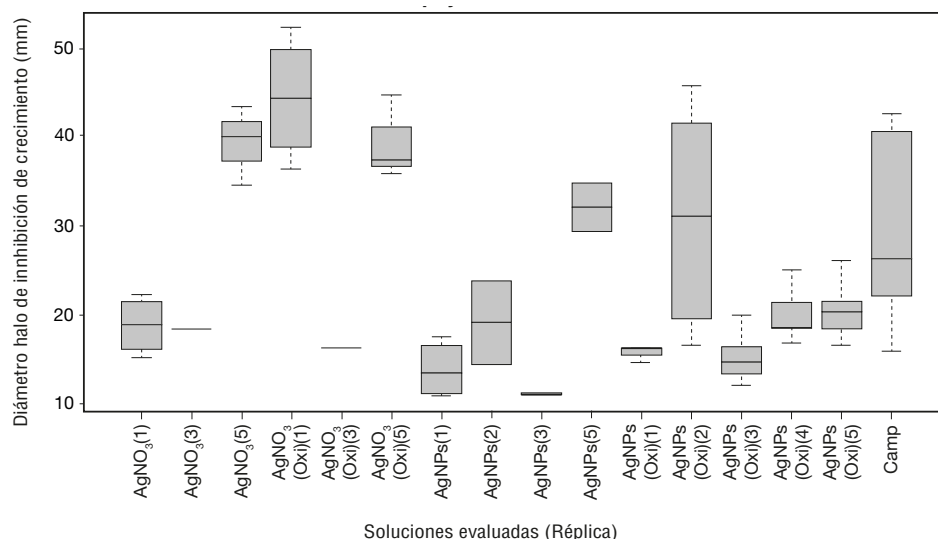
**Figura 2.** Boxplot de los diámetros de halos de inhibición (eje Y) en las 5 réplicas (eje X) de *E. coli*, realizados en RStudio.

**Fuente:** elaboración propia.

Al comparar el CMI obtenido de *E. coli* con lo reportado en la literatura, los valores varían entre estudios, debido a las características únicas de cada AgNPs sintetizada en cada estudio. Algunos ejemplos de los datos de tamaño de AgNPs y CMI encontrados en *E. coli* son: 32 nm y 0,11  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Ebrahimzadeh *et al.*, 2020), 40 nm y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (López *et al.*, 2020), 11,9 nm y 4,79  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Pansara *et al.*, 2019), 59,5 nm y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Rao *et al.*, 2020), 9,67 nm y 1,56  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Rolim *et al.*, 2019), 3 nm y 3,04  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Wan *et al.*, 2016), y 3 nm y 110  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Krce *et al.*, 2020). Estos resultados coinciden en que la CMI de esta bacteria usualmente se encuentra en concentraciones bajas, entre 0,11 y 110  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , con tamaños medios de AgNPs entre 3 y 60 nm.

Para *S. aureus*, según la tabla 1, los valores de halos de inhibición del control con ampicilina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) coinciden con los indicados por el CLSI, entre 27 y 35 mm (CLSI, 2021).

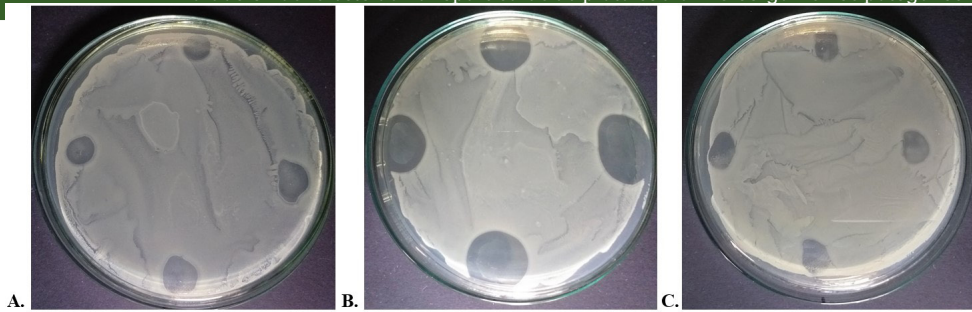
El valor del CMI de las AgNPs de esta bacteria grampositiva, después de compararlo con sus controles, fue de  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ , con tamaño de 10 nm y forma esférica. Este resultado nos indica un efecto del tamaño de las AgNPs, que indica que a menor tamaño de nanopartícula más alta es su actividad antibacteriana (Mapara *et al.*, 2015). Como se observa en la figura 3, se presentaron diferencias entre las réplicas de  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{AgNO}_3$  (Oxi) (Kruskal-Wallis;  $p=0,045$ ), así como una mayor inhibición del nitrato en comparación con las AgNPs (Kruskal-Wallis;  $p=9,8 \times 10^{-10}$ ), debido a su alta concentración y, por ende, mayor cantidad de  $\text{Ag}^+$  que interactuaba con la bacteria. Se encontraron diferencias entre las AgNPs y AgNPs (Oxi) (Kruskal-Wallis;  $p=3,5 \times 10^{-8}$ ), siendo mayor el halo de inhibición en las oxigenadas.



**Figura 3.** Boxplot de los diámetros de halos de inhibición (eje Y) en las 5 réplicas (eje X) de *S. aureus*, realizados en RStudio.

**Fuente:** elaboración propia.

En la figura 4 (A, B y C) se presentan las diferencias en los halos de inhibición de AgNPs, AgNPs (Oxi) y  $\text{AgNO}_3$  de *S. aureus*, que concuerdan con lo obtenido en la figura 3. Los resultados de CMI de *S. aureus* son similares a los reportados en la literatura. Algunos de los datos reportados para esta bacteria en tamaño de AgNPs y CMI son: 32 nm y  $0,11 \mu\text{g}/\text{mL}$  (Ebrahimzadeh *et al.*, 2020), 11,9 nm y  $9,57 \mu\text{g}/\text{mL}$  (Pansara *et al.*, 2019), 9,67 nm y  $1,56 \mu\text{g}/\text{mL}$  (Rolim *et al.*, 2019), 3 nm y  $6,08 \mu\text{g}/\text{mL}$  (Wan *et al.*, 2016), 8 nm y  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  (Huq, 2020), 10 nm y  $12,5 \mu\text{g}/\text{mL}$  (Manipriya *et al.*, 2018) y 5 nm y  $16,49 \mu\text{g}/\text{mL}$  (Quintero *et al.*, 2020). Estos resultados coinciden en que la CMI de esta bacteria usualmente se encuentra a concentraciones bajas, entre 0,11 y  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ , con tamaños medios de AgNPs entre 3 y 60 nm.



**Figura 4.** Cajas de petri con halos de inhibición. A: *S. aureus* con 4 gotas de AgNPs. B: *S. aureus* con 4 gotas de AgNPs (Oxi). C: *S. aureus* con 4 gotas de  $\text{AgNO}_3$ .  
Fuente: elaboración propia.

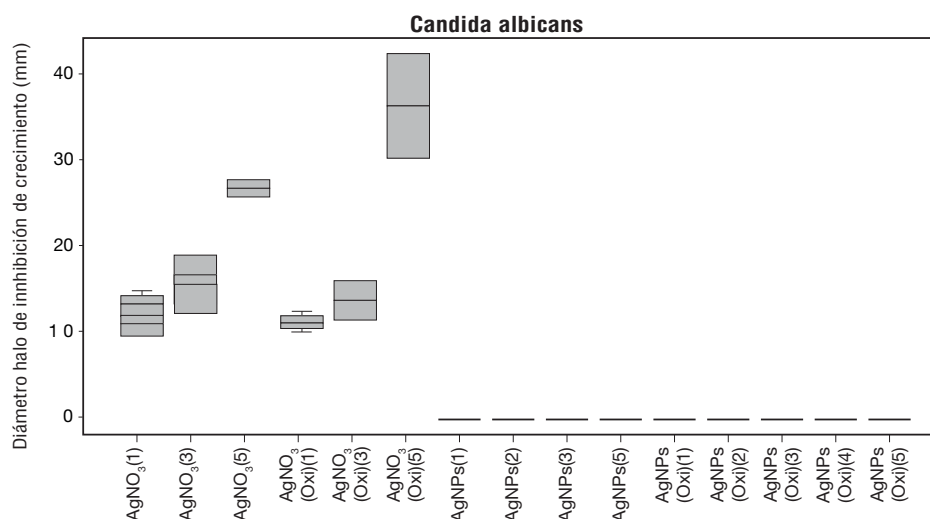
Tanto los valores reportados en la literatura como los resultados obtenidos en este estudio indican que las concentraciones inhibitorias de crecimiento de las AgNPs pueden variar entre estudios, incluso teniendo el mismo tamaño. Según Kirtiwar *et al.* (2019), la actividad antibacteriana de las AgNPs depende de la concentración, pues aumenta la concentración de iones  $\text{Ag}^+$  que interactúan con la bacteria. Los datos del CMI reportados en otros artículos difieren con los obtenidos aquí, pues diversos factores varían, como la concentración microbiana inicial, las cepas microbianas y la composición de los medios de cultivo. Y las características de las AgNPs pueden ser diferentes en tamaño, forma y agente de recubrimiento (Agnihotri *et al.*, 2014). Como se observó en este estudio, a pesar de seguir el mismo método de síntesis de AgNPs en las 5 réplicas, cada una presentaba una concentración inicial y tamaños distintos (tabla 1), teniendo un mayor efecto antibacteriano las AgNPs de menor tamaño y menor concentración.

Según se reporta en la literatura, los mecanismos de acción de las AgNPs y  $\text{AgNO}_3$  y sus iones  $\text{Ag}^+$  sobre los microorganismos, tanto bacterias como levadura, son similares. Causan efectos directos sobre la pared y membranas celulares, lo que altera la integridad de la membrana (poros, agujeros y pliegues), a través de los cuales ingresan a la célula, de forma que promueven la desnaturalización de biomoléculas (enzimas o proteínas), disolución del citoplasma y daño del material genético (Hamida *et al.*, 2021), así como interferencia con la vía de señalización del crecimiento bacteriano al modular la fosforilación de tirosina, afectando la viabilidad y división celular, interrumpiendo la reacción en cadena respiratoria, uniéndose a los grupos de azufre y fósforo del ADN, alterando la absorción de nutrientes y el transporte de electrones al bloquear los canales o disolviendo iones  $\text{Ag}^+$  en el citoplasma, causando un efecto antibacteriano (Liao *et al.*, 2019). Se ha comprobado que alteran la permeabilidad de la membrana, pues hacen que aumenten los niveles de la enzima LDH, que se libera de las células cuando se rompe su membrana. Promueven un desequilibrio metabólico, al interactuar con ATPasas y solo las AgNPs promueven la generación en gran medida de ROS (Hamida *et al.*, 2021). Los  $\text{AgNO}_3$  y sus iones  $\text{Ag}^+$  actúan diferente a las AgNPs cuando generan conglomeración del ADN bacteriano y sus daños son más severos en algunas partes de las paredes celulares bacterianas (Hamida *et al.*, 2021). Esta mayor letalidad de los  $\text{AgNO}_3$  se debe a sus iones  $\text{Ag}^+$  sobre la envoltura celular, que causan muerte celular, además, como agente fungicida provoca mayores reducciones en los niveles de ATPasas (Hamida *et al.*, 2021).

De acuerdo con nuestros resultados, el efecto antibacteriano que presentaron las AgNPs fue más pronunciado en *S. aureus*, debido probablemente a su mayor sensibilidad a antibióticos, en comparación de *E. coli* resistente a ampicilina. Sin embargo, en la literatura se indica un efecto más pronunciado de las AgNPs sobre bacterias gramnegativas en comparación de grampositivas, debido a diferencias en la estructura de la pared celular

(Abbaszadegan *et al.*, 2015). Las bacterias grampositivas presentan una pared gruesa de péptidoglicano, mientras que las bacterias gramnegativas tienen una delgada capa de péptidoglicano y una membrana exterior compuesta de lípidos, donde las cargas positivas  $\text{Ag}^+$  de las AgNPs se adhieren a la pared externa bacteriana cargada negativamente (Abbaszadegan *et al.*, 2015). La actividad antibacteriana de las AgNPs encontrada en este estudio da la posibilidad de evaluar en futuros estudios su uso como desinfectantes y aplicarlas en áreas hospitalarias, evaluándolas sobre otras especies de bacterias catalogadas como intrahospitalarias, con el objetivo de reducir las tasas de infección ocasionadas por organismos resistentes a antimicrobianos (Almatroudi, 2020).

Por otro lado, en la figura 5 y tabla 1, *C. albicans* en las 5 réplicas no presentó inhibición de AgNPs ni AgNPs (Oxi). No presentó diferencias significativas ente el uso de  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{AgNO}_3$ (Oxi) (Kruskal-Wallis;  $p=0,529$ ), pero sí diferencias entre el halo de inhibición de  $\text{AgNO}_3$ (Oxi) de las réplicas 1 y 5 (Test de Dunn;  $p=0,021$ ), siendo mayor en esta última. Esta diferencia en el tamaño de halos, aun cuando la concentración usada de  $\text{AgNO}_3$  en todas las réplicas fue de  $2675 \mu\text{g/mL}$ , indican que los halos de inhibición pueden variar en diámetro incluso cuando se usa la misma concentración.



**Figura 5.** Boxplot de los diámetros de halos de inhibición (eje Y) en las 5 réplicas (eje X) de *C. albicans*, realizados en RStudio.

**Fuente:** elaboración propia.

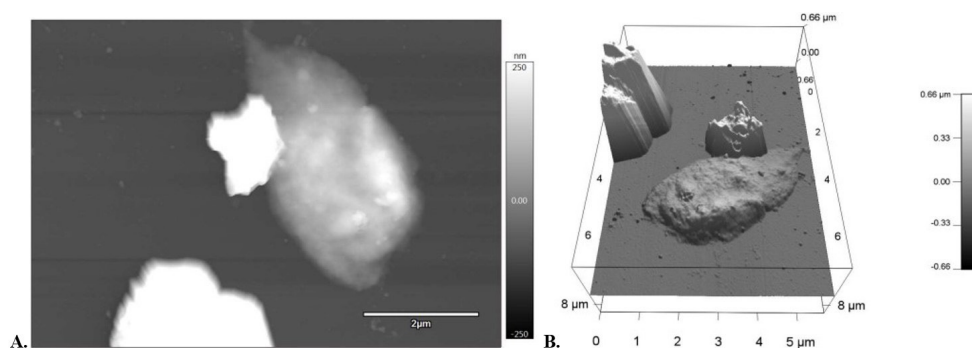
A pesar de que las AgNPs evaluadas en este estudio no presentaron un efecto antifúngico sobre el hongo, en la literatura se reporta la inhibición de la filamentación de esta levadura usando AgNPs más grandes (213–238 nm) y en mayores concentraciones (275–150  $\mu\text{g/mL}$ ), como reportan (Gómez *et al.*, 2021). Los mecanismos de acción de AgNPs frente a *C. albicans* implican daños y cambios de permeabilización en membrana y pared celular por la liberación de iones  $\text{Ag}^+$  (Gómez *et al.*, 2021). Sin embargo, también se reportan capacidades inhibitorias de crecimiento de *Candida* con concentraciones y tamaños de AgNPs similares a las usadas en este estudio, como  $5 \mu\text{g/mL}$ – $40 \mu\text{g/mL}$  esféricos de 10–30 nm. Existe una correlación positiva entre el efecto inhibitorio y la concentración,

donde los niveles de ROS endógenos aumentaban a medida que aumentaba la concentración de AgNPs (Radhakrishnan *et al.*, 2018).

La actividad antifúngica de las AgNPs se da por su capacidad de afectar múltiples dianas celulares, entre las que se incluyen la inducción apoptosis disfuncional mitocondrial al aumentar el estrés oxidativo (generación de ROS) y alteraciones de la membrana y pared celular (estado físico, composición de lípidos, ácidos grasos saturados e insaturados y desestabilización de funciones de la membrana). Aunque se sigue dando el crecimiento normal de las yemas, su ciclo celular está parcialmente inhibido (Radhakrishnan *et al.*, 2018). Los mecanismos letales de AgNPs contra *C. albicans* son la alta producción de ROS (estrés oxidativo extenso), mientras que los mecanismos letales del  $\text{AgNO}_3$  se relacionan con la alteración de la envoltura celular, por un fenómeno donde la levadura sintetiza AgNPs como estrategia de defensa para desintoxicar los iones de plata de  $\text{AgNO}_3$ . Sin embargo, estos AgNPs producidos terminan matando las células fúngicas (Hamida *et al.*, 2021).

### Caracterización de posible mecanismo de acción de las AgNPs sobre los microorganismos

La muestra de los halos de inhibición de crecimiento obtenidos de *S. aureus* en la réplica 4, usando AgNPs, se observó en el AFM (figura 6, A y B). Donde se pueden observar los posibles restos celulares de la bacteria recubierta por pequeñas AgNPs. Al medir estas AgNPs se encontraron los siguientes tamaños: 2,02 nm, 5,72 nm, 19,62 nm, 23,46 nm y 36,98 nm. Debido a que estas nanopartículas se encontraban aparentemente sobre la envoltura celular de la bacteria y estas eran de tamaño pequeño, se cree que el posible mecanismo de acción fue uniéndose a la pared celular, a la cual le hacía perforaciones. Esto ocasionaba que el contenido citoplasmático saliera y, en consecuencia, que ocurriera muerte celular (Quintero *et al.*, 2020). A ello se debe esa apariencia blanda y con forma mal definida en la bacteria (figura 6, B).



**Figura 6.** Imágenes del AFM analizadas con el software Gwyddion, con tamaño de 8,2x85,7 μm y escala de 2 μm. A: HeightRetrace. B: HeightRetrace 3D.

**Fuente:** elaboración propia.



## Conclusiones

Este estudio logró determinar que el método más efectivo de síntesis química de AgNPs se debe hacer en la oscuridad, oxigenándolas y usándolas en un periodo no superior a 2 horas, para que no pierdan su efectividad antimicrobiana. Las condiciones de sensibilidad de los microorganismos a las AgNPs, que permitieron obtener un efecto antibacteriano en las cepas bacterianas, fue mediante el uso de agar Mueller-Hinton y la técnica modificada de Kirby-Bauer con microgotas de 10 µg/mL de AgNPs esféricas con tamaños entre 10 nm y 32 nm. Así se encontró que *E. coli* resistente a ampicilina y *S. aureus* fueron sensibles al uso de AgNPs, con valores de CMI de 3,74 µg/mL y 1 µg/mL, respectivamente. El hongo *C. albicans* no presentó actividad antimicrobiana por las AgNPs, pero sí fue sensible al AgNO<sub>3</sub> evaluado como control.

Sí hay un efecto antimicrobiano *in vitro* de las AgNPs sobre las bacterias patógenas *S. aureus* y *E. coli* resistente a ampicilina, pero no sobre el hongo *C. albicans*. Este efecto antibacteriano depende de las características de las AgNPs por el método de síntesis, así como de las condiciones de siembra de los microorganismos y el medio de cultivo utilizado.

## Agradecimientos

Agradecemos a Minciencias (programa Jóvenes investigadores) por la financiación del proyecto y a la Universidad Central por el préstamo de sus instalaciones. Agradecemos a la FUCS, a Corporación CorpoGen y al Sinchi, por las cepas microbiológicas y reactivos. También a Jhon Pazos por su ayuda en la caracterización en el AFM. Este artículo es resultado del proyecto de investigación “Desarrollo de nanocompuestos de plata: dosis mínima inhibitoria y su potencial aplicación como agente antibacteriano *in-vitro*”, cofinanciado por MinCiencias.

## Referencias

- Abbaszadegan, A., Ghahramani, Y., Gholami, A., Hemmateenejad, B., Dorostkar, S., Nabavizadeh, M., & Sharghi, H. (2015). The Effect of Charge at the Surface of Silver Nanoparticles on Antimicrobial Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria: A Preliminary Study. *Journal of Nanomaterials*, 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/720654>
- Agnihotri, S., Mukherji, S., & Mukherji, S. (2014). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Advances*, 4(8), 3974–3983. <https://doi.org/10.1039/C3RA44507K>
- Almatroudi, A. (2020). Silver nanoparticles: synthesis, characterisation and biomedical applications. *Open Life Sciences*, 15(1), 819. <https://doi.org/10.1515/BIOL-2020-0094>
- Bélteky, P., Rónavári, A., Igaz, N., Szerencsés, B., Tóth, I., Pfeiffer, I., Kiricsi, M., & Kónya, Z. (2019). Silver nanoparticles: aggregation behavior in biorelevant

- conditions and its impact on biological activity. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 667. <https://doi.org/10.2147/IJN.S185965>
- Chirayath, R., Jayakumar, R., Biswas, R., & Vijayachandran, L. (2019). Development of *Mangifera indica* leaf extract incorporated carbopol hydrogel and its antibacterial efficacy against *Staphylococcus aureus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 178, 377–384. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.034>
- CLSI (2012). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility: Tests for bacteria that grow aerobically* (11th Ed.). <https://bitly.co/H7zR>
- CLSI (2021). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing* (31st Ed.). <https://bitly.co/H7zI>
- D'Enfert, C., Kaune, A., Alaban, L., Chakraborty, S., Cole, N., Delavy, M., Kosmala, D., Marsaux, B., Fróis, R., Morelli, M., Rosati, D., Valentine, M., Xie, Z., Emritloll, Y., Warn, P., Bequet, F., Bougnoux, M., Bornes, S., Gresnigt, M., & Brown, A. (2021). The impact of the Fungus–Host–Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(3), 1–55. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUAA060>
- Ebrahimzadeh, M., Naghizadeh, A., Amiri, O., Shirzadi, M., & Mortazavi, S. (2020). Green and facile synthesis of Ag nanoparticles using *Crataegus pentagyna* fruit extract (CP-AgNPs) for organic pollution dyes degradation and antibacterial application. *Bioorganic Chemistry*, 94, 103425. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103425>
- Gharpure, S., Kirtiwar, S., Palwe, S., Akash, A., & Ankamwar, B. (2019). Non-antibacterial as well as non-anticancer activity of flower extract and its biogenous silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 30(19), 195701. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/AB011A>
- Gómez, M., Gutiérrez, L., Gil, C., Escobar, C., Rozo, A., González, M., & Sierra, E. (2021). Inhibition of the filamentation of *Candida albicans* by Borojoa patinoi silver nanoparticles. *SN Applied Sciences*, 3(2). <https://doi.org/10.1007/S42452-020-04103-0>
- Grillet, N., Manchon, D., Cottancin, E., Bertorelle, F., Bonnet, C., Broyer, M., Lermé, J., & Pellarin, M. (2013). Photo-oxidation of individual silver nanoparticles: A real-time tracking of optical and morphological changes. *The Journal of Physical Chemistry C*, 117(5), 2274–2282. <https://doi.org/10.1021/jp311502h>
- Hamida, R., Ali, M., Goda, D., & Redhwan, A. (2021). Anticandidal potential of two Cyanobacteria-synthesized silver nanoparticles: Effects on growth, cell morphology, and key virulence attributes of *Candida albicans*. *Pharmaceutics*, 13(10), 1688. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101688>
- Huq, M. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles using *Pseudoduganella eburnea* MAHUQ-39 and their antimicrobial mechanisms investigation against drug resistant human pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1510. <https://doi.org/10.3390/ijms21041510>
- Ivanova, O., & Zamborini, F. (2010). Size-dependent electrochemical oxidation of silver nanoparticles method for measuring the oxidation potential of Ag

- nanoparticles as a function of size. *J. Am. Chem. Soc.*, *132*, 70-72. <https://doi.org/10.1021/ja908780g>
- Jalal, M., Ansari, M., Alzohairy, M., Ali, S., Khan, H., Almatroudi, A., & Raees, K. (2018). Biosynthesis of silver nanoparticles from Oropharyngeal *Candida glabrata* Isolates and their antimicrobial activity against clinical strains of Bacteria and Fungi. *Nanomaterials*, *8*(8). <https://doi.org/10.3390/NANO8080586>
- Kim, S., Jung, J., Lamsal, K., Kim, Y., Min, J., & Lee, Y. (2012). Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic Fungi. *Mycobiology*, *40*(1), 53. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.1.053>
- Kirtiwar, S., Gharpure, S., & Balaprasad, A. (2019). Effect of nutrient media on antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized using *Neolamarckia cadamba*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, *19*(4), 1923-1933. <https://doi.org/10.1166/JNN.2019.16117>
- Krce, L., Šprung, M., Maravić, A., Umek, P., Salamon, K., Krstulović, N., & Aviani, I. (2020). Bacteria exposed to silver nanoparticles synthesized by laser ablation in water: Modelling *E. coli* growth and inactivation. *Materials*, *13*(3), 653. <https://doi.org/10.3390/ma13030653>
- Liao, S., Zhang, Y., Pan, X., Zhu, F., Jiang, C., Liu, Q., Cheng, Z., Dai, G., Wu, G., Wang, L., & Chen, L. (2019). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Nanomedicine*, *14*, 1469-1487. <https://doi.org/10.2147/IJN.S191340>
- Lok, C., Ho, C., Chen, R., He, Q., Yu, W., Sun, H., Tam, P., Chiu, J., & Che, C. (2007). Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *12*(4), 527-534. <https://doi.org/10.1007/S00775-007-0208-Z>
- López, A., Bartomeu, C., Navarro, S., & Webster, T. (2020). Novel silver-platinum nanoparticles for anticancer and antimicrobial applications. *International Journal of Nanomedicine*, *15*, 169-179. <https://doi.org/10.2147/IJN.S176737>
- Manipriya, B., Banu, T., Prem, L., & Kalyani, M. (2018). Evaluation of antibacterial activity of silver nanoparticles against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and detection of virulence factors - Nuclease, phosphatase, and bio film production. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, *11*(5), 224-229. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i5.24097>
- Mapara, N., Sharma, M., Shriram, V., Bharadwaj, R., Mohite, K., & Kumar, V. (2015). Antimicrobial potentials of Helicteres isora silver nanoparticles against extensively drug-resistant (XDR) clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(24), 10655-10667. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6938-x>
- Mohammadzadeh, T., Sadjjadi, S., Habibi, P., & Sarkari, B. (2012). Comparison of agar dilution, broth dilution, cylinder plate and disk diffusion methods for evaluation of anti-leishmanial drugs on *Leishmania promastigotes*. *Iranian Journal of Parasitology*, *7*(3), 43-47.

- Ortiz, J. (2019). *Actividad antimicrobiana de nanopartículas cerámicas sintetizadas por método verde para uso en aplicaciones biomédicas*. Universidad Autónoma de Occidente. <https://bitly.co/H7yY>
- Palencia, M., Córdoba, A., & Meléndrez, M. (2019). Nanocomposites based on cationic polyelectrolytes and silver nanoparticles: Synthesis, characterization, molybdate retention and antimicrobial activity. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(6), 825–834. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2017.11.020>
- Pansara, C., Chan, W., Parikh, A., Trott, D., Mehta, T., Mishra, R., & Garg, S. (2019). Formulation optimization of chitosan-stabilized silver nanoparticles using in vitro antimicrobial assay. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 108(2), 1007–1016. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.09.011>
- Paramelle, D., Sadovoy, A., Gorelik, S., Free, P., Hobley, J., & Fernig, D. (2014). A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. *Analyst*, 139(19), 4855–4861. <https://doi.org/10.1039/C4AN00978A>
- Quintero, C., Botero, L., Zárate, D., Acevedo, N., Escobar, J., Pérez, V., & Cruz, L. (2020). Synthesis and characterization of a silver nanoparticle-containing polymer composite with antimicrobial abilities for application in prosthetic and orthotic devices. *Biomaterials Research*, 24(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s40824-020-00191-6>
- Radhakrishnan, V., Mudiam, M., Kumar, M., Dwivedi, S., Singh, S., & Prasad, T. (2018). Silver nanoparticles induced alterations in multiple cellular targets, which are critical for drug susceptibilities and pathogenicity in fungal pathogen (*Candida albicans*). *International Journal of Nanomedicine*, 13, 2647. <https://doi.org/10.2147/IJN.S150648>
- Rani, A., Ravindran, V., Surapaneni, A., Mantri, N., & Ball, A. (2021). Review: Trends in point-of-care diagnosis for *Escherichia coli* O157:H7 in food and water. *International Journal of Food Microbiology*, 349, 109233. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2021.109233>
- Rao, S., Saptami, K., Venkatesan, J., & Rekha, P. (2020). Microwave-assisted rapid synthesis of silver nanoparticles using fucoidan: Characterization with assessment of biocompatibility and antimicrobial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 745–755. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.230>
- Rolim, W., Lamilla, C., Pieretti, J., Díaz, M., Tortella, G., Diez, M., Barrientos, L., Seabra, A., & Rubilar, O. (2019). Comparison of antibacterial and antibiofilm activities of biologically synthesized silver nanoparticles against several bacterial strains of medical interest. *Energy, Ecology and Environment*, 4(4), 143–159. <https://doi.org/10.1007/S40974-019-00123-8>
- Sikder, M., Lead, J., Chandler, G., & Baalousha, M. (2018). A rapid approach for measuring silver nanoparticle concentration and dissolution in seawater by UV-Vis. *Science of The Total Environment*, 618, 597–607. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.04.055>

- Šileikaitė, A., Puišo, J., Prosyčevus, I., & Tamulevičius, S. (2009). Investigation of silver nanoparticles formation kinetics during reduction of silver nitrate with sodium citrate. *Materials Science*, *15*(1), 21-27. <https://matsc.ktu.lt/index.php/MatSc/article/view/26114>
- Stewardson, A., Allignol, A., Beyersmann, J., Graves, N., Schumacher, M., Meyer, R., Tacconelli, E., Angelis, G., Farina, C., Pezzoli, F., Bertrand, X., Gbaguidi, H., Edgeworth, J., Tosas, O., Martinez, J., Ayala, M., Pan, A., Zoncada, A., Marwick, C.A., & Falcone, C. (2016). The health and economic burden of bloodstream infections caused by antimicrobial-susceptible and non-susceptible Enterobacteriaceae and Staphylococcus aureus in European hospitals, 2010 and 2011: a multicentre retrospective cohort study. *Eurosurveillance*, *21*(33). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.33.30319>
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., Magrini, N., & WHO Pathogens Priority List Working Group (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, *18*(3), 318-327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- Vinh, H., Dai, L., Thi, C., Dinh, H., Ngoc, T., Gia, D., & Xuan, P. (2010). Synthesis, characterization, antibacterial and antiproliferative activities of monodisperse chitosan- based silver nanoparticles. *Physicochem. Eng. Aspects*, *360*(1-2), 32-40. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.02.007>
- Wan, X., Zhuang, L., She, B., Deng, Y., Chen, D., & Tang, J. (2016). In-situ reduction of monodisperse nanosilver on hierarchical wrinkled mesoporous silica with radial pore channels and its antibacterial performance. *Materials Science and Engineering C*, *65*, 323-330. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.04.058>
- Xiu, Z., Ma, J., & Álvarez, P. (2011). Differential effect of common ligands and molecular oxygen on antimicrobial activity of silver nanoparticles versus silver ions. *Environ. Sci. Technol*, *45*, 9003-9008. <https://doi.org/10.1021/es201918f>
- Yadav, P., Manjunath, H., & Selvaraj, R. (2019). Antibacterial and dye degradation potential of zero-valent silver nanoparticles synthesised using the leaf extract of *Spondias dulcis*. *IET Nanobiotechnology*, *13*(1), 84-89. <https://doi.org/10.1049/IET-NBT.2018.5058>