

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS  
DIAMELA MARIA ROCCA

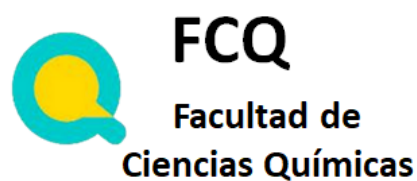
“BÚSQUEDA DE NUEVOS COMPUESTOS CON  
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN BACTERIAS DE  
RELEVANCIA CLÍNICA”

Departamento de Ciencias Farmacéuticas

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

-Año 2021-



**Directora:** Prof. Dra. María Cecilia Becerra

**Comisión evaluadora de tesis:**

Prof. Dra. Virginia Aiassa

Prof. Dra. Claudia Del Valle Sola

Prof. Dra. Luciana C. Schmidt

**Evaluadora externa:**

Prof. Dra Carolina Lorente

*Considero que estas palabras jamás podrán expresar por completo mi gratitud y cariño hacia aquellas personas que estuvieron presentes, de una u otra manera, durante el proceso de investigación y redacción de este manuscrito.*

*En primer lugar, quisiera agradecer, a la Universidad Nacional de Córdoba, al apoyo económico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT-FONCyT), la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (Secyt-UNC), a la Facultad de Ciencias químicas de Ottawa, al Prof. Dr. J. C. Scaiano y su grupo de investigación, por brindarme la oportunidad de alcanzar una meta más en mi vida. Así mismo a la comisión evaluadora de este trabajo, la Dra. Virginia Aiassa, Dra. Claudia Solá, Dra. Luciana Schmidt y la Dra. Carolina Lorente por el tiempo y dedicación que pusieron en la revisión de este manuscrito.*

*A Ceci por poner a mi disposición su tiempo, conocimiento y espacio de trabajo para que yo desarrollara esta investigación, por acompañarme en todo momento. A Vir por el acompañamiento constante en este proceso formativo, por escucharme y estar cuando necesitaba ayuda. A Jaz por su disposición, compañía, ayuda y acompañamiento en este proceso, por todos los lindos días compartidas en el laboratorio. A ustedes muchas gracias por su voto de confianza, cariño y los buenos recuerdos que dejan los experimentos, congresos y juntadas de grupo. Y sobre todo gracias por su hermosa amistad.*

*Al grupo LINBIO, conformado por Ceci, Vir, Jaz y Ari, por permitirme ser parte de su equipo, de ustedes aprendí muchísimo, las admiro y valoro no solo como personas, sino como excelentes investigadoras.*

*A mis compañeras de trabajo y amigas: Sol, Meli, Ara, Sil, Vivi B, Nati y Mica. Gracias por todos los momentos compartidos, tanto dentro como fuera del laboratorio.*

*Sol gracias por compartir conmigo mis primeros pasos en el laboratorio, enseñarme, y hacerme reír con tus ocurrencias. Meli, por compartir momentos tan divertidos y musicales. Ara, por tu gran buena onda y simpatía. Sil, gracias por tus charlas y mates, por estar cuando necesitaba un oído. Vivi B. por tus consejos, compañía de charlas, y en prácticos y seminarios. Nati por tu alegría y sonrisa que contagian. Mica gracias por tu amistad y por compartir mi paso en la docencia.*

*A Ana, Pauli y Dra. Albesa por los hermosos momentos compartidos en el grupo, por los días de mate, almuerzos, tortas compartidas y sobre todo por brindarme su cariño y compañía.*

*A las secretarias del departamento de Ciencias Farmacéuticas Lauri, Fer y María Ester, por ser las primeras en saludarme con una hermosa sonrisa. Además, de las historias compartidas y hermosas charlas.*

*A mis maravillosos padres y hermana, a mis sobrinos Zari y Fran que los amo con todo mi corazón, así mismo a la familia de Cesar, gracias, porque su amor y apoyo SIEMPRE está presente.*

*A César por acompañarme en cada paso de mi vida, por entenderme, por jamás soltar mi mano y darme fuerzas cuando más lo necesitaba, por ser el mejor amigo y confidente. Espero seguir descubriendo nuevas aventuras a tu lado.*

*A Vivi Cano gracias por tu hermosa amistad, por aceptarme, quererme y apoyarme tal como soy, por estar siempre cuando necesitaba un consejo. A Fer por apoyarme, compartir tantos lindos momentos, charlas y comidas ricas, y acompañarme en varios proyectos de mi vida. A Ani por tus consejos, por estar siempre apoyandome. A ustedes chicas por estar siempre llenándome de alegría en este camino de tesis.*

*A todas las maravillosas personas que conocí durante el doctorado, gracias, Dary, Jesi, Karen, Caro, Eli, Niña Ka, María, Génesis, Andrea, Cata, Tefii, por su amistad. Las quiero mucho y estoy tan agradecida de tenerlas en mi vida. A estas personas maravillosas que han sido mis amigos desde los 5 años, y los que he conocido desde que me mudé a Córdoba para estudiar: Dani, Aldana, Nati, Pao G, Pao C, Gise G, Gise M, Lili, Clau, Ema, Sil, Valle, gracias por cada momento compartido y por los que vendrán!*

*A todos muchas gracias por formar parte de este capítulo en mi vida.*

# BÚSQUEDA DE NUEVOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN BACTERIAS DE RELEVANCIA CLÍNICA

## ÍNDICE

.....	1
ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y FÓRMULAS QUÍMICAS.....	1
RESUMEN DEL TRABAJO DE TESIS.....	4
INTRODUCCIÓN .....	8
1.1 Resistencia a antibióticos: problemática actual .....	8
1.2 Formas de vida bacteriana: células planctónicas y biofilms .....	10
1.3 Alternativas terapéuticas a los antibióticos de uso clínico .....	12
1.4 Terapia Fotodinámica Antimicrobiana (PACT) como alternativa para el tratamiento de infecciones por bacterias multirresistentes .....	14
1.5 Alternativas para combatir el desarrollo de biofilms en dispositivos médicos. Antecedentes de recubrimientos. Materiales antifouling. ....	18
HIPÓTESIS, OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS .....	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN: PARTE I. ....	24
SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS COMO FOTSENSIBILIZADORES EN LA PACT .....	24
2.1 Síntesis de nanopartículas de oro conjugadas y estabilizadas con trihidrato de amoxicilina (amoxi@AuNP).....	24
2.2 Caracterización de amoxi@AuNP .....	28
2.2.1 Caracterización de amoxi@AuNP por TEM .....	29
2.3 Estabilidad coloidal de amoxi@AuNP .....	35
2.4 Síntesis de nanopartículas de plata conjugadas y estabilizadas con lignina (lignina@AgNP) .....	37
2.5 Caracterización de lignina@AgNP .....	41
2.5.1 Caracterización de lignina@AgNP por TEM .....	41
2.6 Estabilidad coloidal de lignina@AgNP.....	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN: PARTE II. ....	48
EFICACIA DE LAS NANOPATÍCULAS METÁLICAS COMO FOTSENSIBILIZADORES EN LA PACT	48
3.1 Eficacia de amoxi@AuNP como fotosensibilizador para la PACT. Curvas de muerte bacteriana .....	48
3.2 Ensayos en biofilms bacterianos.....	50
3.2.1 Cuantificación de la masa de biofilm con la tinción con Cristal Violeta (CV).....	50

3.2.2 Eficacia de amoxi@AuNP para la PACT en biofilms maduros.....	52
3.2.3 Investigación de la eficacia de amoxi@AuNP para la PACT en biofilms maduros mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	53
3.2.4 Viabilidad celular en biofilm maduro determinada por microscopía de escaneo láser confocal (CLSM) .....	56
<b>3.3 Determinación de la actividad antimicrobiana de lignina@AgNP.....</b>	<b>58</b>
3.3.1 Cinética de muerte bacteriana bajo irradiación .....	58
<b>3.4 Eficacia de lignina@AgNP para la PACT en biofilm maduro.....</b>	<b>62</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN: PARTE III. ....</b>	<b>65</b>
<b>MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS UTILIZADAS COMO FOTSENSIBILIZADORES EN LA PACT .....</b>	<b>65</b>
<b>4.1 Estudio del mecanismo de acción de amoxi@AuNP .....</b>	<b>65</b>
4.1.1 Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y especies reactivas del nitrógeno (ERNs) por espectrofluorometría utilizando la sonda 1,2,3 -Dihidrorodamina (DHR). ....	65
4.1.2 Actividad antimicrobiana de amoxi@AuNP en cultivos planctónicos de cepas anaerobias facultativas. ....	66
4.1.3 Análisis del daño inducido por amoxi@AuNP en la PACT mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). ....	67
<b>4.2 Investigación de la actividad hemolítica de amoxi@AuNP .....</b>	<b>73</b>
<b>4.3 Viabilidad celular de amoxi@AuNP en fibroblastos 3T3 .....</b>	<b>74</b>
<b>4.4 Estudio del mecanismo de acción de lignina@AgNP .....</b>	<b>75</b>
4.4.1 Cuantificación de EROs y ERNs en cultivos planctónicos por espectrofluorometría utilizando la sonda fluorescente diacetato 2',7'-dicloro-hidrofluoresceína (H2DCFDA) .....	75
<b>4.5 Viabilidad celular de lignina@AgNP en fibroblastos 3T3 .....</b>	<b>80</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN: PARTE IV. ....</b>	<b>83</b>
<b>DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN FARMACÉUTICA DE Amoxi@AuNP PARA APLICACIÓN TÓPICA.....</b>	<b>83</b>
<b>5.1 Desarrollo y caracterización de formulaciones de amoxi@AuNP para aplicación tópica .....</b>	<b>83</b>
5.1.1 Desarrollo de gel de amoxi@AuNP para aplicación tópica .....	83
5.1.2 Estabilidad de geles de amoxi@AuNP para aplicación tópica .....	87
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN: PARTE V. ....</b>	<b>94</b>
<b>DESARROLLO DE UN RECUBRIMIENTO ANTIFOULING PARA DISPOSITIVOS MÉDICOS.....</b>	<b>94</b>
<b>6.1 Síntesis in situ de nanoplacas de oro como recubrimiento antifouling para dispositivos médicos (Kauratec®).....</b>	<b>94</b>
6.1.1 Síntesis de nanoplacas de oro .....	94
<b>6.2 Caracterización de nanoplacas de oro .....</b>	<b>97</b>
<b>6.3 Recubrimiento in situ con nanoplacas de oro en catéteres y prótesis de silicona .....</b>	<b>100</b>

6.4 Estudio de durabilidad y resistencia del recubrimiento con nanoplacas de oro .....	102
6.5 Capacidad antifouling del recubrimiento con nanoplacas de oro .....	103
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>108</b>
<b>PROYECCIONES.....</b>	<b>110</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>111</b>
7.1 Cepas y condiciones de cultivo bacteriano .....	111
7.2 Síntesis de nanopartículas de oro conjugadas con amoxicilina (amoxi@AuNP) como fotosensibilizadores para la PACT .....	111
7.2.1 Síntesis de amoxi@AuNP y nanopartículas de oro (AuNP) sin recubrir .....	111
7.2.2 Caracterización de amoxi@AuNP .....	112
7.2.3 Estabilidad coloidal de amoxi@AuNP .....	113
7.3 Síntesis de nanopartículas de plata conjugadas y estabilizadas con lignina (lignina@AgNP) .....	113
7.3.1 Síntesis de lignina@AgNP .....	113
7.3.2 Caracterización de lignina@AgNP .....	114
7.3.3 Estabilidad coloidal de lignina@AgNP .....	114
7.4 Eficacia de amoxi@AuNP como fotosensibilizador para la PACT. Curvas de muerte bacteriana .....	115
7.5 Ensayos en biofilms bacterianos.....	115
7.5.1 Cepas bacterianas.....	115
7.5.2 Inducción de la formación de biofilm maduro .....	115
7.5.3 Cuantificación de la masa de biofilm con la tinción con Cristal Violeta (CV).....	116
7.5.4 Eficacia de amoxi@AuNP para la PACT en biofilms maduros .....	116
7.5.5 Imágenes de biofilms obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	116
7.5.6 Análisis de imágenes obtenidas por SEM mediante Fiji-ImageJ® .....	117
7.5.7 Viabilidad celular en biofilm maduro determinada por microscopía de escaneo láser confocal (CLSM) .....	117
7.6 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) de lignina@AgNP en cultivos planctónicos .....	117
7.7 Actividad antimicrobiana de lignina@AgNP. Curvas de muerte bacterianas.....	118
7.8 Formación de biofilm bacteriano y eficacia de lignina@AgNP en la disminución de la viabilidad celular en biofilm maduro.....	118
7.9 Estudio del mecanismo de acción de amoxi@AuNP .....	119
7.9.1 Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y especies reactivas del nitrógeno (ERNs) por espectrofluorimetría utilizando la sonda 1,2,3 -Dihidrorodamina (DHR).....	119

7.9.2 Actividad antimicrobiana de amoxi@AuNP en cultivos planctónicos de cepas anaerobias facultativas .....	119
7.9.3 Análisis del daño inducido por amoxi@AuNP en la PACT mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	120
<b>7.10 Investigación de la actividad hemolítica de amoxi@AuNP .....</b>	<b>120</b>
<b>7.11 Viabilidad celular de amoxi@AuNP en fibroblastos 3T3 .....</b>	<b>121</b>
<b>7.12 Estudio del mecanismo de acción de lignina@AgNP.....</b>	<b>122</b>
7.12.1 Cuantificación de EROs y ERNs en cultivos planctónicos por espectrofluorometría utilizando la sonda fluorescente diacetato 2',7'-dicloro-hidro-fluoresceína (H2DCFDA) ..	122
<b>7.13 Viabilidad celular de lignina@AgNP en fibroblastos 3T3 .....</b>	<b>122</b>
<b>7.14 Desarrollo y caracterización de formulaciones tópicas de amoxi@AuNP.....</b>	<b>123</b>
7.14.1 Desarrollo de gel de amoxi@AuNP para aplicación tópica .....	123
7.14.2 Estabilidad de geles de amoxi@AuNP para aplicación tópica .....	123
<b>7.15 Síntesis in situ de nanoplacas de oro como recubrimiento antifouling para dispositivos médicos .....</b>	<b>124</b>
7.15.1 Síntesis y caracterización de nanoplacas de oro .....	124
7.15.2 Recubrimiento in situ con nanoplacas de oro en catéteres y prótesis de silicona ..	125
<b>7.16 Estudio de durabilidad y resistencia del recubrimiento con nanoplacas de oro .....</b>	<b>125</b>
<b>7.17 Capacidad antifouling del recubrimiento con nanoplacas de oro .....</b>	<b>125</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>126</b>
<b>PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....</b>	<b>152</b>
Publicaciones científicas .....	152
Presentaciones a congresos.....	152



## ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y FÓRMULAS QUÍMICAS

### Abreviatura: significado

NP: nanopartículas  
PACT: Terapia Fotodinámica Antimicrobiana  
FS: fotosensibilizador  
AuNP: nanopartículas de oro  
AgNP: nanopartículas de plata  
amoxi@AuNP: nanopartículas de oro conjugadas con amoxicilina  
lignina@AgNP: nanopartículas de plata conjugadas con lignina  
EROs: especies reactivas del oxígeno  
ERNs: especies reactivas del nitrógeno  
°C: grados centígrados  
h: hora  
min: minutos  
μL: microlitros  
M: molar  
mM: milimolar  
nM: nanomolar  
μg: microgramos  
mL: mililitros  
rpm: revoluciones por minuto  
TEM: microscopía electrónica de transmisión  
FT-IR: espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier  
CLSM: microscopía de escaneo láser confocal  
SEM: microscopía electrónica de barrido  
DLS: dispersión de luz dinámica  
TGA: análisis termogravimétrico  
ICP-OES: espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente  
ATR: reflectancia total atenuada  
RMN-H<sup>1</sup>: resonancia magnética nuclear de protón  
RNP: radio de la nanopartícula  
rA: radio atómico covalente del metal  
nm: nanómetro  
PBS: buffer fosfato salino  
TS: caldo tripteína soya  
MH: caldo Mueller Hinton  
LB: caldo Luria Bertani  
CC: caldo cerebro corazón  
AMH: agar Mueller Hinton  
DMEM: medio Dulbecco's Modified Eagle  
SAMS: *Staphylococcus aureus* meticilino sensible  
SAMR: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente

PAE: *Pseudomonas aeruginosa*  
UFC: unidades formadoras de colonias  
DO: densidad óptica  
CIM: concentración inhibitoria mínima  
LED: diodo emisor de luz  
cm: centímetros  
W/m<sup>2</sup>: vatios por metro cuadrado  
DHR: dihidrorodamina  
HR: hidrorodamina  
DMSO: dimetilsulfóxido  
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio  
XTT: 2,3 bis (2 metoxi-4-nitro-5 sulfofenil) 2H tetrazolio, 5 carboxanilida  
PMS: metasulfato de fenazina  
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético  
Abs: absorbancia  
p/v: peso en volumen  
v/v: volumen en volumen  
CV: cristal violeta  
NA: naranja de acridina  
H<sub>2</sub>DCFDA: diacetato 2',7'-dicloro-hidro-fluoresceína  
HDCF: 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína  
DCF: 2',7'-diclorofluoresceína  
EDS: espectrometría de rayos X de dispersión de energía  
XRD: difracción de rayos X  
SEM/EDS: microscopía electrónica de barrido con detector EDS  
CLSI: Clinical and Laboratory Standard Institute  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
IDSA: Sociedad Estadounidense de Enfermedades Infecciosas  
EPS: matriz polimérica extracelular  
PDI: índice de polidispersidad  
TEA: trietanolamina  
ITU: infecciones del tracto urinario

#### Fórmula química: significado

AuHCl<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O: ácido tetracloroáurico trihidrato  
Au: oro  
Au<sup>+3</sup>: catión oro valencia +3  
AgNO<sub>3</sub>: nitrato de plata  
Ag: plata  
Ag<sup>+1</sup>: catión plata valencia +1  
NaBH<sub>4</sub>: borohidruro de sodio  
CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono  
NaCl: cloruro de sodio  
D<sub>2</sub>O: óxido de deuterio  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: ácido sulfúrico  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno

NaOH: hidróxido de sodio  
 $O_2^{\cdot-}$ : anión superóxido  
 $O_2$ : oxígeno molecular  
OH $\cdot$ : radical hidroxilo  
NO: óxido nítrico  
ONOO $\cdot$ : peróxido de nitrito  
 $^1O_2$ : oxígeno singlete  
ZnNP: nanopartículas de zinc  
ZnO: óxido de zinc  
CuO: óxido de cobre  
TiO $_2$ : dióxido de titanio

## RESUMEN DEL TRABAJO DE TESIS

En esta tesis doctoral se plantearon cinco objetivos de trabajo con la finalidad de realizar la búsqueda de nuevos nanomateriales con actividad antibacteriana en cepas resistentes a antibióticos de uso clínico. La resistencia a antimicrobianos es uno de los problemas que más impacto tiene en el sector de salud pública en la actualidad, siendo los biofilms bacterianos una de las causas de resistencia y de persistencia de numerosas infecciones, presentando hasta 1000 veces más resistencia que las bacterias en estado planctónico. Debido a esto, la búsqueda de nuevos compuestos antibacterianos, en especial aquellos capaces de erradicar biofilms preformados, es de suma importancia. El uso de nanopartículas (NP) metálicas como fotosensibilizadores en Terapia Fotodinámica Antimicrobiana (PACT) surgió como alternativa a esta problemática.

El primer aspecto del estudio involucró la síntesis de nanopartículas de oro (AuNP) y plata (AgNP) conjugadas con antibiótico o con el polímero natural lignina, respectivamente (amoxi@AuNP y lignina@AgNP). La síntesis se llevó a cabo en un solo paso, aprovechando la capacidad reductora y estabilizadora de los mencionados compuestos. De esta manera, las NP obtenidas fueron estables de acuerdo a los resultados obtenidos a partir de la caracterización de las mismas mediante diferentes técnicas como espectrofotometría, microscopía electrónica de transmisión (TEM), espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), medición del potencial  $\zeta$  (Zeta).

La segunda etapa de trabajo se focalizó en el estudio de la actividad antibacteriana de las NP metálicas sintetizadas, utilizadas como fotosensibilizadores en la PACT, en cultivos planctónicos bacterianos de cepas clínicas resistentes de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Mediante curvas de muerte bacteriana, se obtuvo como resultado un efecto bactericida de las NP a los pocos minutos de irradiación. A su vez, se estudió el efecto fotosensibilizador de las NP en biofilms de las cepas bacterianas mencionadas anteriormente, donde se obtuvo una marcada reducción de la viabilidad celular, resultado que fue corroborado mediante técnicas como microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de escaneo láser confocal (CLSM).

El tercer eje de trabajo estuvo orientado a la investigación del posible mecanismo de acción y estudio de citotoxicidad de los compuestos mencionados. La PACT se define como una reacción fotoquímica dependiente del oxígeno, que ocurre tras la activación del fotosensibilizador mediada por la luz, que conduce a la generación de especies reactivas del oxígeno (EROs) y especies reactivas del nitrógeno (ERNs). Mediante espectrofluorimetría, se observó la producción de EROs y ERNs en las cepas mencionadas anteriormente en estado planctónico, cuando las mismas fueron tratadas con las NP bajo irradiación. A su vez, la excitación de NP metálicas crea una zona de mayor temperatura en su superficie debido a la oscilación de los electrones en la superficie. Este aumento de la temperatura local conlleva a la desnaturalización de proteínas y lípidos presentes en la pared bacteriana. Por lo que la acción bactericida de las NP en la PACT en cultivos planctónicos fue el resultado de un efecto fotoquímico y fototérmico. Otro aspecto interesante fue evaluar la toxicidad en células eucariotas y la selectividad de las NP por las células bacterianas, lo que se llevó a cabo mediante ensayos de viabilidad en fibroblastos 3T3 y análisis por TEM de co-cultivos bacterianos

y células sanguíneas, tratados con las NP bajo irradiación. Los resultados obtenidos demostraron que las NP sintetizadas presentaron una mayor afinidad por la membrana bacteriana, a la cual se unieron en mayor proporción, de acuerdo a lo observado en las imágenes y por lo tanto demostraron ser biocompatibles.

En el cuarto objetivo se llevó a cabo el diseño y caracterización de una formulación a base de hidrogel de las amoxi@AuNP para aplicación tópica. La formulación obtenida logró ser estable y con propiedades de sólido viscoelástico, sólido con propiedades adecuadas para la aplicación tópica de las NP en el tratamiento de infecciones bacterianas.

El quinto eje de estudio se basó en el desarrollo de un recubrimiento con propiedades antifouling para productos médicos de base polimérica, mediante síntesis *in situ* de nanoplacas laminares de oro, utilizando un antibiótico aminoglucósido como agente reductor, y luego de pocos minutos de reacción, se logró la síntesis sobre la superficie del producto médico. Este recubrimiento presentó propiedades antifouling contra biofilms de cepas clínicas resistentes de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, y una cepa de referencia de *Escherichia coli*, resultado observado mediante SEM. Este nuevo método facilitó la producción de nanoplacas de oro de alta pureza, aplicado directamente a la superficie deseada de forma rápida y sencilla. El revestimiento obtenido fue resistente a la erosión y al calor y confirió su capacidad antifouling al material.

Mediante estos estudios pudimos obtener NP metálicas sintetizadas en un solo paso, de manera sencilla, rápida y económica, las cuales resultaron ser estables. Utilizadas como fotosensibilizadores en la PACT, presentaron actividad antibacteriana tanto en cultivos planctónicos como en biofilms de cepas bacterianas clínicas resistentes a antibióticos, optimizando el tiempo de tratamiento. Con base en los resultados obtenidos, esta terapia promete ser una alternativa terapéutica para tratar infecciones bacterianas resistentes a antibióticos, manteniendo la selectividad por células procariotas. A su vez, el desarrollo de una formulación a base de hidrogel de las NP permitiría un sistema de entrega para la aplicación local, mejorando la propiedad antibacteriana con el aumento de la concentración de NP, que podría ser alta en la zona de infección a través de la administración de la formulación. Por último, el desarrollo del recubrimiento antifouling podría aplicarse a dispositivos médicos para prevenir la formación de biofilms y extender su vida útil.

Los resultados obtenidos en la tesis doctoral bajo la premisa del objetivo de encontrar compuestos para combatir la resistencia a antimicrobianos, tendría un gran impacto para la industria farmacéutica.

In this doctoral thesis, four lines of work were proposed in order to search for new nanomaterials with antibacterial activity against antibiotic resistant clinical strains. Antimicrobial resistance infections due to bacterial biofilms have a major impact on public health. In fact, these biofilms cause up to 1000 times more persistent pathologies than microorganisms in planktonic state. Therefore, research for new antibacterial compounds is urgently needed, especially those capable of eradicating preformed biofilms. In this thesis, we have developed four approaches to this issue. The first aspect of the study involved the synthesis of gold (AuNP) and silver (AgNP) nanoparticles synthesized and conjugated with antibiotics or with the natural polymer lignin, respectively (amoxi@AuNP and lignin@AgNP). The synthesis was carried out in a single

step, taking advantage of the reducing and stabilizing capacity of the mentioned compounds. In this way, the NP obtained were stable according to the results obtained from the characterization of the NP using different techniques such as spectrophotometry, transmission electron microscopy (TEM), infrared spectroscopy with Fourier transform (FT-IR), potential measurement  $\zeta$ .

The second stage of work focused on the study of the antibacterial activity of the synthesized metallic NP used as photosensitizers in PACT in bacterial planktonic cultures of resistant clinical strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. After a few minutes of irradiation, a bactericidal effect was reached. In turn, the photosensitizing effect of NP in biofilms of the mentioned bacterial strains was studied, where a marked reduction in cell viability was obtained, a result that was corroborated by techniques such as scanning electron microscopy (SEM) and scanning microscopy confocal laser (CLSM).

The third approach was oriented to the investigation of the possible mechanism of action and cytotoxicity of the mentioned compounds. PACT is defined as an oxygen-dependent photochemical reaction, which occurs after light-mediated photosensitizer activation, leading to the generation of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). By means of spectrofluorimetry, the production of ROS and RNS was observed in the strains mentioned above in a planktonic state, after treatment with the NPs under irradiation. In turn, the excitation of metallic NP creates a zone of higher temperature on its surface due to the oscillation of electrons on the surface. This increase in local temperature leads to the denaturation of proteins and lipids present in the bacterial wall. Therefore, the bactericidal action of NP on PACT in planktonic cultures was the result of a photochemical and photothermal effect. Another interesting aspect was to evaluate the toxicity in eukaryotic cells and the selectivity of NPs for bacterial cells, which was carried out through viability assays in 3T3 fibroblasts and TEM analysis of bacterial co-cultures and blood cells treated with the NP under irradiation. The results obtained showed that the synthesized NP had a great affinity for the bacterial membrane.

In the fourth approach, the design and characterization of a hydrogel-based formulation of amoxi@AuNP for topical application were carried out. The formulation obtained was stable and present properties of a viscoelastic solid, suitable for the topical application of NP in the treatment of bacterial infections.

Last, we have focused on the development of an antifouling coatings for polymer-based medical products, by means of *in situ* synthesis of laminar gold nanoplates, using an aminoglycoside antibiotic as a reducing agent. This coating showed antifouling properties against biofilms of resistant clinical strains of *S.aureus* and *P.aeruginosa*, and the reference strain of *Escherichia coli*, this result was observed by SEM. This new method facilitated the production of high purity gold nanoplates, applied directly to the desired surface. The obtained coating was resistant to erosion and hea in tested times (up to 30 days), giving to the material its antifouling capacity.

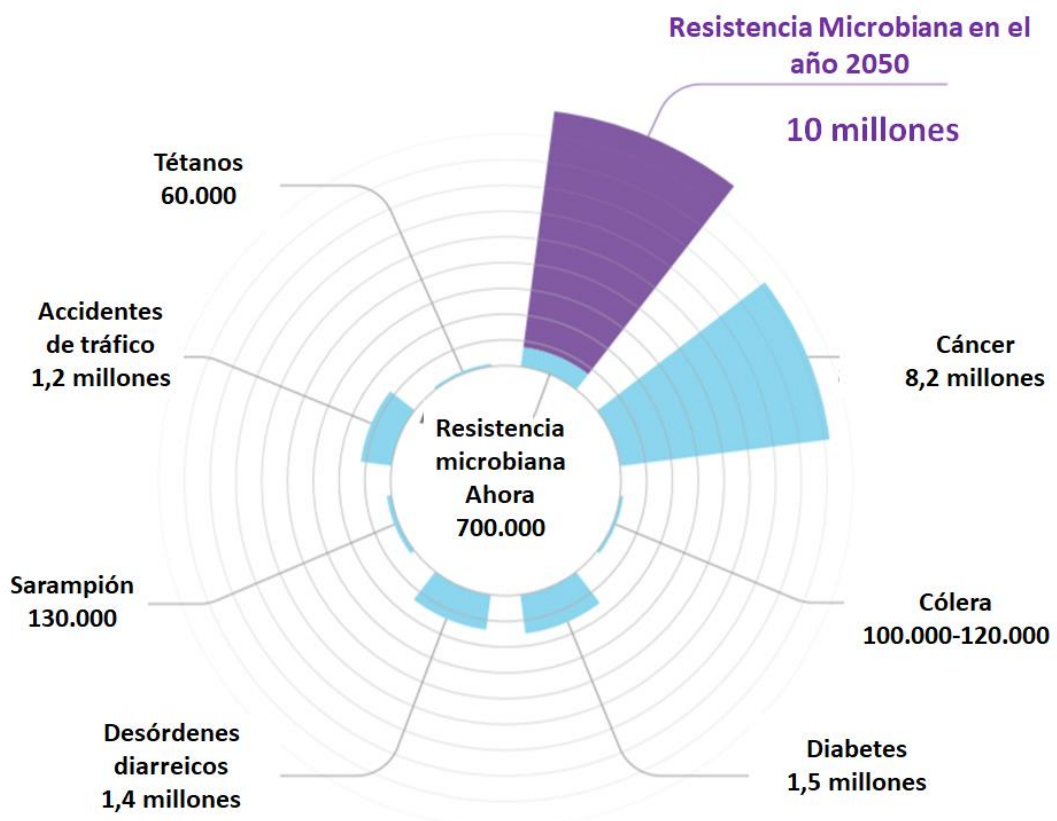
Through these studies, we were able to synthesize metallic NP in a single step, in a simple, fast and economic way, which turned out to be stable. Used as photosensitizers in PACT, they showed antibacterial activity both in planktonic cultures and in biofilms of antibiotic resistant clinical bacterial strains, optimizing the treatment time. Based on the results, this therapy promises to be a therapeutic alternative to treat antibiotic-resistant bacterial infections, maintaining selectivity for prokaryotic cells. In turn, the

development of a hydrogel-based formulation of NP would allow a delivery system for local application. Finally, the development of the antifouling coating could be applied to a wide range of medical devices to prevent the formation of biofilms and extend their useful life. The results obtained in this doctoral thesis under the premise of finding compounds to combat antimicrobial resistance, could have a positive impact for the pharmaceutical industry.

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Resistencia a antibióticos: problemática actual

La resistencia bacteriana a antibióticos es un problema grave que enfrenta la salud pública mundial (Christaki y col., 2020). Está causada por la capacidad de adaptación que desarrollan los microorganismos a ambientes hostiles y el uso clínico inadecuado de los antimicrobianos. Además de la resistencia mediada genéticamente, la capacidad de las bacterias para desarrollar biofilms aumenta la resistencia a los antibióticos, responsable de un número creciente de enfermedades infecciosas crónicas, persistentes y difíciles de tratar (Tozar y col., 2019). La asamblea de la Organización Mundial de la Salud (OMS), celebrada en Ginebra el 12 de mayo de 2015, acordó, entre los países miembros, un plan de acción global para combatir la resistencia a los antibióticos. Actualmente, se registran 700.000 muertes anuales asociadas a resistencia a antimicrobianos con una proyección en aumento de 10.000.000 de muertes para el año 2050 (Figura 1), superando al cáncer como causa principal (O'Neill, 2016; Cox y col., 2017; Ghosh y col., 2019).



**Figura 1.** Proyección de causas de muerte para el año 2050, ascendiendo la resistencia a antibióticos a 10 millones por año (O'Neill, 2016).

En Europa, las infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos cuestan a la sociedad alrededor de 1,5 mil millones de euros al año y 600 millones de



días de productividad perdida, mientras que en los EE.UU., las bacterias multirresistentes causan alrededor de 99.000 muertes al año y costos sanitarios asociados de 21 a 34.000 millones de dólares al año.

En Argentina, el aumento de la resistencia a los antimicrobianos tiene una vinculación directa con el abuso y el mal uso de estos agentes terapéuticos. Se estima que el 50% de todos los antimicrobianos que se prescriben son innecesarios o se usan de manera inadecuada. Entre los factores que inciden en el uso incorrecto de antimicrobianos, se encuentran la automedicación, la dispensa sin prescripción y el incumplimiento de indicaciones médicas (Lazovski y col., 2017). En los últimos años, se ha incrementado el número de hospitales con casos o brotes de enterobacterias productoras de carbapenemasas, como *Klebsiella pneumoniae* (Ceriana y col., 2012).

La frecuencia de desarrollo de nuevas clases de antibióticos disminuyó significativamente en las últimas décadas, entre los años 1930 y 1962 se descubrieron y comercializaron veintidós antibióticos (Powers, 2004); y sólo dos lipopéptidos, daptomicina y linezolid, se introdujeron después de este período (Zhanel y col., 2010; Tozar y col., 2019). Sin embargo, resultados de ensayos preclínicos revelaron resistencia bacteriana para el linezolid en cepas de *Staphylococcus epidermidis* y *S. aureus* meticilino resistente (Vestergaard y col., 2019). Además, las once moléculas aprobadas por Food and Drug Administration (FDA) entre 2007 y 2017 son representantes de las clases de antibióticos ya conocidas (FDA Approved Drugs in Infections and Infectious Diseases, CenterWatch), a las que las bacterias se adaptan y desarrollan resistencia fácilmente, como se ha demostrado para la ceftarolina, fidaxomicina, ceftolozano/tazobactam, ceftazidima/avibactam, y dalbavancina (Zhanel y col., 2010; Laudano y col., 2011; Leeds y col., 2014; Humphries y col., 2015; Haidar y col., 2017).

La Sociedad Estadounidense de Enfermedades Infecciosas (IDSA) ha designado a *Enterococcus faecium*, *S.aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* como "patógenos ESKAPE" debido a la rápida disminución de la disponibilidad de antibióticos de uso común, incluidos los fluoroquinolónicos, lactamas, macrólidos, aminoglucósidos, tetraciclinas, contribuyendo al alto porcentaje de muertes causadas por infecciones adquiridas en el hospital relacionadas con la formación de biofilms (Post y col., 2019; Narayana y col., 2019). La OMS ha incluido recientemente a *P. aeruginosa* resistente a los carbapenémicos como una de las tres especies bacterianas en las que existe una necesidad crítica de desarrollar nuevos antibióticos o estrategias terapéuticas para tratar infecciones (Tacconelli y col., 2017).

Alrededor del 80% de las infecciones bacterianas están relacionadas con la formación de biofilms, los cuales pueden llegar a ser 100 a 1000 veces más resistentes que sus contrapartes planctónicas (Hall y col., 2017; Ciofu y col., 2017; Del Pozo, 2018), por lo que se necesitan dosis de antibióticos en concentraciones más altas durante el tratamiento, acelerando el desarrollo de multirresistencia. Otros factores contribuyen a esta tolerancia antimicrobiana, como ser, una tasa de crecimiento lento, disminución en la penetración del agente antimicrobiano dentro del biofilm, cambios en la fisiología y expresión génica debido al modo de crecimiento del biofilm (Del Pozo y col., 2007). La producción de sustancia polimérica extracelular, la aparición de variantes de colonias pequeñas (Bui y col., 2015), la presencia de biomateriales o disfunción local de los neutrófilos (Begun y col., 2007; Prabhakara y col., 2011), también desempeñan un papel en la disminución de la susceptibilidad de las bacterias del biofilm a los agentes

antimicrobianos. Además, las densidades celulares más altas que se encuentran en los biofilms aumentan considerablemente la probabilidad de transferencia horizontal de genes (Hausner y col., 1999), lo que incrementa la aparición de cepas con aumento de resistencia o alteración de los perfiles de virulencia.

Los biofilms pueden desarrollarse en una amplia variedad de superficies, incluidos tejidos vivos, dispositivos médicos permanentes, tuberías del sistema de agua potable, sistemas acuáticos naturales, donde las bacterias tienden a formar una comunidad heterogénea, interactuar e intercambiar información utilizando genes y/o señales (Anderson y col., 2008). Los biofilms bacterianos se asocian a una amplia gama de infecciones, desde infecciones tisulares crónicas como las que ocurren en los pulmones de pacientes con fibrosis quística, hasta las relacionadas con dispositivos exógenos, como catéteres o prótesis articulares (Ciofu y col., 2017).

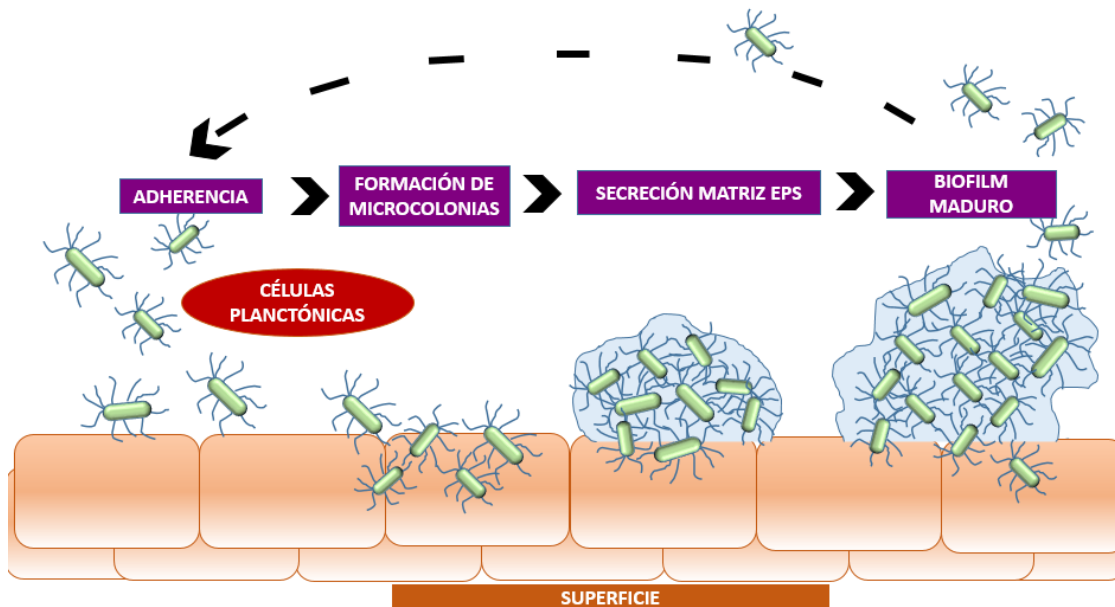
Los implantes y dispositivos médicos forman una parte importante de la medicina y han hecho grandes contribuciones para mejorar la calidad de vida humana, sin embargo, se han asociado con complicaciones derivadas de la formación de biofilms, que pueden causar infecciones crónicas, prolongar las estancias en el hospital, ocasionando grandes gastos en el sistema de salud pública (Xu y col., 2017). La contaminación microbiana, colonización y formación del biofilm en las superficies de dispositivos médicos implantados puede ocurrir 24 h después de la inserción (Gominet y col., 2017). Se han estimado datos de infecciones relacionadas con dispositivos médicos, tales como implantes mamarios (2%), prótesis articulares (2%), válvulas cardíacas mecánicas (4%), derivaciones ventriculares (10%), marcapasos y desfibrilador (4%), y alrededor del 40% en dispositivos asistidos para ventrículo (Jamal y col., 2017). Entre los dispositivos médicos, los catéteres urinarios son los dispositivos más utilizados en todo el mundo, con estimaciones de más de 100 millones de catéteres uretrales vendidos anualmente y más de 30 millones de catéteres urinarios colocados cada año sólo en los EE.UU. (Pelling y col., 2019). Alrededor de un 80% de las infecciones del tracto urinario (ITU) están asociadas al uso de catéteres, siendo una de las infecciones nosocomiales más comunes (Sabir y col., 2017). La prevalencia de las ITU asociadas al uso de catéteres, conlleva a un elevado costo financiero y humano, estimado en 10-25 mil millones de euros y hasta 2.100 muertes por año dentro del servicio de salud nacional del Reino Unido. Se estima que el costo en el tratamiento de ITU relacionadas al uso de catéteres, y las complicaciones a largo plazo en pacientes cateterizados en la comunidad, pueden rondar los 10.000 euros por paciente, junto con estudios que destacan la prevalencia de derivaciones hospitalarias de emergencia en este grupo (Pelling y col., 2019). Se prevé que el mercado de catéteres seguirá creciendo, junto con las complicaciones asociadas a su uso y la formación de biofilms bacterianos en estos dispositivos (Feneley y col., 2015; Pelling y col., 2019).

## *1.2 Formas de vida bacteriana: células planctónicas y biofilms*

Las bacterias pueden encontrarse en la naturaleza bajo dos formas, bacterias libres denominadas planctónicas, o como comunidades organizadas y encapsuladas en una matriz que ellas mismas secretan llamadas biofilms (Hernández-Jiménez y col., 2013), (Figura 2). Los biofilms se presentan como comunidades tridimensionales organizadas adheridas a una superficie viva o inerte. Estos conglomerados celulares se encuentran encapsulados en una matriz polimérica extracelular (EPS) que los mismos

secretan, separada por canales acuosos que actúan como el principal sistema de circulación de nutrientes y productos de desechos (Davies, 2003). Asimismo, el biofilm está compuesto en un 85% por esta matriz, mientras que el 15% restante corresponde a microorganismos (Lawrence y col., 1991). Una pequeña fracción de las bacterias se encuentra en forma planctónica. Se ha postulado que el 99% de todas las células bacterianas existen en calidad de biofilms, y tan sólo 1% vive en estado planctónico (Donlan, 2002). La formación de biofilms representa una estrategia de supervivencia de las células procariontas. Esto se debe a que la estructura de estos conglomerados celulares les proporciona protección frente a fluctuaciones del medio ambiente (humedad, temperatura y pH), además les permite acumular nutrientes y les facilita la eliminación de desechos, y desempeña un papel en una serie de procesos que incluyen la unión celular, interacciones de célula a célula y tolerancia a antimicrobianos (Tolker-Nielsen, 2014).

El ciclo de desarrollo de biofilms incluye, fijación inicial de bacterias a una superficie, formación de microcolonias, maduración del biofilm y dispersión del biofilm (Figura 2).



**Figura 2.** Células en estado planctónicas o libres y fases de formación de los biofilms

Existen diferencias importantes entre el aspecto externo de las bacterias en un biofilm y el de las bacterias en estado planctónico. Las bacterias en los biofilms presentan características fisiológicas y fenotípicas distintas de sus contrapartes planctónicas, particularmente con respecto a tasas de crecimiento y expresión genética (Donlan, 2001). Además, los biofilms presentan una baja actividad metabólica, junto con una regulación de genes necesarios para el crecimiento en condiciones anaerobias. Considerando que las bacterias planctónicas están diseñadas para colonizar nuevos nichos, pero con una menor probabilidad de supervivencia, el biofilm proporciona una forma más segura para que las bacterias se reproduzcan y sobrevivan. Esto explica, en parte, la mayor tolerancia del biofilm contra antibióticos, desinfectantes y el sistema inmunológico del huésped (Hernández-Jiménez y col., 2013).

### 1.3 Alternativas terapéuticas a los antibióticos de uso clínico

Dos de los inconvenientes actuales más importantes en el tratamiento de infecciones ocasionadas por bacterias multirresistentes son la disminución de la eficiencia de los antibióticos de uso clínico y la falta de desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos.

Según Coates y col., (2011) y Chaudhary y col., (2016), veinte nuevas clases de antibióticos, en términos de estructura y mecanismos de acción, serían necesarias para desafiar eficazmente a las bacterias multirresistentes en los próximos 50 a 60 años. Dado que los patógenos bacterianos que viven en biofilms son responsables de un gran número de infecciones crónicas persistentes debido a la resistencia tanto a los antibióticos como al sistema inmunológico del huésped, ha aumentado el interés en el desarrollo de nuevos enfoques para combatir la adhesión bacteriana y la formación de biofilms.

Una alternativa al desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos para aplicaciones clínicas es la reutilización de medicamentos, la serratiopeptidasa aprobada por ANMAT o la betametasona, son un ejemplo de fármacos a reutilizar. La serratiopeptidasa, una enzima antiinflamatoria producida por una bacteria del género *Serratia*, tiene un mecanismo de acción contra biofilms de *S. aureus* diferente de su actividad proteolítica, siendo capaz de obstaculizar la entrada de *S. aureus* en los tejidos humanos al afectar la capacidad de este patógeno para adherirse a dispositivos médicos, prótesis o catéteres (Papa y col., 2013; Selan y col., 2015). De manera similar, la betametasona, un fármaco esteroide del grupo de los corticosteroides con propiedades inmunosupresoras y antiinflamatorias, ha demostrado que mejora el efecto de los antibióticos contra diferentes cepas bacterianas (Artini y col., 2014).

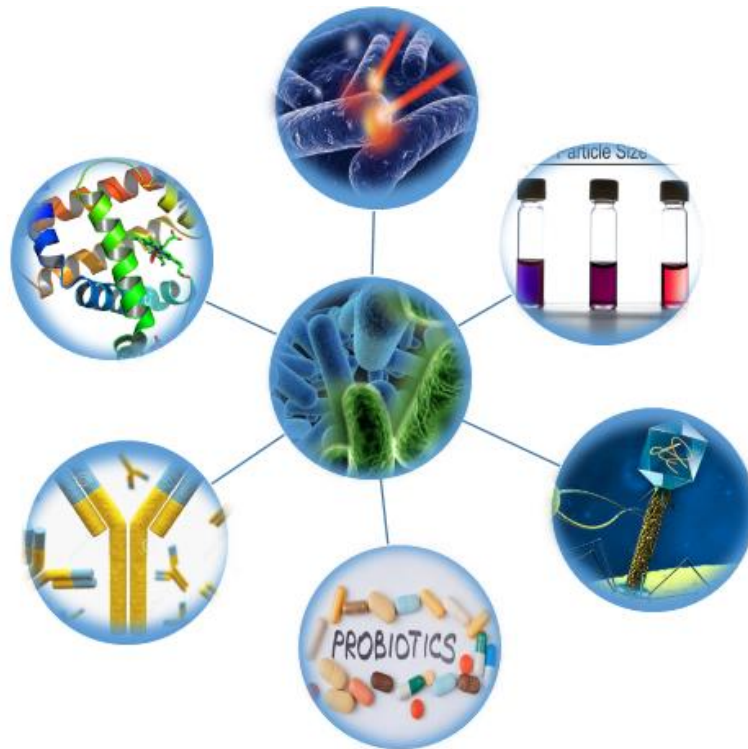
Un enfoque metodológico para la reutilización de fármacos actuales como antimicrobianos, es generar nuevas moléculas por fotoactivación y probar los nuevos productos para la actividad deseada (Casadevall y col., 2010). Un ejemplo es la clase de las fenotiazinas, grupo de fármacos antipsicóticos, cuyos numerosos derivados exhiben efectos farmacológicos significativos, tales como: insecticida, antifúngico, actividades antibacterianas y antihelmínticas (Aaron y col., 2008). Algunos estudios han demostrado que la radiación láser se puede aplicar en varios medicamentos parenterales preparados en soluciones (en la mayoría de los casos soluciones acuosas), como vancomicina, ecodisteroides, polidocanol, para la obtención de nuevos fotoproductos, basados en la modificación de la estructura molecular del correspondiente compuesto original (Smarandache y col., 2010; Smarandache, 2012; Hunyadi y col., 2012; Dinache y col., 2015).

Avances en biotecnología e ingeniería genética, han abierto nuevas vías hacia la búsqueda de terapias que pueden sustituir a los antibióticos. Se ha implementado parcialmente el uso de bacteriófagos y anticuerpos, y otras estrategias prometedoras, como probióticos, lisinas, bacteriocinas y péptidos antimicrobianos, que se encuentran en diversas etapas de desarrollo (Ghosh y col., 2019; Łusiak-Szelachowska y col., 2020; Jiale y col., 2021; Wang y col., 2021; Oliveira y col., 2021). Los bacteriófagos se pueden utilizar para tratar infecciones por diversas bacterias, que van desde *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Shigella* y *Salmonella*. Los bacteriófagos han sido probados para el

tratamiento de infecciones resistentes como la fibrosis quística (Abedon, 2015), sin embargo, la farmacocinética de los fagos es una preocupación, ya que difunden fácilmente a varios órganos del cuerpo; además el pH, y por lo tanto la estabilidad de la preparación de fagos debe considerarse como factores que afectan la eficacia del tratamiento (Abedon y col., 2011). Los péptidos antimicrobianos (AMP por sus siglas en inglés) son producidos por varios organismos multicelulares contra patógenos invasores (Brogden, 2005; Hancock y col., 2006). Presentan efectos antibacterianos, antifúngicos, antivirales, anticancerosos, insecticidas, entre otros (Zhang y col., 2016); sin embargo, estudios reportaron la existencia de resistencia bacteriana a los AMP (Guilhelmelli y col., 2013; Andersson y col., 2016). Algunas cepas bacterianas producen pequeños AMP, llamados bacteriocinas, que presentan actividad contra patógenos de importancia clínica resistentes a los antibióticos, sin embargo se ha observado el desarrollo de la resistencia en el laboratorio (Cotte y col., 2013). Los anticuerpos son alternativas útiles para el tratamiento de infecciones bacterianas multirresistentes. Numerosos anticuerpos contra estafilococos, *P. aeruginosa*, *Bacillus anthracis* y *Clostridium difficile* se encuentran en diversas etapas del desarrollo clínico y algunos de ellos ya han sido aprobados por la FDA (Bebington y col., 2008; Saylor y col., 2009). Un gran inconveniente del uso de anticuerpos para la terapia antibacteriana es el costo de producción y su escasa vida útil.

La nanotecnología ha surgido en las últimas décadas como una alternativa terapéutica para el tratamiento de infecciones bacterianas y otras enfermedades (Rao y col., 2021). La nanotecnología es un campo científico multidisciplinario que puede definirse como el diseño, producción, caracterización y aplicación de materiales, estructuras, dispositivos y sistemas controlando su tamaño y forma en el rango de nanoescala de 1 a 100 nm. En el campo médico, la aplicación de la nanotecnología se conoce como nanomedicina, que incluye el uso de nanomateriales para el diagnóstico, tratamiento, control y prevención de enfermedades. A lo largo de las décadas, las nanopartículas (NP) se han utilizado y estudiado ampliamente debido a sus propiedades únicas, como tamaño pequeño, solubilidad mejorada, adaptabilidad de la superficie y multifuncionalidad, lo que ha resultado en el desarrollo de medicamentos más seguros, tratamientos dirigidos a tejidos, nanomedicinas personalizadas, diagnóstico temprano y prevención de enfermedades. Las NP constituyen una de las estrategias más prometedoras para controlar las infecciones por biofilms, especialmente debido a su gran área superficial y propiedades químicas y físicas únicas. Estos nanomateriales están hechos de diferentes materiales como polímeros, metales (cobre, zinc, titanio, magnesio, oro, plata, etc.) y sus sales (Naik y col., 2015; Campos y col., 2020).

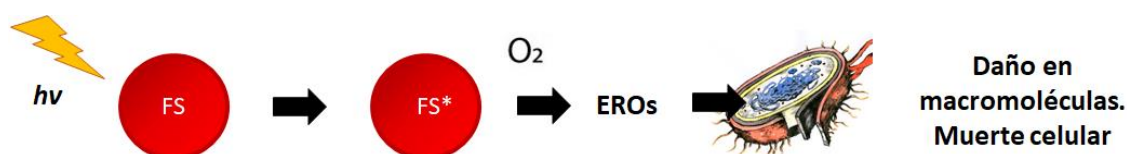
La terapia fotodinámica antimicrobiana (PACT, por sus siglas en inglés) tiene aplicaciones potenciales en la prevención y tratamiento de infecciones bacterianas multirresistentes y de biofilms (Roy y col., 2018; Piskorz y col., 2021). Esta terapia presenta numerosas ventajas, es una alternativa terapéutica económica, no tóxica, tiene actividad antimicrobiana equivalente contra patógenos sensibles y resistentes a los antibióticos, y no se han reportado mecanismos de resistencia bacteriana (Hughes y col., 2017), resultando en una alternativa muy prometedora, en relación a los demás tratamientos antimicrobianos reportados (Figura 3).



**Figura 3.** Ilustración de las alternativas terapéuticas a los antibióticos de uso clínico. Entre ellas se pueden mencionar el uso de péptidos antimicrobianos, bacteriófagos, anticuerpos, probióticos, nanotecnología, PACT.

#### ***1.4 Terapia Fotodinámica Antimicrobiana (PACT) como alternativa para el tratamiento de infecciones por bacterias multirresistentes***

El principio de la PACT se basa en la combinación de tres compuestos, una molécula no tóxica *per se*, llamada fotosensibilizador (FS), luz de un rango espectral apropiado para la excitación del FS (del espectro visible al espectro infrarrojo cercano) y oxígeno molecular (Cieplik y col., 2018). Cuando el FS es irradiado con luz a una longitud de onda apropiada, pasa a un estado excitado, y en presencia de oxígeno molecular se generan especies reactivas de oxígeno (EROs), ocasionando daño en macromoléculas de las células diana, con la consiguiente muerte celular (Figura 4). La PACT se aplica a todo tipo de microorganismos (bacterias, hongos y parásitos), incluidos los virus, y se ha demostrado su eficacia contra miembros representativos de todos ellos (Pérez-Laguna y col., 2018). Esta terapia se ha utilizado en aplicaciones dentales como periodontitis (Andersen y col., 2007), desinfección del conducto radicular (Garcez y col., 2007), gingivitis (Raghavendra y col., 2009), candidiasis oral (Mima y col., 2010); debido al fácil acceso a la fuente de luz en la boca. Otras aplicaciones médicas de la PACT son tratamientos en quemaduras (Dai y col., 2009), heridas (Dai y col., 2010) y acné (Degitz y col., 2010).



**Figura 4.** Ilustración del mecanismo de la PACT.

La PACT presenta varias ventajas para ser utilizada como alternativa para el tratamiento de las infecciones bacterianas: tiene un amplio espectro de acción, ya que las EROs generadas actúan sobre bacterias, hongos, levaduras y protozoos; poca probabilidad de promover el inicio de la mutagenicidad y resistencia bacteriana; brinda la disponibilidad de formulaciones que permitan una entrega rápida y específica del fotosensibilizador al área infectada; permite el uso de fuentes de luz de bajo costo para la activación del agente FS; es una técnica biocompatible, ya que los FS presentan afinidad por las células procariontas en relación a las eucariotas (Jori y col., 2006).

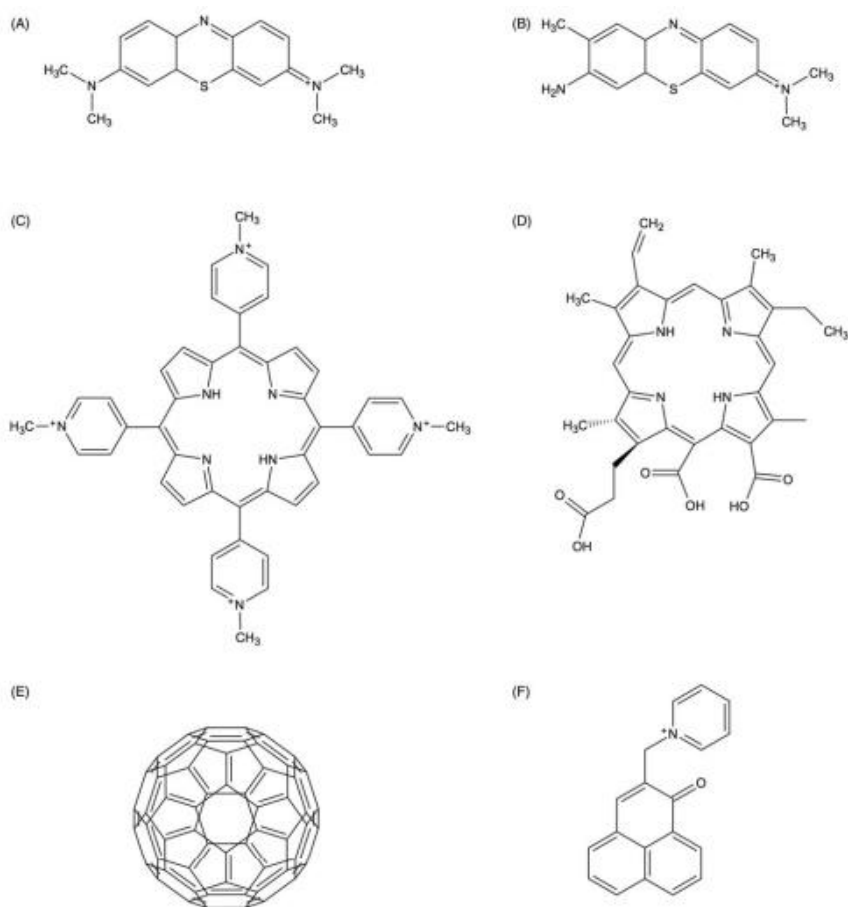
En la PACT, se han descrito la utilización de tres fuentes de luz principales: láseres (por ejemplo, argón, diodo o neodimio dopado); diodos emisores de luz (LED) y lámparas de gas, por ejemplo, lámparas de descarga de xenón o de tungsteno de cuarzo (Wilson y col., 2008; Nagata y col., 2012), estas fuentes irradian luz a la longitud de onda correspondiente al pico de máxima absorción del FS. Los láseres se aplican principalmente por su monocromaticidad más que por sus otras propiedades, como propagación de haz paralelo. En comparación con los láseres, los LED ofrecen un espectro de emisión más amplio y sus costos son más bajos. Las lámparas halógenas tienen la ventaja de que pueden ser filtradas espectralmente para irradiar cualquier FS; sin embargo, estas lámparas causan más calentamiento en comparación a las otras fuentes de luz mencionadas (Nagata y col., 2012). El calentamiento causado por una fuente de luz determinada debe considerarse para cualquier aplicación clínica de la PACT en el cuerpo humano. Dependiendo del período de irradiación y la respectiva fuente de luz utilizada, la dosis de energía aplicada puede causar un aumento de temperatura, lo que puede provocar daños tisulares.

Los FS son sustancias químicas capaces de transferir la energía absorbida a otros compuestos que, a su vez, generan especies metaestables que son muy reactivas. Estas especies reactivas son responsables del resultado del proceso llamado terapia fotodinámica (Maisch y col., 2004; Hamblin y col., 2004).

Varios FS han sido estudiados por su capacidad para unirse a bacterias y generar de manera eficiente EROs tras la fotoestimulación. Las características de los FS han sido discutidas en varios artículos (Castano y col., 2004; Detty y col., 2004; Allison y col., 2004). Dentro de las características más importantes, los FS deben presentar actividad frente a múltiples clases de células microbianas a niveles bajos y concentraciones bajas de luz, deben presentar niveles bajos de toxicidad en oscuridad, y deben mostrar selectividad por las células microbianas sobre las células mamíferas (Sperandio y col., 2013). La síntesis del FS debe ser relativamente fácil y los materiales de partida disponibles para hacer factible la producción a gran escala, además los FS deben ser solubles en agua o solubles en una mezcla de solventes acuosos biocompatibles.

Uno de los grupos de FS para la PACT más estudiados lo constituyen los derivados de porfirina, probadas por primera vez en humanos en 1913 (Krajczewski y col., 2019), estos derivados generan EROs tales como oxígeno singlete o radicales libres cuando se

irradian con longitudes de onda apropiadas y en presencia de oxígeno. En consecuencia, estos compuestos son adecuados para el tratamiento curativo o profiláctico de varias afecciones médicas que incluyen infecciones por cocos Gram-negativos como *Neisseria spp.* y bacilos Gram-negativos como *Escherichia coli* (Love y col., 2011). Los colorantes de xanteno aniónicos derivados de la fluoresceína como eosina y, eritrosina y rosa de bengala, constituyen una familia de potentes FS, se emplearon para lograr la terapia fotodinámica en tejidos humanos y animales (Dees y col., 2011). Otros FS han sido estudiados para la PACT (Figura 5), como los derivados del fulereno, riboflavina, curcumina, clorinas fenalenona, azul de metileno y azul de toluidina (Cieplik y col., 2018).



**Figura 5.** Principales FS empleados en PACT: A) azul de metileno; B) azul de toluidina; C) derivado de porfirina; D) derivado de clorina; E) derivado de fulereno; F) derivado de fenalenona (Cieplik y col., 2018).

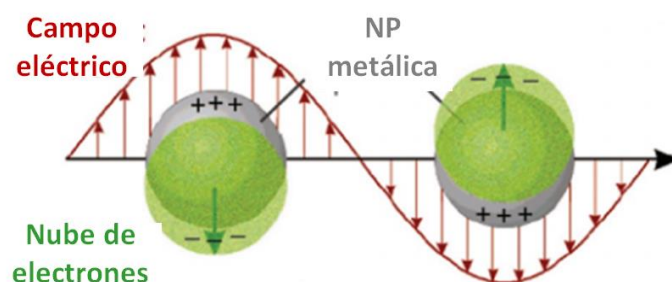
La PACT en conjunto con la nanotecnología, mejoran la eficiencia del tratamiento de infecciones bacterianas, mediante el uso de NP. Las NP constituyen una amplia clase de materiales que tienen una dimensión menor a 100 nm (Laurent y col., 2010). Dependiendo de la forma general, estos materiales pueden ser 1D, 2D o 3D (Tiwari y col., 2012). Las NP se dividen ampliamente en varias categorías según su morfología, tamaño y propiedades químicas, en NP lipídicas, poliméricas, semiconductoras, NP basadas en carbono, y NP metálicas. Las NP presentan propiedades físicas, químicas y



biológicas significativamente diferentes a la de sus contrapartes a granel (Ho y col., 2013). Esto se debe a que las NP tienen un área superficial mucho mayor que las formas a granel, lo que contribuye a un aumento en la reactividad química y bioactividad, como así también de las propiedades antimicrobianas. Además, las NP son lo suficientemente pequeñas como para penetrar biofilms y paredes de células microbianas, causando daños irreversibles a la membrana o al ADN de las células bacterianas (Suci y col., 2007).

Las NP de metales nobles presentan muchas ventajas sobre los FS orgánicos, son mucho más estables bajo irradiación que los colorantes orgánicos, ya que los mismos pueden descomponerse bajo una irradiación intensa, lo que conduce a velocidades de reacción reducidas. Dentro de las NP metálicas, las NP de oro (AuNP) y plata (AgNP) exhiben coeficientes de extinción significativamente mayor en relación a los FS orgánicos estándar.

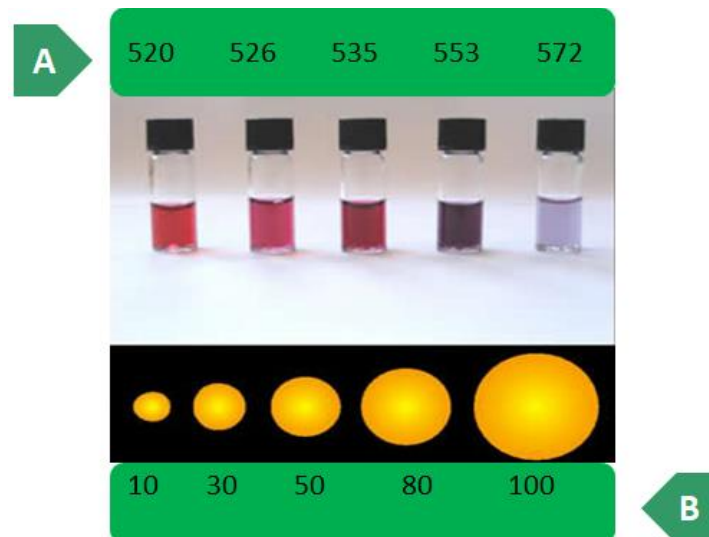
Las NP metálicas presentan propiedades ópticas y eléctricas únicas, debido a la resonancia plasmónica de superficie (RPS). Cuando una NP metálica es irradiada por la luz, el campo eléctrico oscilante causa que los electrones de conducción oscilen de manera colectiva (Figura 6) (Xia y col., 2005).



**Figura 6.** Ilustración gráfica que ejemplifica la resonancia plasmónica de superficie (RPS) en la superficie exterior de una NP metálica (Xia y col., 2005).

Las NP de los metales alcalinos y nobles, como Cu, Ag y Au, tienen una banda de absorción en la zona visible del espectro solar electromagnético (Dreaden y col., 2012).

El tamaño y forma de las NP rigen la frecuencia de oscilación de los electrones y las diferentes propiedades ópticas (Figura 7) (Khan y col., 2019), es decir que, variando el tamaño y la forma de las NP, es posible controlar la posición de la RPS.



**Figura 7.** Suspensiones de AuNP esféricas. Longitud de onda de máxima absorción del plasmón (nm, A) en relación al diámetro de las AuNP (nm, B). El tamaño de las AuNP, como así también la forma, rigen las diferentes propiedades ópticas. (Khan y col., 2019)

La excitación del plasmón de superficie produce su efecto antimicrobiano a través de un mecanismo fototérmico o fotoquímico (Hallett-Tapley y col., 2011; Krajczewski y col., 2019). El estrés oxidativo inducido por EROs es uno de los principales mecanismos de toxicidad bacteriana.

### *1.5 Alternativas para combatir el desarrollo de biofilms en dispositivos médicos. Antecedentes de recubrimientos. Materiales antifouling.*

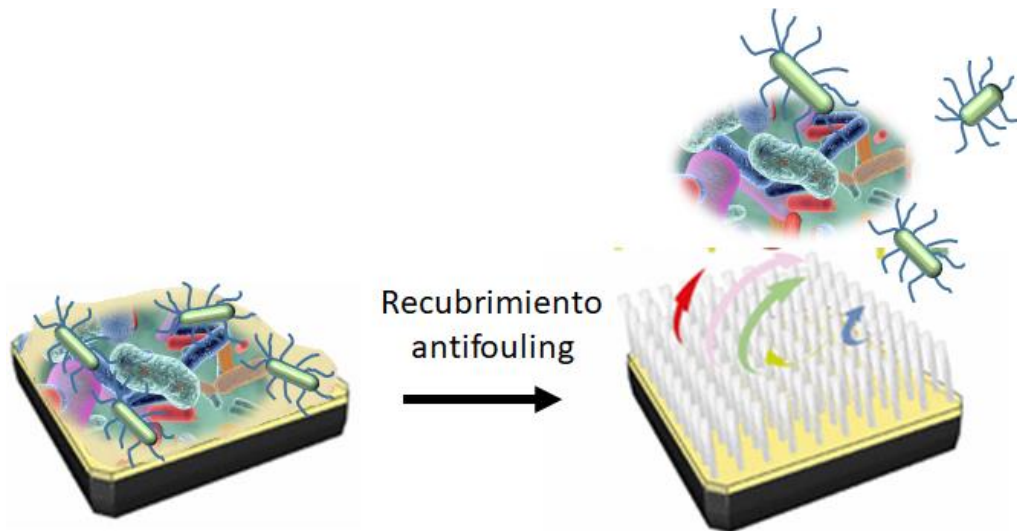
El uso de dispositivos médicos, como los implantes y catéteres, es una de las principales causas del aumento de infecciones por biofilms (Wu y col., 2015). Las estrategias de intervención que se utilizan actualmente para el control de biofilms implican prevenir la contaminación inicial del dispositivo; minimizar la unión inicial de células microbianas al dispositivo; penetrar en el biofilm y matar las células asociadas al biofilm; o retirar el dispositivo y su biofilm asociado (Del Pozo, 2018). Para tratar infecciones asociadas al biofilm, la eliminación de los dispositivos seguido de reemplazo por otros nuevos no infectados junto con la administración de antibióticos, constituye una práctica común en el tratamiento de biofilms desarrollados en dichos dispositivos médicos. En los casos en que la eliminación no sea posible, se deben administrar antibióticos a largo plazo. Este tipo de tratamiento implica costos adicionales de atención médica y a menudo se asocian con largos períodos de hospitalización, morbilidad, deterioro funcional grave y aumento de la mortalidad, como así también aumento en la resistencia bacteriana (Banerjee y col., 2011).

Se ha observado que rifampicina, tiene una excelente penetración en biofilms formados en diversos sitios de tejidos (Zavasky y col., 1998) y de hecho se ha demostrado que tiene actividad frente a estafilococos adheridos a dispositivos médicos. Sin embargo, la resistencia a la rifampicina es común debido a rápidas mutaciones, dificultando su uso en monoterapia. En general, múltiples estudios han demostrado que

la rifampicina es excelente como adyuvante o como tratamiento previo, actuando de esta manera como sensibilizador a los antibióticos. La daptomicina se ha utilizado como antibiótico profiláctico para la prevención de infecciones en material ortopédico, incluso en dosis bajas (Niska y col., 2012). Se ha demostrado que daptomicina es eficaz como terapia de bloqueo con antibióticos en catéteres vasculares (Meije y col., 2014). Incluso en los casos en que hay susceptibilidad a la vancomicina, la daptomicina puede tener una mejor penetración en la matriz del biofilm. Las terapias combinadas se vuelven aún más relevantes en el tratamiento de infecciones relacionadas con biofilms. En un estudio de cohorte de 161 pacientes con infecciones de prótesis articulares asociadas con implantes de cadera y rodilla, la administración de linezolid y rifampicina logró erradicar en un 70% la infección en 49 pacientes, evitando así la eliminación del implante (Gomez y col., 2011). Por otra parte, la terapia combinada con claritromicina y daptomicina resultó útil para erradicar biofilms formados *in vitro* en dispositivos ortopédicos (Fujimura y col., 2015). La prevención en la formación de biofilms en los catéteres venosos centrales se puede lograr con antibióticos tópicos utilizando catéteres recubiertos o mediante técnica de bloqueo con antibióticos (Del Pozo y col., 2009; Del Pozo y col., 2012; Meije y col., 2014). El uso de una técnica de bloqueo con antibióticos, como la profilaxis, implica la aplicación de un pequeño volumen de antimicrobianos concentrados, que se deja reposar dentro de la luz del catéter durante 12-24 h. Se han utilizado implantes de colágeno que contienen gentamicina en procedimientos de cierre esternal para reducir la incidencia de infección en la herida. Asimismo, los materiales impregnados con antibióticos como gentamicina, tobramicina y vancomicina, reducen la incidencia de infecciones articulares protésicas asociadas con biofilms.

Muchos agentes antimicrobianos utilizados como agente de recubrimientos actúan produciendo EROs luego de la irradiación con luz. Algunos ejemplos incluyen  $\text{TiO}_2$ , porfirinas, azul de toluidina, rosa de bengala, y azul de metileno (Page y col., 2009). Los colorantes rosa de bengala y azul de toluidina fueron incorporados en una matriz de celulosa (Decraene y col., 2006) mientras que el azul de metileno y el azul de toluidina junto con AuNP han sido incorporados en polisiloxanos y poliuretanos (Perni y col., 2009), materiales de uso común en catéteres. Además, las porfirinas también se han utilizado como agentes antimicrobianos (Banfi y col., 2006). El  $\text{TiO}_2$ , utilizado como agente antimicrobiano fotoactivado, presenta actividad contra *E. coli*, *S. aureus*, *S. aureus* meticilino resistente (SAMR) y *Bacillus anthracis*. Sin embargo, un problema común asociado con el  $\text{TiO}_2$  y otros materiales activados por luz es que su incorporación en materiales orgánicos conduce a la degradación de la matriz debido a la generación de EROs (Banerjee y col., 2011).

El descubrimiento de superficies *antifouling* o antimicrobianas puede ser otro enfoque posible para prevenir la formación de biofilms (Roy y col., 2018). La capacidad *antifouling* (no incrustante) de los dispositivos médicos, evita la adsorción de proteínas, células u otras especies biológicas, haciendo que el dispositivo sea significativamente menos detectable por las células del sistema inmunológico (Li y col., 2019) (Figura 8). Este comportamiento *antifouling* generalmente se logra recubriendo la superficie con macromoléculas bioinertes.



**Figura 8.** Ilustración de un material con recubrimiento *antifouling* que evita la adhesión de proteínas y células en su superficie (Li y col., 2019).

Los recubrimientos hidrófilos poliméricos tales como polietilenglicol (PEG) se utilizan para construir superficies *antifouling* ya que minimizan o dificultan la adhesión microbiana (Mondal y col., 2021). La construcción de superficies antimicrobianas implica la impregnación con antibióticos o antisépticos, principalmente polímeros de poliuretano, que se cargan con diferentes antibióticos (Donelli y col., 2002; Donelli y col., 2006).

Otro método para evitar la infección bacteriana en los implantes y, por tanto, prevenir la adhesión bacteriana y formación de biofilms, es utilizar recubrimientos que pueden liberar antibióticos. Dichos recubrimientos se pueden preparar sumergiendo el material de soporte en una solución que contenga antibióticos o mediante impregnación de antibióticos directamente en el dispositivo médico. Los antibióticos que contienen grupos ácidos carboxílicos (por ejemplo, amoxicilina, cefalotina, carbenicilina y cefamandol) mostraron una mejor incorporación y una liberación del antibiótico más lenta en comparación con los que carecen de estos grupos; la tasa de liberación lenta fue atribuida a una mayor afinidad de los antibióticos hacia el material de revestimiento (Banerjee y col., 2010).

Por otro lado, AMP representan un biomaterial atractivo para desarrollar recubrimientos microbicidas y *antifouling* debido a numerosas ventajas: varios AMP han demostrado tener un amplio espectro de actividad antimicrobiana incluso a concentraciones bajas (Guyomard y col., 2008; Kazemzadeh-Narbat y col., 2021), y mostraron ser menos susceptibles a la resistencia bacteriana en relación a otros antibióticos (Fjell y col., 2009).

El recubrimiento con NP, como AgNP y NP antioxidantes, ha sido utilizado para prevenir la adhesión bacteriana y formación de biofilms en dispositivos médicos como catéteres (Antonelli y col., 2012; Crisante y col., 2015; Shao y col., 2021). Los iones de metales de transición como la plata, el oro, el zinc y el cobre, tienen mejores propiedades antibacterianas y antibiofilms en relación a otros iones metálicos (Saleh y col., 2011). Las AgNP y los iones de plata presentan un amplio espectro de actividad antimicrobiana y son particularmente eficaces contra la colonización polimicrobiana

asociada con infección en dispositivos médicos. La plata ( $\text{Ag}^0$ ) o los iones  $\text{Ag}^+$  son incorporados en matrices orgánicas como los polímeros, en matrices inorgánicas como biovidrios, en matrices de dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ), en poliamidas, en multicapas de polielectrolitos, fibra de vidrio, y otros polímeros, así como en hidrogeles, con el fin de formar películas con propiedades *antifouling* (Jacquart y col., 2013; Taglietti y col., 2014). Los iones  $\text{Ag}^+$  liberados de las matrices, se absorben en la superficie de las paredes bacterianas con carga negativa, conduciendo a la ruptura de la pared celular y la membrana celular (Jung y col., 2008). Los recubrimientos con AgNP en dispositivos médicos, mostraron inhibición en la formación de biofilms al prevenir la adhesión bacteriana inicial en las superficies (Namasivayam y col., 20013; Martínez-Gutiérrez y col., 2013). Sin embargo, existen algunas desventajas asociadas con el uso de AgNP como agente de recubrimiento, entre ellas se nombran la desactivación por uniones de proteínas, la agregación de NP y la fotooxidación de iones  $\text{Ag}^+$  (Naik y col., 2013). De hecho, debido al amplio uso de la plata, están surgiendo cepas bacterianas resistentes (Banerjee y col., 2011). Por otro lado, estudios sugieren que las AgNP pueden ser tóxicas para las células de los mamíferos (Asharani y col., 2009; Samberg y col., 2010; Díez-Escudero y col., 2020). Otras NPs, como  $\text{TiO}_2$ , dióxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ), óxido de magnesio ( $\text{MgO}$ ), óxido de cobre ( $\text{CuO}$ ) y óxido de zinc ( $\text{ZnO}$ ) presentan actividad biocida. Sin embargo, la estrategia de recubrimiento ha encontrado dificultades ya que la superficie se erosiona rápidamente y, por lo tanto, se vuelve disponible para la formación de biofilms (Roy y col., 2018).

Los recubrimientos *antifouling* diseñados con AuNP, son una buena alternativa para evitar la formación de biofilms, debido a que el oro es un material noble y durante muchos años se ha utilizado para instrumentos médicos y prótesis. Al ser un material biológicamente inerte, presenta numerosas ventajas cuando se utiliza en catéteres médicos, stents, implantes, instrumentos y dispositivos (Yachia y col., 1990; Song y col., 2016; Seo y col., 2021), constituyendo una buena opción *antifouling* para dispositivos médicos e implantes.

Teniendo en cuenta lo reportado, el desarrollo de nuevos nanomateriales representa una solución promisoriosa para hacer frente a la creciente resistencia bacteriana. Las AuNP y AgNP son algunos ejemplos de cómo la nanotecnología ha jugado un papel importante en diversos campos de la ciencia y ha contribuido al progreso en medicina y en la industria farmacéutica (Giménez y col., 2016). En el grupo de investigación, se sintetizaron y caracterizaron AuNP y NP bimetálicas de oro y plata conjugadas y estabilizadas con azúcares (Hallett-Tapley y col., 2011; Fasciani y col., 2014; Silvero y col., 2014, Silvero y col., 2016). Estas NP fueron utilizadas como fotosensibilizadores para la PACT, y los resultados demostraron que las mismas presentan actividad frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas. Por otro lado, el mecanismo de acción de estas NP fue estudiado mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), donde en las imágenes obtenidas se pudo apreciar una disposición selectiva de las AuNPs alrededor de cocos Gram positivos debida posiblemente a la interacción electrostática entre la superficie de las NPs con carga positiva y la pared celular, constituida por peptidoglicano, con carga negativa (Silvero y col., 2016). Una vez establecida esta interacción, las AuNPs logran el efecto fototóxico por generación de EROs o causando directamente oxidación de macromoléculas por el gran incremento de temperatura localizado (Fasciani y col., 2014).

Las AuNP y AgNP se han utilizado ampliamente en aplicaciones biológicas (Lim y col., 2016; Rónavári y col., 2021; Paiva-Santos y col., 2021) por ejemplo, para la liberación de drogas, ya que son particularmente útiles debido a que pueden transportar múltiples grupos activos. Además, las NP esféricas con una gran variedad de modificaciones de superficie han demostrado no ser tóxicas en células humanas. En este sentido, es novedosa la unión de NP a antibióticos o moléculas biocompatibles, lo que abriría nuevas posibilidades para la investigación médica, favoreciendo la selectividad de las NP por las células procariotas, efectivizando el tiempo de acción antibacteriana de las NP (Huh y col., 2011; Li y col., 2014; Zhao y col., 2010). Esto representaría un novedoso enfoque para hacer frente a la creciente resistencia por parte de estos patógenos.

## HIPÓTESIS, OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

### HIPÓTESIS

Tomando en consideración los antecedentes citados, y con el interés de profundizar en la búsqueda de nuevos nanomateriales con actividad antibacteriana en cepas resistentes y nanomateriales con propiedades *antifouling*, la hipótesis de trabajo que motivó la realización de esta tesis de doctorado fue:

“El desarrollo de nuevos compuestos, particularmente NP metálicas, tendría potencial actividad antibacteriana atribuible al efecto fotosensibilizador, y propiedades *antifouling* para el recubrimiento de dispositivos médicos”.

### OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y estudiar nuevos compuestos con actividad antibacteriana contra patógenos de relevancia clínica, particularmente NP metálicas con potencial efecto fotosensibilizador y sus conjugados con antibióticos y moléculas biocompatibles. A partir de estos conocimientos, desarrollar un nanomaterial como recubrimiento *antifouling* para dispositivos médicos.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo 1: Sintetizar AuNP mediante la reducción del catión  $Au^{+3}$ , conjugarlas y estabilizarlas con antibióticos beta-lactámicos y aminoglucósidos. Sintetizar AgNP mediante la reducción de  $Ag^{+1}$ , conjugarlas y estabilizarlas con lignina.

Objetivo 2: Evaluar el efecto fotosensibilizador de las AuNP y AgNP sintetizadas en cultivos planctónicos y biofilms de cepas clínicas resistentes de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Objetivo 3: Investigar el posible mecanismo de acción de los compuestos mencionados.

Objetivo 4: Desarrollar una formulación de hidrogel de AuNP para aplicación tópica.

Objetivo 5: Desarrollar un recubrimiento *antifouling* para dispositivos médicos de plástico, mediante síntesis *in situ* de AuNP. Evaluar su efecto *antifouling* en cepas clínicas y de referencia de *S. aureus*, *Escherichia coli* y *P. aeruginosa*.

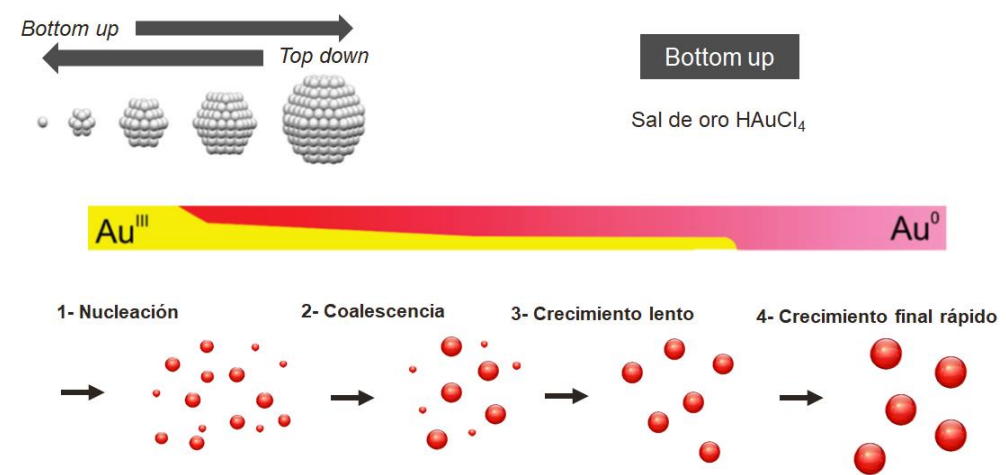
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN: PARTE I.

### SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS COMO FOTOSENSIBILIZADORES EN LA PACT

#### 2.1 Síntesis de nanopartículas de oro conjugadas y estabilizadas con trihidrato de amoxicilina (amoxi@AuNP)

Las técnicas para sintetizar AuNP se clasifican en dos métodos principales, el método "*bottom up*" y el método "*top down*" (Shah y col., 2014). El método *bottom up* incluye técnicas de reducción térmicas, químicas, electroquímicas, fotoquímicas, entre otras. Este método implica el ensamblaje de átomos producidos por reducción de iones en nanoestructuras deseadas. El método *top down* como fotolitografía y litografía de haz de electrones, requiere eliminación de materia desde el material a granel para obtener la nanoestructura deseada. Si bien ambos métodos pueden generar AuNP de forma y tamaño deseados, el método *top down* tiene como inconveniente gran desperdicio de material, instrumentación compleja y alto costo. Para la síntesis de amoxi@AuNP se eligió el método *bottom up*, por su sencillez, fácil aplicación y formación de dispersiones coloidales estables por periodos prolongados, mediante la reducción térmica en un solo paso de  $Au^{+3}$  a  $Au^0$  en solución acuosa. Turkevich propuso un mecanismo de síntesis mediante el método *bottom up*, basado en las etapas de nucleación, crecimiento y aglomeración de átomos de oro (Bönnemann y col., 2001). En el Esquema 1 se muestran en forma representativa las etapas de la síntesis de AuNP. En la etapa inicial, se observa la rápida formación del núcleo de oro donde la sal metálica se reduce para dar átomos metálicos cerivalentes. Éstos pueden colisionar con otros iones metálicos y/o átomos metálicos para formar una semilla (seed) irreversible de núcleos metálicos estables. La etapa de formación del núcleo es seguida de la coalescencia del mismo a partículas más grandes. En la 3ª etapa, ocurre un crecimiento lento de la partícula, sostenido por la continua reducción del precursor de oro. Por último, en la etapa final de crecimiento rápido se obtiene el tamaño final de la nanopartícula, donde el precursor de oro es consumido completamente.



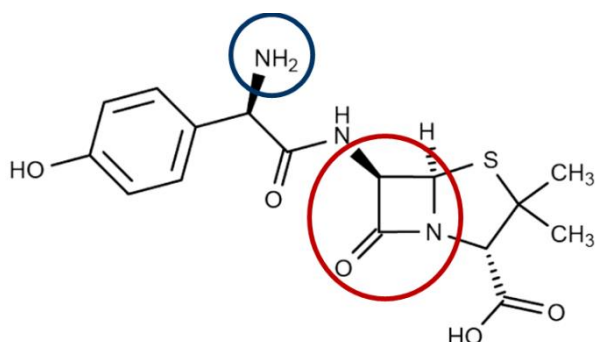


**Esquema 1.** Representación de las etapas de la síntesis de AuNP mediante el método *bottom up*, adaptado de Polte y col., (2010).

Los compuestos de recubrimiento de superficies ya sean orgánicos, inorgánicos o poliméricos, son una parte integral de las NP y se utilizan para controlar el tamaño y la forma durante la síntesis, estabilizar evitando su aglomeración, proteger y direccionar las NP al sitio de acción. La superficie de las AuNP también puede ser modificada por agentes de recubrimiento que presentan diferentes funcionalidades, con el fin de brindar aplicabilidad a las AuNP en los campos de la biología y la medicina, ya que por sí mismas, son consideradas biológicamente inertes (Bönnemann y col., 2001). Varios trabajos científicos han reportado la utilización de compuestos antimicrobianos para funcionalizar y estabilizar AuNP destinadas al tratamiento de infecciones microbianas (Vigderman y col., 2013; Zhang y col., 2015; Rajchakit y col., 2017; Gad y col., 2018; Fan y col., 2019; Rahimi y col., 2019; Kumar y col., 2019; Khan y col., 2021), en los cuales se concluye que las NP conjugadas con antibióticos exhiben una mayor actividad antibacteriana en comparación con el antibiótico o las NP solas, lo que indica un efecto sinérgico (Gu y col., 2003; Smekalova y col., 2016). Además, las NP metálicas dirigen el antibiótico al sitio de acción minimizando los efectos adversos (Slavin y col., 2017; Fakhri y col., 2017; Engin y col., 2019).

La síntesis de amoxi@AuNP fue llevada a cabo en un solo paso mediante el método *bottom up* en solución (Shah y col., 2014) (ver página 112, sección 7.2.1 en Materiales y Métodos). Se utilizó como precursor de oro al ácido tetracloroáurico trihidrato ( $\text{AuHCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), como agente reductor y estabilizador al mismo tiempo al antibiótico trihidrato de amoxicilina y como solvente agua MilliQ. Trihidrato de amoxicilina es un antibiótico  $\beta$ -lactámico (Neu 1987), uno de los más prescritos dentro del grupo de las penicilinas (Maslamani y col., 2018; Huttner y col., 2019), cuyo mecanismo de acción es inhibir la formación de la pared celular bacteriana, tanto en bacterias Gram negativas como Gram positivas. El anillo  $\beta$ -lactámico (Figura 1) es la estructura responsable de dicha actividad antibacteriana (Hauser 2007). Trihidrato de amoxicilina fue utilizada como agente reductor y estabilizador al mismo tiempo para la síntesis de amoxi@AuNP, debido a que en su estructura molecular presenta un grupo amino libre (Figura 1) con afinidad por el núcleo de oro (Chen y col., 2006; Fouladgar y col., 2011). Según reportes, grupos sulfhidrilos, aminos e hidroxilos presentes en los antibióticos tienen una afinidad

de unión fuerte a débil por las AuNP (Wan y col., 2012; Zhou y col., 2012; Zhang y col., 2008).

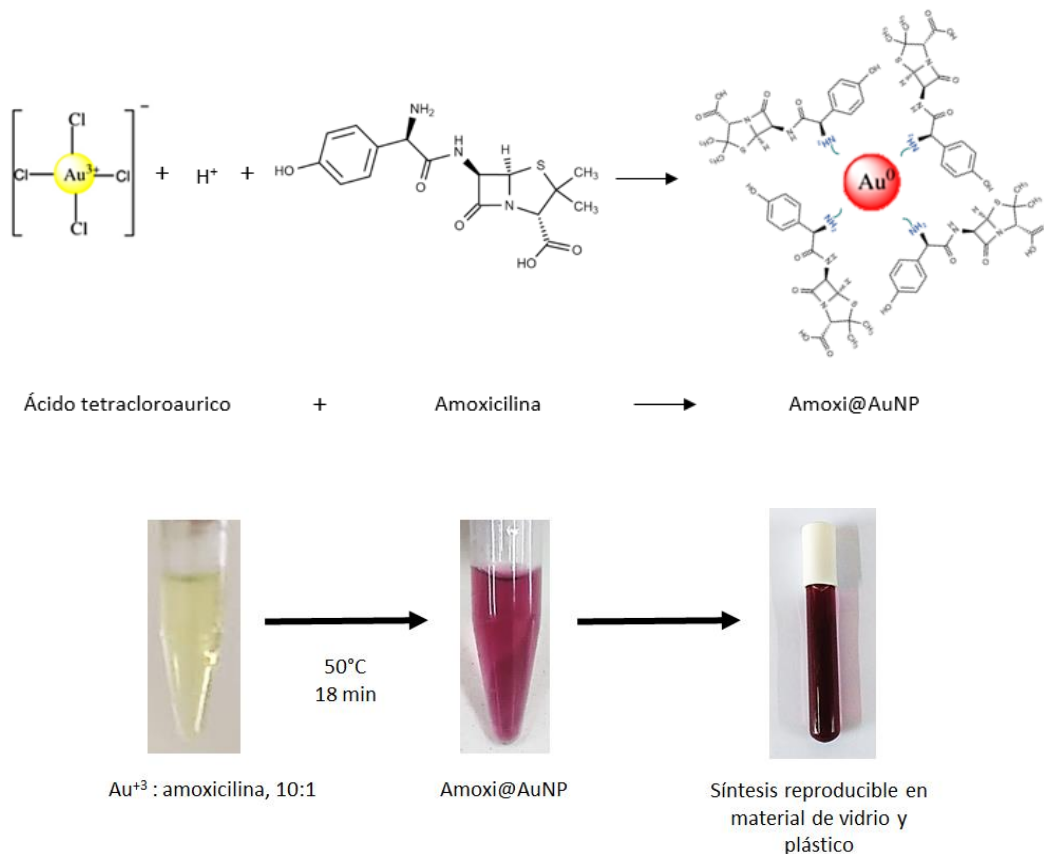


**Figura 1.** Estructura molecular de amoxicilina. Anillo  $\beta$ -lactámico (círculo rojo) estructura responsable de la actividad antibacteriana, grupo amino libre (círculo azul) presenta afinidad por el núcleo de oro.

Para la síntesis se ensayaron diferentes relaciones molares  $\text{Au}^{+3}$ : trihidrato de amoxicilina y diferentes temperaturas en baño termostatzado (Tabla 1). Las condiciones experimentales elegidas fueron las que permitieron obtener amoxi@AuNP en menor tiempo de síntesis, NP más estables y con mayor grado de reproducibilidad. Con base en esto, se eligió la relación molar  $\text{Au}^{+3}$ : trihidrato de amoxicilina, 10:1. La solución inicial de la mezcla del antibiótico y de la sal de oro presentó color amarillo pálido debido a la presencia de iones  $\text{Au}^{+3}$  en solución, y luego de 18 min a temperatura constante de  $50^\circ\text{C}$ , en baño termostatzado, la solución se tornó color rojo-violeta, característica que indica la formación de nanopartículas de oro (Silvero y col., 2014) (Figura 2). La síntesis de amoxi@AuNP fue reproducible tanto en material plástico (eppendorf) como material de vidrio (tubos de khan) (Figura 2). Como control fueron sintetizadas nanopartículas de oro (AuNP) sin recubrir, siguiendo protocolo de síntesis previamente descrito por Low y col., 2010, utilizando  $\text{NaBH}_4$  como agente reductor.

**Tabla 1.** Condiciones experimentales ensayadas para la síntesis de amoxi@AuNP

Relación molar $\text{Au}^{+3}$ : amoxicilina	Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	Tiempo (h)
10; 5; 1; 0,2; 0,1	25	48
10; 5; 1; 0,2; 0,1	30	24
10; 5; 1; 0,2; 0,1	40	1
10; 5; 1; 0,2; 0,1	50	1



**Figura 2.** Síntesis de amoxi@AuNP.

El pH inicial de la dispersión coloidal de amoxi@AuNP obtenido fue de pH = 4,0, el mismo se generó por la disociación de AuHCl<sub>4</sub> para liberar iones H<sup>+</sup>, lo que a su vez permite interacciones electrostáticas entre el grupo amino protonado de amoxicilina (pKa = 7,16) e iones AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup> (Tsuji y col., 1978; Bakshi 2011).

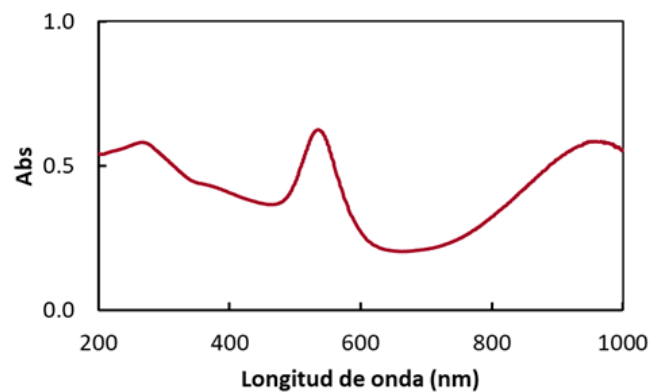
Diferentes antibióticos se han utilizado como agentes de recubrimiento en la síntesis de AuNP, entre ellos se pueden nombrar a vancomicina, ciprofloxacina, norfloxacina, estreptomina, gentamicina, ampicilina, cefaclor (Zhang y col., 2015; Fan y col., 2019; Mohamed 2020). En los reportes de síntesis, además del antibiótico utilizado para funcionalizar AuNP, se utilizaron diferentes solventes como tolueno (Gu y col., 2003), agentes reductores como NaBH<sub>4</sub> y citrato de sodio (Saha y col., 2007; Nirmala y col., 2007; Brown y col., 2012) y agentes estabilizadores como quitosano y liposomas (Chamundeeswari y col., 2010; Pornpattananangkul y col., 2011). En la síntesis de amoxi@AuNP, al utilizar amoxicilina como agente reductor y estabilizador, aplicando temperatura constante de 50°C y agua como solvente, se optimizaron las condiciones de síntesis en cuanto a tiempo, etapas de síntesis, utilización de solventes amigables con el medio ambiente, disminución en la cantidad de compuestos y energía, en comparación a lo anteriormente reportado.

La temperatura con la que se lleva a cabo la síntesis, así como la relación molar Au<sup>3+</sup>: amoxicilina determinan la velocidad de reacción (Yin y col., 2014), en donde una alta concentración de Au<sup>3+</sup> da como resultado la formación rápida de Au atómico (0). Cuando la síntesis de amoxi@AuNP fue realizada a temperatura ambiente y a 30°C, la formación de NP no fue observada hasta después de 2 días de reacción, revelando que

amoxicilina presenta capacidad reductora muy débil. Aumentando la temperatura de reacción a 50°C, el cambio visible de color que confirma la formación de AuNP se produjo en pocos minutos, demostrando la capacidad reductora de amoxicilina a temperaturas un poco más elevadas con respecto a la ambiental (Yin y col., 2014).

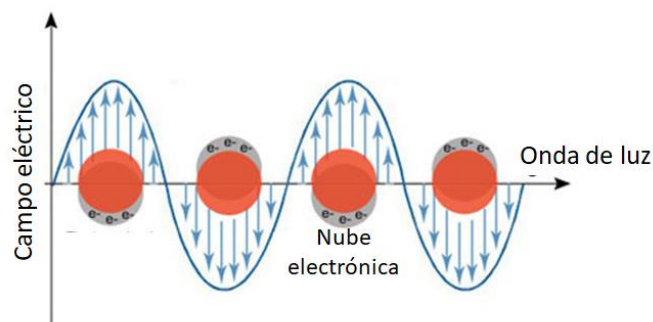
## 2.2 Caracterización de amoxi@AuNP

La Figura 3 corresponde al espectro de absorción de amoxi@AuNP, en el cual se observa la característica banda de absorción del plasmón de superficie de AuNP esféricas en la región verde del espectro UV-visible, centrado alrededor de los 540 nm.



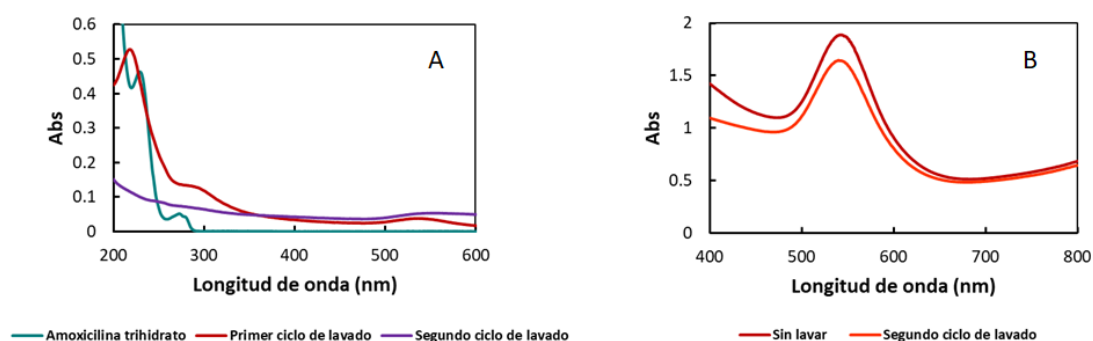
**Figura 3.** Espectro de absorción de amoxi@AuNP.

La resonancia plasmónica de superficie (SPR) es producida por el movimiento de electrones libres en la banda de conducción causada por la interacción con un campo electromagnético (Xia y col., 2005) (Esquema 3). La absorción del plasmón está directamente relacionada con el tamaño y las formas de las NP en solución coloidal. La presencia de una segunda banda de absorción alrededor de 950 nm en el espectro de amoxi@AuNP corresponde al plasmón de bandas de absorción de nanoestructuras con formas más complejas. Los picos de absorción en la zona roja del espectro visible son detectados a medida que las NP presentan diferentes formas y tamaños (Kelly y col., 2003).



**Esquema 3.** Representación de la resonancia plasmónica de superficie de nanopartículas metálicas.

Un aspecto muy importante en la última etapa de la síntesis es el lavado de las amoxi@AuNP. Una vez sintetizadas, se lavaron mediante 2 ciclos de centrifugación, con el fin de descartar moléculas de trihidrato de amoxicilina que no se unieron a las nanopartículas. Mediante espectroscopía UV visible se controlaron los cambios en la SPR sobre el sedimento resuspendido en agua MilliQ (MQ) y la absorción de la molécula de trihidrato de amoxicilina presente en el sobrenadante. Luego del 2° ciclo de lavado, el pico de absorción máximo a 230 nm correspondiente a trihidrato de amoxicilina no fue detectado en el sobrenadante ([https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/a8523pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a8523pis.pdf)), y no se observaron cambios en el máximo de absorción del plasmón de superficie de las amoxi@AuNP resuspendidas (Figura 4). El pH inicial de amoxi@AuNP (pH=4,0) aumentó a 7,0 luego de los ciclos de lavado, en correspondencia con el del agua MQ utilizada para resuspender las nanopartículas.



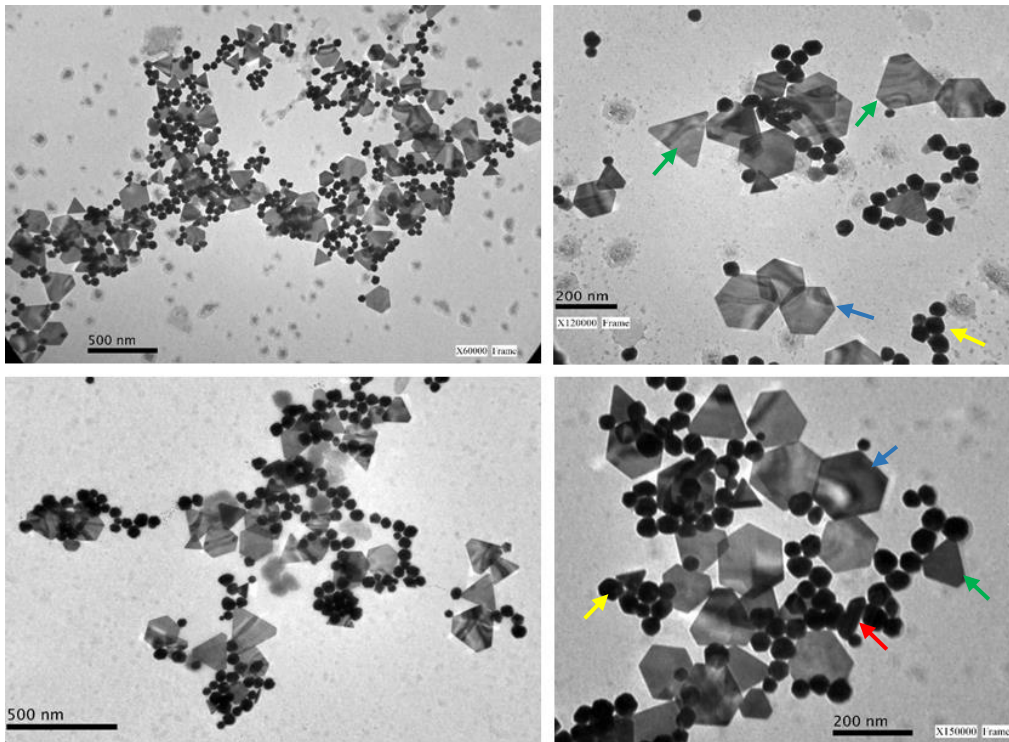
**Figura 4.** Espectros de absorción de: trihidrato de amoxicilina y sobrenadante de amoxi@AuNP (A), amoxi@AuNP sin lavar y luego del segundo ciclo de lavado (B).

Numerosos estudios han examinado el efecto que tienen los métodos de purificación (principalmente centrifugación) en la estabilidad coloidal de AuNP con respecto a diferentes parámetros como la velocidad de centrifugado, el número de lavados y la eliminación de los agentes reductores y estabilizadores en solución. Estos estudios concluyen que la selección cuidadosa de un método de purificación apropiado es fundamental para mantener la estabilidad de AuNP, porque la centrifugación excesiva causa tanto agregación como cambios morfológicos debidos, en parte, a la eliminación de los agentes reductores y estabilizadores de la solución (Ray y col., 2015).

### 2.2.1 Caracterización de amoxi@AuNP por TEM

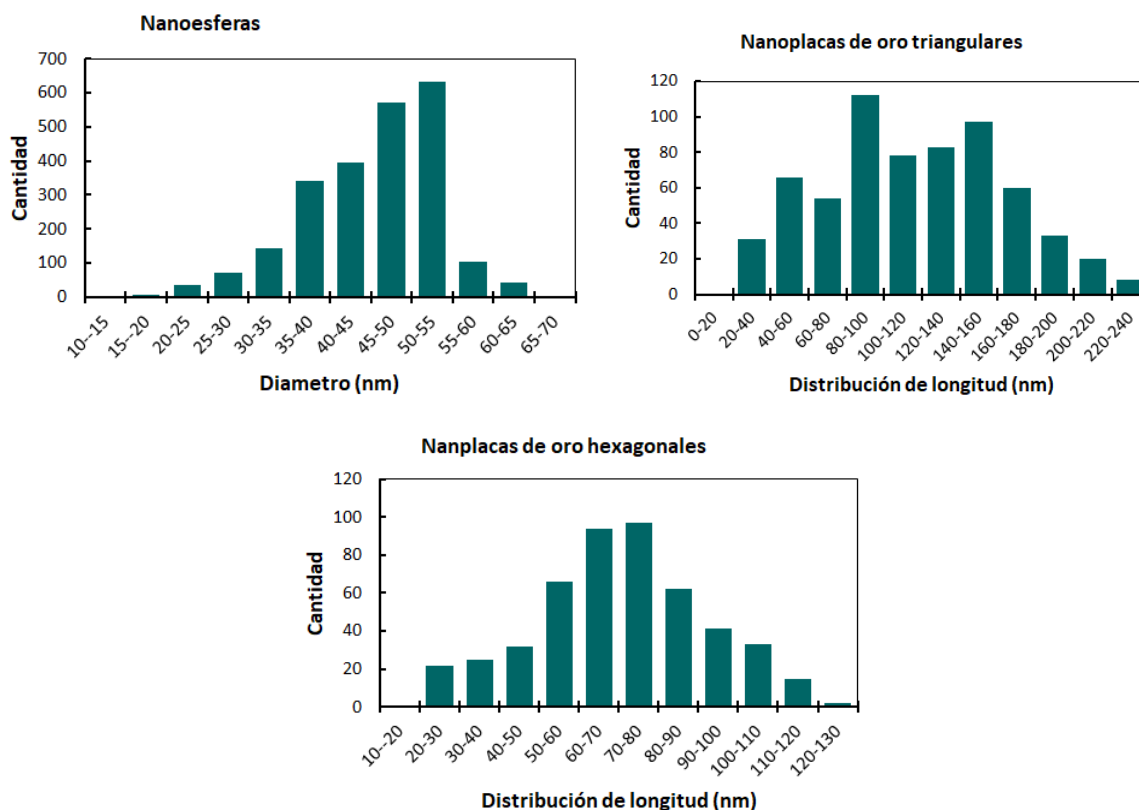
El tamaño y forma de las NP se ve afectada por parámetros de reacción, tales como fuerza del agente reductor, concentración de precursores metálicos, concentración de agentes reductores, temperatura y pH de reacción (Huang y col., 2015). Por ello, se decidió realizar microscopía electrónica de transmisión (TEM) para caracterizar las formas y tamaños de amoxi@AuNP sintetizadas (ver página 112, sección 7.2.2 en Materiales y Métodos). Las micrografías electrónicas de transmisión revelaron

diferentes formas y tamaños de amoxi@AuNP (Figura 5). La mayoría de la población está compuesta por nanoesferas. Además, se observaron nanoplacas triangulares y hexagonales y pocos nanorods.



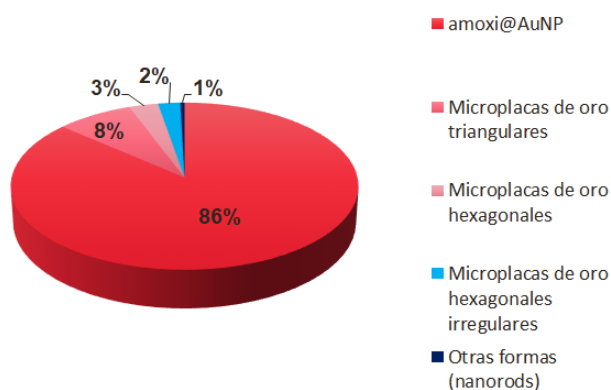
**Figura 5.** Imágenes de amoxi@AuNP obtenidas a partir de TEM. Se observan nanoesferas (flechas amarillas), nanoplacas triangulares (flechas verdes), nanoplacas hexagonales (flechas azules) y nanorods (flecha roja).

Un mínimo de 2300 nanopartículas se analizó estadísticamente utilizando el software ImageJ®. En la Figura 6 se observa la distribución de tamaños de las nanopartículas sintetizadas.



**Figura 6.** Distribución de tamaños de nanoesferas de oro (n=2353), nanoplacas de oro triangulares (n=642) y nanoplacas de oro hexagonales (n=489).

El análisis estadístico mostró que la dispersión de amoxi@AuNP está compuesta por un 86% de nanoesferas de diámetro promedio de  $50 \pm 2$  nm, 8% de nanoplacas triangulares de lado promedio de  $100 \pm 13$  nm, 3% de nanoplacas hexagonales de lado promedio de  $77 \pm 7$  nm, 2% de nanoplacas poligonales irregulares y 1% de otras formas, incluyendo nanorods (longitud <100 nm) (Figura 7).



**Figura 7.** Composición de la dispersión de amoxi@AuNP.

Esta polidispersidad puede explicar la absorción compleja del espectro obtenido (Figura 4). El pico a 540 nm se atribuye a las nanopartículas esféricas más pequeñas, mientras que la absorción por debajo de 450 y por encima de 750 es más probable debido a la dispersión de la luz de las formas laminares más grandes, las nanoplacas exhiben una fuerte absorbancia de plasmón superficial en el intervalo cercano al infrarrojo de 700-3000 nm (Au y col., 2010). Las nanoplacas de oro exhiben líneas de luz y oscuridad al ser observadas en las imágenes TEM (Figura 5), esto es causado por la dispersión del haz de electrones debido a la curvatura/ondulación de la nanopartícula (Au y col., 2010).

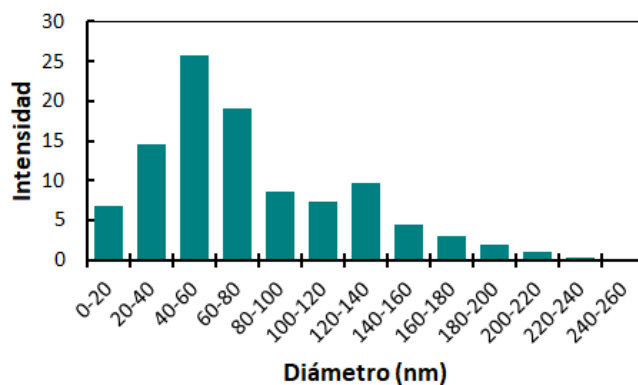
La fuerza del agente reductor (o la facilidad con la que se oxida), juega un rol importante en el proceso de reducción, porque influye en la morfología de las NP obtenidas. Los agentes reductores débiles como el citrato de sodio (método de Turkevich), llevan a cabo una reducción lenta del precursor de oro dando como resultado partículas más grandes y polidispersas, debido a la formación de nuevos núcleos de oro, mientras los preexistentes continúan creciendo. Los agentes reductores fuertes como el  $\text{NaBH}_4$  que producen reducción instantánea de iones de oro, en condiciones de temperatura ambiental dan como resultado NP pequeñas y menos polidispersas que con citrato de sodio (Carnovale y col., 2016). Las microplacas obtenidas probablemente serían el resultado de la lenta reducción de algunos iones de oro derivada del poder reductor suave de la amoxicilina, y formación de conglomerados, ya que se encuentran predominantemente después de un tiempo de reacción a temperaturas bajas. Huang y col. (2015) utilizaron en la síntesis, albúmina de suero ovino, y demostraron que la temperatura afectaba la tasa de reducción de iones metálicos, así como las tasas de nucleación y crecimiento de nanomateriales metálicos. Es conocido que el pH es otro factor crucial que influye en la tasa de reducción, porque los potenciales de reducción de las especies de Au cambian con un pH variable. Por lo tanto, un entorno de pH bajo permitió una disminución de la tasa de reducción del precursor de oro y la consiguiente formación de nanoplacas (Zhan y col., 2012).

La relación de concentraciones entre el precursor metálico y el agente reductor es también un parámetro importante para controlar los tamaños y formas de AuNP. Una concentración más elevada del agente reductor en comparación con el precursor de Au conduce a la formación de AuNP más pequeñas, debido al efecto de recubrimiento por parte del reductor (Zhang y col., 2015).

Las nanoplacas han sido sintetizadas de diversas maneras a través de procesos térmicos y fotoquímicos. De acuerdo con Zhan y col. (2012), los átomos de Au podrían ser fácilmente adsorbidos en las caras laterales de las nanoplacas siguiendo la dirección energéticamente más favorable, donde ocurre un proceso de "fusión", conduciendo al crecimiento de la placa.

Las mediciones de dispersión dinámica de la luz (DLS) y el potencial  $\zeta$  fueron realizadas para investigar el tamaño hidrodinámico y carga superficial de las nanopartículas, respectivamente. Los resultados de distribución de intensidad de DLS para amoxi@AuNP mostraron que el 92% de las nanopartículas tienen un diámetro promedio de  $79 \pm 43$  nm (Figura 8). La amplia distribución de tamaños de partícula demostrada por esta técnica se atribuye a la presencia de nanoestructuras no esféricas más grandes, en contraste con las AuNP sintetizados con  $\text{NaBH}_4$  (AuNPs sin recubrir) que muestran una forma más monodispersa de distribución de tamaños:  $8 \pm 2$  nm.

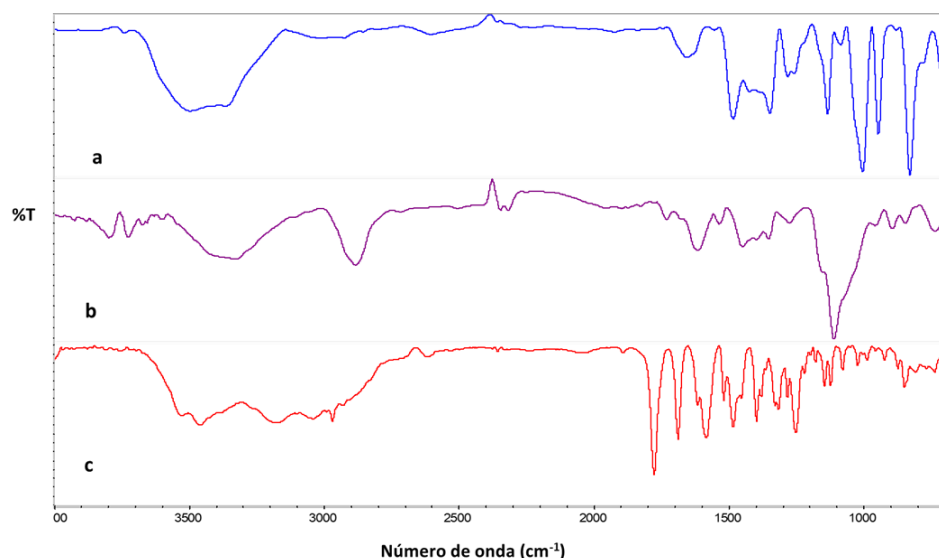




**Figura 8.** Distribución de tamaños por intensidad obtenidos a partir de DLS

El potencial  $\zeta$  está relacionado con la carga superficial, una propiedad que todos los materiales poseen o adquieren cuando están suspendidos en un fluido, que brinda información acerca de la estabilidad coloidal. Cada coloide contiene una carga eléctrica que suele ser de naturaleza negativa, aunque también puede ser positiva. Estas cargas producen fuerzas de repulsión electrostática entre los coloides vecinos. Si la carga es suficientemente elevada, los coloides permanecen dispersos y en suspensión. Reduciendo o eliminando estas cargas se obtiene el efecto opuesto y los coloides se aglomeran y sedimentan fuera de la suspensión. Las dispersiones de nanopartículas con valores de potencial  $\zeta$  de  $\pm 0-10$  mV,  $\pm 10-20$  mV,  $\pm 20-30$  mV y  $> \pm 30$  mV se clasifican como altamente inestables, relativamente estables, moderadamente estables y altamente estables, respectivamente (Bhattacharjee y col., 2016). El valor de potencial  $\zeta$  encontrado para amoxi@AuNPs fue de  $+30 \pm 7$  mV, lo que confirma la efectividad de la amoxicilina como estabilizador coloidal.

La unión de amoxicilina a las nanopartículas de Au se analizó mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR). Se liofilizaron muestras de trihidrato de amoxicilina, AuNP sin recubrir sintetizadas con  $\text{NaBH}_4$  y amoxi@AuNP, luego se midieron mediante FT-IR en condiciones de baja temperatura (Figura 9).



**Figura 9.** Espectros FT-IR de AuNP sin recubrir (a), amoxi@AuNP (b) y trihidrato de amoxicilina (c).

Se puede apreciar en la Figura 9 que el trihidrato de amoxicilina presenta las bandas de absorción características a  $3459,95\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la tensión N-H del grupo amino, a  $1687,44\text{ cm}^{-1}$  la banda que corresponde a la tensión C=O de la amida  $1^\circ$  y flexión N-H del grupo amino, y a  $1771,72\text{ cm}^{-1}$  la tensión C=O del anillo  $\beta$ -lactámico, responsable de la actividad antibacteriana de amoxicilina según lo reportado por Bisson y col. (2010).

En el espectro de amoxi@AuNP se observó un corrimiento hacia longitudes de onda más largas de las bandas que aparecen a  $3459,95\text{ cm}^{-1}$  y a  $1687,44\text{ cm}^{-1}$  en el espectro de amoxicilina, coincidente con lo descrito (Rastogi y col., 2012; Sofokleous y col., 2013). La banda que corresponde a la tensión C-N alifático presente a  $1111\text{ cm}^{-1}$  en el espectro de amoxicilina, se desplazó hacia longitudes de onda mayores en el espectro de amoxi@AuNP, esta banda resultó más ancha y de mayor intensidad (Leff y col., 1996). Estos desplazamientos de bandas en el espectro FT-IR comprueban la unión de trihidrato de amoxicilina a las nanopartículas. Cabe destacar que el sitio activo del antibiótico se conserva luego de la conjugación con la superficie de las nanopartículas, ya que la señal de la tensión C = O del anillo  $\beta$ -lactámico permanece en el espectro FT-IR de la nueva nanopartícula.

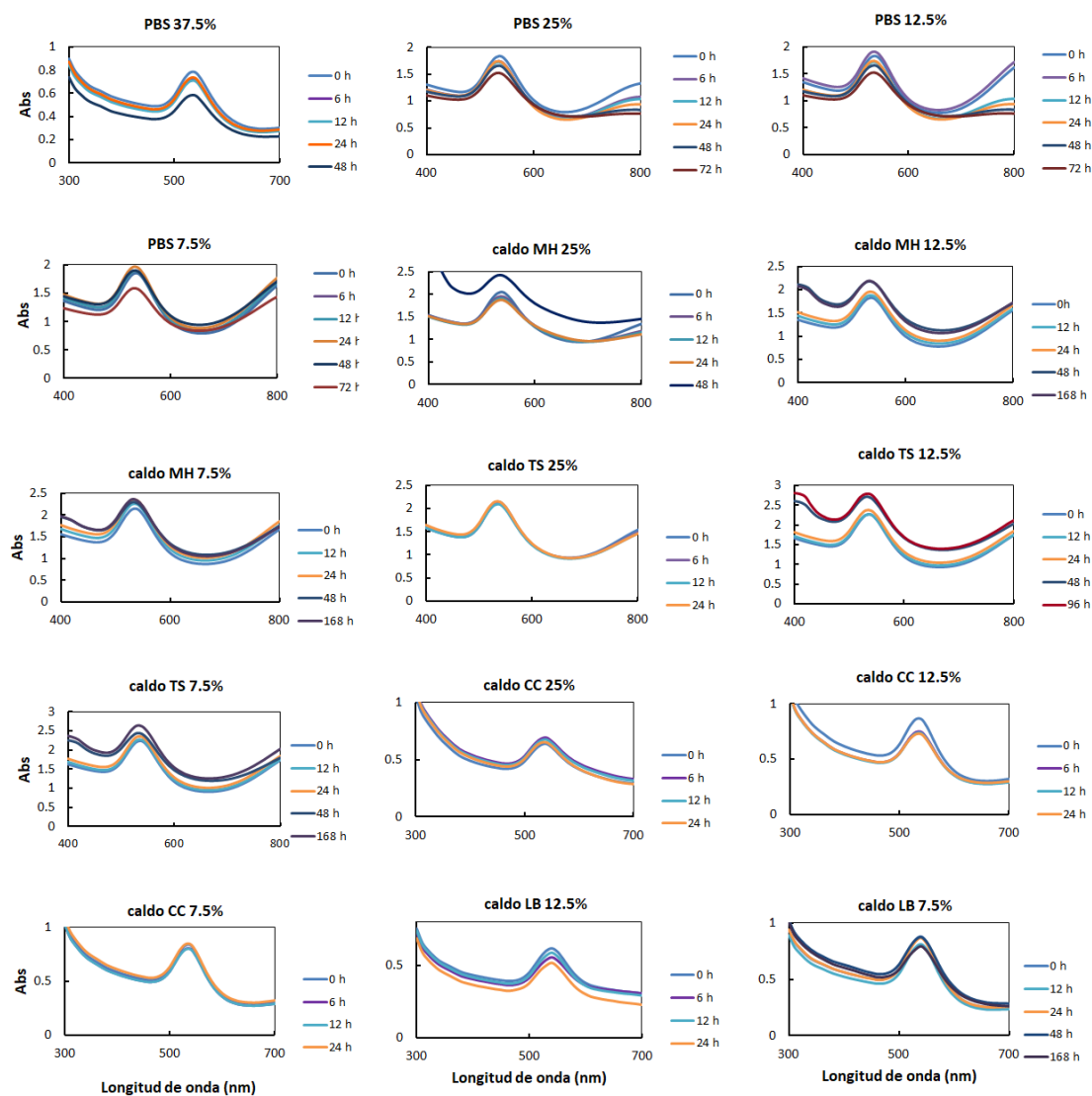
Para determinar la cantidad de trihidrato de amoxicilina unida a las nanopartículas se realizó un análisis termogravimétrico (TGA). El estudio TGA de muestras de amoxi@AuNP previamente secadas en estufa a  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , indicó un 11% de carga de la molécula orgánica en las AuNP. Esta cantidad fue suficiente para estabilizar la nanopartícula, y resultó ser muy baja en comparación con la dosis diaria de amoxicilina administrada a un paciente (generalmente se usan 500 mg por dosis). Esto evitaría todos los efectos secundarios de la propia amoxicilina (Schrag y col., 2001; Gillies y col., 2015).

### 2.3 Estabilidad coloidal de amoxi@AuNP

La estabilidad de las nanopartículas es un requisito previo importante para su uso en aplicaciones *in vitro* e *in vivo* (Gupta y col., 2016). En general, la mayoría de los medios de cultivo de células bacterianas y de células eucariotas están compuestos por soluciones buffer, sales inorgánicas y macromoléculas biológicas. Cuando las nanopartículas son dispersadas en los medios de cultivo, pueden sufrir agregación, disolución o conducir a la adsorción indeseable de componentes biológicos presentes en dichos medios. Por estas razones, es esencial evaluar la estabilidad de las nanopartículas antes de realizar experimentos celulares para observar si se preserva la integridad de las mismas durante los experimentos.

Las mediciones de estabilidad coloidal de amoxi@AuNP en diferentes soluciones buffer y medios de cultivo se realizaron basándose en cambios en los máximos de absorbancia plasmónica en diferentes puntos temporales (ver página 113, sección 7.2.3 en Materiales y Métodos). La estabilidad se consideró como el tiempo que lleva una disminución o aumento del 20% en la absorción de plasmón en la longitud de onda en su absorbancia máxima inicial (Weerasekera y col., 2016). Utilizando espectrofotometría UV-Vis, las mediciones de estabilidad se llevaron a cabo durante 7 días, evaluando la máxima concentración de amoxi@AuNP que se utilizó para los ensayos *in vitro* (1,5 µg/mL).

Los espectros de UV-Vis de amoxi@AuNP mostraron una gran estabilidad en los medios de cultivo ensayados. Las NP fueron estables a las concentraciones de buffer PBS de 37,5% durante 48 h y de 25, 12,5 y 7,5% durante 72 h; en caldo Mueller Hinton (MH) al 25% durante 48 h, y a las concentraciones de 12,5 y 7,5% durante 168 h; en caldo tripteína soya (TS) al 25, 12,5 y 7,5% durante 24, 96 y 168 h respectivamente, en caldo cerebro corazón (CC) a las concentraciones de 25, 12,5 y 7,5% fueron estables durante 24 h, en caldo Luria Bertani (LB) al 12,5 % fueron estables durante 24 h y para la concentración de 7,5% durante 168 h, en agua Milli-Q durante 96 h. Transcurridos estos tiempos, se observó la precipitación de las amoxi@AuNP en los medios de cultivos mencionados anteriormente. A su vez, las NP precipitaron inmediatamente en diferentes concentraciones de solución fisiológica (NaCl 0,9%), y en el resto de los medios de cultivo con alta concentración de sal (100 y 50%). En la Figura 10 se observan los espectros de amoxi@AuNP en los medios de cultivo a las concentraciones en que las NP permanecieron estables.



**Figura 10.** Espectros de absorción de amoxi@AuNP en buffer PBS, caldo MH, caldo TS, caldo CC y caldo LB, a las concentraciones y períodos de tiempo en los que las NP permanecieron estables.

En medios biológicos, la estabilidad coloidal es significativamente dependiente de las propiedades intrínsecas de las NP, como la funcionalización de superficie y carga, la resistencia iónica, pH y composición de proteínas de los medios de cultivo (Gebauer y col., 2012). Las NP se agregan en medios de cultivo con un alto contenido de electrolitos. Las altas fuerzas iónicas en todos los medios de cultivo al 100 y 50% es probablemente una de las razones de aglomeración de amoxi@AuNP (Ji y col., 2010). Generalmente, las NP se estabilizan en solución por una barrera repulsiva que evita la aglomeración de partículas al colisionar unas con otras. La estabilización se puede lograr por repulsión electrostática o estérica (Segets y col., 2011; Kohut y col., 2007). La primera depende de la carga superficial de las partículas, y esta repulsión electrostática se destruye por la presencia de altas concentraciones de electrolitos. La presencia de proteínas en los medios de cultivo puede estabilizar las NP mediante efectos estéricos para evitar su aglomeración, incluso en presencia de concentraciones de electrolitos fisiológicos (Bönnemann y col., 2001; Gebauer y col., 2012). Los caldos de cultivo MH, TS, CC y

LB, contienen nutrientes mínimos disponibles para crecimiento bacteriano, presentan una composición relativamente baja de fuerza iónica en comparación con la solución fisiológica, y están compuestos por moléculas biológicas como proteínas y azúcares. El caldo MH es un medio compuesto por altas concentraciones de proteínas, como la caseína y bajas concentraciones de electrolitos con respecto al resto de los caldos evaluados. Esto explicaría la estabilidad de amoxi@AuNP en caldo MH durante más tiempo con respecto a los caldos TS, CC y LB. A medida que los medios de cultivo se diluyen, aumenta la estabilidad de amoxi@AuNP. La concentración del medio de cultivo elegido para realizar los ensayos de actividad antibacteriana de las NP fue de 37,5%, ya que a esta concentración, las NP permanecen estables, permitiendo el desarrollo bacteriano (Medina y col., 2017; Warren y col., 2019).

En base a los resultados obtenidos, se comprueba la eficacia de trihidrato de amoxicilina como agente estabilizador de amoxi@AuNP en diferentes medios de cultivo celular.

#### *2.4 Síntesis de nanopartículas de plata conjugadas y estabilizadas con lignina (lignina@AgNP)*

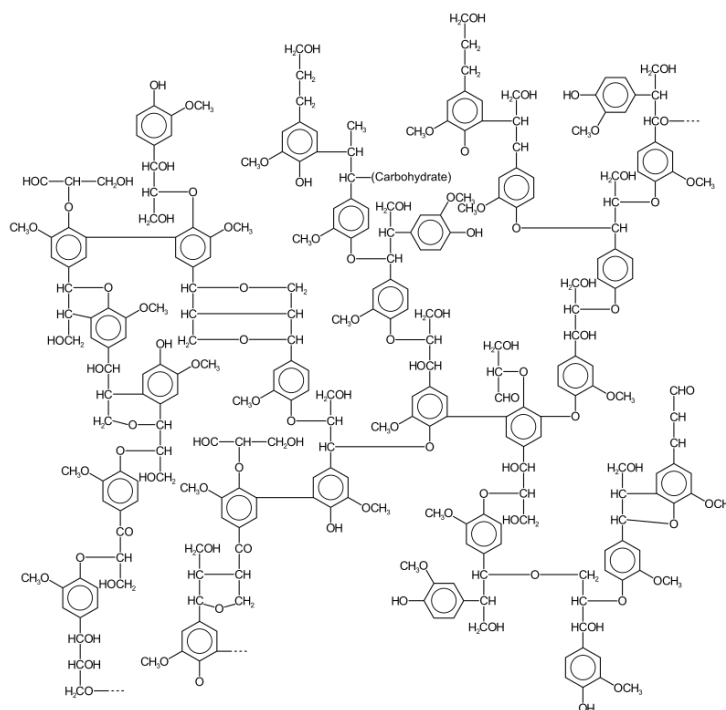
El interés en el uso de agentes de recubrimiento de NP amigables con el medio ambiente, como así también el uso de recursos sustentables y económicos para aplicaciones antimicrobianas se ha incrementado a lo largo de los años (Johnston y col., 2012; Tsai y col., 2017; Sathiyabam y col., 2018). Por esta razón para la síntesis de AgNP se utilizaron agentes de recubrimiento económicos y no tóxicos, como la lignina, y como único solvente se utilizó agua MilliQ.

La lignina es el segundo polímero natural más abundante en la tierra después de la celulosa, es un subproducto tradicional de bajo valor en la industria del papel y de la pulpa, que se está convirtiendo gradualmente en una salida importante de la industria forestal, debido a su composición química. Existe un creciente interés en la búsqueda de aplicaciones de valor agregado para la lignina, que tradicionalmente ha sido considerada como desecho y se utilizaba para la generación de calor (Kai y col., 2016). Debido a su estructura aromática y a la presencia de grupos funcionales, la lignina tiene aplicaciones como aditivo en lubricantes, combustible, en la detección de metales pesados o peróxido de hidrógeno, y nanopartículas de lignina con propiedades antimicrobianas (Berghel y col., 2013; Shen y col., 2014; Aadil y col., 2016; Mu y col., 2018; Yang y col., 2018; Berghel y col., 2013; Schneider y col., 2021).

El término "lignina" abarca una amplia gama de estructuras químicas que incluso en la naturaleza varía según el tipo de especie y el entorno en el que crecen los árboles. Pero la lignina nunca se extrae intacta, debido a que los tratamientos mecánicos, térmicos y químicos requeridos para su extracción cambian su composición química, color y solubilidad. Las modificaciones químicas pueden dar como resultado lignina insoluble o soluble en agua.

La lignina es el polímero natural más complejo en relación con su estructura y heterogeneidad, por esta razón no es posible describir una estructura definida de la lignina; pero la característica química principal es que contiene grupos fenólicos, los cuales son responsables de su actividad antioxidante (Rak y col., 2014; Aadil y col., 2014) (Figura 11). También contienen carbohidratos unidos al resto de la estructura polimérica (Aadil y col., 2016; Marulasiddeshwara y col., 2017). Además de sus propiedades

antioxidantes, se ha demostrado que la lignina puede actuar como agente reductor en la síntesis de nanopartículas metálicas (Rak y col., 2014). Los grupos fenólicos adyacentes a los grupos metoxilos en las estructuras de lignina, y los grupos carboxílicos, pueden oxidarse y, por lo tanto, usarse como agentes reductores. Además, a pH básicos, los grupos fenólicos de lignina se encuentran desprotonados, favoreciendo su capacidad reductora (Quiñones Muñoz y col., 2018).



**Figura 11.** Estructura de lignina.

Varios métodos térmicos fueron reportados para la síntesis de AgNP, y para controlar la morfología y polidispersidad de las NP (Akaighe y col., 2011; Liang y col., 2010; Marulasiddeshwara y col., 2017; Torras y col., 2020; Liu y col., 2014; Shankar y col., 2017). La síntesis térmica de AgNP suele ser rápida, algunas veces se obtiene polidispersidad de partículas y frecuentemente se requieren agentes reductores fuertes y altas temperaturas (Stamplecoskie y col., 2010).

Los métodos fotoquímicos también han sido desarrollados para la síntesis de nanopartículas esféricas, dodecaedros, y nanoprismas (Jin y col., 2001; Cardoso-Avila y col., 2015; Stamplecoskie y col., 2010). Los métodos fotoquímicos presentan la ventaja de evitar el uso de agentes reductores fuertes y nocivos, además de que la síntesis puede ser llevada a cabo a temperatura ambiente (Stamplecoskie y col., 2010).

La síntesis de lignina@AgNP fue llevada a cabo en un solo paso mediante la técnica *bottom up* descrita anteriormente (Shah y col., 2014), a través de métodos térmicos y fotoquímicos, utilizando material de plástico (eppendorf y tubos falcon) y viables de vidrio, respectivamente, sin tapar durante la síntesis (ver página 113, sección 7.3.1 en Materiales y Métodos). Como precursor de plata se utilizó la sal de  $\text{AgNO}_3$  y como agentes reductores y estabilizadores al mismo tiempo, se utilizaron tres tipos diferentes

de lignina (Tabla 2), lignina alcalina (Álcali-lignina) disponible comercialmente en Sigma Aldrich, y dos ligninas provenientes de una compañía local de pulpa y papel de la ciudad de Ottawa, Canadá: ZHL-lignina (despolimerizada) y AL-lignina (extracto de álcali). En la tabla 3 se muestran las condiciones experimentales utilizadas para la síntesis de lignina@AgNP.

**Tabla 2.** Ligninas utilizadas para la síntesis de lignina@AgNP.

	% Carbohidratos	Solubilidad
Álcali-lignina	Bajo contenido de sulfonatos y sin azúcares reductores	pH 7
AL-lignina *	16	pH 12
ZHL-lignina *	27	pH 12

\*FP Innovations de Point-Claire, PQ, Canadá.

**Tabla 3.** Condiciones experimentales ensayadas para la síntesis de lignina@AgNP.

Relación de masa Ag <sup>+1</sup> : lignina *	Longitud de onda de Irradiación (nm)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
10; 5; 1; 0,1	Oscuridad	55-60	10
10; 5; 2; 1; 0,5; 0,2; 0,1	400	25	20
10; 5; 2; 1; 0,5; 0,2; 0,1	465	28	20
5; 1; 0,5; 0,1	530	28	20
10; 5; 2; 1; 0,5; 0,2; 0,1	730	25	20

\*mg del precursor (AgNO<sub>3</sub>) / mg de lignina, para un total de 0,1 mg lignina/mL.

El precursor de plata y la lignina comercial (álcali-lignina) fueron disueltos en agua MilliQ, ZHL-lignina y AL-lignina fueron disueltas en agua MilliQ ajustando el pH hasta 12 con el agregado de NaOH. Todas las soluciones fueron preparadas en el momento de la síntesis. En general, 0,5 mL de la solución del precursor metálico se añadió a 0,5 mL de lignina (0,4 mg/ mL) y el volumen de la solución fue aumentado a un volumen final de 2 mL. En el método de síntesis térmico, las soluciones se calentaron a temperaturas entre 55-60°C en baño termostatzado, manteniendo la temperatura constante durante el tiempo ensayado. El método fotoquímico se realizó por irradiación directa de la mezcla de reacción con luces LED de 405, 465, 530 y 730 nm de longitud de onda. La metodología y condiciones experimentales que proporcionaron la obtención de lignina@AgNP más estables en menor tiempo de síntesis y con mayor grado de

reproducibilidad fueron las seleccionadas. En base a esto, para la síntesis de AgNP conjugadas con álcali-lignina (álcali@AgNP), ZHL-lignina (ZHL@AgNP) y AL-lignina (AL@AgNP), se eligieron las condiciones representadas en la Tabla 4. El cambio de color de la solución a amarillo indicó la formación de AgNP debido a la reducción de  $Ag^{+1}$  a  $Ag^0$  por lignina (Shankar y col., 2017).

**Tabla 4.** Condiciones experimentales seleccionadas para la obtención de lignina@AgNP

Relación de masa $Ag^{+1}$ : lignina	Irradiación (nm)	Temperatura ( $^{\circ}C$ )	Tiempo (min)	
álcali@AgNP	5	465	25	5
ZHL@AgNP	1	Oscuridad	58	5
AL@AgNP	1	465	28	5

Las dispersiones coloidales de las lignina@AgNP obtenidas fueron lavadas con agua MilliQ mediante un ciclo de centrifugación para eliminar lignina libre y/o precursor metálico sin reaccionar. Las lignina@AgNP fueron resuspendidas en 200  $\mu$ L de agua MilliQ (solución stock), y luego esta solución fue diluida en un factor de 10 para la caracterización de las NP mediante espectroscopía UV-Vis, TEM, DLS y potencial  $\zeta$ . Para ensayos de estabilidad coloidal y determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de las NP, se utilizaron las soluciones stock de las tres lignina@AgNP sintetizadas. El pH inicial de la dispersión de álcali@AgNP fue de 7, y el de las dispersiones de ZHL@AgNP y AL@AgNP fue de aproximadamente 10. Luego del lavado, el pH de las tres dispersiones coloidales fue igual a 7, en correspondencia al pH del agua MilliQ que se utilizó para resuspender las NP.

Además, se requirieron condiciones energéticas económicas, ya que las lignina@AgNP fueron obtenidas en 5 min luego de la exposición térmica o fotoquímica de la solución de plata y de la lignina, en comparación con reportes previamente descritos (Shankar y col., 2017; Quintero-Quiroz y col., 2019; Li y col., 2019; Zevallos Torres y col., 2020; Wang y col., 2021), donde se necesitaron solventes tóxicos, y tiempos de síntesis prolongados para la obtención de AgNP.

La fotorreducción del ión metálico  $Ag^{1+}$  mediada por grupos fenólicos presentes en la estructura de lignina se podría explicar mediante los siguientes mecanismos previamente reportados (Gaberell y col., 2003; Rose y col., 2006; Fujii y col., 2010; Yin y col., 2012; Yin y col., 2014):

1-transferencia directa de carga eléctrica del grupo fenólico presente en la estructura de la lignina al ión metálico  $Ag^{1+}$ .

2- el grupo fenólico presente en lignina transfiere un electrón al  $O_2$  para producir radicales libres de anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), que subsecuentemente reduce los iones metálicos  $Ag^{1+}$  a  $Ag^0$ .

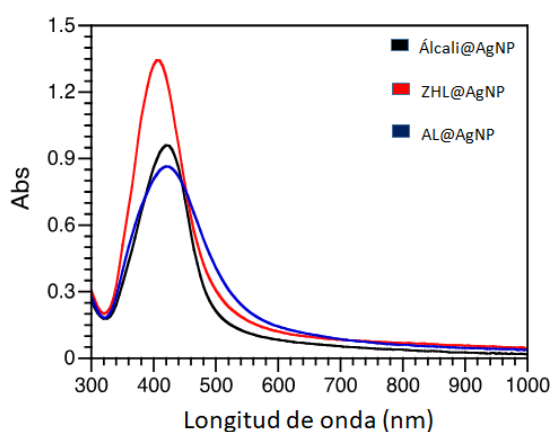
Para la síntesis fotoquímica se utilizaron luces LED, debido a su alta intensidad de emisión y bajo costo. Es importante resaltar que todas las longitudes de onda de irradiación probadas en la síntesis de lignina@AgNP favorecieron la formación de NP metálicas, debido a la capacidad de lignina para reducir térmicamente  $Ag^{1+}$  a  $Ag^0$  (Stamplecoskie y col., 2010; Lanterna y col., 2014). Este resultado sugiere que la reducción de iones de plata es el resultado combinado de lignina y luz visible de una



determinada longitud de onda. Las dispersiones de álcali@AgNP y AL@AgNP fueron obtenidas después de 5 min de irradiación directa con luz LED azul de 465 nm, el tiempo y las condiciones de síntesis fueron optimizados, en comparación con lo reportado en otras síntesis fotoquímicas (Yin y col., 2012; Stampelcoskie y col., 2010; Cardoso-Avila y col., 2015; Lee y col., 2014; Lee y col., 2014; Tang y col., 2015; Liangwei y col., 2015), donde se requirió mayor tiempo de exposición a luz visible, luz UV, o combinación de ambas.

## 2.5 Caracterización de lignina@AgNP

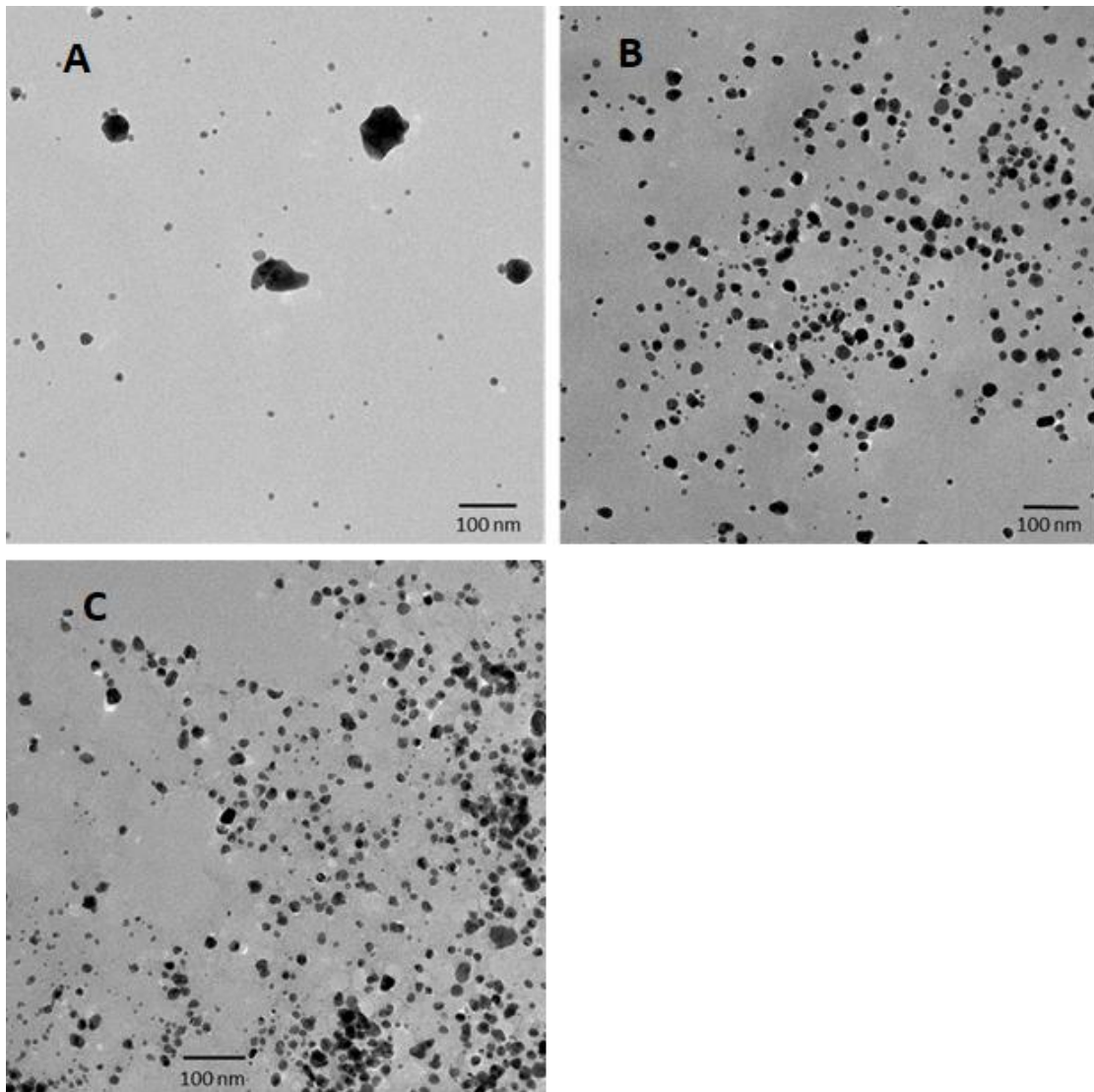
La Figura 12 corresponde a los espectros de absorción de las ligninas@AgNP obtenidas, en los cuales se observa la característica banda de absorción del plasmón de superficie de AgNP centrado alrededor de los 420 nm del espectro UV-visible. De acuerdo a los espectros obtenidos, se obtuvieron AgNP predominantemente esféricas luego de la síntesis con los tres tipos de lignina.



**Figura 12.** Espectro de absorción de lignina@AgNP. Álcali@AgNP (línea negra), ZHL@AgNP (línea roja) y AL@AgNP (línea azul).

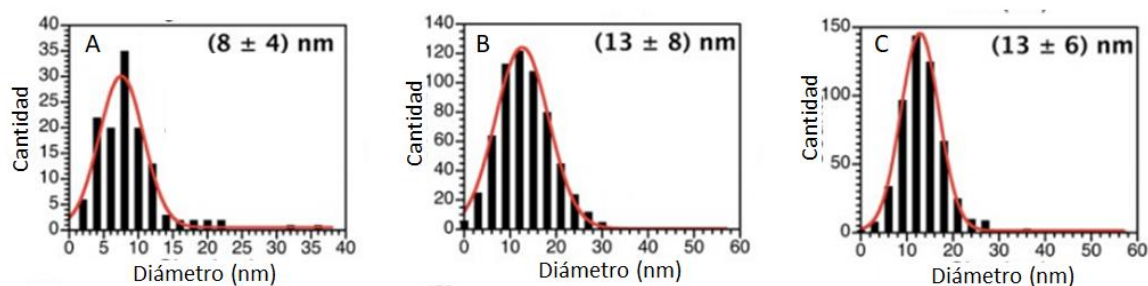
### 2.5.1 Caracterización de lignina@AgNP por TEM

Las imágenes TEM de la Figura 13 revelan que las lignina@AgNP obtenidas fueron principalmente esféricas. En el caso de álcali@AgNP (Figura 13, A), las imágenes TEM mostraron formación de agregados, esto puede deberse a que para la síntesis se necesitaron 5 veces más iones  $\text{Ag}^{1+}$  en relación masa a álcali-lignina. Como se mencionó anteriormente (sección 2.2.1 Caracterización de amoxi@AuNP por TEM) una concentración menor del agente reductor en comparación con el precursor metálico conduce a la formación de NP más grandes o agregados, debido a una disminución en la eficacia de recubrimiento por parte del reductor (Zhang y col., 2015). En el caso de ZHL@AgNP y AL@AgNP, la relación de masa de  $\text{Ag}^{1+}$ : lignina fue de 1, las imágenes TEM revelaron una baja polidispersidad para estas NP.



**Figura 13.** Imágenes obtenidas a partir de TEM de álcali@lignina (A), ZHL@lignina (B) y AL@lignina (C).

Un mínimo de 1200 nanopartículas se analizó estadísticamente utilizando el software ImageJ®. En la Figura 14 se observa la distribución de tamaños de las nanopartículas sintetizadas. El histograma A de la Figura 14 corresponde al diámetro promedio de las NP esféricas de álcali@AgNP de  $8 \pm 4$  nm, en este cálculo se despreció el tamaño de los agregados. El diámetro promedio de ZHL@lignina y AL@lignina fue de  $13 \pm 8$  nm y  $13 \pm 6$  nm, respectivamente.



**Figura 14.** Distribución de tamaños de lignina@AgNP (n=1200). Álcali@AgNP (A) (n=129), ZHL@lignina (B) (n=605) y AL@lignina (C) (n=527).

El tamaño y la forma de las AgNP se ven afectados por condiciones de reacción como tiempo, temperatura, concentración de agente reductor y pH de la reacción.

La influencia del tiempo y la temperatura de reacción en la morfología de AgNP fue investigada por Aadil y col. (2016) y Torras y col. (2020). Para la síntesis térmica de AgNP, se observó que, al aumentar el tiempo de reacción de segundos a 10 min, las partículas experimentan una disminución de tamaño, donde las nanoplacas formadas inicialmente en segundos, desaparecen a favor de la formación de nanopartículas esféricas monodispersas. A medida que aumentaba la temperatura de reacción, la velocidad de reducción también aumentaba y, por lo tanto, la mayoría de los iones  $\text{Ag}^+$  se consumieron en la formación de núcleos, bloqueando el proceso de reducción secundaria en la superficie del núcleo. De esta manera, fueron formadas NP pequeñas y monodispersas.

Al realizar la síntesis de lignina@AgNP, el calentamiento de la solución acuosa de  $\text{AgNO}_3$  en presencia de ZHL-lignina provocó la reducción de  $\text{Ag}^{+1}$  a  $\text{Ag}^0$ , permitiendo la rápida formación de muchos átomos de Ag que pueden crecer en morfologías favorecidas termodinámicamente como esferas.

Cuando se forman los núcleos de  $\text{Ag}^0$ , la lignina libre se une a las superficies de las NP debido a la afinidad de la superficie de Ag con el grupo hidroxilo de lignina, lo que resulta en pequeñas AgNP de forma esférica. Sin embargo, al disminuir la cantidad de lignina podría romper la simetría inicial, contribuyendo a la agregación de NP, como lo observado en la síntesis de álcali@AgNP.

Estudios desarrollados por Khalil y col. (2014) y Aziz y col. (2018) informaron que un pH alcalino favorece la producción de nanopartículas más pequeñas. De acuerdo con lo reportado, para la síntesis de AgNP utilizaron extractos de plantas con alto contenido de grupos funcionales, entre ellos polifenoles y azúcares, y observaron que un pH alcalino favoreció la capacidad reductora y estabilizadora de los grupos antioxidantes del extracto. Por lo tanto, concentraciones bajas del precursor metálico  $\text{AgNO}_3$  y un pH alcalino genera NP esféricas pequeñas en los procesos de síntesis con ZHL-lignina y AL-lignina.

El tamaño hidrodinámico y el índice de polidispersidad (PDI) de lignina@AgNP fue medido mediante DLS. El valor de PDI se calcula a partir de los datos de correlación obtenidos del análisis DLS. Esta es una magnitud adimensional escalada entre 0 y 1. Los valores PDI superiores a 0,5 indican que la muestra es polidispersa. La carga superficial de las NP fue medida mediante potencial  $\zeta$ . En la Tabla 5 se muestran en forma

comparativa los tamaños obtenidos mediante TEM y DLS, el PDI y potencial  $\zeta$  de las tres lignina@AgNP sintetizadas.

**Tabla 5.** Tamaños de lignina@AgNP obtenidos a partir de imágenes TEM, y análisis DLS. PDI y potencial  $\zeta$ .

lignina@AgNP	Diámetro (nm) <sup>a</sup>	Diámetro hidrodinámico (nm) <sup>b</sup>	PDI	potencial $\zeta$
álcali@AgNP	8 ± 4 <sup>c</sup>	65	0,52	-44,3
ZHL@AgNP	13 ± 8	52	0,28	-51,1
AL@AgNP	13 ± 6	100	0,67	-57,8

<sup>a</sup> Tamaño obtenido de los análisis de las imágenes TEM. <sup>b</sup> Tamaño obtenido del análisis DLS. <sup>c</sup> Solo se midieron y consideraron partículas pequeñas. PDI: índice de polidispersidad escalado entre 0 y 1. Los valores superiores a 0,5 indican materiales polidispersos.

Se puede observar que el tamaño hidrodinámico de las tres AgNP fue considerablemente mayor al diámetro obtenido a partir de las imágenes TEM, esto comprueba la presencia de la lignina como agente de recubrimiento de las AgNP, además de actuar como reductor en la síntesis. La estabilidad electrostática de las partículas medidas por el potencial zeta también puede explicar la presencia de agentes de protección que mantienen las partículas dispersas en solución. En las tres lignina@AgNP sintetizadas el potencial zeta es mayor a  $\pm 30$  mV, demostrando el efecto estabilizador de las ligninas, el valor absoluto del potencial fue aún mayor para ZHL@AgNP y AL@AgNP en comparación con álcali@AgNP.

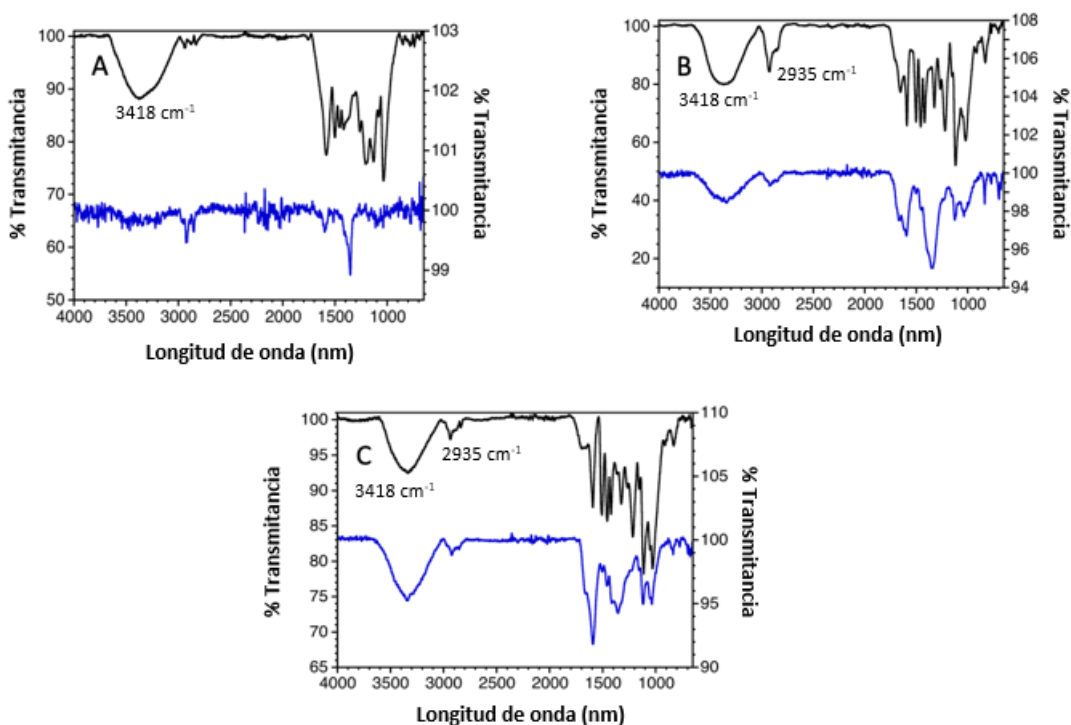
En general, las lignina@AgNP esféricas sintetizadas son bastante monodispersas según las imágenes TEM (excepto en el caso de las álcali@AgNP). Sin embargo, AL@AgNP y álcali@AgNP muestran cierto grado de polidispersidad según las mediciones de DLS (PDI > 0,5), en comparación con ZHL@AgNP (PDI < 0,5). Esto podría explicarse en relación con los métodos de síntesis elegidos para las NP. La obtención de ZHL@AgNP fue realizada mediante síntesis térmica, mientras que las dos AgNP restantes se obtuvieron mediante síntesis fotoquímica. De acuerdo con Yin y col. (2014), en la síntesis de AgNP bajo irradiación con luz, la oscilación de electrones en condiciones resonantes resulta en una distribución no uniforme de carga superficial en las AgNPs y la creación de un dipolo oscilante. Esta atracción dipolo-dipolo entre partículas es lo suficientemente fuerte para impulsar la agregación de estas, en comparación con la síntesis térmica de AgNP, donde no se observó un efecto significativo sobre el tamaño de los NP con un aumento de la temperatura de incubación.

En base a los resultados, es posible concluir que los parámetros de reacción de la síntesis de AgNP son muy importantes para las características de las nanopartículas resultantes y afectan directamente su distribución de tamaño, aglomeración y morfología.

La unión de lignina a las AgNP se analizó mediante FT-IR de reflexión total atenuada (ATR). La ATR es una técnica de muestreo utilizada junto con la espectroscopía

infrarroja que permite examinar las muestras directamente en estado sólido o líquido sin más preparación.

En la Figura 15 se muestran los espectros infrarrojos de muestras líquidas de lignina@AgNP sintetizadas y de las correspondientes ligninas utilizadas en la síntesis.



**Figura 15.** Espectros ATR FT-IR de las lignina solas (negro) y de los compuestos lignina@AgNP (azul). (A) álcali@AgNP, (B) AL@AgNP, (C) ZHL@AgNP.

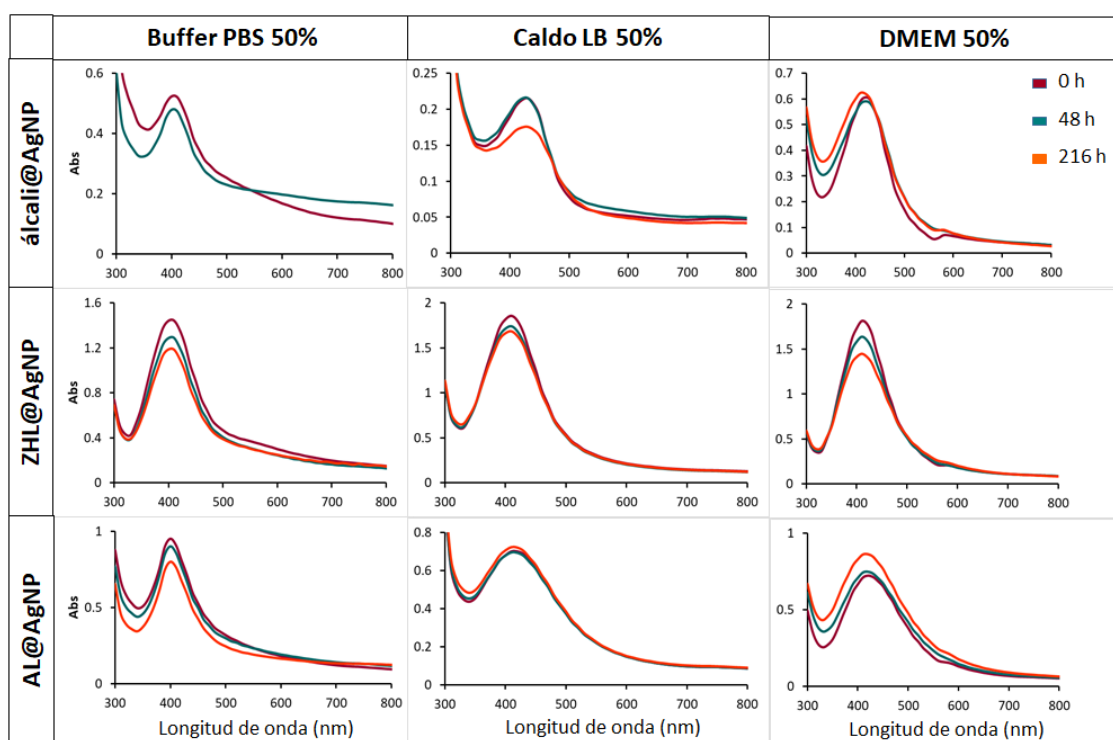
En los espectros FT-IR correspondientes a las ligninas se observó una banda ancha a la frecuencia de  $3418\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento del hidroxilo (OH) del grupo fenólico. Las bandas vibracionales correspondientes al estiramiento del grupo C-H de los metilos y metilenos alifáticos aparecieron a  $2935\text{ cm}^{-1}$ . Las bandas características de anillos aromáticos se observaron entre  $1595$  y  $1512\text{ cm}^{-1}$ . Dos picos distintivos correspondientes a la deformación C-O de grupos alcohólicos fueron observados a  $1079$  y  $1030\text{ cm}^{-1}$ .

En los espectros correspondientes a las tres lignina@AgNP sintetizadas se observó un corrimiento de la banda vibracional del grupo OH y de la banda que aparece a la frecuencia de  $2935\text{ cm}^{-1}$ , lo que demuestra la unión electrostática entre lignina y AgNP (Aadil y col., 2016). Además, en los espectros de las tres muestras de lignina@AgNP, se observó una fuerte banda alrededor de  $1700\text{ cm}^{-1}$  y  $1300\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente al grupo carbonilo (C=O), el cual sería el resultado de la oxidación del grupo R-OH de lignina, reduciendo simultáneamente  $\text{Ag}^{+1}$  a  $\text{Ag}^0$  (Rak y col., 2016; Marulasiddeshwara y col., 2017). Las otras bandas obtenidas en el espectro FT-IR de AgNP fueron características de la lignina para diversos estiramientos, flexiones y deformaciones de los enlaces respectivos.

Por último, la concentración de las tres muestras de lignina@AgNP fue determinada en base a los supuestos de que las NP son perfectamente esféricas y la distribución del tamaño es monodispersa. Mediante plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) se determinó el contenido total de Ag en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , presente en la NP.

## 2.6 Estabilidad coloidal de lignina@AgNP

La estabilidad de las lignina@AgNP en diferentes medios biológicos fue determinado siguiendo los cambios en la banda de absorción del plasmón inicial en función del tiempo en cada medio (de acuerdo a la sección 2.3 Estabilidad de amoxi@AuNP). Las tres muestras de lignina@AgNP (solución stock) fueron resuspendidas en los de medios de cultivo caldo Luria Bertani (LB), buffer PBS y medio de cultivo celular Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) a las concentraciones de 100; 50; 37,5 y 25% (ver página 114, sección 7.3.3 en Materiales y Métodos). La estabilidad fue determinada durante un período no mayor a los 10 días, donde un 20% de disminución o aumento en la banda de absorción inicial del plasmón fue aceptado como parámetro de estabilidad. La Figura 16 muestra la evolución de la banda de absorción del plasmón de las tres lignina@AgNP a las concentraciones de los medios de cultivo donde las NP fueron estables.



**Figura 16.** Estabilidad de lignina@AgNP en los medios de cultivo buffer PBS, caldo LB y DMEM al 50%, durante un período no mayor a los 10 días.

En los medios de cultivo LB y DMEM, las tres lignina@AgNP fueron estables por más de una semana a la concentración del 50% del medio. En buffer PBS al 50%, ZHL@AgNP y AL@AgNP fueron estables durante todo el período ensayado, mientras

que álcali@AgNP fue estable durante 2 días. Cuando las tres muestras de lignina@AgNP fueron resuspendidas en buffer PBS y en los medios de cultivo al 100%, las NP precipitaron al poco tiempo de contacto con los medios. El buffer PBS contiene concentraciones relativamente altas de iones monovalentes como  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . La desestabilización y agregación de AgNP puede acelerarse en presencia de iones  $\text{Cl}^-$ , lo que da como resultado el blindaje de la carga superficial y la formación de un precipitado de AgCl, comprometiendo así la integridad de AgNP (Weerasekera y col., 2017). Los medios de cultivo LB y DMEM están formados por cantidades variables de proteínas, azúcares y contraiones, compuestos que pueden adsorberse en las superficies de las tres muestras de AgNP, llevando a la agregación de las NP cuando son resuspendidas en los medios al 100%.

Sin embargo, cuando las tres muestras de lignina@AgNP son resuspendidas en PBS y en los medios de cultivo al 50% muestran gran estabilidad a lo largo del tiempo ensayado, en comparación con trabajos previos (Shannahan y col., 2013; Sharma y col., 2014; Weerasekera y col., 2017). Esto comprueba la eficiencia de lignina como agente estabilizador para AgNP.

Es importante destacar que la síntesis de AL@AgNP y ZHL@AgNP se realizó a valores de pH altos ( $\text{pH} \sim 12$ ), después de la centrifugación y el lavado, las NP fueron estables a valores de pH fisiológicos.

El contenido de azúcar reportado en las ligninas ayuda a prevenir la aglomeración de las NP mediante estabilización estérica (Rahman y col., 2019). Esto se logra luego de la interacción electrostática entre las AgNP y la matriz polimérica de lignina (Mogoşanu y col., 2016).

La síntesis de lignina@AgNP fue lograda mediante el uso de un biopolímero de bajo costo y biodegradable como es la lignina, utilizando un método de síntesis ecológico, efectivo, simple y económico.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN: PARTE II.

### EFICACIA DE LAS NANOPÁTICULAS METÁLICAS COMO FOTOSENSIBILIZADORES EN LA PACT

#### 3.1 Eficacia de amoxi@AuNP como fotosensibilizador para la PACT. Curvas de muerte bacteriana

Las infecciones ocasionadas por *Staphylococcus aureus* son una de las causas más frecuentes de infección nosocomial y de la comunidad. En los últimos 50 años, este microorganismo ha desarrollado diferentes mecanismos de resistencia a antibióticos (Aguayo-Reyes y col., 2018). La resistencia a meticilina (SAMR) fue detectada en un primer momento en cepas hospitalarias y luego en cepas de la comunidad. En el año 2013, en Argentina se reportó la primera cepa de *S. aureus* resistente a meticilina adquirida en la comunidad, con sensibilidad intermedia a vancomicina y sin sensibilidad a daptomicina (Errecalde y col., 2013). En el caso de bacilos Gram negativos no fermentadores, como *Pseudomonas aeruginosa*, ocasiona serios problemas en el ámbito de salud pública debido a su adaptación en diversos ambientes y a la multiresistencia a antimicrobianos, incluyendo aminoglucósidos, quinolonas, cefalosporinas y  $\beta$ -lactámicos, lo que repercute en opciones de tratamiento limitadas (Hancock y col., 2000; Pang y col., 2019; Savoldi y col., 2019; Fernández-Canigia y col., 2012; Lee y col., 2017). Es por esto que surge la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para el tratamiento de bacterias resistentes a antibióticos.

En este trabajo, se evaluó el potencial de amoxi@AuNP como fotosensibilizador en la PACT mediante cinética de muerte bacteriana bajo excitación del plasmón, en cepa de referencia de *S. aureus* meticilino sensible (SAMS ATCC 293213), en cepas clínicas de *S. aureus* meticilino resistente (SAMR 9455) y *P. aeruginosa* (PAE 191150) (ver página 116, sección 7.4 en Materiales y Métodos).

Los ensayos microbiológicos se realizaron en buffer PBS a 37,5% v/v, lo que permite que las bacterias permanezcan metabólicamente activas y no interfieran con el control de la absorción del plasmón.

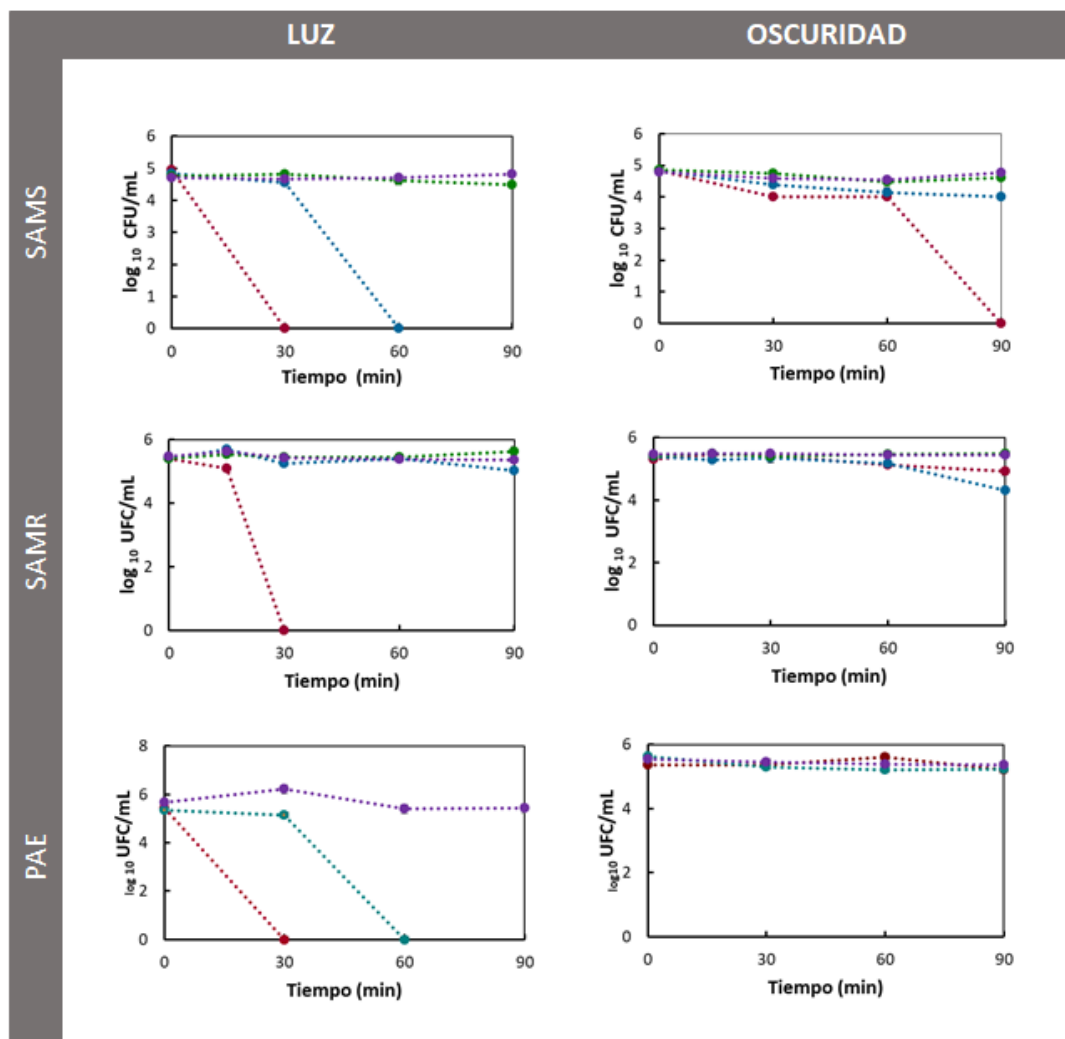
Se eligió luz blanca para cubrir todos los picos de absorción de las diferentes nanopartículas observadas en las imágenes TEM. La irradiación a lo largo de todos los espectros visibles es necesaria para que la variedad de formas y tamaños de NP pueda ser excitada. La irradiación con luz blanca se llevó a cabo utilizando un panel de iluminación LEDs construido *ad hoc* (Figura 17).



**Figura 17.** Panel de iluminación LED construido *ad hoc*, de 23,5 x 16,5 cm. Irradiancia ( $\text{W}/\text{m}^2$ ): 216,65.



En la Figura 18 se muestran las curvas de muerte bacteriana correspondiente a la cepa de referencia SAMS ATCC 29213 y a las cepas clínicas resistentes a meticilina SAMR 9455 y PAE 191150. Las amoxi@AuNP presentaron un efecto bactericida a la concentración de 1,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  después de 30 minutos de irradiación en las tres cepas ensayadas, y a la concentración de 0,15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  luego de 60 min de irradiación en las cepas SAMS ATCC 29213 y PAE 191150. Un resultado prometedor obtenido en esta tesis es que el efecto antibacteriano obtenido para estas nanopartículas se logró a tiempos más cortos en comparación a los nano-fotosensibilizadores probados previamente bajo condiciones de exposición similar (Fasciani y col., 2014; Silvero y col., 2016).



**Figura 18.** Curvas de muerte bacteriana de SAMS ATCC 29213, SAMR 9455 y PAE 191150 en condiciones de luz y oscuridad, en presencia de amoxi@AuNP 1,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (rojo), amoxi@AuNP 0,15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (celeste), trihidrato de amoxicilina a la CIM de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en SAMS ATCC 29213 y de 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en SAMR 9455 (verde) y buffer PBS (violeta).

Los resultados obtenidos permitieron apreciar que la luz en sí misma no produjo daño o cambio en el crecimiento bacteriano. Los resultados obtenidos mostraron que, en condiciones de oscuridad, amoxi@AuNP no presentaron ningún efecto inhibitorio en las cepas clínicas resistentes durante todo el período ensayado, indicando que la

actividad antibacteriana de amoxi@AuNP se debe principalmente a su fototoxicidad, a diferencia de la cepa sensible a meticilina SAMS ATCC 29213, donde amoxi@AuNP presentó actividad bactericida después de 90 minutos en oscuridad. Esta actividad antibacteriana en oscuridad podría ser consecuencia del efecto sinérgico entre el antibiótico y la nanopartícula (Gu y col., 2003; Smekalova y col., 2016), ya que la amoxicilina por sí sola no presentó efecto inhibitorio a la concentración inhibitoria mínima (CIM) de 2 µg/mL en SAMS ATCC 29213 y de 32 µg/mL en SAMR 9455. Durante todo el procedimiento experimental, la temperatura se mantuvo a 37 °C tanto en luz como en oscuridad.

La excitación del plasmón superficial de AuNP puede inducir un calor localizado en la superficie de la nanopartícula, aumentando su temperatura hasta unos 300 °C (Kyrsting y col., 2011), suficiente para desnaturalizar biomoléculas presentes en las células bacterianas (St Denis y col., 2011; Ramasamy y col., 2014). Por lo tanto, la alta temperatura local experimentada por la bacteria en la proximidad a la superficie de la nanopartícula podría desencadenar su muerte (Huang y col., 2010). Otro posible mecanismo de acción en la PACT es la generación de especies reactivas del oxígeno (EROs) en presencia de oxígeno. Las EROs son las responsables de degradar los componentes que mantienen las funciones fisiológicas normales y la morfología estructural en las células bacterianas (Wang y col., 2017).

### 3.2 Ensayos en biofilms bacterianos

Aproximadamente el 80% de las infecciones bacterianas están relacionadas con la formación de biofilms, estructuras formadas por comunidades bacterianas cubiertas por una matriz extracelular que se desarrolla cuando los microorganismos interactúan unos con otros y se unen irreversiblemente a superficies vivas o inertes. En este estado, las bacterias forman una barrera que resiste tanto el efecto de los antimicrobianos como condiciones hostiles del medio ambiente, proporcionando una fuente de infecciones crónicas. Es por esto por lo que los biofilms bacterianos representan uno de los problemas más grandes en salud pública debido a la continua aparición de resistencia a la terapia antibiótica convencional, siendo hasta 100 ó 1000 veces más resistentes que las bacterias en estado libre o planctónico (Hoiby y col., 2010; Wang y col., 2017; Preda y col., 2019; Azevedo y col., 2020). Tanto las bacterias Gram-positivas, como *S. aureus* y las bacterias Gram-negativas, como *P. aeruginosa* pueden ser muy difíciles de erradicar cuando forman biofilms, y causan severos problemas en pacientes inmunocomprometidos, ocasionando casos de fibrosis quística, infecciones graves en heridas, neumonías, endocarditis, meningitis, sepsis, infecciones que están asociados con una alta tasa de mortalidad (Lee y col., 2017; Vašková y col., 2020).

#### 3.2.1 Cuantificación de la masa de biofilm con la tinción con Cristal Violeta (CV)

Se evaluó la formación de biofilm bacteriano en dos cepas clínicas de *S. aureus* meticilino resistentes (SAMR 771 y SAMR 773) y en dos cepas de *P. aeruginosa* resistentes a antibióticos (PAE 191150 y PAE 189718) mediante la técnica de tinción con cristal violeta (ver páginas 115 a 116, secciones 7.5.1, 7.5.2 y 7.5.3 en Materiales y Métodos). El cristal violeta utilizado para cuantificar la biomasa del biofilm es un colorante básico, que se une a moléculas con carga negativa en su superficie y a los

polisacáridos en la matriz extracelular, por lo tanto, la absorbancia obtenida se estima proporcional a la biomasa del biofilm formado. Esta técnica no permite diferenciar entre células vivas o muertas (Peeters y col., 2018; Stepanović y col., 2007).

Las cuatro cepas estudiadas mostraron ser formadoras de biofilms, siendo las cepas PAE 191150 y PAE 189718 las que presentaron mayor producción de biomasa, con densidades ópticas (DO) de  $4,18 \pm 0,20$  y  $3,18 \pm 0,16$ , respectivamente. La DO obtenida a partir de la biomasa de biofilm de la cepa SAMR 771 fue de  $0,84 \pm 0,09$  y en la cepa de SAMR 773 de  $0,45 \pm 0,08$ , mostrando una moderada formación (Tabla 6).

Los valores de densidad óptica (DO) obtenidos fueron interpretados de acuerdo con la escala establecida por Stepanovic y col. (2000), donde la biomasa total se cuantificó usando la siguiente escala: fuerte producción de biofilm ( $DO > 0,8$ ), moderada formación de biofilm ( $0,4 < DO \leq 0,8$ ), débil formación de biofilm ( $0,2 < DO \leq 0,4$ ) y no producción de biofilm ( $DO \leq 0,2$ ).

**Tabla 6.** Formación de biofilm de cepas clínicas SAMR y PAE resistentes a antibióticos. Cuantificación de la biomasa de biofilm mediante tinción con CV a 595 nm.

Cepas clínicas	DO(595 nm)
PAE 189718	$> 0,8$
PAE 191150	$> 0,8$
MRSA 771	$> 0,4$ y $< 0,8$
MRSA 773	$> 0,4$ y $< 0,8$

La matriz extracelular actúa como agente de recubrimiento, material de adhesión y barrera protectora para las bacterias que conforman el biofilm, la misma está compuesta por exopolisacáridos, ADN extracelular, ARN, proteínas y lípidos. Aproximadamente el 97% del biofilm es agua, que es responsable del flujo de nutrientes necesarios para la supervivencia bacteriana dentro del biofilm (Preda y col., 2019). Los biofilms que contienen mayores cantidades de exopolisacáridos insolubles y ADN extracelular en su matriz muestran una mayor resistencia a los antimicrobianos (Gloag y col., 2018).

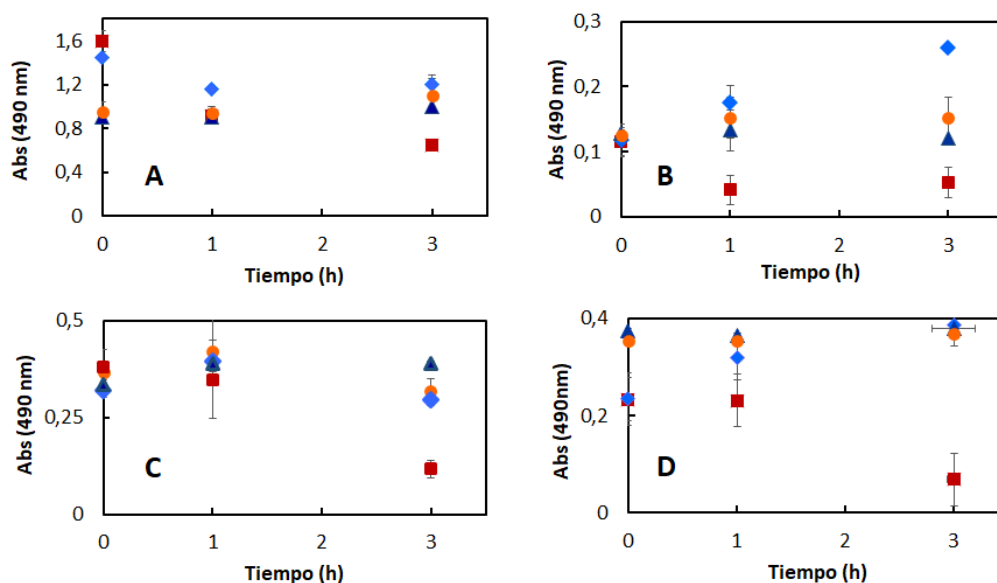
*P. aeruginosa* se caracteriza por la formación de biofilms con gran desarrollo de matriz extracelular, como lo demuestran los resultados obtenidos en la Tabla 2. Su matriz extracelular está compuesta principalmente por polisacáridos, entre ellos alginato, el cual es un polímero cargado negativamente de ácidos gulurónico y manurónico, es uno de los más estudiados ya que cumple una función importante en la retención de agua y nutrientes, como así también en la resistencia a antimicrobianos y en la evasión de la respuesta inmune (Lee y col., 2017).

Los estafilococos producen proteínas extracelulares que facilitan la unión intercelular en la formación del biofilm (Shukla y col., 2017). La matriz extracelular de biofilms de *S. aureus* está compuesta principalmente por proteínas citoplasmáticas y ADN extracelular, (Foulston y col, 2014; Moormeier y col., 2017), que favorecen el desarrollo y la estabilidad del biofilm, contribuyendo con la patogenicidad de *S. aureus*.

### 3.2.2 Eficacia de amoxi@AuNP para la PACT en biofilms maduros.

Mediante el ensayo colorimétrico con XTT (sal de tetrazolio) se evaluó la viabilidad celular en biofilms maduros de 24 h de SAMR 771, SAMR 773, PAE 191150 y PAE 189718 (ver página 116, sección 7.5.4 en Materiales y Métodos). El XTT es reducido por los sistemas de transporte de electrones presentes en las bacterias, originando un producto de color naranja, muy soluble en agua llamado formazán. Dado que este compuesto es producto de la actividad metabólica de las bacterias, la cantidad formada es proporcional al número de bacterias viables (Peeters y col., 2018).

Los biofilms maduros de las 4 cepas clínicas mostraron una reducción en su viabilidad celular luego de ser irradiados con luz LED blanca en presencia de 1,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de amoxi@AuNP (Figura 19). Se observó una disminución de la viabilidad celular respecto del control del 64% en el biofilm de SAMR 773 luego de 1 h de irradiación, y una reducción de la viabilidad celular de 59, 69 y 70% en biofilms de SAMR 771, PAE 191150 y PAE 189718, respectivamente, luego de 3 h de irradiación.



**Figura 19.** Cinética de viabilidad celular en biofilms de SAMR 771 (A), SAMR 773 (B), PAE 191150 (C), PAE 189718 (D). Muestras irradiadas en presencia de 1,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  amoxi@AuNP (cuadrados rojos). Muestras control irradiadas (PBS) (rombos de color azul claro). Muestras tratadas con 1,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de amoxi@AuNP en condiciones de oscuridad (triángulos azules) y muestras control en oscuridad (PBS) (círculos naranjas)

Los resultados obtenidos indican que las cepas clínicas PAE 191150 y PAE 189718 producen una mayor cantidad de biomasa en comparación con las muestras de biofilms

de SAMR, y su actividad metabólica es notablemente reducida después del tratamiento con amoxi@AuNP e irradiación.

Las cepas tratadas con amoxi@AuNP en condiciones de oscuridad no presentaron cambios en la viabilidad, a su vez la luz por sí misma no produjo ningún efecto en la actividad metabólica, como se muestra en la Figura 19. Cabe destacar que no fue necesario aumentar la concentración de amoxi@AuNP para observar una inhibición del metabolismo del biofilm, en comparación con lo reportado para la terapia con antimicrobianos de uso clínico, donde concentraciones de hasta 1000xCIM son necesarias para lograr una reducción en la viabilidad (Ciofu y col., 2017; Hall y col., 2017; Del Pozo y col., 2018).

Además, no se observó una disminución de la viabilidad celular en biofilms de SAMR cuando fueron tratados con trihidrato de amoxicilina a la concentración de 10xCIM (datos no mostrados), lo que demuestra que la actividad antimicrobiana se atribuye a las nanopartículas conjugadas e irradiadas.

Los biofilms bacterianos están asociados con infecciones recurrentes que presentan resistencia a la terapia antibacteriana convencional. El uso de NP metálicas como fotosensibilizadores en la PACT representa un enfoque novedoso para el tratamiento de infecciones asociadas a biofilms (Hu y col., 2017). Las AuNP proporcionan una buena estrategia para tratar biofilms bacterianos, con el potencial de usarlas combinadas o recubiertas con antibióticos, además de presentar la ventaja de ser biocompatibles (Yang y col., 2019).

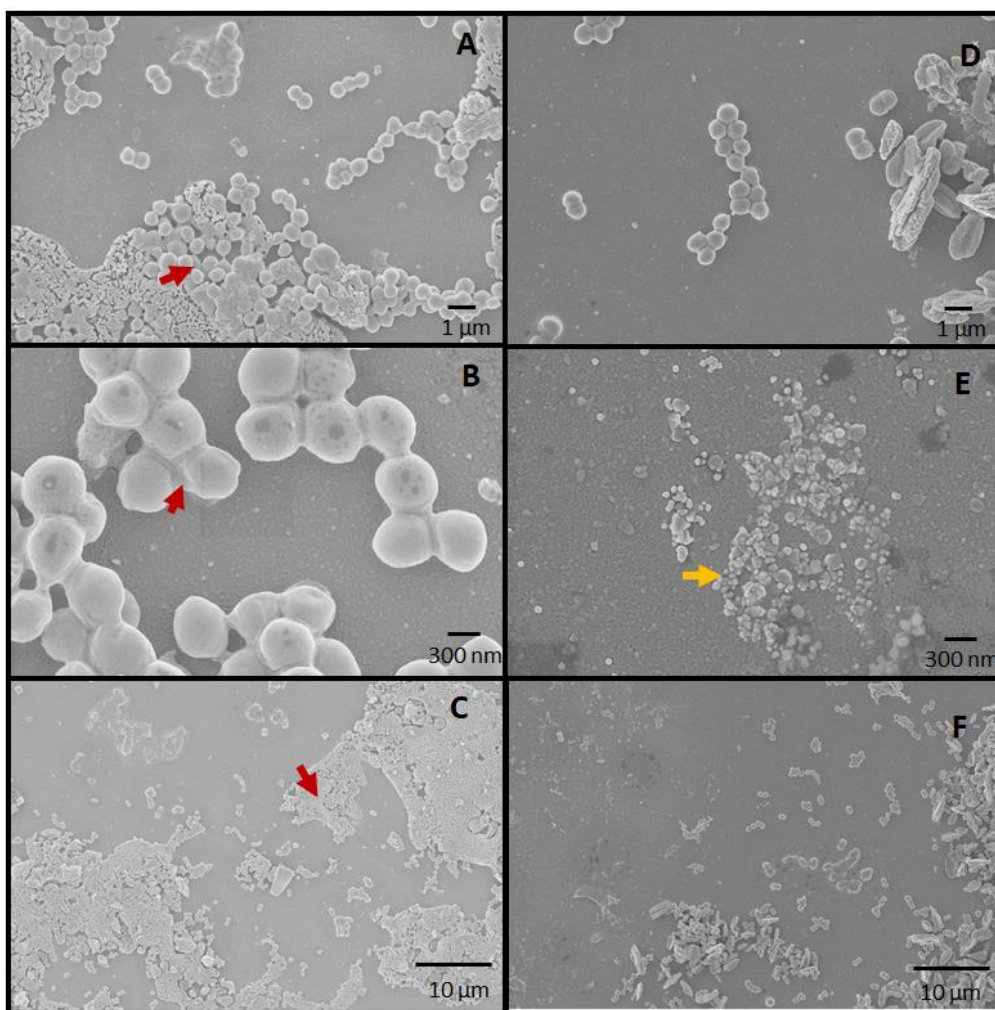
Según lo reportado por Yao y col., (2017) y Kirui y col., (2019), una marcada reducción de la viabilidad celular en biofilms de SAMR y PAE fue obtenida después del tratamiento con terapia láser dirigida a AuNP en combinación con tratamiento de amikacina y gentamicina durante 24 h. En este trabajo, al utilizar por separado la terapia láser con AuNP y el tratamiento antibiótico, la reducción del metabolismo fue menor en comparación con la combinación de ambos tratamientos, demostrando que la terapia láser con AuNP potencia la actividad de los antibióticos, a través de la destrucción fototérmica de la matriz y los componentes celulares del biofilm.

En otro estudio realizado por Meeker y col., (2016), demostraron que después de 24 h de tratamiento con nanoestructuras de oro conjugadas con daptomicina e irradiadas con luz infrarroja, la viabilidad en biofilms de SAMR disminuyó significativamente. En este último estudio, la erradicación de bacterias viables del biofilm se logró en 24 h; mientras que, en las condiciones experimentales presentadas en esta tesis, se obtuvo una disminución de la viabilidad del 60% en la biofilms de SAMR y un 70% en biofilms de PAE después de la exposición a amoxi@AuNP bajo irradiación durante 3 horas. Amoxi@AuNP demostró ser efectivo a concentraciones más bajas que las descritas anteriormente, cuando son irradiadas con luz proveniente del espectro visible.

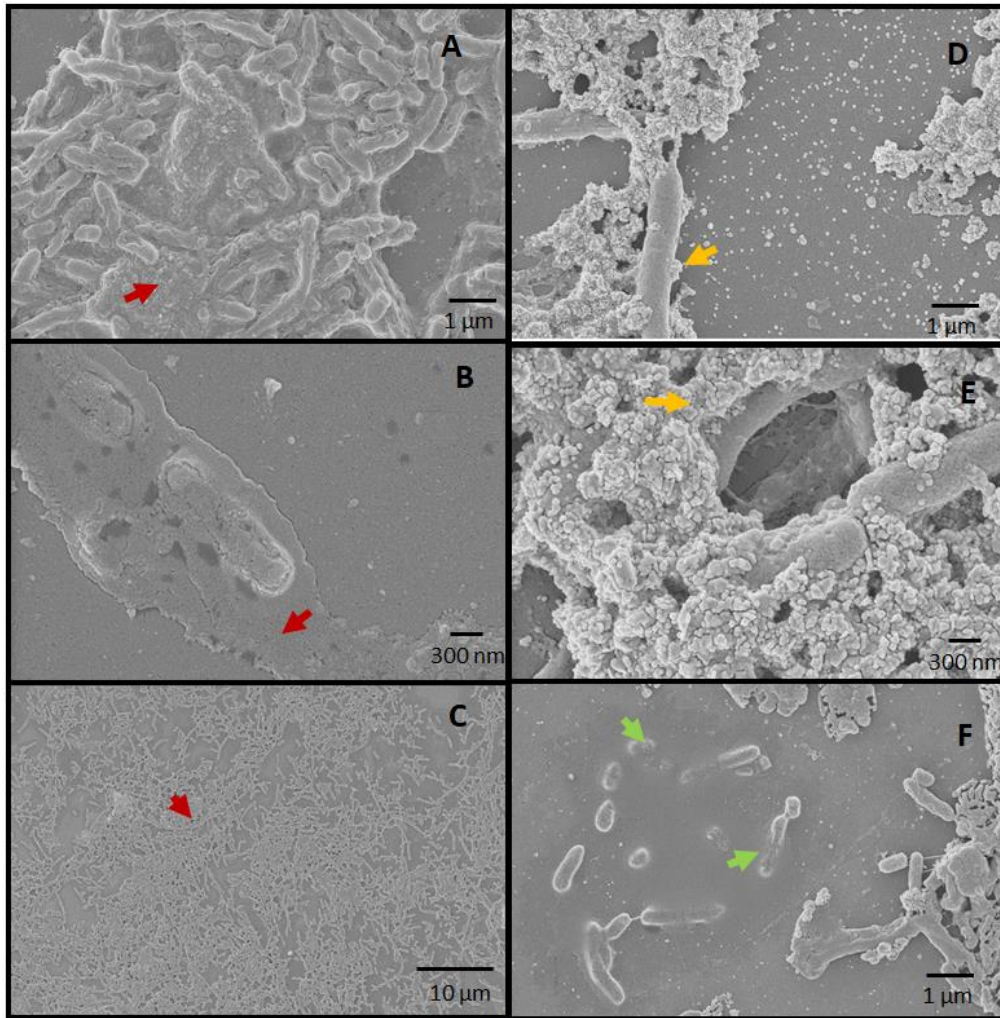
### *3.2.3 Investigación de la eficacia de amoxi@AuNP para la PACT en biofilms maduros mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)*

Para corroborar los resultados obtenidos por métodos colorimétricos, se obtuvieron imágenes SEM de biofilms de las cepas clínicas MRSA 771 y PAE 191150. Los biofilms maduros se expusieron a irradiación con 1,5 µg/mL amoxi@AuNP durante 3 horas (ver página 116, sección 7.5.5 en Materiales y Métodos). Las imágenes revelaron

daños en la integridad de la matriz extracelular del biofilm y una reducción en la densidad de grupos celulares con respecto al control (Figura 20 y 21, D, E, F). Las imágenes también revelaron la interacción de las NP sobre la matriz del biofilm y las células bacterianas (Figura 20 y 21, D). Como control, se tomaron imágenes de biofilms expuestas en las mismas condiciones de irradiación sin NP, donde se pudo observar que las células bacterianas conservaron sus paredes celulares intactas (Figura 20 y 21, A, B, C), lo que sugiere que la luz por sí sola no afecta la integridad y la viabilidad de los biofilms. Por otro lado, en el biofilm de la cepa PAE 191150 tratado con amoxi@AuNP y luz, se pudo apreciar el cambio morfológico de las membranas externas de las bacterias (Figura 21, F). Estas imágenes SEM proporcionaron información útil sobre las alteraciones de la morfología de las células y la densidad de la matriz, que fue notablemente mayor en la cepa clínica de PAE 191150 no tratada (Figura 21).



**Figura 20.** Imágenes SEM de biofilm de SAMR 771. A) B) C): control después de 3 horas de irradiación sin nanopartículas. D) E) F): tratamiento del biofilm después de 3 horas de irradiación con 1,5 µg/mL amoxi@AuNP. Matriz extracelular del biofilm (flechas rojas), amoxi@AuNP unidas al biofilm (flecha amarilla).



**Figura 21.** Imágenes SEM de biofilm de PAE 191150. A) B) C): control después de 3 horas de irradiación sin nanopartículas. D) E) F): tratamiento de biopelícula después de 3 horas de irradiación con amoxi@AuNP 1,5 µg/mL. Matriz extracelular del biofilm (flechas rojas), amoxi@AuNP unidas al biofilm (flechas amarillas), cambios en la morfología bacteriana (flechas verdes).

Mediante el uso del software Fiji-ImageJ® fue posible calcular el área del biofilm maduro formado sobre la superficie del vidrio, y a su vez los porcentajes de reducción del biofilm luego del tratamiento con amoxi@AuNP irradiadas (ver página 118, sección 7.5.6 en Materiales y Métodos). Se observó una reducción del biofilm SAMR 771 del 55% respecto del control, después de la exposición con amoxi@AuNP y luz durante 3 horas. En el caso de la cepa clínica PAE 191150, el porcentaje de reducción del biofilm obtenido fue del 70% (Tabla 7).

**Tabla 7.** Valores calculados por área de recubrimiento mediante el programa Fiji ImageJ®. Muestras irradiadas con luz LED blanca durante 3 h.

CONDICIÓN	AREA $\mu\text{m}^2$		% AREA OCUPADA	
	SAMR	PAE	SAMR	PAE
Control	125243	195751	56	94
Con NP	47515	58379	25	28

Los resultados obtenidos sugieren que las amoxi@AuNP pueden afectar tanto la estructura del biofilm como la adhesión entre las bacterias y la superficie.

Varios estudios han demostrado que la actividad de AuNP en biofilms bacterianos es causada por su interacción electrostática con los biofilms (Khan y col., 2016; de Alteriis y col., 2018; Gloag y col., 2018; Khan y col., 2019). Las amoxi@AuNP presentan carga positiva, lo que favorece la adherencia electrostática entre las NP y las superficies celulares bacterianas cargadas negativamente, dando como resultado una retención de NP en los biofilms de SAMR y PAE.

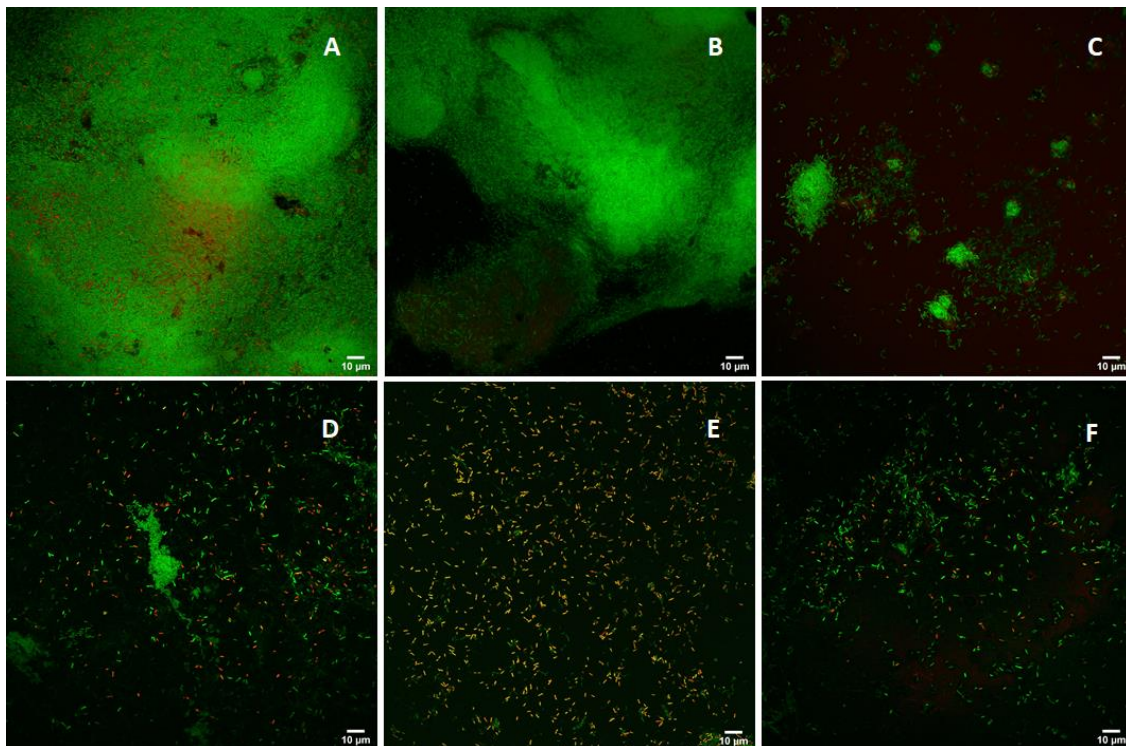
Las formas y tamaños de las NP son otros factores importantes relacionados con la actividad antimicrobiana en los biofilms, es decir, la polidispersidad de las NP puede causar diferentes grados de daño celular bacteriano y un efecto notable en la destrucción de biofilms (Wang y col., 2017; Ribeiro y col., 2018; Benoit y col., 2019). El tamaño de las NP impacta en su difusión a través de la matriz extracelular del biofilm, partículas con diámetros entre 5-500 nm ingresan en el biofilm mediante canales de agua y exopolisacáridos presentes en la matriz. Las amoxi@AuNPs presentaron una gran variedad de formas y tamaños, desde nanoestructuras esféricas de diámetro promedio de  $50 \pm 2$  nm, nanoplacas triangulares de lado promedio de  $100 \pm 13$  nm, hexagonales de lado promedio de  $77 \pm 7$  nm, y algunos nanorods (Figura 5). Esta polidispersidad y la interacción electrostática entre las amoxi@AuNP y el biofilm, podría tener una fuerte influencia en la penetración del biofilm y la adhesión bacteriana (Yang y col., 2016). Además, la excitación del plasmón superficial de AuNP puede inducir un calor localizado en la superficie de la partícula (Pallavicini y col., 2014). Por lo tanto, la alta temperatura local experimentada por las bacterias cercanas a la superficie de la partícula podría causar daño celular mediante desnaturalización de enzimas, proteínas y lípidos, lo que finalmente provocaría la muerte bacteriana (Thorat y col., 2021). Las amoxi@AuNP pueden convertir efectivamente la energía de la luz visible en calor localizado, lo que resulta en la ablación térmica de biofilms de SAMR y PAE.

#### 3.2.4 Viabilidad celular en biofilm maduro determinada por microscopía de escaneo láser confocal (CLSM)

La viabilidad celular en biofilm maduro de la cepa clínica PAE 191150 fue determinada mediante CLSM utilizando naranja de acridina (NA) (ver página 117, sección 7.5.7 en Materiales y Métodos). NA es un colorante de unión a ácidos nucleicos de células, que permite la diferenciación entre ácidos nucleicos bicatenarios y monocatenarios. NA emite fluorescencia roja cuando se une al ADN monocatenario

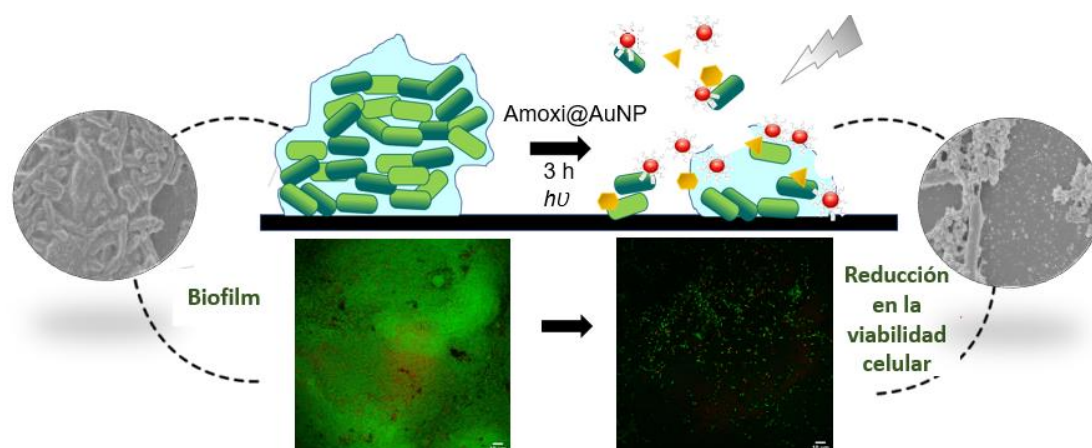


desnaturalizado encontrado en bacterias muertas, y emite fluorescencia verde cuando se une al ADN bicatenario, revelando bacterias vivas (Belbekhouche y col., 2019). La cepa PAE 191150 se seleccionó para realizar el análisis confocal debido a que produce una mayor masa de biofilm en comparación con las otras cepas estudiadas según las imágenes obtenidas en SEM. El biofilm tratado con las NP e irradiado reveló menor intensidad de fluorescencia verde en comparación con el control (Figura 22), además, se observó fluorescencia roja después del tratamiento, lo que se asocia a la pérdida de viabilidad bacteriana. En el control de biofilm sin tratamiento con NP, se observó una marcada fluorescencia verde después de la irradiación, lo que demuestra la presencia de bacterias viables cuando no hay nanopartículas presentes.



**Figura 22.** Imágenes CLSM de biofilm de PAE 191150 después de 3 horas de irradiación. A) B) C): control sin nanopartículas. D) E) F): tratamiento de biofilms con 1,5 µg/mL amoxi@AuNP.

De acuerdo con los resultados presentados, las amoxi@AuNPs sintetizadas en un solo paso podrían ser una posible alternativa terapéutica para PACT contra biofilms de cepas clínicas Gram negativas y Gram positivas resistentes a antibióticos, evitando así los efectos adversos provocados por el uso de altas dosis de antibióticos u otros nanomateriales. También se han acortado los tiempos de irradiación, facilitando la aplicación de la terapia (Figura 23).



**Figura 23.** Ilustración del tratamiento con PACT y amoxi@AuNP para la reducción de la viabilidad celular en biofilms de cepas clínicas resistentes a antibióticos.

### 3.3 Determinación de la actividad antimicrobiana de lignina@AgNP

Para llevar a cabo los experimentos de actividad antibacteriana se utilizó medio LB, en el cual las tres muestras de lignina@AgNP mostraron una mejor estabilidad. Se determinó la CIM de álcali@AgNP, ZHL@AgNP y AL@AgNP mediante método de microdilución en caldo, en cepas de referencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (*S. aureus* ATCC 29253) y *Escherichia coli* CF073 (*E.coli* CF073). Para ello, los inóculos bacterianos de *S.aureus* ATCC 25923 y *E.coli* CF073 ( $10^6$  UFC/mL) se incubaron con diluciones seriadas 1/10 a partir de la solución stock de las muestras de lignina@AgNP en oscuridad. Luego de 24 h, se determinó la CIM como la concentración más baja de NP en la cual la absorbancia a 600 nm fue inferior a 0,03 (Alarcon y col., 2012) (ver página 117, sección 7.6 en Materiales y Métodos).

Las CIM de álcali@AgNP y AL@AgNP obtenidas para ambas cepas bacterianas fueron de 0,03 nM, y 2,9 nM respectivamente. No se observó efecto inhibitorio de las ZHL@AgNP en las dos cepas ensayadas, incluso a la concentración más alta de NP.

#### 3.3.1 Cinética de muerte bacteriana bajo irradiación

Posteriormente, se evaluó el potencial de ZHL@AgNP como fotosensibilizador mediante curva de muerte bacteriana bajo excitación del plasmón, en las cepas de *S. aureus* ATCC 25923 y *E.coli* CF073. En la Tabla 8 se muestran las concentraciones elegidas para ZHL@AgNP, 9,8 nM (concentración A) y 4,9 nM (concentración B). A su vez, el efecto fotosensibilizador de álcali@AgNP a las concentraciones de 0,03 y 0,02 nM, y AL@AgNP a las concentraciones de 2,9 y 1,5 nM fue evaluado, con el fin de obtener la menor concentración de AgNP que produzca muerte bacteriana bajo condiciones de irradiación (ver página 118, sección 7.7 en Materiales y Métodos).

En la Tabla 8, las concentraciones de las NP fueron expresadas en nM, y la cantidad total de Ag presente en esa concentración en  $\mu\text{g/mL}$ . Las muestras fueron irradiadas

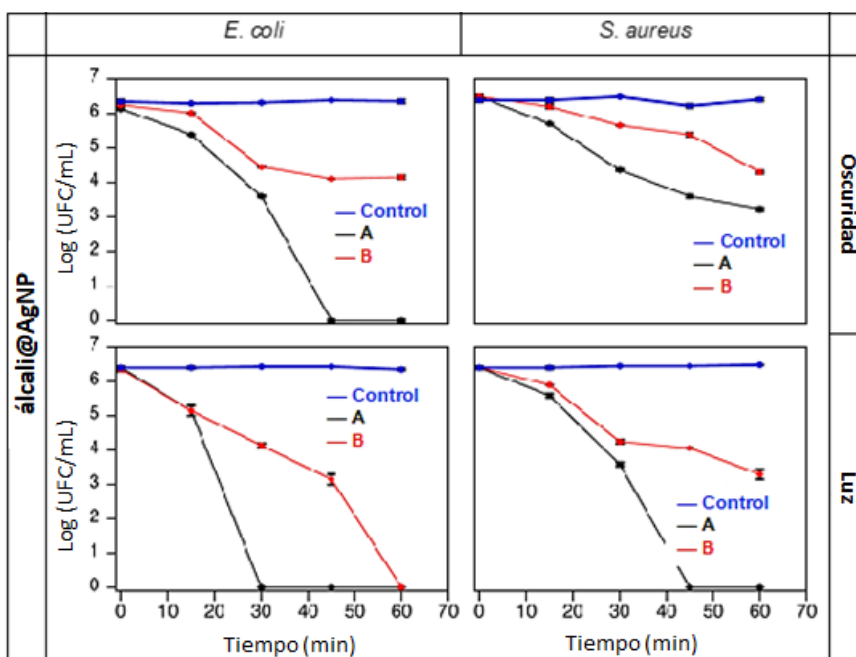
durante 1 h con luz blanca proveniente de un panel LuzChem, de irradiancia total de 78 Wm<sup>-2</sup>.

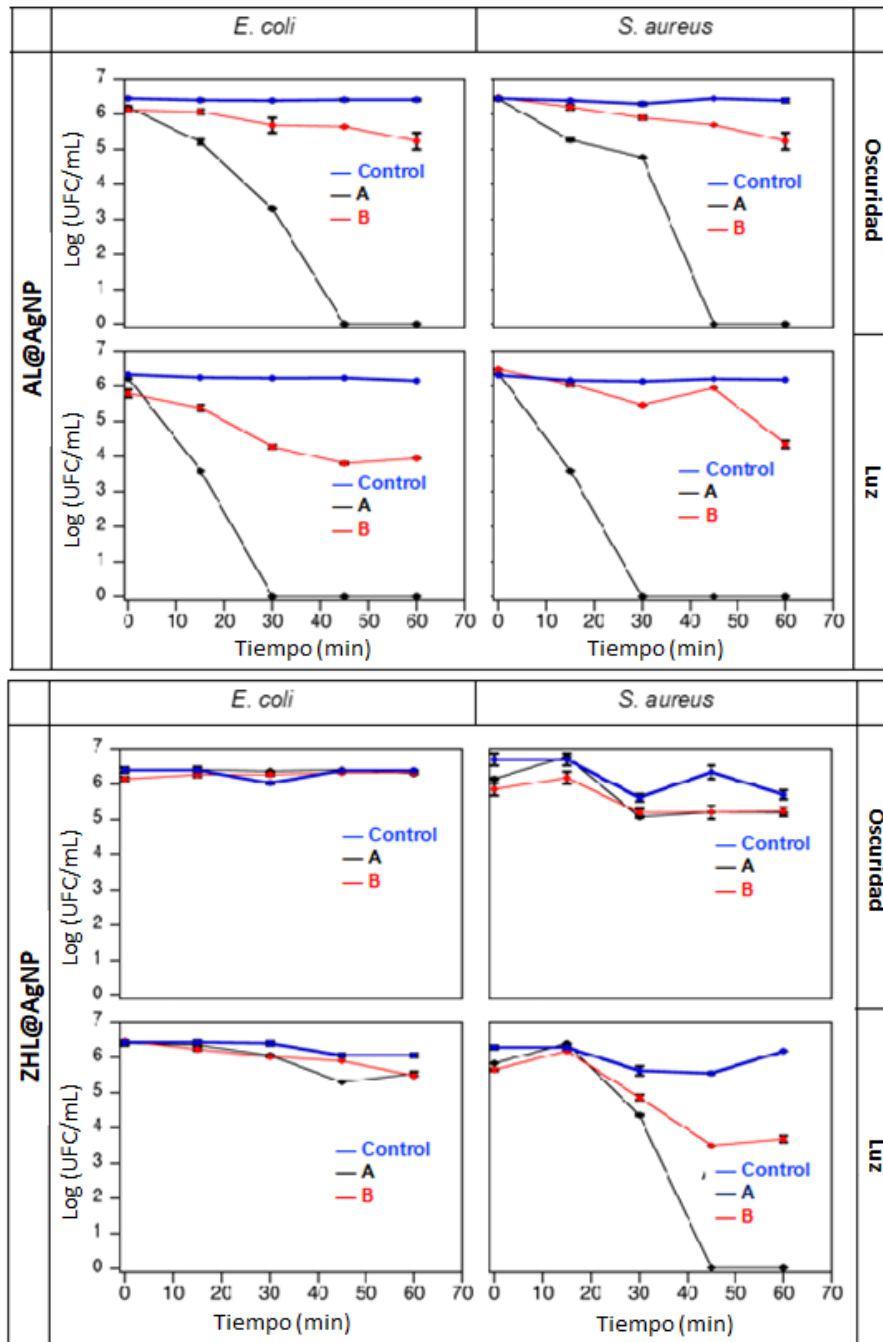
**Tabla 8.** Concentraciones de lignina@AgNP ensayadas en la PACT.

lignina@AgNP	<sup>a</sup> A (nM)	B (nM)	<sup>b</sup> A (μg/mL)	B (μg/mL)
álcali@AgNP	0,03 <sup>c</sup>	0,02 <sup>d</sup>	0,2	0,1
AL@AgNP	2,9 <sup>c</sup>	1,5 <sup>d</sup>	24	12
ZHL@AgNP	9,8	4,9	19	9

<sup>a</sup> Concentraciones de lignina@AgNP calculada a partir de imágenes TEM y ecuación 2 (materiales y métodos). <sup>b</sup> Concentración de Ag presente en la NP, determinado por las mediciones de ICP-OES. <sup>c</sup> Valor correspondiente a CIM. <sup>d</sup> Valor correspondiente a SubCIM.

En la Figura 24 se observan las curvas de muerte bacteriana de *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* CF073 incubadas con álcali@AgNP, ZHL@AgNP y AL@AgNP.





**Figura 24.** Curvas de muerte bacteriana de *E. coli* y *S. aureus* luego de 1 h en oscuridad y bajo irradiación con álcali@AgNP a las concentraciones 0,03 nM (A) y 0,02 nM (B), AL@AgNP a las concentraciones 2,9 nM (A) y 1,5 nM (B), ZHL@AgNP a las concentraciones de 9,8 nM (A) y 4,9 nM (B).

En la curva correspondiente al tratamiento con álcali@AgNP en oscuridad, cuando las bacterias fueron tratadas con una concentración de 0,03 nM, se pudo observar una reducción marcada de UFC, siendo mayor en *E. coli*.

Cuando las cepas fueron irradiadas, la actividad antimicrobiana se obtuvo en menor tiempo de exposición. A su vez, cuando *E. coli* y *S. aureus* ATCC fueron tratadas con la concentración más baja de álcali@AgNP (0,02 nM), luego de los 45 y 60 min de

irradiación, respectivamente, se observó una disminución de UFC de 3 logaritmos, dicho efecto no fue observado en oscuridad.

Con base en esto, cuando las muestras se someten a iluminación con luz blanca, la actividad antibacteriana de álcali@AgNP puede reconocerse ya sea por tiempos de exposición más cortos o por concentraciones de NP más bajas. Un efecto similar fue obtenido para Al@AgNP, pero a diferencia de álcali@AgNP, el mismo efecto antimicrobiano fue observado para ambas cepas.

Las ZHL@AgNP no generaron ningún efecto inhibitorio en oscuridad en ambas concentraciones de NP y cepas ensayadas. Sin embargo, cuando *S. aureus* ATCC fue tratada con ZHL@AgNP e irradiada, una acción bactericida fue producida luego de 45 min de irradiación a la concentración de 9,8 nM. En la cepa *E. coli*, no se observó ninguna actividad antimicrobiana durante todo el período de irradiación a ambas concentraciones de ZHL@AgNP.

En los controles de crecimiento bacteriano, se pudo apreciar que la luz por sí misma no afecta la viabilidad bacteriana. La actividad antimicrobiana de la solución álcali-lignina sola (sin Ag) fue evaluada en ambas bacterias, demostrando que la lignina no tiene efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano. Las ligninas ZHL-lignina y Al-lignina no son dispersables en medios biológicos líquidos, y por tal motivo, los estudios antimicrobianos de estos dos compuestos no fueron realizados.

Estos resultados demuestran el potencial efecto fotosensibilizador que tienen las lignina@AgNP para la PACT en el tratamiento de infecciones bacterianas, tanto para bacterias Gram positivas como Gram negativas, logrando reducir las concentraciones o el tiempo de exposición a AgNP, en comparación con lo reportado acerca de la actividad antimicrobiana de AgNP conjugadas con lignina (Klapiszewski y col., 2015; Marulasiddeshwara y col., 2017; Shankar y col., 2017; Aadil y col., 2018; Li y col., 2019; Zevallos Torres y col., 2020).

Las AgNP han sido ampliamente estudiadas debido a sus propiedades antimicrobianas. Son usadas en sistemas de filtración de agua y aire para eliminar microorganismos y en el área biomédica debido a sus propiedades terapéuticas (Torrás y col., 2020). Las propiedades antimicrobianas de AgNP están relacionadas con el tamaño de la NP, los agentes de recubrimiento, su oxidación en medios acuosos seguida de la liberación de  $Ag^{+1}$  (Quintero-Quiroz y col., 2019). En efecto, las AgNP tienen una mayor actividad antibacteriana que los iones libres de  $Ag^{+1}$ , por lo tanto, las propiedades antibacterianas se pueden atribuir tanto a las propiedades físicas de las NP como a la elución de iones de  $Ag^{+1}$ .

Los AgNP pequeñas y monodispersas tienen una actividad antimicrobiana superior a la de las NP más grandes. Esto se debe a que un área de superficie más amplia entra en contacto con los microorganismos y proporciona un mayor grado de interacción en comparación con las partículas más grandes, facilitando el paso a través de la membrana celular bacteriana (Manosalva y col., 2019; Zevallos Torres y col., 2020). Se cree que la acción antimicrobiana de las AgNP depende del área superficial de las nanopartículas. Esto se debe a la mayor probabilidad de actuar como reservorios para liberar iones  $Ag^{+1}$  que interactúan con las células bacterianas causando la desintegración de la pared celular, lo que conduce a la lisis celular de las especies Gram negativas y Gram positivas (Klapiszewski y col., 2015).

También se ha sugerido que el mecanismo antimicrobiano de las AgNP está relacionado con el daño a la membrana debido a los radicales libres derivados de la

superficie de las NP que causan un aumento significativo en la permeabilidad de la membrana y conducen a la muerte celular (Shankar y col., 2017; Wang y col., 2021).

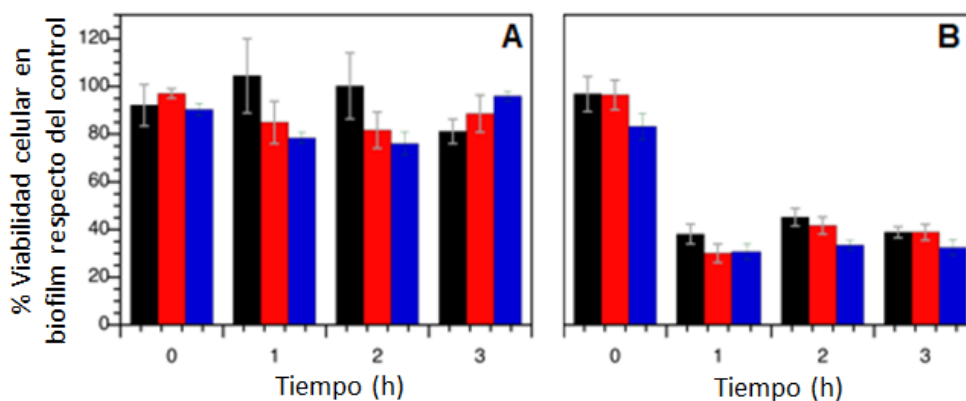
Por otro lado, las NP metálicas, al ser irradiadas con luz a la longitud de onda de absorción del plasmón, genera una oscilación de los electrones libres en la banda de conducción, y en presencia de O<sub>2</sub> se generan EROs, que interaccionan con las estructuras de las células bacterianas, conduciendo a la muerte celular (Jan y col., 2019). También, las NP metálicas al ser irradiadas generan calor sobre su superficie, lo que ocasiona la desnaturalización de componentes celulares en las bacterias unidas a las NP.

Todo lo planteado podrían ser posibles vías de acción antimicrobiana para álcali@AgNP y AL@AgNP. En el caso de ZHL@AgNP, ningún efecto antibacteriano fue observado cuando las cepas de *S. aureus* ATCC y *E. coli* fueron tratadas en oscuridad. Cuando la muestra de *E. coli* fue irradiada en presencia de ZHL@AgNP, tampoco se observó un efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano, mientras que cuando *S. aureus* ATCC fue tratada en las mismas condiciones, se observó una acción bactericida a los minutos de irradiación. Este comportamiento podría dar indicio de que ZHL@AgNP ocasiona muerte bacteriana mediante un efecto fototérmico, y que este efecto, mayor en la cepa *S. aureus* ATCC, podría ser debida a una afinidad de la pared bacteriana por la lignina que recubre las NP, atribuida por la diferencia en composición de la pared celular de Gram positivas y Gram negativas (Marulasiddeshwara y col., 2017). En conclusión, todas las lignina@AgNP mostraron mejor actividad antibacteriana bajo irradiación con luz blanca, convirtiéndolas en buenos fotosensibilizadores para la PACT.

### 3.4 Eficacia de lignina@AgNP para la PACT en biofilm maduro

La eficacia de álcali@AgNP, AL@AgNP y ZHL@AgNP como fotosensibilizadores en la PACT para el tratamiento de infecciones bacterianas ocasionadas por biofilms fue evaluada en este trabajo de tesis.

La actividad de las NP fue evaluada en biofilm maduro de la cepa *S. aureus* ATCC 29253, a las concentraciones que resultaron ser bactericidas en cultivo planctónico luego de la exposición con luz blanca (0,02 nM álcali@AgNP; 2,9 nM AL@AgNP y 9,8 nM ZHL@AgNP). El biofilm maduro de *S. aureus* en contacto con las NP fue irradiado con luz blanca por un total de 3 h. Las mismas condiciones se evaluaron para el control en oscuridad. Luego de los tratamientos, la viabilidad celular en el biofilm fue determinada mediante el ensayo colorimétrico utilizando la sal de tetrazolio MTT. Debido a la actividad de las enzimas respiratorias en las membranas bacterianas se forma un compuesto insoluble de formazán de color lila, producto de la reducción del MTT, por lo tanto la cantidad formada es proporcional al número de bacterias viables (Trafny y col., 2013) (ver página 118, sección 7.8 en Materiales y Métodos). En la Figura 25 se muestran los porcentajes de viabilidad celular en el biofilm de *S. aureus* ATCC 25923 respecto del control sin tratamiento con NP, a los tiempos de 0, 1, 2 y 3 h de irradiación y oscuridad.



**Figura 25.** Porcentajes de viabilidad celular en biofilm de *S. aureus* ATCC 25923 respecto del control, en oscuridad (A) y en condiciones de irradiación (B). Álcali@AgNP 0,02 nM (barras negras), AL@AgNP 2,9 nM (barras rojas), ZHL@AgNP 9,8 nM (barras azules).

Los resultados mostraron una reducción de la viabilidad celular en el biofilm maduro del 60% respecto del control sin NP, luego de la primera h de irradiación, y en contacto con las tres lignina@AgNP. Cuando el biofilm fue tratado en las mismas condiciones pero en oscuridad, no se observó una inhibición en la actividad metabólica durante todo el período ensayado. Estos resultados demuestran la eficacia de las AgNP como fotosensibilizadores para la reducción de la viabilidad celular en biofilms bacterianos, sin la necesidad de aumentar la concentración de NP, comparado con la antibioterapia disponible, donde concentraciones de antibióticos mayores a la CIM (hasta 1000 x CIM) son requeridas para el tratamiento de infecciones asociadas a biofilms.

Otros autores han estudiado la actividad de AgNP conjugadas con ligandos biocompatibles y antibióticos como la rifampicina, mostrando una disminución de la viabilidad de biofilms de *P. aeruginosa* y *S. aureus* en tiempos de contacto más largos y concentraciones más altas de AgNP (Loo y col., 2016; Pansara y col., 2019; Patel y col., 2019; Permana y col., 2021), en comparación con los resultados obtenidos en esta tesis.

La cantidad de infecciones asociadas con bacterias resistentes a los antibióticos está en continuo aumento. Los microorganismos que crecen en biofilms causan muchas de estas infecciones. Las bacterias más comunes que forman biofilms asociados con infecciones humanas son: *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Proteus mirabilis* y *P. aeruginosa*.

Los biofilms bacterianos son particularmente resistentes a tratamientos antibióticos, debido no sólo a un aumento en la transferencia de marcadores de resistencia dentro del biofilm, sino también porque la matriz extracelular dificulta la difusión de antibióticos, disminuyendo su eficacia y debido a que las células persistentes metabólicamente inactivas sobreviven al tratamiento. En conjunto, estas características hacen que los biofilms bacterianos sean hasta 1000 veces más resistentes a antibióticos que las células planctónicas.

Las AgNP como biocidas tienden a apuntar a múltiples sitios de acción tanto en la superficie como en el interior de las células bacterianas y, por lo tanto, tienen actividad de amplio espectro (Franci y col., 2015; Permana y col., 2021).

Estudios demuestran que las AgNP interfieren con la integridad del biofilm al interactuar con la matriz extracelular de exopolisacáridos (EPS), inhibiendo su producción y formación en bacterias Gram negativas y Gram positivas. Las AgNP también pueden actuar sobre los canales iónicos en los biofilms bacterianos, regulando así la actividad metabólica de las bacterias (Wang y col., 2017; Franci y col., 2015).

Las lignina@AgNP sintetizadas en este proyecto de tesis doctoral presentaron actividad antibacteriana en cultivos planctónicos de cepas Gram negativa y Gram positiva, luego de pocos minutos de irradiación. A su vez la viabilidad celular del biofilm maduro de dichas cepas disminuyó significativamente luego de la exposición de las NP irradiadas con luz, demostrando la eficacia de las lignina@AgNP como fotosensibilizadores para el tratamiento de infecciones bacterianas.



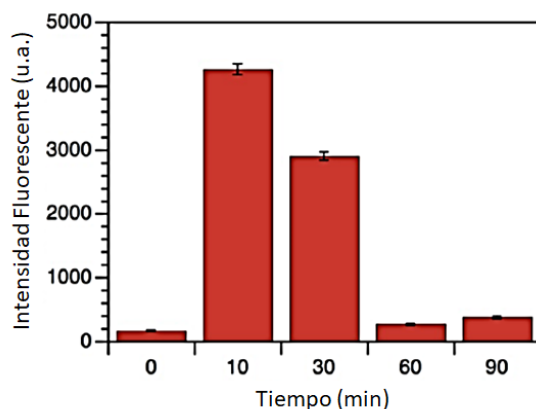
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN: PARTE III.

### MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS UTILIZADAS COMO FOTSENSIBILIZADORES EN LA PACT

#### 4.1 Estudio del mecanismo de acción de amoxi@AuNP

##### 4.1.1 Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y especies reactivas del nitrógeno (ERNs) por espectrofluorometría utilizando la sonda 1,2,3 -Dihidrorodamina (DHR).

Como posible mecanismo de acción de las amoxi@AuNP, se determinó la producción de EROs totales y ERNs en cultivo planctónico de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente 9455 (SAMR 9455) bajo irradiación con amoxi@AuNP 1,5 µg/mL durante 90 min, mediante espectrofluorometría utilizando la sonda 1,2,3-DHR. Esta sonda difunde pasivamente a través de la membrana celular, y allí es oxidada en presencia de especies radicalarias generando el compuesto fluorescente 1,2,3 rodamina (Henderson y col., 1993) (ver página 119, sección 7.9.1 en Materiales y Métodos). La Figura 26 muestra la producción máxima de EROs totales y ERNs (casi 25 veces respecto del control sin NP) cuantificada después de 10 minutos de irradiación con amoxi@AuNP. Este nivel de generación de EROs y ERNs es mayor que el observado para *S. aureus* tratado con AuNP y luz reportado previamente (Silvero y col., 2016).



**Figura 26.** Producción de EROs y ERNs en cepa SAMR 9455 luego de 90 min de irradiación con amoxi@AuNP 1,5 µg/mL.

Se observó un aumento significativo en la formación de EROs y ERNs (casi 17 veces mayor respecto del control sin tratamiento) después de 30 minutos de irradiación. Luego de la irradiación con las NP durante 30 min, no se observó crecimiento bacteriano, como lo demostraron los resultados obtenidos en resultados y discusión Parte II, sección 3.1 Eficacia de amoxi@AuNP como fotosensibilizador para la terapia antimicrobiana (PACT). La generación de especies radicalarias en este tiempo podría deberse a la presencia de algunas organelas y estructuras bacterianas, cuya integridad y funcionalidad global están demasiado dañadas para mantener a las bacterias vivas.

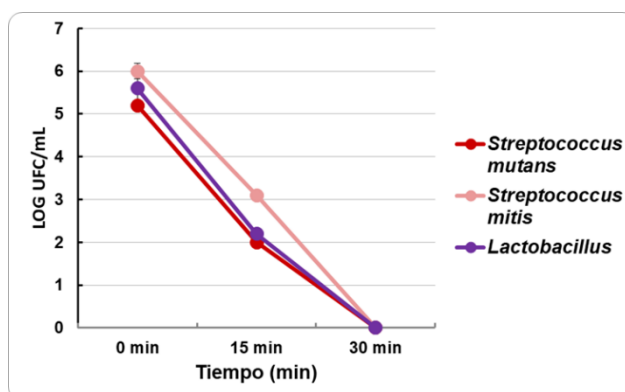
Después de 60 min, la producción de EROs y ERNs es insignificante. No se observó producción de especies radicalarias en condiciones de oscuridad, por lo que no se muestran en el gráfico. La temperatura de todas las muestras (incluidas las irradiadas) se mantuvo a 37°C durante todo el experimento, evitando la influencia del efecto térmico macroscópico. La cantidad significativa de especies radicalarias detectada podría indicar que el efecto bactericida está en relación directa con el estrés oxidativo generado en las bacterias cuando se irradian con amoxi@AuNP.

La terapia fotodinámica antimicrobiana (PACT) ha surgido en los últimos años como una alternativa terapéutica no invasiva para el tratamiento de diversas infecciones por bacterias, hongos y virus. Esta terapia se define como una reacción fotoquímica dependiente del oxígeno, que ocurre tras la activación del fotosensibilizador mediada por la luz, que conduce a la generación de EROs y ERNs, predominantemente oxígeno singlete (Baltazar y col., 2015; Tavares y col., 2017). Dos tipos de mecanismos pueden ocurrir: reacción tipo I y reacción tipo II (Ding y col., 2011). La reacción de tipo I implica reacciones de transferencia de electrones entre el estado excitado del fotosensibilizador y moléculas orgánicas de las células, produciendo radicales libres. Estas especies de radicales libres pueden interactúan tanto con el oxígeno molecular endógeno para producir especies de oxígeno altamente reactivas, como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), óxido nítrico ( $NO^\cdot$ ) y peróxido de nitrito ( $ONOO^\cdot$ ), los cuales son perjudiciales para la integridad de la membrana celular, como también participar en la formación de aductos de tirosina que constituyen uno de los principales daños oxidativos en proteínas (Stacpoole y col., 2019).

En la reacción de tipo II, el fotosensibilizador reacciona con oxígeno para producir un estado de oxígeno excitado electrónica y altamente reactivo, conocido como oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) que puede interactuar con una gran cantidad de sustratos biológicos como proteínas y lípidos, induciendo daño oxidativo en la membrana y pared celular. Los microorganismos que son eliminados por el oxígeno singlete incluyen virus, bacterias y hongos. La reacción de tipo II constituye la vía principal en el daño de las células microbianas mediante PACT (Baltazar y col., 2015). Estas especies radicalarias generadas durante el tratamiento con PACT ocasiona cambios en la permeabilidad de la membrana celular bacteriana, provocando alteraciones mediante la oxidación de lípidos y proteínas (Wang y col., 2017). Resultados obtenidos previamente en el grupo de investigación, demostraron que la muerte bacteriana es el resultado del daño macromolecular ocasionado por grandes cantidades de radicales que se generan después de la excitación del plasmón de superficie de AuNP (Silvero y col., 2016). Estas especies radicalarias afectaron a todas las macromoléculas biológicas (ADN, lípidos y proteínas) en cepas de *S. aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Además, una vez formados los productos lipídicos y proteicos oxidados, pueden causar daño pre-mutagénico en el ADN, con graves consecuencias para las células.

#### 4.1.2 Actividad antimicrobiana de amoxi@AuNP en cultivos planctónicos de cepas anaerobias facultativas.

Para profundizar en el estudio del mecanismo de acción de amoxi@AuNP, la actividad antimicrobiana de las NP fue testada en cultivos planctónicos de cepas anaerobias facultativas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, y *Lactobacillus* spp. Se realizaron curvas de muerte bacteriana en las tres cepas bajo irradiación con luz blanca y amoxi@AuNP a la concentración de 1,5 µg/mL, durante 30 min. El cultivo bacteriano se realizó en jarra de anaerobiosis (ver página 119, sección 7.9.2 en Materiales y Métodos). La Figura 27 muestra las curvas de muerte bacteriana, donde se observó la muerte total de las células bacterianas luego de 30 min de irradiación con las NP.



**Figura 27.** Curvas de muerte bacteriana de *S. mutans*, *S. mitis*, y *Lactobacillus* spp, luego de 30 min de irradiación con luz blanca y amoxi@AuNP 1,5 µg/mL.

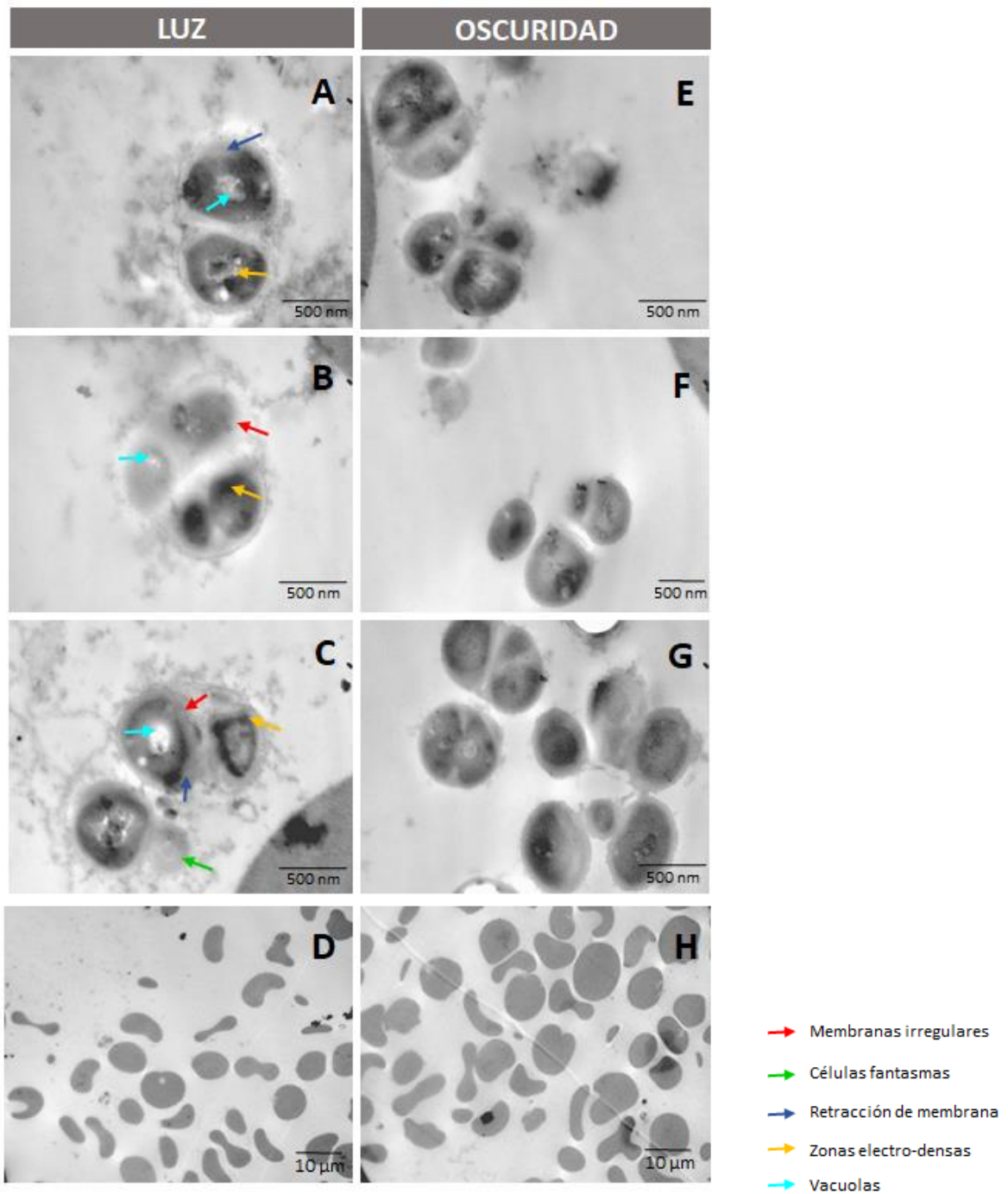
El efecto bactericida observado en las cepas anaerobias facultativas podría ser el resultado tanto de la liberación de calor como del daño oxidativo generado cuando las amoxi@AuNP son irradiadas. Similares resultados fueron reportados por Wang y col. (2018), donde sintetizaron AuNP poligonales conjugadas con el antibiótico vancomicina, las cuales después de irradiación con luz infrarroja durante varios minutos, presentaron una capacidad fototérmica efectiva en *Enterococos* vancomicina resistentes.

En la PACT, la excitación de NP metálicas utilizadas como fotosensibilizadores, con luz de longitud de onda correspondiente a la absorción del plasmón, crea una localización rápida de calentamiento en su superficie debido a la oscilación colectiva de los electrones en la superficie, pudiendo sobrepasar los 300°C. Este aumento de la temperatura local conlleva a la desnaturalización de proteínas y lípidos presentes en la pared bacteriana (Sanchez-Barcelo y col., 2014).

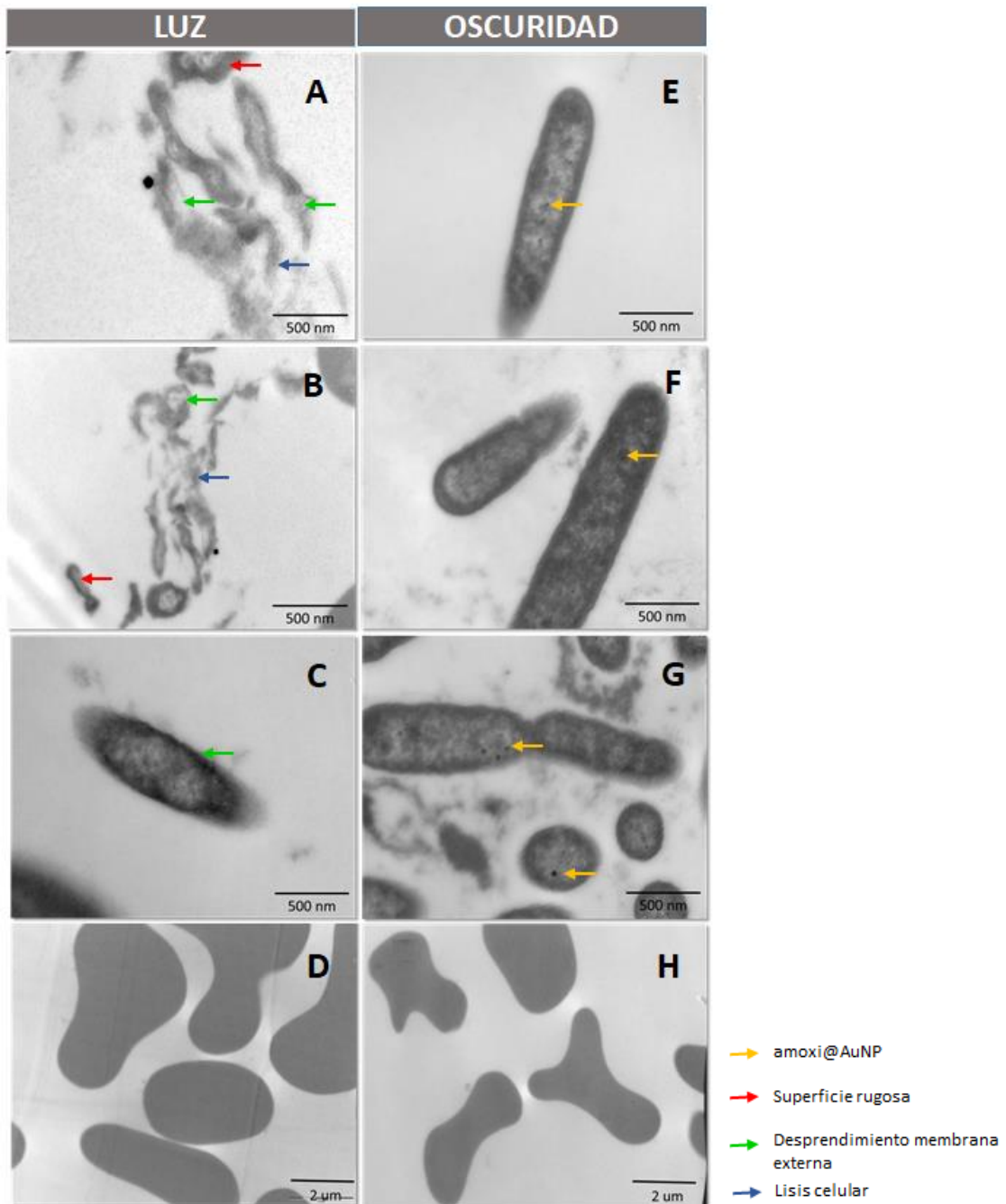
#### 4.1.3 Análisis del daño inducido por amoxi@AuNP en la PACT mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Mediante TEM se evaluó el daño estructural en las células bacterianas ocasionado por amoxi@AuNP en la PACT. El análisis se realizó en co-cultivos de la cepa Gram positiva SAMR 9455 (Figura 28) y de la cepa Gram negativa PAE 191150 (Figura 29) con células sanguíneas, con el fin de evaluar la selectividad de las NP hacia las células bacterianas. Los co-cultivos fueron expuestos durante 10 min a irradiación con luz blanca y amoxi@AuNP 1,5 µg/mL. En paralelo y en condiciones de oscuridad, los co-cultivos

fueron expuestos a las NP como control (ver página 120, sección 7.9.3 en Materiales y Métodos). Las dos cepas bacterianas mostraron integridad en la pared bacteriana en condiciones de oscuridad y en contacto con amoxi@AuNP (Figura 28 E, F y G; Figura 29 E, F y G). En las imágenes de SAMR 9455 tratadas con amoxi@AuNP en oscuridad, se pudo apreciar NP unidas a la pared celular bacteriana, donde las mismas conservaron su forma e integridad (Figura 28 E, F y G). Cuando las muestras fueron expuestas bajo irradiación durante 10 min con amoxi@AuNP se visualizaron cambios a nivel de la membrana e irregularidades en la estructura celular (Figura 28 A, B y C). También se observaron algunas células fantasmas, las cuales presentaron membranas difusas e indistinguibles del resto del contenido celular, además, se observó la formación de retracciones en la membrana plasmática, y la formación de vacuolas como indicador de daño bacteriano ocasionado por la generación de especies radicalarias, como lo previamente informado por Mohamed y col. (2017) y Kakhkashan Perveen y col. (2021). En el citoplasma se pudieron distinguir zonas electrodensas típicas del inicio de la muerte bacteriana por oxidación de componentes proteicos. Los glóbulos rojos mantuvieron su integridad en condiciones de luz y oscuridad, y no se encontraron rodeados por NP, como se observó en las células bacterianas (Figura 28 D y H).



**Figura 28.** Imágenes TEM de co-cultivo de SAMR 9455 y células sanguíneas tratadas con amoxi@AuNP 1,5 µg/mL, bajo irradiación (A, B, C y D), y en condiciones de oscuridad (E, F, G y H).



**Figura 29.** Imágenes TEM de co-cultivo de PAE 191150 y células sanguíneas tratadas con amoxi@AuNP 1,5 µg/mL, bajo irradiación (A, B, C y D), y en condiciones de oscuridad (E, F, G y H).

En el co-cultivo de PAE 191150 y células sanguíneas expuesto a amoxi@AuNP en condiciones de oscuridad, se pudo apreciar que las NP penetran la pared bacteriana e ingresan al citoplasma celular, manteniendo en gran medida la integridad de la estructura bacteriana (Figura 29 E, F y G). Cuando la muestra fue irradiada durante 10 min con amoxi@AuNP, se observaron cambios morfológicos, como superficie rugosa (Figura 29 B y C), no pudiéndose divisar en forma definida los límites de la membrana interna. Otro aspecto importante para destacar es que se apreció lisis celular (Figura 29

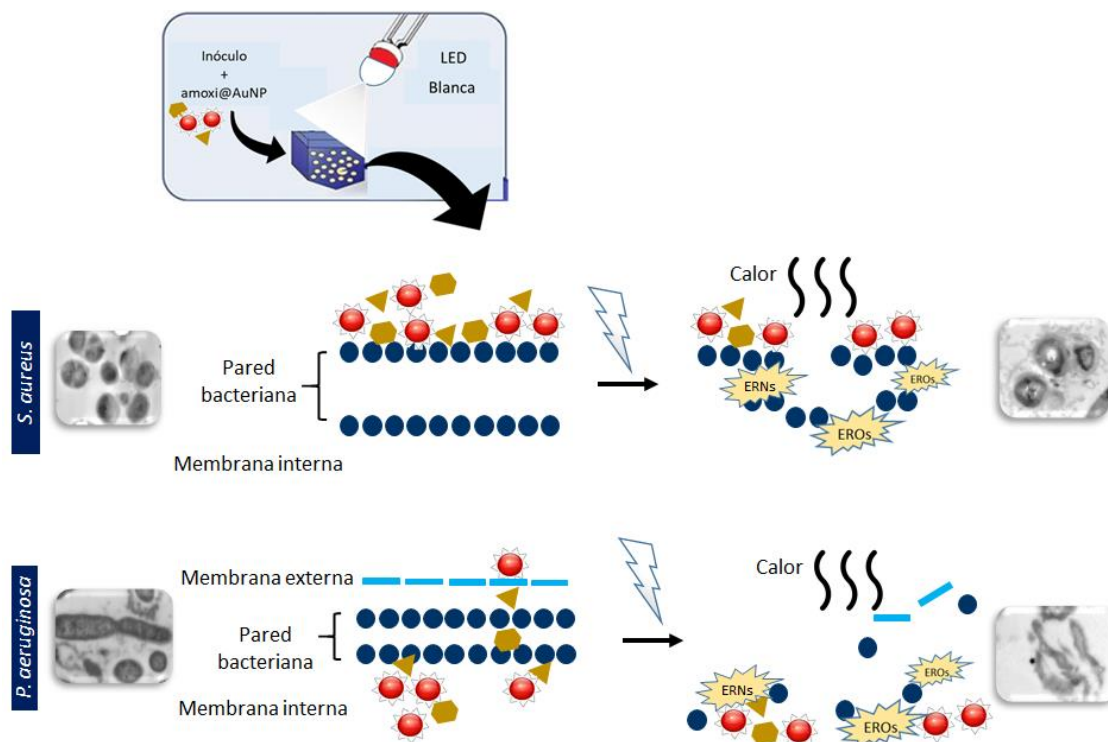
A y B), así como también desprendimiento e interrupción de la membrana externa (Figura 29 A, B y C). Al mismo tiempo, se observó claramente que los glóbulos rojos mantuvieron su integridad tanto en condiciones de luz como de oscuridad (Figura D y H). Resultados similares en cuanto al daño estructural se obtuvieron en otros estudios, donde demostraron que las AuNP en contacto con *S. aureus* redujeron significativamente el número de bacterias viables luego de la irradiación con luz láser (Millenbaugh y col., 2015; Mohamed y col., 2017). Zharov y col. (2006), observaron daño celular en la cepa de *S. aureus* luego de la exposición a la luz y AuNP, ocasionado por un efecto fototérmico acompañado por la formación de burbujas debido al sobrecalentamiento local. Fasciani y col. (2014) y Kumar y col. (2018), observaron que AuNP conjugadas con péptidos ingresaban al interior de bacterias Gram negativas como *E. coli*, resultado que indica que estas NP podrían actuar como sistemas portadores para facilitar la entrada de antimicrobianos a las células bacterianas, o lograr una reducción microbiana mediante terapia fototérmica.

Los estudios de TEM son una herramienta útil para revelar con mayor claridad las alteraciones estructurales inducidas por compuestos con actividad antibacteriana (Otto y col., 2010; Silvero y col., 2014). Los cambios morfológicos de las células bacterianas representan información sobre el modo de acción antibacteriano de las AuNP, ya sean extracelulares o intracelulares. Los resultados obtenidos revelaron una clara desorganización de la pared bacteriana causada por la combinación de amoxi@AuNP 1,5 µg/mL y luz blanca en SAMR 9455 y PAE 191150. El daño a nivel estructural se observó a los 10 min del tratamiento, tiempo en el cual se observó la mayor producción de especies radicalarias. El daño estructural fue más notorio en la cepa Gram negativa. Este efecto es debido a la diferencia que existe en la composición de la pared celular entre bacterias Gram negativas y Gram positivas. En el caso de las bacterias Gram negativas, como *P. aeruginosa*, las células bacterianas están cubiertas por una capa de lipopolisacáridos (1–3 µm de espesor) y peptidoglicano (~ 8 nm de espesor), facilitando la entrada de NP a la célula. Por otro lado, las bacterias Gram positivas como *S. aureus* poseen una capa de peptidoglicano mucho más gruesa que las bacterias Gram negativas, con un espesor de más de 80 nm, conformada por ácidos teicoicos y lipoteicoicos unidos covalentemente. La destrucción de la pared celular producida por la interacción física entre las NP y la pared celular es más perjudicial para las bacterias Gram negativas, ya que carecen de la gruesa capa de peptidoglicano que se encuentra en las bacterias Gram positivas, que posiblemente podrían actuar como una capa protectora (Wang y col., 2017). Tanto las bacterias Gram positivas como las Gram negativas tienen una pared celular cargada negativamente, característica que influye en las interacciones entre las paredes celulares de las bacterias y las NP. La susceptibilidad de bacterias Gram-negativas a las NP se debe a que estas bacterias están recubiertas por una membrana externa que contiene moléculas de lipopolisacáridos, con carga negativa. Estas moléculas cargadas negativamente tienen una mayor afinidad por las NP con carga positiva, como en el caso de amoxi@AuNP, lo que conduce a una acumulación y una mayor absorción de NP, que luego ocasionan daño intracelular. Además, la membrana externa de las bacterias Gram-negativas facilita el transporte no mediado por vesículas, a través de canales como porinas o transportadores especializados. Los canales de porina son los principales canales para el movimiento de moléculas y compuestos dentro y fuera de la estructura celular bacteriana (Wang y col., 2017; Maliszewska y col., 2018). El agente de recubrimiento juega un papel importante en las acciones

bactericidas y en la selectividad de las AuNP por las células microbianas (Pradeepa y col., 2016). Los resultados obtenidos de TEM revelaron que las amoxi@AuNP presentan afinidad por la superficie celular bacteriana y no por las células sanguíneas, como se pudo apreciar en las imágenes TEM de *S. aureus*, y lo que permitió el ingreso de las NP en *P. aeruginosa*. El agente de recubrimiento utilizado para la síntesis de amoxi@AuNP, amoxicilina trihidrato, es un antibiótico  $\beta$ -lactámico que se une e inhibe las enzimas carboxipeptidasa y transpeptidasa que se requieren para la biosíntesis de peptidoglicano, tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas (Hauser 2007). Es por esto por lo que el agente de recubrimiento empleado para la síntesis de amoxi@AuNP, le confiere selectividad a las NP por la pared bacteriana, permitiendo la unión de las NP a la pared celular.

Con base en los resultados obtenidos, el efecto bactericida obtenido mediante amoxi@AuNP para la PACT se debe a la combinación de un efecto fotoquímico mediante la producción de EROs y ERNs y de un efecto fototérmico (Figura 30). Las amoxi@AuNP luego de ser irradiadas generan calor en su superficie, favoreciendo la escisión de las paredes y membranas de las bacterias unidas a las NP, lo que contribuye el ingreso de las EROs y ERNs a las células, generando estrés oxidativo y posterior muerte bacteriana (Mao y col., 2019; Thorat y col., 2021). El daño celular ocasionado por la generación de especies radicalarias y por el efecto fototérmico se observó a partir de los 10 min de irradiación con amoxi@AuNP, y luego de los 30 min de irradiación se logró la muerte total de bacterias resistentes en estado planctónico. La combinación de los efectos fotoquímicos y fototérmicos mejora eficientemente el tiempo y la acción bactericida de amoxi@AuNP para la PACT. Además, esta terapia resulta en una alternativa terapéutica para tratamiento de infecciones ocasionadas por bacterias multirresistentes, ya que presenta un riesgo bajo en el desarrollo de mecanismos de resistencia, en comparación a los tratamientos con antibióticos (Silvero y col., 2016; Karinja y col., 2018). El mecanismo antimicrobiano de los antibióticos suele ser relativamente simple, por lo que en parte ha surgido la resistencia bacteriana. A diferencia de los antibióticos, las NP utilizadas como fotosensibilizadores para la PACT combaten los microorganismos a través de múltiples mecanismos de acción que ocurren simultáneamente, dañando a estructuras como ADN, proteínas y membranas lipídicas. La ventaja de estos mecanismos simultáneos es la baja probabilidad de que un microorganismo tenga múltiples genes mutados, por lo que es mucho más difícil desarrollar resistencia a las NP para la PACT (Wang y col., 2017).



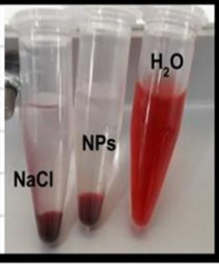


**Figura 30.** Ilustración de los posibles mecanismos de acción de amoxi@AuNP utilizadas en la PACT para el tratamiento de infecciones ocasionadas por bacterias Gram positivas y Gram negativas.

#### 4.2 Investigación de la actividad hemolítica de amoxi@AuNP

La investigación de la biocompatibilidad de amoxi@AuNP en la PACT fue realizada en células sanguíneas, y se evaluó el porcentaje de hemólisis luego de la incubación con NP bajo irradiación con luz blanca y en oscuridad durante 0, 2, 5 y 24 h, a la concentración bactericida de amoxi@AuNP de 1,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La hemólisis total se estableció agregando agua MilliQ a las muestras de glóbulos rojos (ver página 120, sección 7.10 en Materiales y Métodos). En todas las condiciones ensayadas, las amoxi@AuNPs no produjeron ninguna alteración en células sanguíneas, como se muestra en la Tabla 9. Estos resultados concuerdan con lo obtenido a partir de las imágenes TEM de co-cultivos de bacterias y células sanguíneas. En base a este resultado, las amoxi@AuNPs son selectivamente tóxicas para las bacterias y no afectan a los eritrocitos. En estas condiciones de iluminación, el efecto fototérmico es inofensivo para las células eucariotas, posiblemente debido a la falta de interacción entre la membrana de células eucariotas y amoxicilina trihidrato utilizada como agente de recubrimiento para amoxi@AuNP.

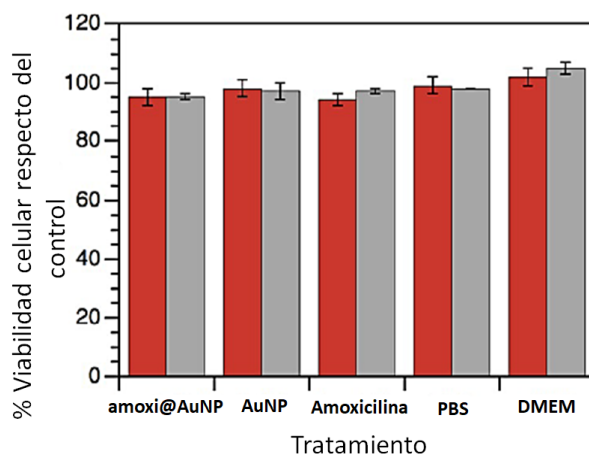
tiempo	control		amoxi@AuNP	
	0 h	1,3	1,2	1,2
2 h	1,3	1,3	1,3	1,4
5 h	1,2	1,2	1,2	1,2
24 h	1,3	1,2	1,2	0,9
LED	OFF	ON	OFF	ON



**Tabla 9.** Porcentaje de hemólisis (%) de muestras de sangre tratadas con Amoxi@AuNP 1,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , NaCl 0,9% como control negativo y H<sub>2</sub>O MilliQ como control positivo de hemólisis.

#### 4.3 Viabilidad celular de amoxi@AuNP en fibroblastos 3T3

La línea celular 3T3 se ha convertido en la línea celular de fibroblastos estándar desde que Todaro y Green originalmente los obtuvieron del tejido embrionario de ratón albino suizo en 1962 (Huang y col., 2010; Leibiger y col., 2013). Esta línea corresponde a células inmortalizadas, y son mucho más sensibles a factores externos que las células HeLa, utilizadas con mayor frecuencia para experimentos *in vitro*. Por esta razón, la actividad de las enzimas mitocondriales de fibroblastos 3T3 fue evaluada mediante el ensayo colorimétrico con 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), luego del tratamiento con amoxi@AuNP 1,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , amoxicilina trihidrato 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , AuNP 0,2 mM, buffer PBS 37,5%, y medio DMEM en condiciones de irradiación con luz LED blanca y en oscuridad durante 24 h. El ensayo con MTT es un parámetro importante para el análisis de los efectos de nuevos fármacos en células eucariotas, ya que brinda información acerca de la toxicidad potencial de fármacos en mamíferos (ver página 121, sección 7.11 en Materiales y Métodos). La Figura 30 muestra el efecto de la amoxicilina libre, AuNP sin recubrir y amoxi@AuNPs en sus concentraciones antibacterianas o foto-antibacterianas.



**Figura 31.** Porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos 3T3 tratados con amoxi@AuNP 1,5  $\mu\text{g/ml}$ , AuNP sin recubrir 0,2 mM, amoxicilina trihidrato 32  $\mu\text{g/ml}$ , buffer PBS 37,5% y DMEM bajo irradiación con luz visible de 24 h (rojo) y en condiciones oscuras (gris) durante 24 h 37 °C, 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% humedad.

Los resultados revelaron que la viabilidad celular de las muestras tratadas con el antibiótico y las NP es similar al control sin tratamiento (PBS 37,5%), y presentaron una reducción mínima en su supervivencia con respecto al control en el medio de cultivo celular DMEM. Según informes previos en literatura, la amoxicilina trihidrato no es tóxica en células de mamíferos (Amoxicillin, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01060>). En la Figura 30 se observó que las amoxi@AuNP no resultaron citotóxicas, incluso bajo las mismas condiciones de irradiación utilizadas para el antibiótico. Resultados similares fueron encontrados en bibliografía para AuNP funcionalizadas con polímeros anfifílicos (Wijesiri y col., 2017). Las AuNP son esencialmente inofensivas para células eucariotas, en comparación con otras NP antimicrobianas, como las nanopartículas de zinc (ZnNP), óxido de zinc (ZnO), óxido de cobre (CuO), dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ), que tienen impacto tóxico en fibroblastos humanos después de varias horas de tratamiento (Dönmez Güngüneş y col., 2017; Horie y col., 2018; Vujovic y col., 2019; Saber y col., 2021). Esto demuestra que el fotosensibilizador sintetizado en este trabajo es selectivamente tóxico para bacterias y no afecta las células eucariotas de manera significativa, debido a la ausencia de cualquier unión a penicilina en la membrana eucariota (Silvero y col., 2018).

#### 4.4 Estudio del mecanismo de acción de lignina@AgNP

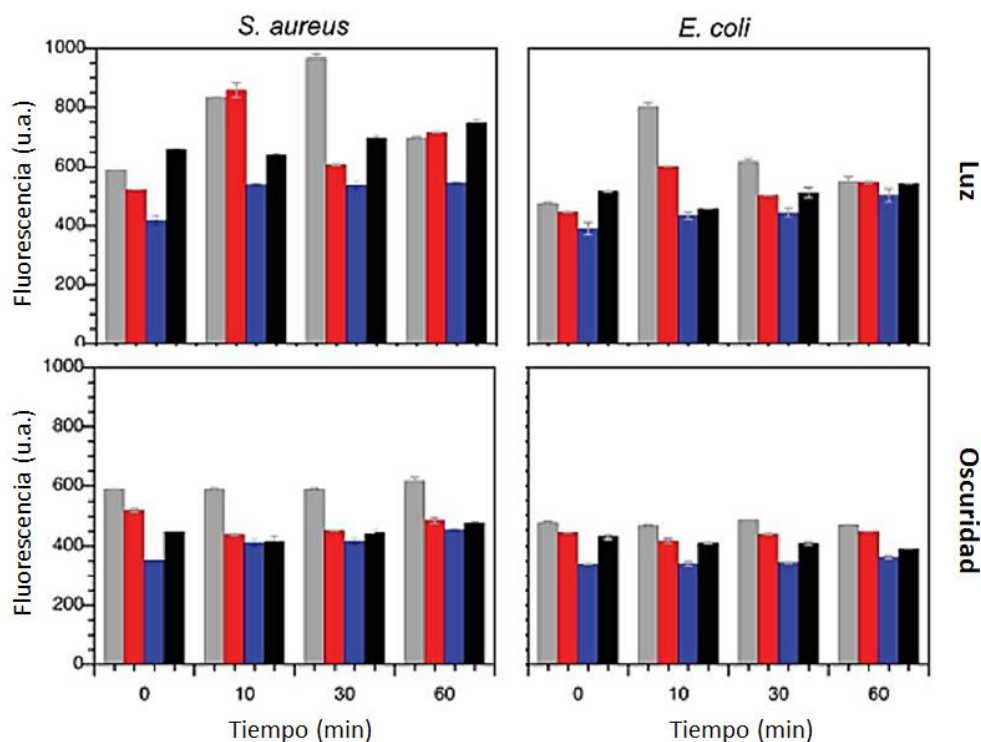
##### 4.4.1 Cuantificación de EROs y ERNs en cultivos planctónicos por espectrofluorimetría utilizando la sonda fluorescente diacetato 2',7'-dicloro-hidrofluoresceína (H2DCFDA)

Uno de los principales mecanismos de acción antibacteriano reportado para las AgNP, es la formación de radicales libres, que inducen daño a la membrana celular (Manosalva y col., 2019; Zhang y col., 2021). La generación de EROs y ERNs inhiben el sistema de defensa antioxidante de las bacterias y causan daño en la membrana celular. Zhang y col., 2013, examinaron el mecanismo de generación de especies radicalarias en AgNP y AuNP en suspensión acuosa bajo irradiación UV (365 nm). El resultado mostró

que las AgNP generaron radicales superóxido e hidroxilo, mientras que las AuNP generaron solo oxígeno singlete, que ingresó en las células para producir un efecto antibacteriano.

La producción de EROs y ERNs fue evaluada mediante espectrofluorimetría en cultivos planctónicos de *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* CF073, durante una hora de irradiación con luz blanca y en contacto con álcali@AgNP, Al@AgNP y ZHL@AgNP a las concentraciones de 0,02 nM, 2,9 nM y 9,8 nM respectivamente, y en ausencia de NP. En paralelo y como control los cultivos bacterianos se sometieron a las mismas concentraciones de las NP en oscuridad. La temperatura de todas las muestras (incluidas las irradiadas) se mantuvo a 37°C durante todo el experimento, evitando la influencia del efecto térmico macroscópico (ver página 122, sección 7.12.1 en Materiales y Métodos). La Figura 31 representa los resultados obtenidos de intensidad de fluorescencia en luz y oscuridad, para cada NP, en ambas cepas bacterianas ensayadas. La producción máxima de EROs y ERNs fue observada en presencia de álcali@AgNP y Al@AgNP luego de los 10 min de irradiación, siendo mayor la producción de especies radicalarias en *S. aureus*. Luego de los 30 min de irradiación con Al@AgNP en *S. aureus*, se observó un incremento en la intensidad fluorescente correspondiente a la generación de EROs y ERNs, si bien durante este tiempo de irradiación se observó muerte bacteriana (resultados y discusión Parte II, sección 3.3.1 Cinética de muerte bacteriana bajo irradiación), la generación de especies radicalarias podría deberse a la presencia de algunas organelas y estructuras de bacterias, cuya integridad se encuentra muy dañada como para mantener las bacterias vivas. En el caso de *E. coli* en contacto con álcali@AgNP y Al@AgNP, y de *S. aureus* en contacto con álcali@AgNP, luego de los 30 min de irradiación, no se observó un aumento significativo en la generación de especies radicalarias, lo que concuerda con los resultados obtenidos de la actividad antimicrobiana de las NP durante ese período de irradiación, en donde se obtuvo una disminución de UFC de 3 logaritmos.

Cuando las cepas *S. aureus* y *E. coli* fueron irradiadas con ZHL@AgNP, no se observó la producción de especies radicalarias respecto del control sin tratar, durante todo el período ensayado. ZHL@AgNP presentó actividad antibacteriana en *S. aureus* luego de los 30 min de irradiación, dando como resultado que su principal mecanismo de acción no implica un efecto fotoquímico, como en el caso de álcali@AgNP y Al@AgNP, sino que podría deberse a un efecto fototérmico. En condiciones de oscuridad, no se observó la formación de radicales libres cuando ambas cepas bacterianas fueron incubadas con las ligninas@AgNP. De acuerdo a los resultados obtenidos en resultados y discusión Parte II, sección 3.3.1, álcali@AgNP y Al@AgNP presentaron actividad antimicrobiana en *S. aureus* y *E. coli* en condiciones de oscuridad, esto puede ser el resultado del tamaño de las AgNP, la polidispersidad, el tipo de agente de recubrimiento, y la liberación de iones  $\text{Ag}^{+1}$  desde las AgNP (D'Agostino y col., 2016).



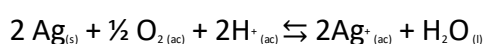
**Figura 32.** Producción de EROs y ERNs en las cepas *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* CF073 luego de 1 h de irradiación y oscuridad con álcali@AgNP 0,02 nM (gris), Al@AgNP 2,9 nM (rojo), ZHL@AgNP 9,8 nM (azul), y en ausencia de NP (negro).

Las ligninas utilizadas en la síntesis de cada NP contienen diferentes concentraciones de azúcares (resultados y discusión Parte I, sección 2.4), siendo ZHL-lignina la que presenta mayor porcentaje, y por ende mejor capacidad antioxidante que álcali-lignina y Al-lignina. Esta podría ser la razón por la cual no se observó la generación de especies radicalarias cuando las cepas bacterianas fueron incubadas bajo irradiación con ZHL@AgNP, inclusive se pudo apreciar menor generación de EROs y ERNs en las cepas tratadas con ZHL@AgNP en oscuridad, en comparación con el control en oscuridad sin NP, donde los radicales formados son producto de la respiración celular (Figura 31).

Diferentes compuestos orgánicos utilizados como agentes de recubrimiento en AgNP, confieren diferencias en la toxicidad en bacterias Gram positivas y Gram negativas (Neal y col., 2008), como el caso de ZHL-lignina utilizada para estabilizar las ZHL@AgNP, que bajo irradiación, mostraron actividad antibacteriana contra *S. aureus*, mientras que en *E. coli* no presentaron ningún efecto inhibitorio. Este resultado sugiere la mayor selectividad de ZHL@AgNP hacia *S. aureus*. Las ZHL@AgNP contienen lignina con mayor contenido de azúcar, lo que podría contribuir a una mejor interacción con la pared celular de *S. aureus* (Le y col., 2014; Weerasekera y col., 2017). Algunos estudios han demostrado que las NP tienen una mayor actividad contra las bacterias Gram positivas que contra las bacterias Gram negativas, porque la pared celular de las bacterias Gram negativas está compuesta por lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas y fosfolípidos (Sarwar y col., 2015; Wang y col., 2017). Los LPS son estructuras únicas de la pared

celular de las bacterias Gram negativas, que proporcionan una región cargada negativamente que atraen y adsorben a las NP. En contraste, el ácido teicoico solo se expresa en la pared celular de las bacterias Gram positivas, por lo que las NP se distribuyen a lo largo de la cadena molecular del fosfato, evitando su agregación (Wang y col., 2017).

Varios autores están de acuerdo en que las NP se adhieren e interactúan con la membrana celular, lo que resulta en una falla metabólica y conduce a la lisis bacteriana (Vanaja y col., 2013; Chamakura y col., 2011; Durán y col., 2016; Manosalva y col., 2019). Del mismo modo, las NP alteran la morfología de la membrana, cambiando su permeabilidad y, por lo tanto, el transporte correcto de sustancias a través de ella, lo que desencadena la lisis bacteriana. Las AgNP también tienen la capacidad de causar deformaciones irregulares en la pared celular (Liu y col., 2006; Pal y col., 2007; Slavin y col., 2017). También se ha reportado que las AgNP pueden penetrar las membranas celulares bacterianas para causar un aumento en la permeabilidad y alteraciones en la respiración, que conducen a la muerte celular (Neal y col., 2008). Los iones  $\text{Ag}^{+1}$  liberados desde las AgNPs pueden interactuar con proteínas y grupos tioles para inactivar enzimas vitales y para afectar la replicación del ADN (Karinja y col., 2018). La liberación de iones  $\text{Ag}^{+1}$  ocurre en presencia de agua debido a la oxidación superficial de los átomos de plata (Neal y col., 2008; Slavin y col., 2017). La disolución de AgNP puede expresarse por la siguiente ecuación (Liu y col., 2010):

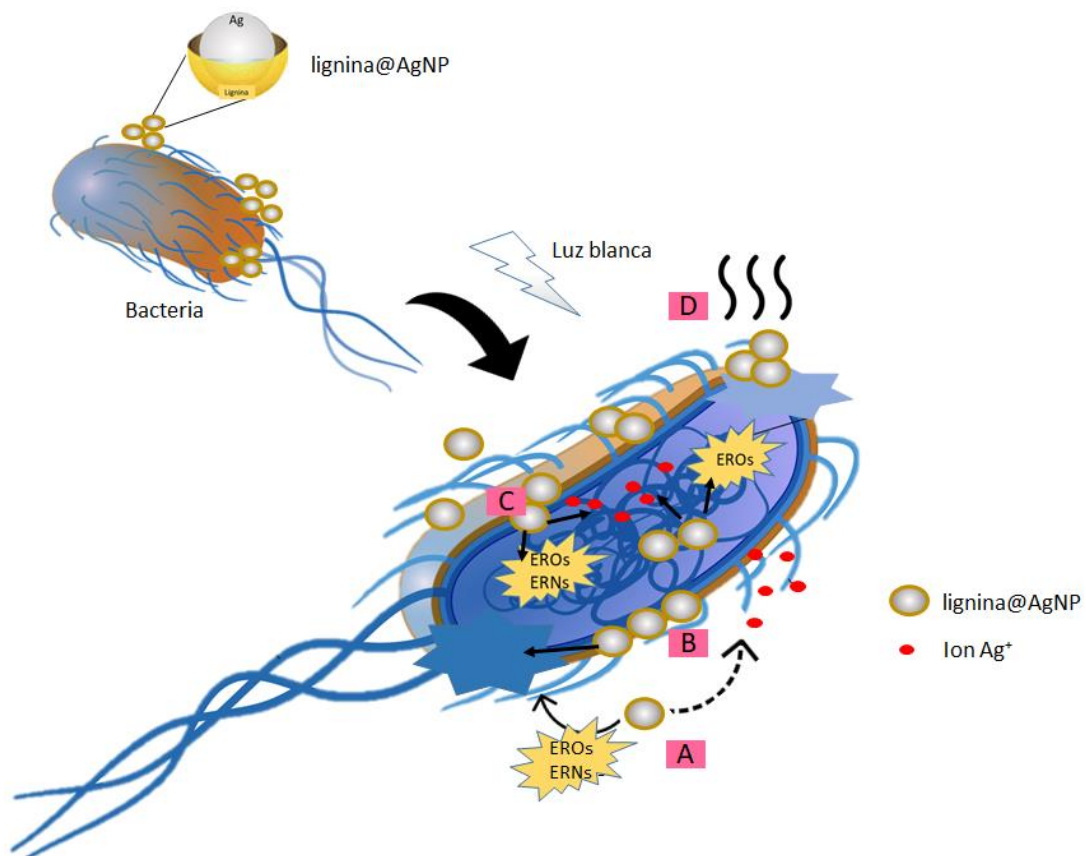


Resultados obtenidos por Jung y col. (2008) demostraron que cuando las cepas bacterianas *E. coli* y *S. aureus* fueron tratadas con  $\text{Ag}^{+1}$  ocurre lisis celular, y mediante TEM observaron que la pared celular se separó físicamente del entorno celular interno. Esto ocurre gracias a la interacción entre  $\text{Ag}^{+1}$  con compuestos cargados negativamente ubicados en la pared celular bacteriana, tales como grupos fosfato, carboxilo y amino (Slavin y col., 2017). La combinación de iones  $\text{Ag}^{+1}$  con la membrana cargada negativamente perfora la membrana, permitiendo así que el contenido citoplasmático fluya fuera de la célula, disipando el gradiente de  $\text{H}^{+}$  a través de la membrana y causando la muerte celular (Knetsch MLW y col., 2011). Si las bacterias aún no se han eliminado, la interacción entre los iones  $\text{Ag}^{+1}$  y la membrana, permite a los iones moverse a través de la pared celular y la membrana plasmática (Lara HH y col., 2010). Además, estudios sugieren que los iones  $\text{Ag}^{+1}$  liberados, interactúan con la cisteína en ciertas regiones de proteínas en las membranas bacterianas, causando la pérdida de  $\text{K}^{+}$  desde el interior y la interrupción de los sistemas de transporte celular, lo que finalmente conduce a la muerte celular bacteriana (Taglietti A y col., 2012; Guo L y col., 2013; Yang K y col., 2018).

Como se mencionó anteriormente en el estudio del mecanismo de acción de amoxi@AuNP, la carga de las NP es un aspecto importante para la actividad antibacteriana y para la interacción de las NP con las células bacterianas. Las AgNP sintetizadas como parte del presente proyecto de tesis presentaron una carga superficial negativa. Un estudio mostró que las NP cargadas negativamente no se adhieren a las bacterias debido a la carga negativa en ambas. Sin embargo, a concentraciones más altas, las NP cargadas negativamente presentan actividad antibacteriana, lo que conduce a interacciones entre las NP y la superficie bacteriana (Arakha y col., 2015; Wang y col., 2017). Las lignina@AgNP sintetizadas mostraron actividad antibacteriana a

los pocos minutos de contacto con cepas Gram-negativa y Gram positiva, por lo que no fue necesario ajustar o cambiar la carga superficial de las NP.

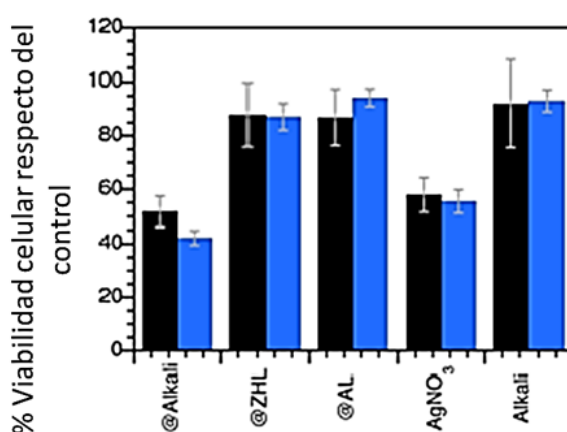
En base a los resultados presentados, cuando las bacterias fueron irradiadas con luz en contacto con las lignina@AgNP, se observó un efecto antibacteriano más eficiente en cuanto al tiempo y concentración de NP, debido a la combinación de diferentes posibles mecanismos de acción (Figura 33): unión de las lignina@AgNP en la pared bacteriana, ingreso dentro de la célula, liberación de iones  $\text{Ag}^{+1}$ , generación de radicales libres y producción de calor sobre la superficie de las NP metálicas que ocasiona la desnaturalización de proteínas y daño en lípidos presentes en la pared de las bacterias próximas a las NP.



**Figura 33.** Ilustración de los mecanismos de acción planteados para lignina@AgNP, cuando bacterias Gram positivas y Gram negativas son irradiadas con luz blanca en contacto con las NP. A) Liberación de iones plata y generación de EROs y ERNs que ocasionan daño a nivel de la pared celular. B) Acumulación de lignina@AgNP en la pared bacteriana afectando la permeabilidad de la misma. C) Penetración de lignina@AgNP dentro de la célula donde pueden generar EROs y ERNs y liberación de iones  $\text{Ag}^{+1}$  que afectan al ADN. D) Generación de calor localizado sobre la superficie de lignina@AgNP unidas a la pared bacteriana, lo que conduce a la desnaturalización de proteínas y daño en los lípidos de la pared.

#### 4.5 Viabilidad celular de lignina@AgNP en fibroblastos 3T3

La biocompatibilidad de las álcali@AgNP, Al@AgNP y ZHL@AgNP fue evaluada en fibroblastos 3T3 a las concentraciones de 0,02 nM, 2,9 nM y 9,8 nM respectivamente, en condiciones de luz y oscuridad durante 1 h, mediante ensayo colorimétrico MTT. Como controles, se realizaron tratamientos sin NP, con álcali-lignina a una concentración de 0,1 mg/mL y tratamiento en presencia de AgNO<sub>3</sub> 0,1 mg/mL como referencia de la posible toxicidad de las lignina@AgNP debida a la liberación de iones Ag<sup>+1</sup>, los cuales son altamente citotóxicos para queratinocitos y fibroblastos (Karinja y col., 2018) (ver página 122, sección 7.13 en Materiales y Métodos). En la Figura 32 se muestran los porcentajes de viabilidad celular respecto del control sin tratamiento con NP, y en base a estos resultados Al@AgNP y ZHL@AgNP no mostraron citotoxicidad en comparación con el control, mientras que las álcali@AgNP mostraron la misma toxicidad que el tratamiento con AgNO<sub>3</sub>, con una disminución de la viabilidad en los fibroblastos cercana al 50%, por lo que la toxicidad de álcali@AgNP estaría relacionada con la liberación de iones Ag<sup>+1</sup>. Cuando los fibroblastos 3T3 fueron tratados con álcali-lignina, no se observó toxicidad tanto en condiciones de luz como de oscuridad.



**Figura 34.** Porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos 3T3 respecto del control sin tratamiento con NP, mediante ensayo colorimétrico MTT después de 1 h de incubación con lignina@AgNP, álcali lignina y AgNO<sub>3</sub>. Las barras negras corresponden a las condiciones de oscuridad, las barras azules bajo irradiación con luz blanca.

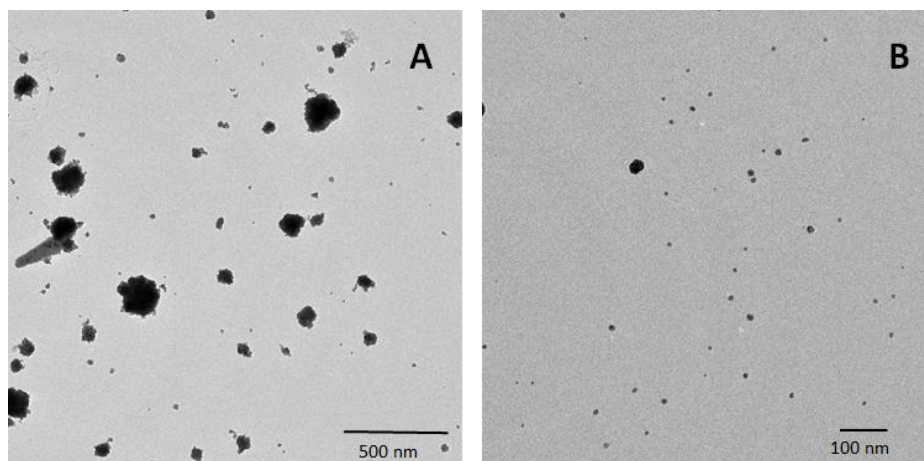
Las AgNP dañan directamente las membranas celulares, interrumpen la producción de ATP y la replicación del ADN, alternan expresiones genéticas, liberan iones Ag<sup>+1</sup> tóxicos, y producen especies reactivas de oxígeno para oxidar los componentes biológicos de la célula. La producción de especies radicalarias debido a AgNP es una de las principales fuentes de daño espontáneo al ADN (Sharma y col., 2013). Debido a esto, requieren especial atención en cuanto a su biocompatibilidad, ya que se utilizan en más de 240 productos comerciales, incluyendo ropa, productos de cuidado personal, alimentos y envases de bebidas, electrodomésticos, productos para bebés e incluso suplementos alimenticios. También se usan para el tratamiento antimicrobiano en instrumentos médicos como catéteres (urinario, drenaje y venoso), escalpelos y vendajes para heridas (Cheng y col., 2011; Sharma y col., 2014). Cuando las AgNP son expuestas a condiciones ambientales diferentes a las del laboratorio de investigación,



factores como la luz, temperatura, salinidad, etc., afectan tanto su estabilidad como su toxicidad (Cheng y col., 2011). Algunos estudios han revelado la biodistribución y la toxicidad de las AgNP *in vivo* en ratas y ratones. Las AgNP administradas por inhalación, ingestión o inyección se detectaron posteriormente en la sangre y causaron toxicidad en varios órganos, incluido el cerebro (Ahamed y col., 2010). Otro informe implicaba que las AgNP a altas dosis podrían tener efectos genotóxicos y citotóxicos en las células humanas (Jena y col., 2012). Sin embargo, otros informes sugieren que la toxicidad de las AgNP para las células de mamíferos es baja. En experimentos donde usaron dosis terapéuticas de AgNP, sólo se detectaron niveles muy bajos (menos de 0,5 mg/g de un órgano) en los órganos de los ratones, lo que sugiere que las AgNP son seguras a bajas concentraciones (Wong y col., 2010).

El recubrimiento de las AgNPs influye en la estabilidad y la toxicidad de las AgNP en soluciones acuosas, en sistemas biológicos y en el medio ambiente (Sharma y col., 2014; Ilić y col., 2021), como, por ejemplo, AgNP recubiertas con polisacáridos, derivados del quitosano, que poseen actividad antimicrobiana, pero no son tóxicas para células eucariotas (Liu y col., 2010). En este trabajo de tesis diferentes ligninas fueron elegidas como agentes de recubrimiento para las AgNP, debido a que su utilización en el área biomédica está creciendo rápidamente (Witzler y col., 2018; Trovagunta y col., 2021; Venkatesan Savunthari y col., 2021) y se ha demostrado su biocompatibilidad en la aplicación de nanomateriales e hidrogeles (Meng y col., 2019; Arruda y col., 2021).

La polidispersidad y el tamaño de las AgNP también son factores importantes que influyen en la toxicidad de las AgNP en células de mamíferos. Se ha demostrado que las AgNP que presentan polidispersidad pueden absorber eficientemente la radiación láser del infrarrojo cercano para disiparla como calor y luego matar las células bacterianas mediante el tratamiento fototérmico, mejorando el efecto antibacteriano debido a la liberación de iones  $\text{Ag}^{+1}$ , y por consiguiente presentar una disminución en la biocompatibilidad (D'Agostino y col., 2016; Fan y col., 2020; Liu y col., 2021). La concentración de iones  $\text{Ag}^{+1}$  en medio acuoso y en las AgNP depende de la superficie de la partícula de plata promedio, y las AgNP más pequeñas son mucho más tóxicas que las grandes (Klapiszewski y col., 2015; Li y col., 2021). Las álcali@AgNP sintetizadas presentaron polidispersidad, con la formación de grandes aglomerados, y AgNP pequeñas de 8 nm de diámetro (Figura 35). Un efecto sinérgico debido tanto a la presencia de los grandes aglomerados como a las pequeñas NP que pueden liberar una gran cantidad de iones  $\text{Ag}^{+1}$ , podrían explicar la toxicidad de este compuesto en luz y en oscuridad, como así también la actividad antimicrobiana a concentraciones más bajas con respecto a Al@AgNP y ZHL@AgNP. Este efecto se atribuye al tipo de lignina utilizada (álcali-lignina), la cual no actuaría como buen estabilizador de AgNP, por tener una unión más débil a la superficie de las NP debido a la menor concentración de azúcares reductores en su estructura en comparación con las otras ligninas, por lo que su eliminación desde las NP sería facilitada (Cheng y col., 2011). Al-lignina y ZHL-lignina resultaron ser buenos agentes de recubrimientos y estabilizadores de las AgNP, como lo demuestran los resultados de biocompatibilidad y de caracterización de las AgNP, donde no se observaron formación de aglomerados en las imágenes TEM.



**Figura 35.** Imágenes TEM de álcali@AgNP. A) Formación de aglomerados. B) álcali@AgNP esféricas de 8 nm de diámetro.

Con base en a los resultados obtenidos, Al-lignina y ZHL-lignina mostraron ser buenos candidatos como agentes reductores y estabilizadores de AgNP, presentando actividad antibacteriana, la cual fue mejorada al irradiar las NP con luz blanca. Al@AgNP y ZHL@AgNP presentaron biocompatibilidad en células de mamíferos, incluso bajo irradiación. Estas nuevas AgNP sintetizadas podrían ser utilizadas como alternativas para tratamientos de infecciones bacterianas, y de gran utilidad en el desarrollo de formulaciones o de dispositivos médicos para prevenir contaminación bacteriana.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN: PARTE IV.

### DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN FARMACÉUTICA DE Amoxi@AuNP PARA APLICACIÓN TÓPICA

#### *5.1 Desarrollo y caracterización de formulaciones de amoxi@AuNP para aplicación tópica*

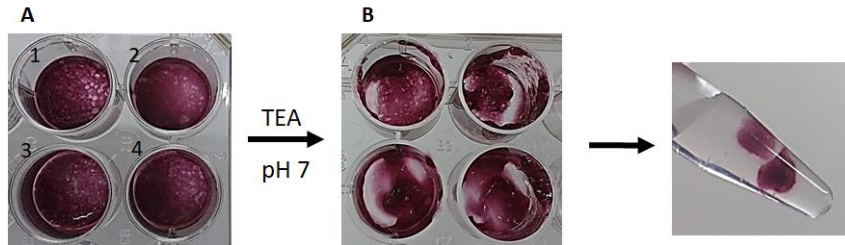
##### *5.1.1 Desarrollo de gel de amoxi@AuNP para aplicación tópica*

Una gran mayoría de los sistemas de aplicación tópica de fármacos, utilizan formulaciones en gel de ácidos poliacrílicos (polímero sintético, comercialmente denominado Carbopol®), que imparten un aspecto estéticamente agradable, claro, brillante y se lavan fácilmente de la piel con agua (Sareen y col., 2011). Los geles se definen comúnmente como redes tridimensionales de polímeros reticulados química o físicamente (a través de reacciones de entrecruzamiento o interacciones electrostáticas) cuya estructura hidrofílica los hace capaces de retener grandes cantidades de agua en sus redes tridimensionales, y se forman debido al cambio de parámetros como temperatura, fuerza iónica, pH, exposición a rayos ultravioleta, conservando su integridad estructural física (Ickenstein y col., 2018; Desfrançois y col., 2018; Yang y col., 2018). Son hidrófilos, biocompatibles y fáciles de procesar por diferentes métodos, y agregan la posibilidad de controlar la liberación del fármaco espacial y temporalmente. Los geles también tienen propiedades físicas y mecánicas ajustables para una amplia gama de aplicaciones en medicina. En este sentido, se han utilizado como sistemas de administración de medicamentos durante varios años, ya que ofrecen una matriz de soporte conveniente para los ingredientes activos (Desfrançois y col., 2018). Otros beneficios de los geles tópicos es que permiten administrar el medicamento directamente al sitio de acción (Devi y col., 2002; Sareen y col., 2011), prolongar el tiempo de residencia de la forma de dosificación debido a la bioadhesión a la piel, y mejorar el cumplimiento por parte del paciente (Gohel y col., 2000; Saleem y col., 2005), debido a la facilidad de aplicación y mejor absorción percutánea en comparación con otras preparaciones semisólidas, como cremas, pastas, ungüentos, etc (Loganathan y col., 2001).

La síntesis de geles de Carbopol® se realiza de una manera simple a través del método de dispersión (Reddy y col., 2006; Sareen y col., 2011), en la cual una cantidad determinada de dispersión del fármaco y Carbopol® se agita para homogeneizar a temperatura ambiente y se ajusta al pH de gelificación del Carbopol® (indicado por el proveedor, generalmente entre 6 y 8), produciendo el compuesto fármaco-gel. La solución acuosa de estos polímeros entra en transición a fase de gel cuando el pKa es superior a 5,5.

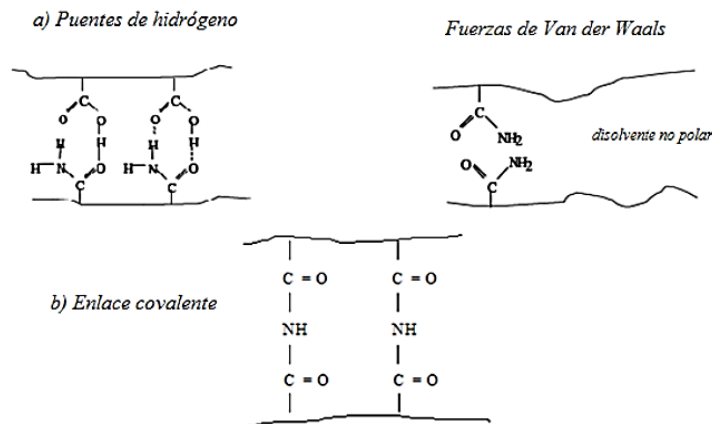
Para la obtención del gel de amoxi@AuNP para aplicación tópica, se utilizaron dos polímeros sintéticos ampliamente usados en la industria farmacéutica, Carbopol® 934 y Carbopol® ultrez 10, en donde concentraciones de 0,5 y 1% p/v de cada polímero fueron dispersadas lentamente sobre una suspensión de amoxi@AuNP de concentración 1,5 ug/mL (concentración bactericida). Luego de 24 h en el caso del Carbopol® 934 y de 30 min para el Carbopol® ultrez 10 a temperatura ambiente, se obtuvieron los geles de

amoxi@AuNP posteriormente al agregado de trietanolamina (TEA, neutralizador no iónico) para ajustar el pH aproximadamente a 7 (ver página 123, sección 7.14.1 en Materiales y Métodos). Todas las formulaciones de gel resultaron ser claras y homogéneas (Figura 36).



**Figura 36.** Formación de gel de amoxi@AuNP. A) Agregado de Carbopol® ultrez 10 al 0,5% p/v (1), 1 % p/v (2) y de Carbopol® 934 al 0,5 % p/v (3), 1% p/v (4), a una suspensión de 1,5 ug/mL amoxi@AuNP. B) Formación del gel luego del agregado de TEA.

El fenómeno de gelificación se explica por el entrecruzamiento físico o químico de las cadenas de polímeros. Los geles físicos presentan una red tridimensional formada por uniones que no son completamente estables a ciertos cambios físicos (pH, temperatura). Las uniones son del tipo Van der Waals y puente de hidrógeno, son uniones mucho más débiles que los enlaces covalentes (Figura 37). Los geles químicos son aquellos en los que la red está formada por enlaces covalentes, este tipo de enlace es muy fuerte y su ruptura conduce a la degradación del gel (Desfrançois y col., 2018):



**Figura 37.** Tipos de enlaces en geles, a) geles físicos, b) geles químicos.

El grado de entrecruzamiento, la concentración y la naturaleza de los polímeros (sintéticos o naturales) son los tres parámetros clave que influyen en la porosidad y el grado de hinchamiento de los geles. Estas dos características (porosidad y grado de hinchamiento) controlan la cinética de difusión pasiva de moléculas activas, biomoléculas o NP cargadas dentro de la matriz (Lin y col., 2006). Debido al gran tamaño

de los poros del gel y su alto contenido de agua, los medicamentos pequeños y solubles en agua se liberan rápidamente de la red.

En los últimos 20 años, los investigadores han usado diferentes tipos de polímeros para formular geles, desde polímeros sintéticos como poliésteres, carbómeros o carbopoles, hasta polisacáridos naturales como alginato, quitosano, almidón, gelatina (Desfrançois y col., 2018). El Carbopol® es un polímero sintético de alto peso molecular y enlaces cruzados de ácido acrílico; contiene entre 56% a 68% de grupos de ácido carboxílico, es un polvo blanco esponjoso con un leve olor característico, higroscópico y ligeramente ácido. Puede soportar valores de pH de 7 en geles y de 5 en líquidos. Las modificaciones hidrofóbicas de este polímero muestran propiedades reológicas excelentes, elevada viscosidad, y elevado hinchamiento. En formulaciones bioadhesivas se usan derivados del ácido acrílico de alto peso molecular (Kadajji y col., 2011). Los grupos carboxilos presentes en su estructura molecular (Tabla 10), se ionizan después de la neutralización con una base, como hidróxido de sodio o aminas orgánicas, como la TEA, formando un gel debido a la repulsión electrostática entre la cadena de polímero cargada negativamente, lo que finalmente aumenta el volumen del gel y las capacidades espesantes (Shin y col., 2000; Sareen y col., 2011). Carbopol® proporciona formulaciones listas para usar, baratas y biológicamente bien toleradas (Bhaskar, K. y col., 2009).

**Tabla 10.** Características de Carbopol®

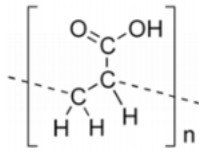
Polímero	Estructura química	Tipo de interacción en cadena	Propiedades
Ácido poliacrílico (Carbopol®)		Entrecruzamiento de cadenas	Fácil utilización debido a sus propiedades reológicas. Biocompatibilidad

Tabla adaptada de Kadajji y col., (2011).

La obtención de hidrogel de Carbopol® es sencilla en comparación con otros polímeros sintéticos utilizados para vehicular fármacos, como los poloxámeros, donde se requieren bajas temperaturas para lograr la gelificación (Desfrançois y col., 2018). Generalmente, se necesita una cantidad igual o menor al 1% p/v de polvo de Carbopol® en solución para obtener una formulación con la viscosidad adecuada para uso tópico.

Carbopol® 934 y Ultrez 10 son polímeros de gran aplicación farmacéutica y cosmética. Demuestran diferentes propiedades reológicas y valores de viscosidad, que se reflejan en el tamaño de partícula del polímero, peso molecular entre enlaces cruzados, asignación de reticulaciones moleculares y la cadena libre en los extremos (Kumara y col., 2015). El Carbopol® 934 es un coloide soluble en agua, mucoadhesivo y biodegradable. Está compuesto por un 62% de grupos carboxílicos formados por repetición de unidades de ácido acrílico. Este polímero posee capacidad bioadhesiva que es atribuible a la formación de puentes de hidrógeno con la mucina presente en la mucosa (Singh y col., 2014). Ofrece excelente estabilidad a alta viscosidad y produce formulaciones espesas para gel opaco (Jadhav y col., 2016). Carbopol® Ultrez 10 fue integrado hace pocos años como un híbrido entre el Carbopol® 940 y 934. Muestra propiedades de dispersión superiores que Carbopol® 934 y una gama de aplicaciones

más amplia. Estas propiedades hacen que el proceso de dispersión coloidal homogénea del Carbopol® Ultrez 10 sea más fácil, corto y económico. Se requiere menos esfuerzo y energía para producir formulaciones a base de este polímero (Welin-Berger y col., 2001; Fresno y col., 2002).

Estudios han demostrado que la vehiculización de NP en hidrogeles de Carbopol® presentaron propiedades reológicas óptimas y estabilidad térmica, comparadas con otros sistemas de vehiculización como microemulsiones (Bhaskar y col., 2009; Song y col., 2014).

Debido a su alto contenido de agua, los geles se consideran plataformas ideales para la entrega de fotosensibilizadores (Zhang y col., 2017). Chang y col. (2010) han informado que una formulación de Carbopol® 971P con ácido aminolevulínico (ALA) presentó un efecto satisfactorio en la terapia fotodinámica para el tratamiento de la queratosis actínica. Liang y col. (2017) y Zheng y col. (2019) demostraron que el Azul de toluidina O (TBO, utilizado como fotosensibilizador en la terapia fotodinámica para el tratamiento del acné) vehiculizado en un gel con Carbopol® 934, obtuvo un mejor efecto terapéutico que la solución de TBO, prolongando el tiempo de retención del fotosensibilizador en el sitio de la lesión. El efecto del hidrogel de TBO en la terapia fotodinámica inhibió tanto las bacterias Gram positivas como las Gram negativas.

Las estructuras de red tridimensionales de los hidrogeles ayudan a incorporar varias NP (metálicas, inorgánicas, bioactivas, etc.) dando lugar a hidrogeles con propiedades mecánicas y propiedades ópticas, eléctricas, magnéticas o biológicas únicas (Raveendran y col., 2017; Mekkawy y col., 2017). Entre las NPs metálicas, las NP de plata (AgNP) han ganado especial interés debido a sus actividades antibacterianas y antifúngicas (Zhao y col., 1998). La actividad antimicrobiana de las AgNP puede deberse a la liberación de iones de plata, que dañan la pared celular bacteriana y las respuestas metabólicas, ocasionando muerte celular (Zohuriaan-Mehr y col. 2009; Qiu y col., 2012). Por tanto, las AgNP vehiculizadas en hidrogeles, son una buena alternativa para la liberación de iones de plata de manera controlada (Das y col., 2015; Pérez-Díaz y col., 2016; Jadhav y col., 2016). Lali Raveendran y col. (2017) formularon un hidrogel de AgNP mediante método por condensación y reducción *in situ*. Para la elaboración del gel utilizaron amilosa extraída del almidón, y fue acoplada junto al polímero natural quitosano, luego fue incorporado AgNO<sub>3</sub> para la obtención de las AgNP mediante reducción *in situ*. Se observó que el gel de AgNP presentó efecto inhibitorio en el crecimiento de hongos. Mekkawy y col. (2017), formularon un gel de AgNP para uso tópico, a partir de una dispersión de AgNP, utilizando diferentes agentes gelificantes, carboximetilcelulosa de sodio, alginato de sodio, hidroxipropilmetilcelulosa, y quitosano. En este estudio demostraron una actividad antibacteriana superior y una capacidad de cicatrización de heridas, con una apariencia normal de la piel y crecimiento del cabello para las formulaciones de hidrogel, en comparación con la crema de sulfadiazina de plata disponible comercialmente (Dermazin®).

Gao y col. (2014) informaron el desarrollo de una formulación de hidrogel que contiene NP de oro (AuNP) estabilizadas con liposomas, para la administración tópica en el tratamiento de infecciones microbianas. El hidrogel fue preparado mezclando AuNP con acrilamida como monómero y polietilenoglicol dimetacrilato como agente reticulante. El proceso de gelificación se inició agregando persulfato de amonio y tetrametiletildiamina. La reacción se llevó a cabo durante 12 h a temperatura ambiente. En otros estudios, las AuNP fueron vehiculizadas mediante hidrogel

formulado a partir del polímero sintético poloxámero 407, también conocido como Pluronic® F-127, por Arafa y col. (2018) y Mahmoud y col. (2019), destinado al tratamiento antibacteriano y cicatrización de heridas. Los hidrogeles fueron formulados implementando el método en frío, a 4°C en constante agitación. La mezcla se almacenó durante la noche a 4 °C hasta la obtención de un gel translúcido. Estos polímeros son usados en ingeniería de tejidos debido a la disponibilidad comercial y a que presentan una transición sol-gel cerca de la temperatura y el pH fisiológicos. Una desventaja es su rápida tasa de degradación *in vivo* (Klouda y Mikos, 2008; Lippens y col., 2013). Para superar este problema, Pluronic® se reticula con frecuencia con otro  $\alpha$ -hidroxi o aminoácido para alterar la estructura química (Lippens y col., 2013).

En el trabajo de tesis propuesto, se llevó a cabo una formulación de amoxi@AuNP utilizando el polímero sintético biocompatible Carbopol® como agente gelificante. Durante el proceso de formulación, no fue necesaria la adición de solventes o demás compuestos gelificantes, obteniéndose un gel de apariencia translúcida en pocos min de reacción con Carbopol® ultrez 10, en comparación con formulaciones en gel de NP metálicas realizadas en investigaciones previas.

### 5.1.2 Estabilidad de geles de amoxi@AuNP para aplicación tópica

Los estudios de estabilidad acelerada son estudios destinados a aumentar la velocidad de degradación química y la modificación física de una sustancia y/o alteraciones de características de la forma farmacéutica, usando condiciones forzadas de almacenamiento con el propósito de monitorear las reacciones de degradación, a prever el plazo de validez en las condiciones normales de almacenamiento (Zheng y col., 2019).

El estudio de estabilidad debe realizarse considerando el mercado para el cual está destinado el producto y las zonas climáticas en que será utilizado. Para fines de estudios mundiales son reconocidas 4 zonas climáticas (Tabla 11):

**Tabla 11.** Zonas climáticas para los estudios de estabilidad.

Zona climática	Definición	Condición de almacenamiento	Condiciones forzadas
I	Templada	21°C - 45%HR	40°C - 75% HR- 3 meses
II	Subtropical con posible Humedad elevada	25°C - 60% HR	40°C - 75% HR- 3 meses
III	Caliente/seca	30°C – 35% HR	40°C - 75% HR- 6 meses o 50°C – 90% HR- 3 meses
IV	Caliente/húmeda	30°C – 70% HR	40°C - 75% HR- 6 meses o 50°C – 90% HR- 3 meses

Tabla adaptada de Disposición de ANMAT N° 3555/2002.

La estabilidad de geles de 1,5 ug/mL amoxi@AuNP formulados con Carbopol® 934 al 0,5% y 1% p/v, y Carbopol® ultrez 10 al 0,5% y 1% p/v, se llevó a cabo mediante estudios de estabilidad acelerada a 40°C y 75% de humedad relativa (HR) en gabinete de estabilidad, durante 3 meses. Durante ese período se inspeccionó visualmente el color, la homogeneidad, consistencia y separación de fases durante el almacenamiento; se evaluó el pH, la estabilidad coloidal de las NP mediante cambios en la absorción del plasmón por espectrofotometría, y las propiedades reológicas de las formulaciones. Como control se realizaron formulaciones de los carbopoles en agua MilliQ (solvente utilizado para la síntesis de amoxi@AuNP), a las mismas concentraciones utilizadas para los geles de amoxi@AuNP (ver página 123, sección 7.14.2 en Materiales y Métodos). Las formulaciones fueron preparadas en viales de vidrio (Figura 38), y cubiertas cuando fueron almacenadas en el gabinete de estabilidad.



**Figura 38.** Formulación de gel de Carbopol® en agua MilliQ (A, control), y gel de amoxi@AuNP (B), en viales de vidrio para estudios de estabilidad acelerada.

Las pruebas de estabilidad de las formulaciones mostraron que la homogeneidad, estabilidad coloidal, pH, propiedades reológicas y viscosidad se mantuvieron estables durante todo el período ensayado para el gel de amoxi@AuNP formulado con Carbopol® ultrez 10 al 1% p/v.

Las mediciones de pH se realizaron por triplicado utilizando un medidor digital de pH precalibrado y se calcularon los valores promedio. En la Tabla 12 se muestran los valores de pH del gel de amoxi@AuNP con Carbopol® ultrez 10 al 1% p/v, y del control sin NP. Este resultado muestra que el pH de las formulaciones se mantuvo constante durante todo el período de permanencia en el gabinete de estabilidad.

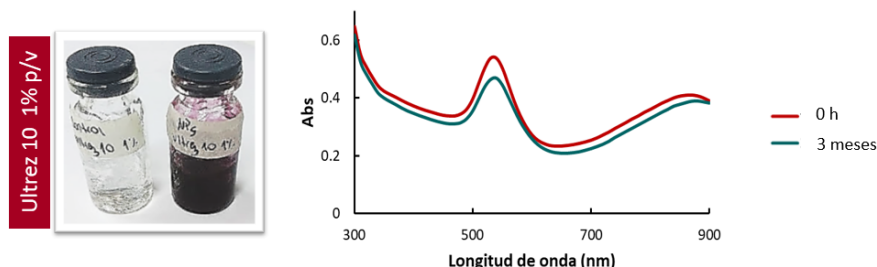
**Tabla 12.** Valores promedio de pH del gel de amoxi@AuNP formulado con Carbopol® ultrez 10 al 1% p/v y el control sin NP, obtenidos a tiempo 0 y 3 meses de permanencia en gabinete de estabilidad.

Formulación	pH (0 h)	pH ( 3 meses)
Amoxi@AuNP + Carbopol® ultrez 10 1% p/v	7,05 ± 0,06	6,99 ± 0,04
Control Carbopol® ultrez 10 1% p/v	7,03 ± 0,05	6,88 ± 0,05

Para evaluar la estabilidad coloidal de amoxi@AuNP en las formulaciones, la absorción del plasmón de superficie de las NP fue medida mediante espectrofotometría. La estabilidad se determinó como el tiempo en el que se obtiene una disminución del



20% en la absorción del plasmón a la longitud de onda de la absorbancia máxima inicial (Weerasekera y col., 2017). En el gel de amoxi@AuNP formulado con Carbopol® ultrez 10 al 1% p/v, no se detectaron cambios en el máximo de absorción del plasmón, luego de los 3 meses de almacenamiento en el gabinete de estabilidad (Figura 39).



**Figura 39.** Gráfico de absorción del plasmón del gel de amoxi@AuNP formulado con Carbopol® ultrez 10 al 1% p/v, a tiempo 0 y a 3 meses de almacenamiento en gabinete de estabilidad.

La caracterización reológica es importante en la formulación, procesamiento, transporte y almacenamiento de formulaciones farmacéuticas, además es una herramienta útil en el diseño y predicción de la estabilidad de muestras almacenadas y proporciona información sobre los mecanismos de gelificación.

Los estudios reológicos nos permiten determinar y cuantificar las propiedades mecánicas de los geles cuando éstos sufren una deformación. La resistencia mecánica representa la capacidad de un material para soportar la acción de una fuerza sin romperse y generalmente se caracteriza por el esfuerzo que induce dicha rotura. La respuesta de un material a la acción de una fuerza puede tener dos comportamientos extremos:

- Viscoso: todo tipo de fuerza aplicada deforma el material, y al dejar de actuar, permanece la deformación.
- Elástico: una vez cesa la fuerza aplicada, desaparece la deformación volviendo al estado inicial.

Entre estos dos comportamientos, encontramos el comportamiento viscoelástico definiéndose como la combinación de ambos. Los materiales poliméricos poseen la capacidad de sufrir deformaciones temporales cuando se les aplica un esfuerzo externo de intensidad limitada. Esta deformación, desaparece cuando cesa la fuerza aplicada. Cuando el material se encuentra entrecruzado, como se da en los geles, formando una red tridimensional, éste puede soportar esfuerzos mayores sin perder su forma, ya que los enlaces intermoleculares evitan el desplazamiento de unas cadenas con respecto a otras (Ickenstein y col., 2018).

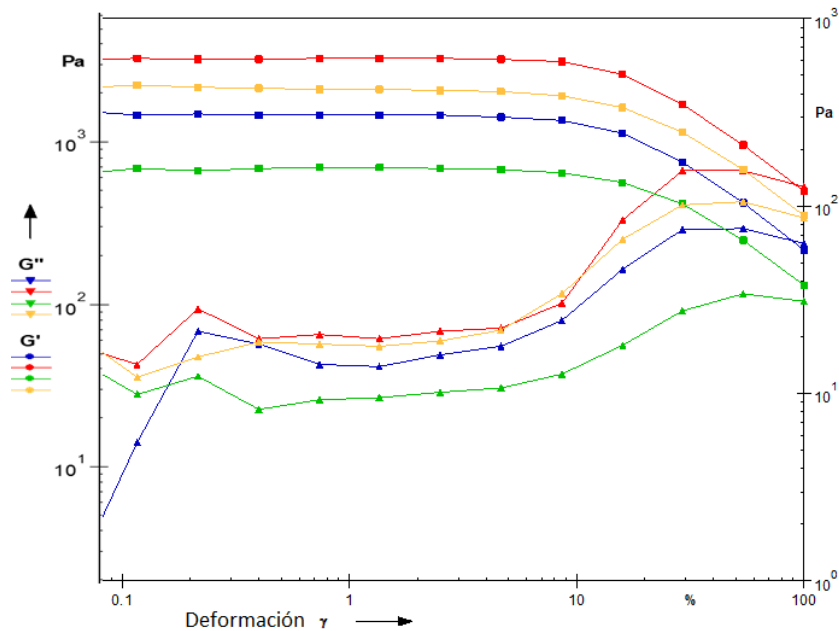
Se realizó una medición oscilatoria que indica cómo se encuentra el sistema en estado de equilibrio, de los geles de amoxi@AuNP y geles sin NP como control. A partir de esta medición se realizó un barrido de deformación de la muestra, donde se obtienen dos módulos o curvas, el módulo  $G'$  que representa la parte elástica del sistema y módulo  $G''$  que representa la parte viscosa de la formulación. A partir del barrido de deformación del sistema se pudo determinar el rango de viscoelasticidad lineal del sistema amoxi@AuNP: Carbopol®, este rango se define como el rango en el que el gel cumple la ley de elasticidad de Hooke:

$$\sigma = G \cdot \gamma$$

Siendo  $\sigma$  el esfuerzo aplicado,  $G$  el módulo de relajación y  $\gamma$  la deformación que sufre el material,  $\gamma$  es el rango en el que el sistema presenta un comportamiento viscoelástico (Tuncay Tannirverdi y col., 2018).

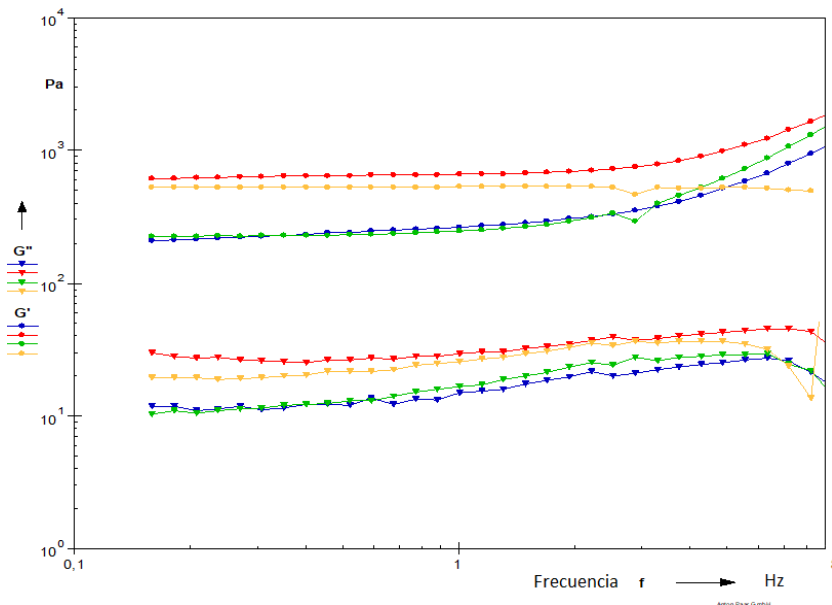
El barrido de deformación se realizó entre  $1 \times 10^{-3}$  y 1000 % de deformación, fijando la frecuencia y la temperatura a 1 Hz y 20 °C respectivamente, a tiempo 0 y luego de 3 meses de almacenamiento de los geles en el gabinete de estabilidad.

Los resultados obtenidos a partir del barrido de deformación a tiempo 0 h, demostraron que el rango de viscoelasticidad lineal, donde los módulos  $G'$  y  $G''$  se mantienen paralelos entre sí, osciló entre 1 y 8 % de deformación en todas las formulaciones. Luego del período de almacenamiento de los geles en el gabinete de estabilidad, el gel de amoxi@AuNP formulado con Carbopol® ultrez 10 al 1% p/v conservó este comportamiento, al igual que el control sin NP (Figura 40).



**Figura 40.** Barrido de deformación del gel de amoxi@AuNP formulado con Carbopol® ultrez 10 al 1% p/v a tiempo 0 h (línea azul) y a los 3 meses de almacenamiento en gabinete línea verde). Control del gel de Carbopol® ultrez 10 al 1% p/v sin NP a las 0 h (línea roja) y a los 3 meses de almacenamiento en gabinete (línea amarilla). Frecuencia constante de 1 Hz a 20°C.

A partir de este gráfico se selecciona el % de deformación donde ambas curvas permanecen paralelas, en este caso se eligió un porcentaje de deformación del 2 %, a partir del cual se realizó un barrido de frecuencia entre 0.01 y 100 Hz a 20°C, analizando las curvas de los módulos  $G'$  y  $G''$  del gel de amoxi@AuNP formulado con Carbopol® ultrez 10 al 1% p/v (Figura 41).



**Figura 41.** Barrido de frecuencia del gel de amoxi@AuNP formulado con Carbopol® ultrez 10 al 1% p/v a tiempo 0 h (línea azul) y a los 3 meses de almacenamiento en gabinete (línea verde). Control del gel de Carbopol® ultrez 10 al 1% p/v sin NP a las 0 h (línea roja) y a los 3 meses de almacenamiento en gabinete (línea amarilla). Deformación constante del 2% a 20°C.

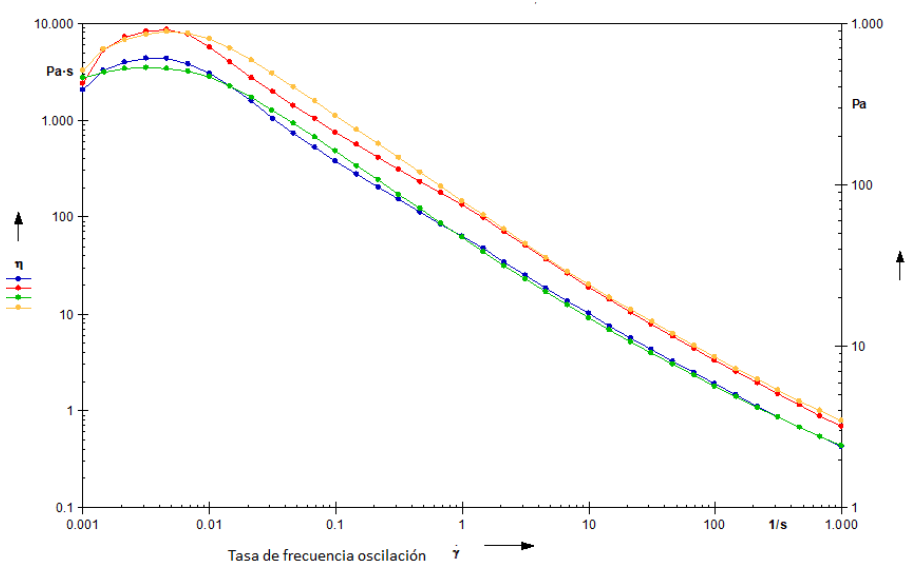
Los resultados demostraron que gel de amoxi@AuNP formulado con Carbopol® ultrez 10 al 1% p/v y el control sin NP se comportan como sólidos viscoelásticos, en donde el componente elástico fue mayor que el componente viscoso ( $G' > G''$ ) y ambos módulos permanecen paralelos entre sí, lo que indica que es un sistema con características predominantemente elásticas, esto quiere decir que la deformación conseguida es directamente proporcional al esfuerzo aplicado. De esta forma, si se aplica un esfuerzo sobre un sólido viscoelástico éste se deforma hasta que la fuerza cesa y la deformación vuelve a su valor inicial (Pierre y col., 2015; Tuncay Tanrıverdi y col., 2018).

Este comportamiento de sólido viscoelástico del gel de amoxi@AuNP formulado con Carbopol® ultrez 10 al 1% p/v, se mantuvo luego de los 3 meses de la preparación del gel y de su almacenamiento en el gabinete para estudios de estabilidad acelerada.

Por último, se realizó una medición rotacional, que brinda información acerca del historial de la desestructuración del sistema. Esta medición brinda información acerca de la viscosidad ( $\eta$ ) de la formulación (gráfico de viscosidad vs tasa de frecuencia de oscilación). La viscosidad es una propiedad que describe la resistencia del líquido al flujo y está relacionada con la fricción interna del líquido. El tipo más común de comportamiento de flujo es el flujo de cizallamiento (deformación lateral que se produce por una fuerza externa) en el que las capas de líquido se mueven cada una en relación con la otra, en respuesta a una fuerza de cizallamiento. Muchos líquidos simples se clasifican como newtonianos, lo que significa que su viscosidad es independiente de la cantidad de cizallamiento aplicado, como por ejemplo el agua y los hidrocarburos simples. Conforme la complejidad del líquido aumenta, por ejemplo, mediante la incorporación de polímeros, los líquidos pueden asumir un comportamiento más complejo y mostrar una respuesta no newtoniana, en la que la viscosidad depende de

la cantidad de cizallamiento aplicado, este comportamiento es común a muchos productos industriales, comerciales, y farmacéuticos, donde la viscosidad disminuye con el aumento de la tasa de cizallamiento. En los productos farmacéuticos para aplicación tópica, se exige que la viscosidad sea alta en tasas de cizallamiento bajas para prevenir la sedimentación o el colapso, pero que disminuya a tasas de cizallamiento más altas para facilitar la aplicación o el procesamiento (Tuncay Tanrıverdi y col., 2018).

El gel de amoxi@AuNP formulado con Carbopol® ultrez 10 al 1% p/v fue sometido a una medición rotacional a 20 °C, a tiempo 0 y a los 3 meses de almacenamiento en gabinete, mostrando como resultado una alta viscosidad a menor tasa de frecuencia de oscilación y disminución de la viscosidad a mayor tasa de frecuencia de oscilación, comportamiento que se conservó luego de su almacenamiento en gabinete (Figura 42). Con base en el resultado obtenido acerca de la viscosidad de la formulación, el gel presenta propiedades óptimas para su almacenamiento y para la aplicación tópica.



**Figura 42.** Medición rotacional del gel de amoxi@AuNP formulado con Carbopol® ultrez 10 al 1% p/v a tiempo 0 h (línea azul) y a los 3 meses de almacenamiento en gabinete (línea verde). Control del gel de Carbopol® ultrez 10 al 1% p/v sin NP a las 0 h (línea roja) y a los 3 meses de almacenamiento en gabinete (línea amarilla). Temperatura constante de 20°C.

En base a los resultados obtenidos, el tratamiento con gel con NP metálicas podría ser una alternativa para las infecciones causadas por bacterias resistentes. Hay varias ventajas de estos materiales antimicrobianos. Primero, las NP metálicas podrían ser buenos sustitutos de los antibióticos, ya que rara vez se ha informado de resistencia bacteriana. Presumiblemente, esto se debe a los múltiples mecanismos de acción antimicrobiana, mientras que los antibióticos generalmente tienen un solo mecanismo de acción (Desfrançois y col., 2018). En segundo lugar, el pequeño tamaño de las NP les permite pasar a través de las paredes y las membranas celulares del peptidoglicano, penetrando fácilmente en el citoplasma de las células bacterianas. Finalmente, los geles pueden ofrecer un sistema de entrega para la aplicación local, mejorando la propiedad antibacteriana con el aumento de la concentración de NP, que podría ser alta en la zona

de infección a través de la aplicación de la formulación. Todas las ventajas mencionadas anteriormente indican que los geles con NP pueden ayudar a resolver los desafíos actuales de la medicina antimicrobiana. En esta etapa del trabajo de tesis, se cumplieron con las condiciones de síntesis deseables (proceso simple, utilizando como solvente agua, sin el agregado de solventes orgánicos o calor) para una formulación de hidrogel de las amoxi@AuNP, la cual fue estable y con las características necesarias para la administración tópica.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN: PARTE V.

### DESARROLLO DE UN RECUBRIMIENTO ANTIFOULING PARA DISPOSITIVOS MÉDICOS

#### ***6.1 Síntesis in situ de nanoplacas de oro como recubrimiento antifouling para dispositivos médicos (Kauratec®)***

##### *6.1.1 Síntesis de nanoplacas de oro*

La formación de biofilms es una de las principales causas de las infecciones hospitalarias, especialmente las relacionadas al uso de dispositivos médicos. Los dispositivos médicos elaborados con material plástico son los más propensos al desarrollo de biofilms en su superficie. De acuerdo con Donlan, 2002, las propiedades fisicoquímicas de la superficie ejercen una fuerte influencia en la tasa y el grado de adherencia bacteriana. Los microorganismos se adhieren más rápidamente a superficies hidrófobas no polares como el teflón y otros plásticos que a materiales hidrófilos como vidrio.

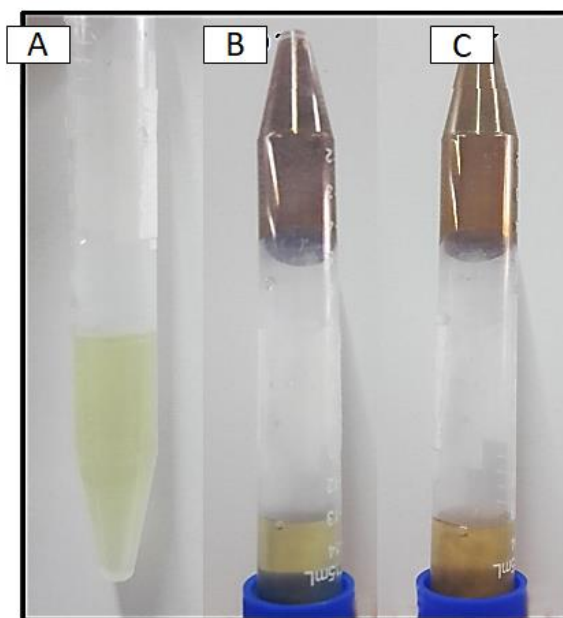
La mejor estrategia para prevenir infecciones bacterianas asociadas al uso de dispositivos médicos es prevenir la adhesión de las primeras células bacterianas a la superficie de los dispositivos antes de que el biofilm pueda desarrollarse (Almog y col., 2018).

Por este motivo, el desarrollo de opciones *antifouling* eficaces es urgente. Se sabe desde hace muchos años que el oro es un material noble que se ha utilizado para instrumentos médicos y prótesis. Como es biológicamente inerte, presenta numerosas ventajas cuando se utiliza en catéteres médicos, stents, implantes, instrumentos y dispositivos médicos (Yachia y col., 1990; Song y col., 2016). Sin embargo, con el auge de la ciencia de los polímeros, ha sido reemplazado por otros materiales mucho más económicos y flexibles (como la silicona). Estos materiales son muy susceptibles a la adhesión bacteriana, por lo que su recubrimiento con metales nobles como el oro puede ser una alternativa para evitar la formación de biofilms bacterianos.

Lo expuesto anteriormente, nos motivó a plantear como objetivo de esta etapa de tesis doctoral, obtener un recubrimiento basado en nanoplacas laminares de oro, mediante un método rápido y ecológico, con el fin de evitar la formación de biofilms bacterianos sobre catéteres/prótesis de diferentes materiales.

En una primera instancia la síntesis de nanoplacas laminares se llevó a cabo en tubos Falcon, utilizando como precursor de oro al ácido tetracloroaurico trihidrato ( $\text{AuHCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) y como agente reductor un antibiótico aminoglucósido (Rocca y col., 2020). Se prepararon soluciones de  $\text{AuHCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  y del antibiótico disolviendo directamente los sólidos en agua MilliQ. Luego, iguales cantidades de cada solución (500  $\mu\text{L}$ ) se colocaron gota a gota en un tubo Falcon que contenía 4,5 mL de agua MilliQ, agitando la solución con la ayuda de un vórtex. El tubo Falcon con las soluciones se llevó a calentamiento en baño termostatzado (ver página 124, sección 7.15.1 en Materiales y Métodos). Inicialmente, la solución presentó color amarillo pálido debido a la sal de oro. Luego de unos pocos minutos de calentamiento de la mezcla, la solución se tornó incolora (Rocca y col., 2020). Transcurrido el tiempo total de calentamiento, la solución se tornó dorada y las paredes del tubo Falcon adquirieron un color dorado/cobrizo,

indicativo de la formación de nanoplacas de oro laminares en las paredes del tubo. Finalmente, se observó una gran cantidad de sólido dorado brillante mientras se agitaba la solución (Figura 43). Resultados idénticos se observaron al calentar las muestras durante pocos segundos en un microondas convencional de uso doméstico (Rocca y col., 2020).



**Figura 43.** Síntesis de nanoplacas laminares en tubo Falcon y baño termostatzado. A) Solución inicial de color amarillo pálido, antes de calentar. B) Líquido con sólido dorado en suspensión y paredes en tubo Falcon cobrizas, luego de los primeros minutos de calentamiento en baño termostatzado. C) Suspensión final con mayor cantidad de sólido dorado en suspensión y paredes del tubo de color dorado/cobrizo, finalizada la etapa de calentamiento.

El antibiótico aminoglucósido fue elegido como agente reductor para la formación de nanoplacas de oro (Rocca y col., 2020). El antibiótico seleccionado es un aminoglucósido reductor, debido a la capacidad que presentan sus grupos funcionales de oxidarse a grupos carbonilos (Stojiljkovic y col., 2018). Esta propiedad en particular fue empleada, en este caso, para reducir  $\text{Au}^{+3}$  y formar las nanoplacas de oro.

La síntesis se logró mediante calentamiento de la mezcla de soluciones del precursor de oro y del agente reductor, utilizando baño termostatzado y microondas doméstico de uso convencional. Las nanoplacas de oro se obtuvieron luego de 15 min en baño termostatzado, y luego de 1 min en microondas, optimizando de esta forma el tiempo de síntesis. La química asistida por microondas es una fuente de calentamiento ventajosa que proporciona un calentamiento volumétrico uniforme de la solución de reacción, tiempos de reacción más cortos, menor consumo de energía y alto rendimiento del producto. Permite la síntesis de muchos tipos de NP inorgánicas, desde un solo componente (metales y óxidos metálicos; Pascu y col., 2012) hasta NP multicomponentes o aleaciones metaestables (Yu y col., 2015; May-Masnou y col., 2018). Una de las principales ventajas de la técnica de microondas es que es una técnica rápida (Bilecka y col., 2010; Zhu y col., 2014).

Diferentes parámetros y condiciones de síntesis son utilizadas para lograr la síntesis de nanoplacas metálicas, como la temperatura y tiempo de reacción (Xiong y col., 2005), el uso de un agente reductor suave (Washio y col., 2006), y la concentración del precursor metálico.

Cuando la reducción del precursor metálico es rápida (temperatura alta durante mucho tiempo), hay suficientes átomos metálicos para unirse a la superficie de los núcleos metálicos para un crecimiento continuo, tendiendo a productos termodinámicamente favorecidos. Sin embargo, cuando la reducción del precursor metálico es lenta (baja temperatura o tiempos cortos a alta temperatura y capacidad reductora suave del agente reductor), la concentración de átomos metálicos es pequeña, y los nanocristales tomarán formas que se desvían de las favorecidas termodinámicamente, dando lugar a estructuras anisotrópicas similares a nanoplacas y microplacas cinéticamente favorables (triángulos, hexágonos y formas truncadas, Torras y col., 2020).

Otros tipos de nanomateriales han sido estudiados para prevenir la formación de biofilms. Varios grupos han estudiado compuestos que cuentan con restos hidrófilos e hidrófobos (glicolípidos, lipopéptidos, complejos de polisacárido-proteína, fosfolípidos, ácidos grasos y lípidos neutros) para reducir la capacidad de unión de los microorganismos a la superficie de las prótesis (Bryers, 2008; Rodrigues, 2011). Los resultados hasta ahora han sido mixtos, con estudios que sugieren que una cohorte inicial de microorganismos es capaz de adherirse a estas superficies recubiertas y posteriormente modificar la superficie creando una película que aumenta la unión de más microorganismos. Además, muchos de los recubrimientos sólo funcionan contra ciertos tipos de bacterias, lo que impulsa la necesidad de usar múltiples agentes (Hetrick y col., 2006). La unión directa de antibióticos a implantes ortopédicos metálicos es otra alternativa que permitiría matar las bacterias primero cuando entran en contacto con una prótesis, y de esta manera detener la progresión a la formación de biofilms. Stewart y col., (2012); Kruszewsk y col., (2013), demostraron una reducción de la colonización bacteriana en implantes de titanio unidos covalentemente en su superficie con vancomicina. Sin embargo, resultados de laboratorio indicaron que este tipo de recubrimientos de superficie tienden a ser de corta duración, y la evaluación de los efectos a largo plazo sobre el desgaste o la citotoxicidad de las partículas no ha sido comprobada (Mc Conoughey y col., 2014).

Dentro de los metales, la plata tiene una larga historia de actividad antimicrobiana, incluido el recubrimiento de dispositivos médicos (Clement y col., 1994), pero su síntesis para el recubrimiento implica varios pasos y reactivos (Ho y col., 2013; Yassin y col., 2019). Las NP de plata (AgNP) pueden matar tanto organismos Gram negativos como Gram positivos (Fayaz y col., 2010). Estas NP resultaron efectivas en un estudio de prevención de biofilms en catéteres expuestos a *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.* y *Staphylococcus aureus* (Roe y col., 2008). Si bien la plata es actualmente el metal más estudiado en este contexto, otros metales también se están considerando por su potencial eficacia antibiofilm. Entre estos se encuentran el zinc, titanio, hierro y cobre. Sin embargo, la mayor parte del trabajo se ha realizado con óxido de zinc contra bacterias planctónicas de patógenos dentales. El óxido de zinc mostró una menor capacidad para inhibir biofilms en relación con la plata (Aydin Sevinc y col., 2010; Seil y col., 2011). El cobre ha presentado buenas propiedades antibiofilm para hospitales y superficies públicas en entornos médicos, por ejemplo, puertas, perillas, material de

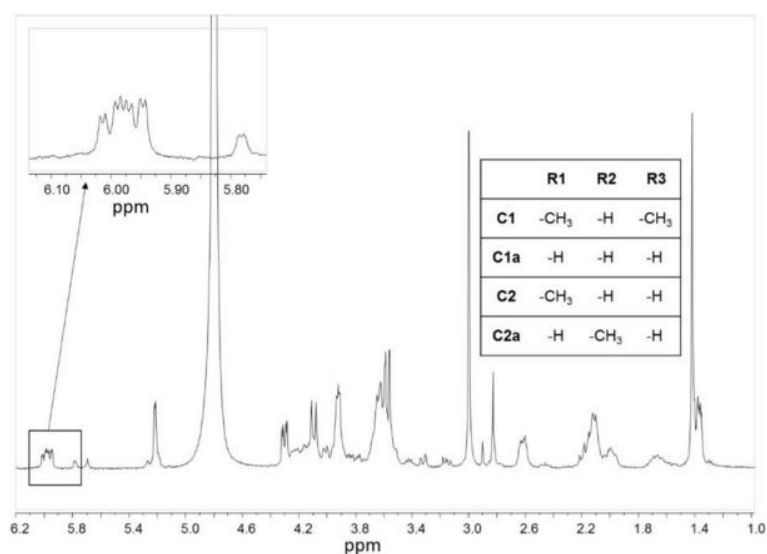


tuberías u otras superficies inanimadas en diferentes instalaciones o para dispositivos médicos (Vincent y col., 2018); sin embargo, está asociado a posibles problemas de toxicidad (Dupont y col., 2011).

El recubrimiento con nanoplacas de oro desarrollado en este trabajo, presenta varias ventajas en relación a lo reportado anteriormente, en primer lugar, se necesitan dos reactivos para su síntesis: la sal de oro ( $\text{AuHCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) y un aminoglucósido, un antibiótico de amplio espectro disponible comercialmente, como solvente se utilizó únicamente agua MilliQ, y el tiempo de síntesis fue optimizado, en comparación a lo reportado. Además, este revestimiento está conformado de oro nanoestructurado, característica que le otorga una mayor capacidad para prevenir la adhesión de microorganismos a las superficies plásticas de dispositivos médicos.

## 6.2 Caracterización de nanoplacas de oro

El antibiótico aminoglucósido utilizado como agente reductor del precursor de oro, está compuesto por purpurosamina, desoxiestreptamina y garosamina con variaciones en el patrón de sustitución de la purpurosamina, que tiene como resultado cuatro componentes principales: C1, C1a, C2 y C2a (Figura 44). Deubner y col., (2003) demostraron que los estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) permiten la caracterización de los componentes principales, analizando el área cubierta por los hidrógenos anoméricos de purpurosamina que forman parte de la molécula. Por lo tanto, el antibiótico usado en la síntesis se caracterizó usando resonancia magnética nuclear de protón (RMN- $\text{H}^1$ ). El espectro obtenido mostró la presencia de los cuatro componentes principales en la muestra (Figura 44). Esto sugiere que el antibiótico, debido a sus grupos funcionales, es la responsable de la reducción de la sal de oro. Adicionalmente, la presencia de grupos carbonilos formados luego de la reducción de los grupos funcionales del antibiótico, se detectaron con 2,4-dinitrofenilhidrazina (Alomari y col., 2018).



**Figura 44.** Espectro de RMN- $\text{H}^1$  del antibiótico aminoglucósido con una expansión de las señales de resonancia de los hidrógenos anoméricos de los diferentes componentes de este.

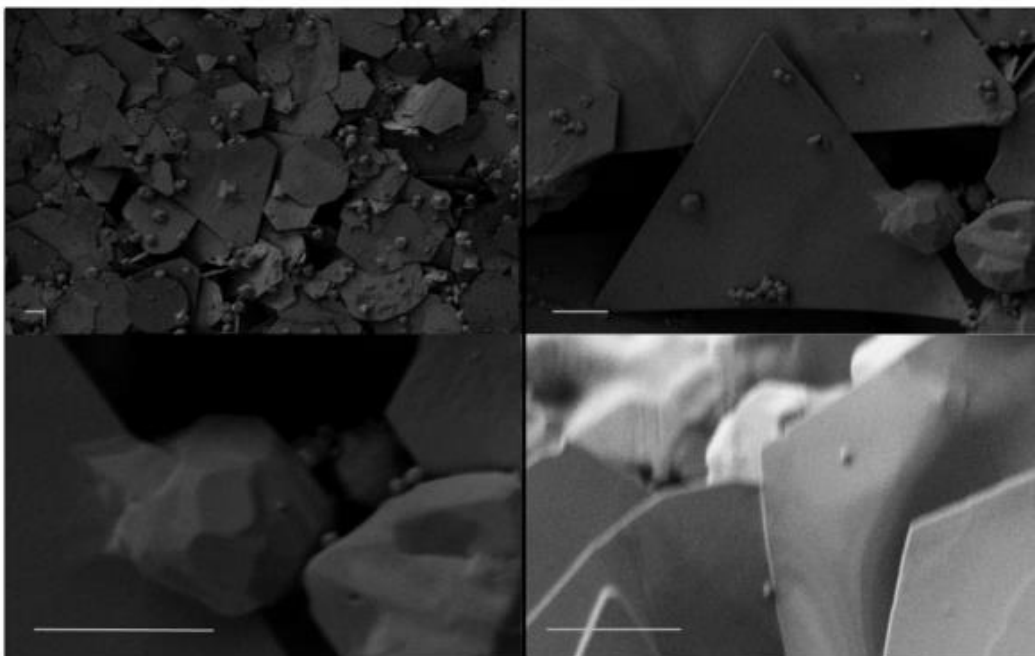
Luego de obtener las nanoplacas de oro en el tubo Falcon, el contenido se transfirió a un eppendorf limpio y se centrifugó a 3500 rpm durante 45 min, con el fin de obtener un producto sólido lo más puro posible. Luego del centrifugado, se obtuvo un precipitado de oro brillante (6,82 mg, 87% de rendimiento) (Figura 45):



**Figura 45.** Sólido de oro brillante precipitado después de centrifugación a 3500 rpm/45 min.

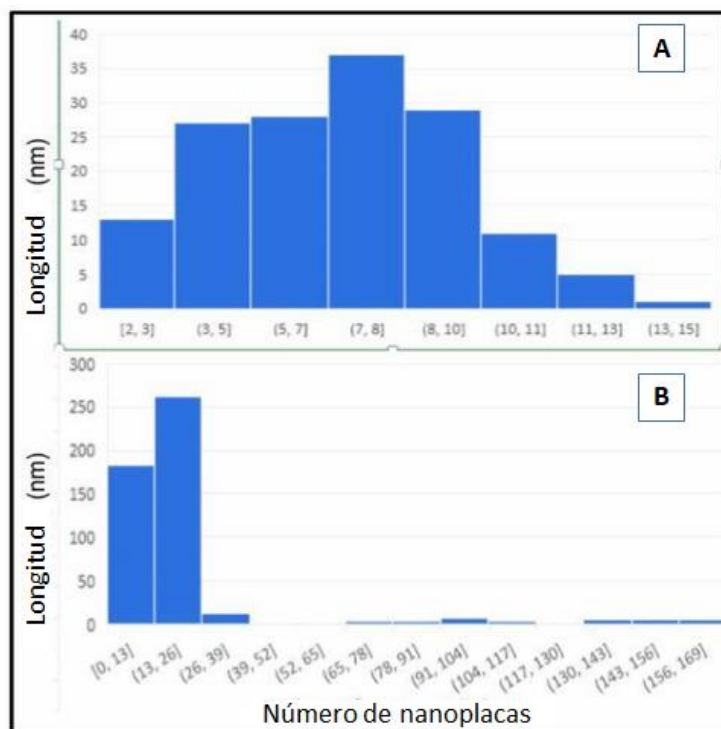
El pH del sobrenadante fue de 1, mientras que la solución inicial tenía un pH de 5. La fuerte acidez del sobrenadante después de la reacción se atribuyó al HCl liberado durante la reacción de la sal de oro y de la sal del antibiótico en medio acuoso.

Las nanoplacas de oro presentes en el pellet, se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), con el fin de evaluar formas y tamaños de las nanoplacas. Las imágenes SEM revelaron formas geométricas laminares, la mayoría nanoplacas hexagonales, algunas triangulares y otras poliédricas (Figura 46). Se observaron algunos grupos amorfos, formados por piezas geométricas más pequeñas.



**Figura 46.** Imágenes SEM de nanoplacas de oro sintetizadas con antibiótico aminoglucósido. Escala: 50 nm.

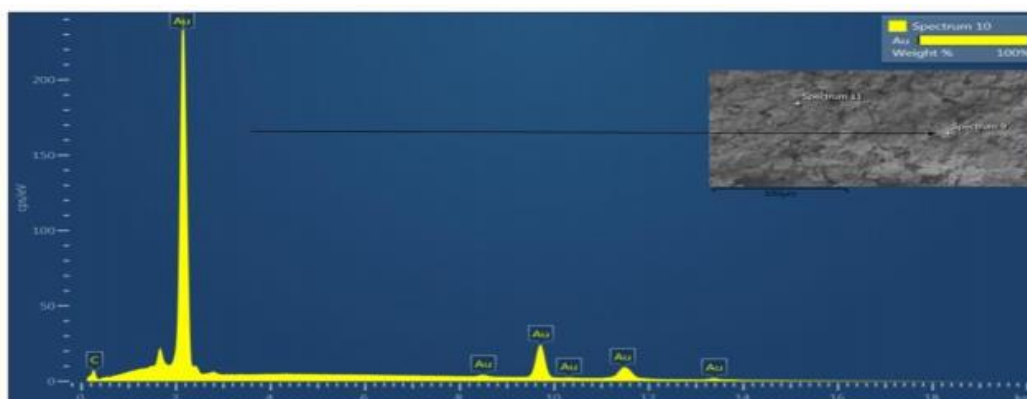
A partir de las imágenes SEM, se calculó la longitud de los lados de las nanoplacas, mediante el software ImageJ®, con lados de 2 a 30  $\mu\text{m}$  (Figura 47):



**Figura 47.** Distribución estadística de las longitudes de los lados (eje horizontal, nm) de nanoplacas de oro hexagonales (A) y nanoplacas de oro triangulares (B).

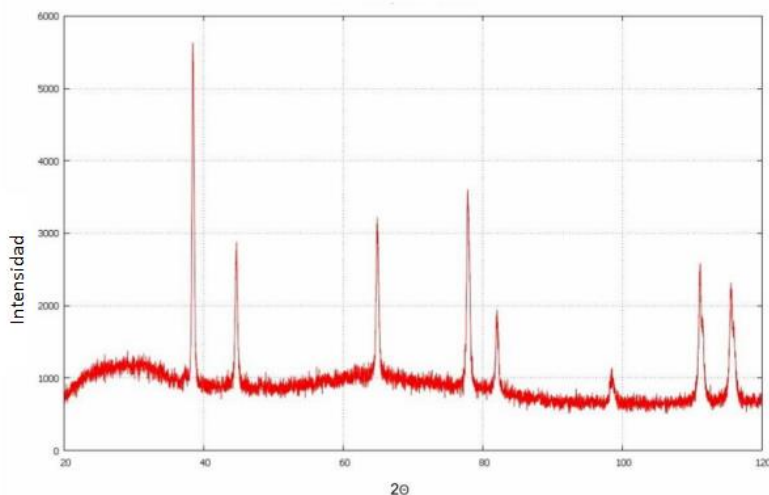
Para la determinación de estructuras cristalinas, composición y pureza de las nanoplacas se realizó espectrometría de rayos X de dispersión de energía (EDS) y difracción de rayos X (XRD). El sólido de oro brillante (gránulo) se sumergió completamente en ácido nítrico concentrado sin sufrir cambios visibles, lo que sugiere la presencia del metal noble puro (Perea y col., 2003).

La pureza de este sólido se evaluó mediante EDS (Figura 48), mostrando una composición del 100% de  $\text{Au}^0$ .



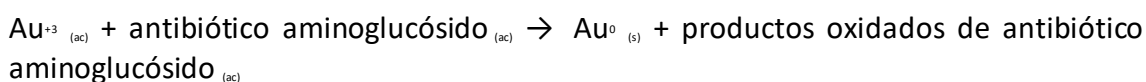
**Figura 48.** Espectro EDS de oro metálico puro obtenido tras la reducción de la sal áurica con el antibiótico aminoglucósido.

El patrón de difracción de rayos X (XRD) obtenido, reveló una estructura cristalina cúbica centrada en la cara con los picos característicos a  $2\theta$  (dos theta): 38, 44, 64, 78 y 81 asignados a los planos de 11, 200, 220, 311 y 222, respectivamente, (Figura 49) característico para el oro puro.



**Figura 49.** Patrón XRD. Estructura cristalina cúbica centrada en la cara de oro puro.

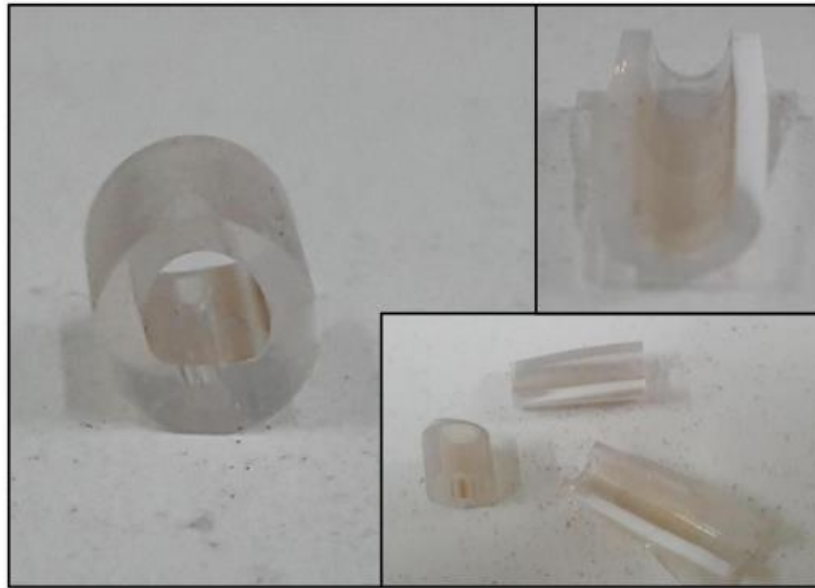
El análisis del sólido y el sobrenadante sugieren que el antibiótico aminoglucósido se oxida mientras el  $\text{Au}^{+3}$  se reduce a  $\text{Au}^0$  a través de la siguiente reacción general propuesta:



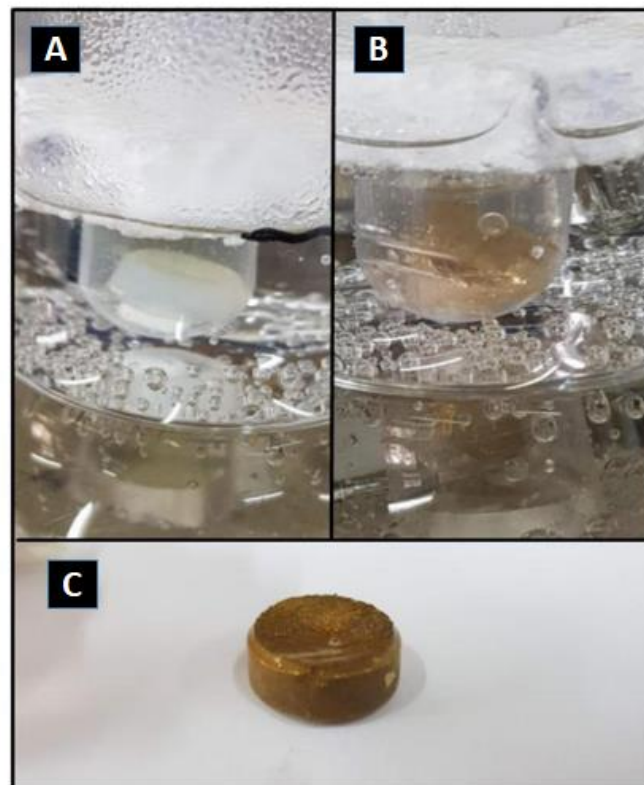
El antibiótico aminoglucósido no permaneció unido a las nanoplacas de oro, actuando sólo como agente reductor del precursor metálico para la formación de nanoplacas.

### 6.3 Recubrimiento *in situ* con nanoplacas de oro en catéteres y prótesis de silicona

La deposición homogénea de nanoplacas de oro en el lumen de un catéter urinario (Figura 50) y la superficie de una prótesis de silicona (sección de una prótesis peneana, Figura 51), se realizó mediante síntesis *in situ*, aplicando el procedimiento detallado anteriormente, logrando el recubrimiento completo durante 15 min en baño termostatzado (ver página 125, sección 7.15.2 en Materiales y Métodos).

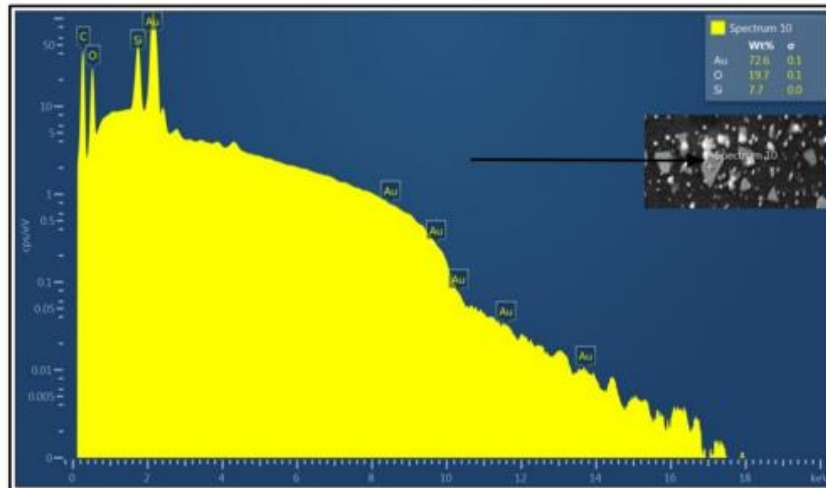


**Figura 50.** Imágenes de catéteres de plástico después del recubrimiento y muestras en rodajas para imágenes SEM.



**Figura 51.** Fase inicial (A) y fase final (B) del revestimiento *in situ* en la superficie de una prótesis. Prótesis completamente recubierta (C).

El espectro EDS (Figura 52) muestra la presencia predominante de oro (72,6%), seguido de silicio y oxígeno, que forman parte de la pared del catéter de silicona.



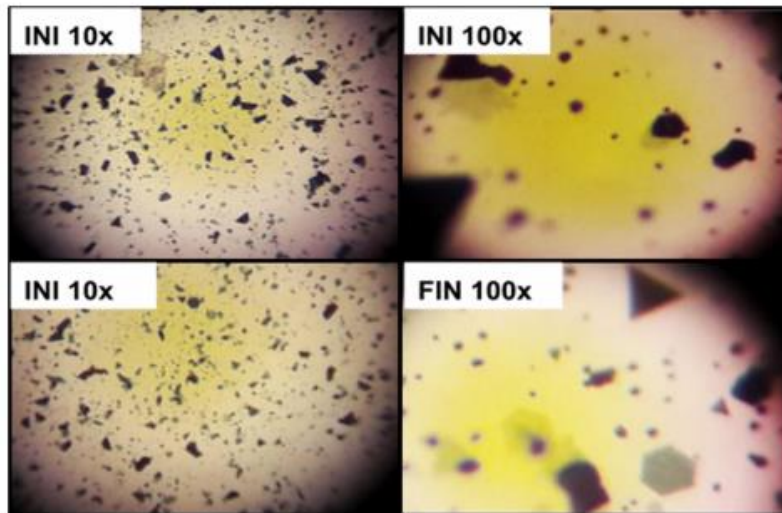
**Figura 52.** Espectro SEM/EDS del lumen del catéter después del recubrimiento.

El método de síntesis propuesto en este trabajo ofrece la síntesis de una capa de nanoplacas de oro puro formado directamente sobre las superficies plásticas de diferentes dispositivos médicos. (Figura 50 y Figura 51). Otros estudios han reportado la síntesis de nanoplacas de oro, pero están limitados por la baja pureza como por el rendimiento obtenido (Malikova y col., 2002; Sarma y col., 2004).

#### **6.4 Estudio de durabilidad y resistencia del recubrimiento con nanoplacas de oro**

Los catéteres generalmente se someten a erosión líquida, gota a gota o por flujo constante, por lo que la durabilidad y resistencia del revestimiento con nanoplacas de oro se evaluaron simulando las condiciones de uso real para fines clínicos, mediante la técnica de erosión hídrica (ver página 125, sección 7.16 en Materiales y Métodos).

Las imágenes obtenidas mediante microscopio óptico antes y después de la prueba de erosión líquida, demostraron que la misma cantidad de nanoplacas de oro permanecieron unidas al catéter (Figura 53).



**Figura 53.** Imágenes obtenidas de microscopio óptico de catéter de silicona recubierto con nanoplacas de oro, antes y después de la prueba de erosión líquida. Etiquetado como inicial (INI) y final (FIN).

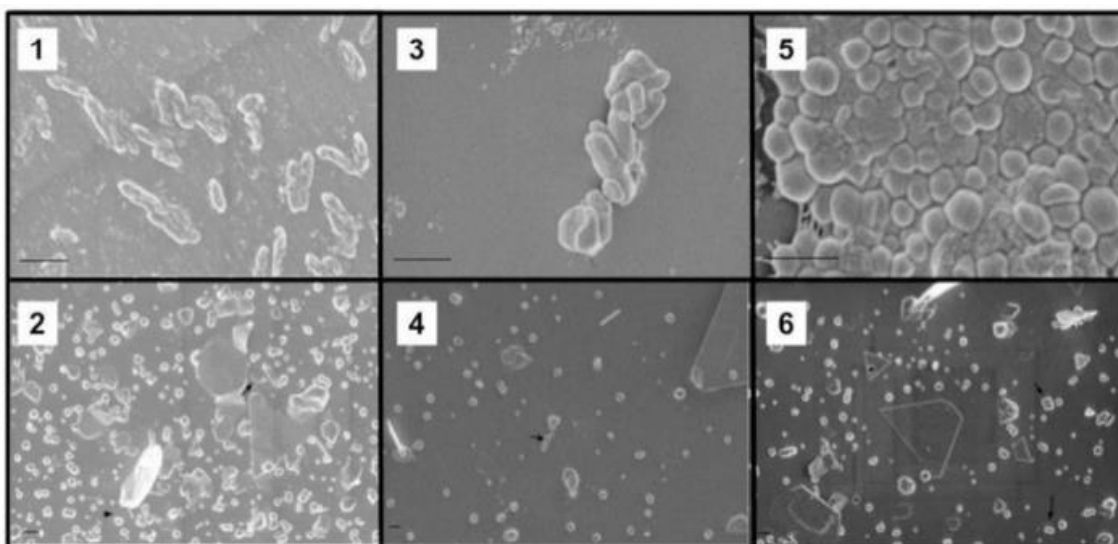
La durabilidad del revestimiento podría atribuirse a la interacción favorable entre las nanoplacas de oro y los compuestos presentes en el catéter. Un estudio establece que las proteínas presentes en la superficie del látex de caucho favorecen la nucleación y estabilización de nanomateriales de oro (Gong y col., 2015). Este tipo de interacción podría explicar por qué no hubo cambios significativos en el recubrimiento cuando se observaron las imágenes en el microscopio. Su distribución fue homogénea, sin cambios luego de la prueba de durabilidad. Las imágenes de las pruebas de erosión indican que no hay una diferencia significativa entre la superficie recubierta antes y al final del ensayo de erosión ( $80 \pm 2$  y  $78 \pm 1\%$  de superficie revestida, respectivamente). Este resultado demuestra que el recubrimiento de nanoplacas de oro es lo suficientemente resistente para ser empleado en un uso clínico regular.

### 6.5 Capacidad antifouling del recubrimiento con nanoplacas de oro

Las infecciones asociadas a biofilms se pueden dividir en dos categorías. En primer lugar, las infecciones por biofilms debidas a dispositivos médicos permanentes. Por ejemplo, existen infecciones asociadas con catéteres venosos centrales, catéteres urinarios, prótesis articulares, catéteres de diálisis peritoneal, marcapasos, lentes de contacto y dispositivos intrauterinos. Las segundas son las infecciones por biofilms en los tejidos del huésped, como neumonía crónica en pacientes con fibrosis quística, otitis media crónica, endocarditis, osteomielitis crónica, prostatitis crónica, infección del tracto urinario y gingivitis (Donlan, 2001). El principal problema de las infecciones por biofilms en diversos entornos médicos se debe a su extraordinaria resistencia a diversos antibióticos y otros desinfectantes. Los biofilms se han aislado de casi todas las infecciones relacionadas con dispositivos médicos y son muy difíciles de eliminar. Algunos de los patógenos nosocomiales responsables de las infecciones relacionadas con el catéter, como *Pseudomonas aeruginosa* y *S. aureus*, establecen biofilms en la superficie del catéter, constituyendo el 75% de los biofilms que se encuentran en los

dispositivos médicos. Estos organismos poseen varios mecanismos de resistencia a los antibióticos. *P. aeruginosa* se aísla con frecuencia a partir de infecciones en catéteres urinarios, catéteres intravasculares, articulaciones artificiales e implantes cocleares (Chen y col., 2013; Tolker-Nielsen, 2014).

Para determinar la capacidad antifouling de las nanoplacas de oro, muestras de catéteres de silicona recubiertos y no recubiertos se incubaron con tres cepas bacterianas formadoras de biofilm: cepas clínicas *S. aureus* meticilino resistente (SAMR 9455) y *P. aeruginosa* (PAE 191150); y una cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922 (*E.coli* 25922). Las muestras fueron incubadas durante 24 h a 37°C, y mediante microscopía electrónica de barrido con detector EDS (SEM/EDS) se evaluó la formación de biofilms bacterianos en las muestras de catéteres recubiertos con nanoplacas de oro y muestras sin recubrir como control (ver página 125, sección 7.17 en Materiales y Métodos). En este estudio se observó que todas las cepas bacterianas fueron formadoras de biofilm sobre la superficie del catéter sin recubrir, siendo la cepa clínica SAMR 9455 la que presentó una mayor formación de biofilm en la superficie del catéter (Figura 54).



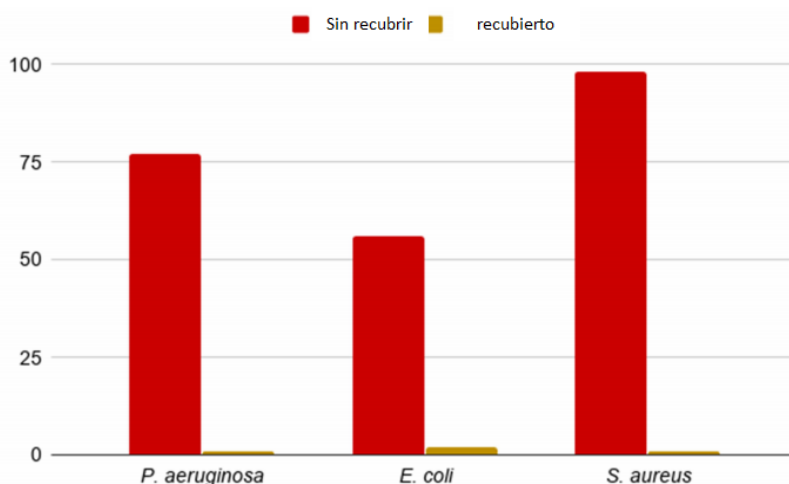
**Figura 54.** Catéteres incubados con cepas de bacterias clínicas formadoras de biofilms: *P.aeruginosa* (1 y 2), *E. coli* (3 y 4) y *S. aureus* (5 y 6) (imágenes obtenidas por SEM). Formación de biofilms sobre la superficie de catéteres sin recubrir (1, 3 y 5), catéteres recubiertos con nanoplacas de oro, donde no se observa formación de biofilms (2, 4 y 6), unas pocas bacterias planctónicas fueron observadas (flechas).

En las imágenes obtenidas de los catéteres que fueron recubiertos previamente con las nanoplacas de oro, ninguna de las tres cepas en estudio pudo adherirse a la superficie del catéter y formar biofilms (Figura 54), observándose las nanoplacas de oro, y unas pocas bacterias en estado planctónico. Estos resultados demuestran que los catéteres recubiertos previenen el desarrollo de biofilms de cepas clínicas resistentes y cepa de referencia.

Mediante el software ImageJ® fue posible procesar las imágenes SEM de los catéteres previamente recubiertos y sin recubrir, luego de la incubación con las cepas clínicas resistentes a antibióticos (Figura 55). A partir de este análisis, se pudo confirmar la capacidad antifouling que presenta este recubrimiento. El porcentaje de bacterias que



cubren la superficie disminuyó mientras aumentó el porcentaje de nanoplacas de oro que cubren la superficie del catéter (Tabla 12).



**Figura 55.** Capacidad antifouling del catéter recubierto en comparación con el catéter sin recubrir, incubados con cepas clínicas resistentes a los antibióticos (A: *P. aeruginosa*; B: *E. coli*; C: *S. aureus*) expresadas como % de bacterias/% de superficie recubierta de las muestras de catéter. DE <4%.

**Tabla 12.** % de bacterias/% de superficie recubierta de muestras de catéter. Seis imágenes de cada condición fueron analizadas con el software ImageJ. DE <4%

	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<b>Catéter sin recubrir</b>	77/0	56/0	98/0
<b>Catéter recubierto</b>	< 1/96	< 2/81	< 1/92

El desarrollo de biofilms en dispositivos médicos de plástico y las infecciones posteriores que causan, se encuentran entre las principales razones para recubrir dichos dispositivos. Estas infecciones tienen un alto riesgo de progresión a infecciones sistémicas (Lee y col., 2017). Un estudio clínico comparó la bacteriuria (como indicador de infección uretral) de 217 pacientes a los que se les colocaron catéter de silicona, con 222 pacientes con catéter de látex recubierto de oro. Se encontró que la aleación de metales nobles como recubrimiento resultó en una reducción de 5 veces en las infecciones asociadas al catéter (Stenzelius y col., 2011). Otro artículo más reciente informa que el revestimiento de aleaciones de metales nobles demostró ser una buena estrategia para reducir los efectos adversos relacionados con los catéteres, manteniendo al mismo tiempo una seguridad toxicológica (Björling y col., 2017). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la colonización microbiana. Liedberg y col., (1990), compararon la colonización de diferentes revestimientos de catéteres urinarios por una cepa clínica de *P. aeruginosa* después de 10 minutos y 10 horas de incubación y encontraron que los discos recubiertos de aleación de plata evitaron el crecimiento de biofilms en materiales de látex, Teflón® y silicona. Además, otros ensayos demuestran que el recubrimiento de plata en catéteres urinarios confiere

propiedades antimicrobianas (Johnson y col., 2006). La formación de biofilms en catéteres puede ser inducida por la acumulación y adhesión de bacterias en la superficie (Mukherjee y col., 2017). Los resultados de este trabajo demuestran la alta capacidad del recubrimiento con nanoplacas de oro para prevenir el desarrollo de biofilms. El revestimiento se puede aplicar eficazmente a diferentes dispositivos médicos de silicona, pero no se probó en los materiales de látex, ya que el uso de este último ha ido disminuyendo debido a las desventajas en comparación con la silicona de grado médico. La resistencia química y las propiedades mecánicas-térmicas de la silicona la han convertido en el principal material para los dispositivos médicos.

El efecto *antifouling* observado (Figura 54) podría estar relacionado con la fuerte influencia sobre la topografía a nanoescala en la unión bacteriana. Las células bacterianas adaptan su orientación en un intento de maximizar el área de contacto con la superficie, con el fin de estabilizar su adherencia, según lo informado por Hsu y col., (2013). En un análisis más detallado de Rizzello y col., (2011), demostraron las modificaciones significativas en los aspectos morfológicos, genéticos y respuesta proteómica de *E. coli* a la superficie nanoestructurada. Micrografías (por microscopía de fuerza atómica y microscopía electrónica de barrido) capturaron las variaciones y características en la forma de las bacterias, específicamente la pérdida de fimbrias adherentes de tipo 1. Ambos estudios, en relación con el comportamiento encontrado en la superficie del recubrimiento con nanoplacas de oro, indican que un comportamiento puramente físico, como la nanoestructuración en la superficie del material, juega un papel importante en la prevención del desarrollo de biofilms. Esto podría explicar la capacidad antifouling del recubrimiento basado en nanotecnología.

En resumen, este nuevo método facilita la producción de nanoplacas de oro de alta pureza, que se puede aplicar directamente a la superficie deseada de forma rápida y sencilla. El revestimiento obtenido es resistente a la erosión y al calor y confiere su capacidad antifouling al material. Este recubrimiento podría usarse en una amplia gama de dispositivos médicos para prevenir la formación de biofilms y extender su vida útil (Figura 56).



**Figura 56.** Ilustración de la síntesis *in situ* de nanoplacas de oro en la superficie de un catéter y su capacidad *antifouling*.

## CONCLUSIONES GENERALES

En el presente trabajo de tesis se llevó a cabo el desarrollo de nuevos nanomateriales utilizados como fotosensibilizadores en la PACT en bacterias productoras de biofilms y en estado planctónico, y el desarrollo de un nanomaterial con propiedades antifouling, de manera tal, que se obtuvieron las siguientes conclusiones a partir de los resultados obtenidos.

- ❖ La síntesis de amoxi@AuNP y lignina@AgNP fue llevada a cabo en un solo paso, en pocos minutos de reacción, utilizando trihidrato de amoxicilina y lignina como agentes reductores y estabilizadores de AuNP y AgNP respectivamente, agua MiliQ como único solvente y poca energía calórica para su desarrollo.
- ❖ Las amoxi@AuNP y lignina@AgNP fueron estables en diferentes medios de cultivo bacteriano y celular, evidenciando la eficacia del antibiótico y la lignina como agentes estabilizadores.
- ❖ Las amoxi@AuNP y lignina@AgNP presentaron actividad bactericida en cultivos planctónicos luego de irradiación con luz blanca, optimizando el tiempo de acción bactericida de horas (de acuerdo a los antecedentes informados por el grupo de investigación con AuNP (no conjugadas) y NP bimetálicas de oro y plata sintetizadas previamente) a sólo unos pocos minutos.
- ❖ Se observó una disminución de la viabilidad celular en biofilms maduros, con valores entre el 60-70% de disminución respecto del control, luego del tratamiento con amoxi@AuNP y lignina@AgNP bajo irradiación.
- ❖ Las amoxi@AuNP y lignina@AgNP fueron biocompatibles con células eucariotas, lo que demuestra que ambos fotosensibilizadores propuestos son selectivamente tóxicos para las bacterias y no afectan a las células eucariotas en una extensión significativa.
- ❖ Se logró el desarrollo de una formulación farmacéutica estable de amoxi@AuNP de tipo hidrogel, con características de sólido viscoelástico, ofreciendo un sistema de entrega para la aplicación tópica local de amoxi@AuNP para el tratamiento de infecciones bacterianas.
- ❖ Se desarrolló un recubrimiento antifouling de nanoplacas de oro para dispositivos médicos de plástico, cuya síntesis se realizó *in situ*, en pocos minutos, utilizando un antibiótico aminoglucósido como agente reductor y agua MiliQ como solvente. Este nuevo nanomaterial permitió que cepas tanto de referencia como clínicas no se adhieran a la superficie de los dispositivos, evitando la formación de biofilms bacterianos. Este desarrollo se realizó en conjunto con la Dra Aiassa, Dra. Becerra, Dra. Silvero y Dra. Zoppi, conformando el centro de transferencia de la FCQ-UNC: LINBIO. El desarrollo se encuentra en trámite de patentamiento, y su marca registrada como Kauratec®.

Además, se destaca que, a partir de los compuestos obtenidos en el presente trabajo de tesis, empresas locales de la industria farmacéutica han solicitado el desarrollo de nuevos compuestos, los que potencialmente pueden ser plausibles de patentamiento.

## PROYECCIONES

Con base en los resultados obtenidos durante el trabajo de tesis se plantea continuar con los siguientes estudios:

- ❖ Profundizar en el mecanismo de acción antibacteriano de amoxi@AuNP y lignina@AgNP en cultivos planctónicos y en biofilms maduros.
- ❖ Profundizar en el estudio de la actividad antimicrobiana en biofilms bacterianos de las NP sintetizadas, estudiar qué efecto tendrían las NP en los biofilms luego de su irradiación, ya que en el trabajo presentado se logró una disminución de la viabilidad celular en el biofilm del 70% con respecto a su control.
- ❖ Desarrollar NP metálicas con potencial actividad antibacteriana, utilizando otras moléculas biocompatibles, como péptidos antimicrobianos o extractos vegetales con propiedades antibacterianas *per se*, que permitan optimizar el tiempo de acción bactericida en cultivos planctónicos y en biofilms bacterianos.
- ❖ Desarrollar nuevas formulaciones farmacéuticas de NP metálicas en menor tiempo, para el tratamiento de infecciones bacterianas, y para ser utilizadas como desinfectantes.
- ❖ Continuar con el desarrollo de productos a base de nanomateriales, debido a la alta demanda de la industria farmacéutica, permitiendo la transferencia del conocimiento al sector productivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Cepas y condiciones de cultivo bacteriano

Los cultivos bacterianos se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en caldo tripteína soya (TS) y glicerol en la relación 90:10. Para los experimentos, las cepas se cultivaron durante 18 h a  $37^{\circ}\text{C}$  en agar tripteína soya (TS). Los cultivos frescos se prepararon a partir de una única colonia aislada proveniente de un cultivo puro. Los experimentos fueron llevados a cabo con cepas de referencia: *Staphylococcus aureus* meticilino sensible ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* meticilino sensible ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* CF073; cepas anaerobias facultativas: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, y *Lactobacillus* spp.; cepas clínicas resistentes a antibióticos: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente 771, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente 773, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente 9455, *Pseudomonas aeruginosa* 191150 y *Pseudomonas aeruginosa* 189718. Los aislamientos clínicos fueron provistos por el Servicio de Bacteriología del Sanatorio Aconcagua, Córdoba, Argentina. Las cepas anaerobias facultativas fueron adquiridas de la colección de cepas del Servicio Especial de Bacteriología (CCBE), INEI-ANLIS del Instituto Malbrán de Buenos Aires, Argentina.

### 7.2 Síntesis de nanopartículas de oro conjugadas con amoxicilina (amoxi@AuNP) como fotosensibilizadores para la PACT

#### 7.2.1 Síntesis de amoxi@AuNP y nanopartículas de oro (AuNP) sin recubrir

La síntesis de amoxi@AuNP fue llevada a cabo en un solo paso mediante la técnica *bottom up* (Shah y col., 2014) en medio acuoso, donde se utilizó como precursor de oro al ácido tetracloroaurico trihidrato ( $\text{AuHCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) con pureza del 99,9%, amoxicilina trihidrato como agente reductor y estabilizador al mismo tiempo. Todas las soluciones fueron preparadas en el momento en agua MilliQ y estabilizadas 30 min a temperatura ambiente antes de la síntesis. La síntesis fue llevada a cabo en recipientes plásticos (eppendorf) y en recipientes de vidrio previamente lavados con solución piraña (3 partes de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y una parte de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30%) para eliminar restos de sustancias orgánicas que puedan interferir en la síntesis. Durante la síntesis se utilizó material de plástico nuevo (eppendorfs, tips, etc). Para la síntesis de amoxi@AuNP, 900  $\mu\text{L}$  de amoxicilina trihidrato 0,1 mM se agregaron a 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{AuHCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  10 mM (relación  $\text{Au}^{+3}$  : amoxicilina trihidrato, 10:1) y esta solución fue llevada a temperatura constante de  $50^{\circ}\text{C}$  durante 18 min en baño termostático. Obtenidas las nanopartículas (NP) se realizaron 2 ciclos de lavado con agua MilliQ mediante centrifugación a 6000 rpm/10 min, con el fin de descartar amoxicilina trihidrato no unida a las NP. El pellet obtenido fue resuspendido en agua MilliQ para obtener amoxi@AuNP en dos concentraciones, 0,15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 1,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Para obtener 500 mL de AuNP 0,2 mM sin recubrir se llevó a cabo protocolo descrito anteriormente (Low y col., 2010), para ello 1 mL de una solución acuosa de

AuHCl<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O 0,1M se agregaron a 500 mL de agua MilliQ previamente enfriada (8°C). Luego, 10 mL de solución acuosa de borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub> 0,13 M) se transfirió gota a gota a la solución anterior.

### 7.2.2 Caracterización de amoxi@AuNP

Los cambios en la resonancia del plasmón de superficie de las amoxi@AuNP centrifugadas y resuspendidas y el espectro de absorción de las moléculas de amoxicilina trihidrato presentes en el sobrenadante fueron monitoreados usando un espectrofotómetro Cary 60 UV-visible.

La forma y el tamaño de las amoxi@AuNP sintetizadas se midieron por microscopía electrónica de transmisión (TEM) mediante el microscopio TEM-Jeol 1200 EX II en el Centro de investigaciones Agropecuarias (CIAP) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Las muestras para las mediciones de TEM fueron preparadas colocando una gota de 4 µL de la solución amoxi@AuNP en rejillas de cobre recubiertas de carbono y se dejaron secar completamente a 37°C en un horno de secado. Se analizaron estadísticamente al menos 400 nanopartículas utilizando el software ImageJ®.

En las mismas muestras, se midieron el potencial ζ y la dispersión de luz dinámica (DLS) utilizando el equipo Malvern Zetasizer (modelo Nano-S).

La unión de amoxicilina trihidrato a las NP fue analizada mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) en modo de transmisión, utilizando un Espectrofotómetro Nicolet iN 10. Muestras acuosas de amoxicilina trihidrato, AuNP sin recubrir y amoxi@AuNP fueron congeladas y liofilizadas en equipo Freeze Dye Labconco Corp., durante 24 h, para luego ser medidas por FT-IR a baja temperatura.

Se calculó la concentración de las NP, con base en los siguientes supuestos: i) las NP son perfectamente esféricas y ii) la distribución del tamaño es monodispersa. Basado en la metodología previamente reportada (Pacioni y col., 2010) se utilizó la ecuación 1 para determinar el número de átomos por nanopartícula:

$$N = \left( \frac{R_{NP}}{r_A} \right)^3 \quad (1)$$

Donde R<sub>NP</sub> es el radio de la nanopartícula (radio promedio determinado por imagen TEM) y r<sub>A</sub> es el radio atómico covalente del metal (0.144 nm para Au). La concentración de NP se estimó a partir de la ecuación 2:

$$C_{NP} = \frac{N_{NP}}{N_A} = \frac{N_{atoms}}{N \times N_A} = \frac{moles Au^{3+} (or Ag^+) \times N_A}{l} \times \frac{1}{N \times N_A} \quad (2)$$

La cantidad de amoxicilina unida a las NP se determinó por análisis termogravimétrico (TGA) utilizando un equipo TA-TGA Q5000. Para esto, 4 mL de amoxi@AuNP 1,5 µg/mL se centrifugaron y secaron exhaustivamente en un desecador durante 48 h antes del análisis TGA a 10°C/min de 25 a 1000°C bajo atmósfera de nitrógeno (velocidad de flujo de 25 mL/min). Las curvas TGA se utilizaron para determinar la cantidad de amoxicilina trihidrato unida a las NP, extrapolando la pérdida de peso en los valores del eje y.



### 7.2.3 Estabilidad coloidal de amoxi@AuNP

Las mediciones de estabilidad coloidal de amoxi@AuNP 1,5 µg/mL se realizaron en soluciones buffer y diferentes medios de cultivo bacteriano, donde se identificaron cambios en el máximo de absorción del plasmón de superficie a diferentes tiempos, utilizando espectrofotometría UV-visible. La estabilidad es el tiempo en el que se obtiene una disminución o aumento del 20% en la absorción del plasmón a la longitud de onda de la absorbancia máxima inicial (Weerasekera y col., 2017).

Las medidas de estabilidad se llevaron a cabo usando un lector de placa BioTek durante 7 días (0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 12, 18, 24, 48, 72, 120, 144, 168 h) en agua Milli-Q, solución salina, solución buffer PBS (pH 7), caldo Mueller Hinton (MH), caldo de tripteaína soya (TS), caldo Luria Bertani (LB) y caldo cerebro corazón (CC) a diferentes concentraciones (100, 50, 25, 12.5%). Para evitar la contaminación, la medición de estabilidad de NP dispersas en los medios de cultivo se llevó a cabo en condiciones de esterilidad.

## 7.3 Síntesis de nanopartículas de plata conjugadas y estabilizadas con lignina (lignina@AgNP)

### 7.3.1 Síntesis de lignina@AgNP

La síntesis se llevó a cabo en un solo paso mediante el método bottom up (Shah y col., 2014), suministrando calor o luz durante el proceso de síntesis, utilizando como precursor de plata la sal de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), y como agentes reductores y estabilizadores al mismo tiempo tres tipos diferentes de lignina, lignina alcalina disponible comercialmente (Sigma) (con bajo contenido de sulfonato y sin azúcares reductores), y dos ligninas proveniente de una compañía local de pulpa y papel de la ciudad de Ottawa, Canadá: ZHL-lignina (despolimerizada y 27% de contenido de azúcar) y AL-lignina (extracto de álcali, 16% de contenido de azúcar). Tanto el precursor como las ligninas fueron disueltos en agua MilliQ, en el caso de ZHL-lignina y AL-lignina, las soluciones fueron preparadas con agua MilliQ pH 12, ya que estas ligninas son insolubles en pH neutros y ácidos. En general, 0,5 mL de la solución precursora de metal se añadió a 0,5 mL de lignina (0,1 mg/mL) y el volumen de la solución fue aumentado a un volumen final de 2 mL, y se evaluaron diferentes relaciones de masa de precursor metálico/lignina. Se llevaron a cabo dos condiciones de síntesis, por un lado las soluciones se calentaron en baño termostatizado a temperatura entre 55 y 60°C, y por otro lado la mezcla de las soluciones fueron irradiadas de manera directa con luces LED de 405, 465, 530 y 730 nm. La metodología que proporcionó la obtención de lignina@AgNP más estables en menos tiempo para cada tipo de lignina fue seleccionada. Las muestras coloidales preparadas fueron sometidas a un ciclo de centrifugación (centrífuga eppendorf 5804R equipada con un rotor F-34-6-38) y lavado con agua MilliQ para eliminar cualquier resto de lignina libre y/o precursor de metal sin reaccionar. Las NP fueron resuspendidas en 200 µL de agua MilliQ (solución stock) y diluidas 10 veces en agua MilliQ para su caracterización.

### 7.3.2 Caracterización de lignina@AgNP

Los espectros de absorción de lignina@AgNP sintetizadas con los 3 tipos de ligninas se registraron en un espectrofotómetro Agilent Cary 60. La forma y el tamaño de lignina@AgNP se midieron por microscopía electrónica de transmisión (TEM) mediante el microscopio Jeol JEM-2100F, trabajando a una aceleración de 200 kV de tensión. Las muestras para las mediciones de TEM fueron preparadas colocando una gota de 4  $\mu$ L de la solución lignina@AgNP en rejillas de cobre recubiertas de carbono y se dejaron secar completamente. El diámetro de las NP fue determinado usando el software ImageJ<sup>®</sup>. Se obtuvo un análisis estadístico midiendo el diámetro de 200–400 NP por muestra. El potencial  $\zeta$  y la dispersión de luz dinámica (DLS) se midió en equipo Malvern Zetasizer (modelo Nano-S). La cantidad total de metal fue determinada por espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES), utilizando un equipo Agilent 5100 series ICP-OES. Para ello, triplicados de 10 mg de las soluciones se pesaron con precisión y se disolvieron en 0,8 mL de agua regia. Luego se añadieron 5 mL de agua MilliQ, y las soluciones se centrifugaron a 7000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes se resuspendieron en 10 mL de agua MilliQ. Se calculó la concentración en nM de las NP, en base a los siguientes supuestos: i) las NP son perfectamente esféricas y ii) la distribución del tamaño es monodispersa. Basado en la metodología previamente reportada (Pacioni y col., 2010) se utilizó la ecuación 1 para determinar el número de átomos por nanopartícula:

$$N = \left( \frac{R_{NP}}{r_A} \right)^3 \quad (1)$$

Donde RNP es el radio de la nanopartícula (radio promedio determinado por imagen TEM) y rA es el radio atómico covalente del metal (0.153 nm para Ag). La concentración de NP se estimó a partir de la ecuación 2:

$$C_{NP} = \frac{N_{NP}}{N_A} = \frac{N_{atoms}}{N \times N_A} = \frac{\text{moles Au}^{3+} \text{ (or Ag}^+) \times N_A}{l} \times \frac{1}{N \times N_A} \quad (2)$$

Se realizó espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR) de las lignina@AgNP y de los 3 tipos de ligninas, en un equipo Nicolet 6700 FT-IR equipado con un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR).

### 7.3.3 Estabilidad coloidal de lignina@AgNP

La estabilidad coloidal de lignina@AgNP se determinó en tres medios biológicos, buffer PBS pH 7, caldo Luria Bertani (LB) y DMEM a diferentes concentraciones (25, 37,5, 50 y 100%). En placa multiwell de 96 pocillos, se colocaron 100  $\mu$ L de la solución stock de NP y 100  $\mu$ L de las diferentes concentraciones de medios. Se consideró la estabilidad como el tiempo en el que se obtiene una disminución del 20% en la absorción del plasmón a la longitud de onda de la absorbancia máxima inicial (Weerasekera y col., 2017). Las medidas de estabilidad se llevaron a cabo usando un lector de placa SpectraMax M5 durante 10 días.

#### 7.4 Eficacia de amoxi@AuNP como fotosensibilizador para la PACT. Curvas de muerte bacteriana

La actividad antimicrobiana de amoxi@AuNP fue testeada en cultivos planctónicos de *S. aureus* meticilino sensible ATCC 29213 (SAMS ATCC 29213) y en cepas clínicas de *S. aureus* meticilino resistente 9455 (SAMR 9455) y *Pseudomonas aeruginosa* 191150 (PAE 191150).

Los cultivos bacterianos en fase de crecimiento exponencial, se suspendieron en caldo MH hasta alcanzar aproximadamente  $10^8$  UFC/mL ( $DO_{600} \approx 0,1$ ), y se ajustó el inóculo a  $10^6$  UFC/mL mediante la dilución correspondiente en buffer PBS 37,5% (pH 7).

En placa multiwell de 96 pocillos se incubaron 100  $\mu$ L de las suspensiones bacterianas con 100  $\mu$ L de las siguientes soluciones: buffer PBS 37,5% (control de crecimiento), amoxi@AuNP a las concentraciones de 0,15  $\mu$ g/mL y 1,5  $\mu$ g/mL (tratamiento) y amoxicilina trihidrato a una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 2  $\mu$ g/mL para SAMS ATCC 29213 y 32  $\mu$ g/mL para SAMR 9455. La placa fue irradiada a 37°C durante 90 min con luz blanca proveniente de un panel de iluminación LED construido *ad hoc* de 23,5 x 16,5 cm, irradiancia ( $W/m^2$ ): 216,65. En paralelo, se realizaron controles en oscuridad. Todas las muestras se ensayaron por triplicado.

Se recolectaron alícuotas de 10  $\mu$ L de cada muestra a los 0, 30, 60 y 90 min, y se realizaron diluciones seriadas 1/10 en buffer PBS, para su posterior siembra en placas de agar Mueller Hinton (AMH), mediante la técnica de siembra por microgota (Naghili y col., 2013). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 h. Las curvas de muerte bacteriana se construyeron representando gráficamente el  $\log_{10}$  de UFC/mL, en función del tiempo.

#### 7.5 Ensayos en biofilms bacterianos

##### 7.5.1 Cepas bacterianas

Los ensayos de biofilms se realizaron con cepas de *S. aureus* meticilino resistentes (SAMR 771 y SAMR 773) y *P. aeruginosa* resistente a antibióticos (PAE 191150 y PAE 189718), procedentes de aislamientos clínicos provistas por el Sanatorio Aconcagua de la ciudad de Córdoba Capital, Argentina.

##### 7.5.2 Inducción de la formación de biofilm maduro

A partir de cultivos frescos se realizó una dilución en caldo para ajustar la concentración del inóculo bacteriano a  $DO_{600} \approx 0,1$ , turbidez  $\approx 10^8$  UFC/mL. Para inducir la formación de biofilm, el caldo TS fue suplementado con glucosa a una concentración final de 0,25% p/v. Luego, al caldo suplementado, se agregó la suspensión bacteriana hasta alcanzar una concentración final de  $10^6$  UFC/mL. Se colocaron 200  $\mu$ L de esta solución a cada pocillo de la placa de poliestireno estéril y se incubó por 24 h a 37°C con agitación permanente (130 rpm). Posteriormente, se descartó el sobrenadante de la placa y se lavó cada pocillo 2 veces con 200  $\mu$ L de buffer PBS para eliminar las células planctónicas (Aiassa y col., 2014).

### 7.5.3 Cuantificación de la masa de biofilm con la tinción con Cristal Violeta (CV)

El método utilizado para la determinación de la masa de biofilm fue la tinción con CV. Este colorante interacciona con las cargas negativas de la superficie de la matriz extracelular del biofilm, así como también con la pared de las células planctónicas. Tanto las células viables, las muertas y la matriz pueden teñirse con CV, por lo que este es sólo una medida de la cantidad de masa del biofilm (Xu y col., 2016). Posterior a la inducción del biofilm, y remoción del sobrenadante, la placa de poliestireno se introdujo en cabina de flujo laminar o estufa de cultivo por 12 h, para el secado. Luego, se añadieron 200 µL de una solución de CV al 1% a cada pocillo y se dejó reposar durante 15 min. Finalmente, se lavó el exceso de CV dos veces con buffer PBS y el cristal violeta retenido por el biofilm se disolvió en alcohol/acetona 70/30 (% v/v) durante 15 min. Se midió la absorbancia un lector de microplacas Synergia Biotek a 595 nm (Martínez y col., 2016).

### 7.5.4 Eficacia de amoxi@AuNP para la PACT en biofilms maduros

La viabilidad bacteriana se midió indirectamente de forma semicuantitativa usando un ensayo colorimétrico de reducción de 2,3 bis (2 metoxi-4-nitro-5 sulfonil) 2H tetrazolio, 5 carboxanilida (XTT) y metasulfato de fenazina (PMS). El fundamento radica en la reducción de la sal de tetrazolio a su forma soluble en agua (Roehm y col., 1991). Se mide espectrofotométricamente a 490 nm y la absorbancia que arroja es indicativa de la masa de células metabólicamente activas (Zhao y col., 2020). Los biofilms bacterianos de las cepas SAMR 771, SAMR 773, PAE 191150 y PAE 189718 se formaron en una placa de 96 pocillos como se mencionó anteriormente y se incubó a 37°C durante 24 h. Posteriormente, se agregaron las siguientes soluciones: amoxi@AuNP 1,5 µg/mL en buffer PBS 37,5% pH 7 y amoxicilina trihidrato a una concentración 10x CIM para MRSA 771 y MRSA 773. Las muestras se incubaron a 37°C bajo irradiación con luz LED blanca y en condiciones de oscuridad durante 1 y 3 h. Como control de crecimiento bacteriano se incubaron biofilms sin NP en condiciones de luz y oscuridad. A cada tiempo evaluado se descartó el sobrenadante, el biofilm fue lavado dos veces con buffer PBS, se agregaron 250 µL de la solución del colorante (XTT/PMS) y se incubó en oscuridad por un período de 3 h a 37°C. Ambos reactivos (XTT/PMS) se diluyeron en 100 µL de DMSO (0,01% en la solución final) y las soluciones se realizaron en buffer PBS a las concentraciones finales de 200 µg/mL (XTT) y 20 µg/mL (PMS).

### 7.5.5 Imágenes de biofilms obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes de biofilms tratados con amoxi@AuNP para la PACT, se obtuvieron por microscopía electrónica de barrido (SEM). Esta técnica es capaz de producir imágenes tridimensionales de la superficie de una muestra con una alta resolución. Se indujo la formación de biofilm de las cepas SAMR 771 y PAE 191150 sobre cubreobjetos de vidrio. Posterior a la obtención de un biofilm maduro sobre la superficie del cubreobjetos, éste se lavó reiteradas veces con buffer PBS y finalmente se trató con amoxi@AuNP 1,5 µg/mL. Los biofilms bacterianos fueron incubados durante 3 h de contacto con las NP a 37°C bajo irradiación con luz LED blanca y en paralelo se hicieron controles en oscuridad. Luego de cada tratamiento, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con buffer PBS y se deshidrataron con soluciones de etanol: agua de concentración

creciente (50, 70, 80, 90 y 100 %) (Hrubanova y col., 2018). Finalmente, cada muestra (vidrio) se recubrió con oro y se capturaron imágenes utilizando el microscopio Carl Zeiss Sigma del laboratorio de Microscopía y Análisis por Rayos X (LAMARX) de la UNC.

#### 7.5.6 Análisis de imágenes obtenidas por SEM mediante Fiji-ImageJ®

Las imágenes obtenidas por SEM fueron procesadas con el software Fiji-ImageJ® (Schindelin y col., 2012), éste es de dominio público. Se eligieron 8 micrografías representativas obtenidas de cada tratamiento. Para poder diferenciar la superficie de biofilm del fondo de la imagen se aplicó un filtro (*median filter*) no lineal que elimina el ruido de la imagen. Inmediatamente después, la imagen se convirtió en binaria (blanco y negro, donde asigna valores de 0 y 255 para cada píxel, respectivamente) aplicando el *threshold Otsu* por *default*. Luego se cuantificó la totalidad de superficie ocupada por el biofilm para la imagen binaria. Finalmente, se realizó la sustracción (área biofilm) correspondiente a la totalidad de la superficie y así se obtuvo el valor correspondiente al porcentaje de ocupación sobre la superficie (Martínez y col., 2016).

#### 7.5.7 Viabilidad celular en biofilm maduro determinada por microscopía de escaneo láser confocal (CLSM)

El efecto de amoxi@AuNP utilizadas en PACT sobre la viabilidad celular de biofilm maduro de la cepa clínica PAE 191150 se evaluó mediante una tinción con naranja de acridina (NA) seguida de microscopía de fluorescencia (Belbekhouche y col., 2019). La formación de biofilm de la cepa PAE 191150 se realizó sobre cubreobjetos de vidrio como se explicó anteriormente. Posterior a la obtención de un biofilm maduro sobre la superficie del cubreobjetos, este se lavó con buffer PBS y se trató con amoxi@AuNP 1,5 µg/mL, otra muestra sin NP fue preparada como control. Las muestras se irradiaron durante 3 h con luz LED blanca. Las células débilmente adheridas al biofilm se eliminaron lavando con buffer PBS estéril, y el biofilm se tiñó con NA al 0,1% durante 15 min en oscuridad. Los cubreobjetos teñidos se observaron bajo un microscopio confocal invertido Olympus FV1000 en el Centro de Micro y Nanoscopía de Córdoba- CEMINCO en el Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC). Los biofilms se identificaron usando 60x, excitación a 488 nm y emisión a 525 nm.

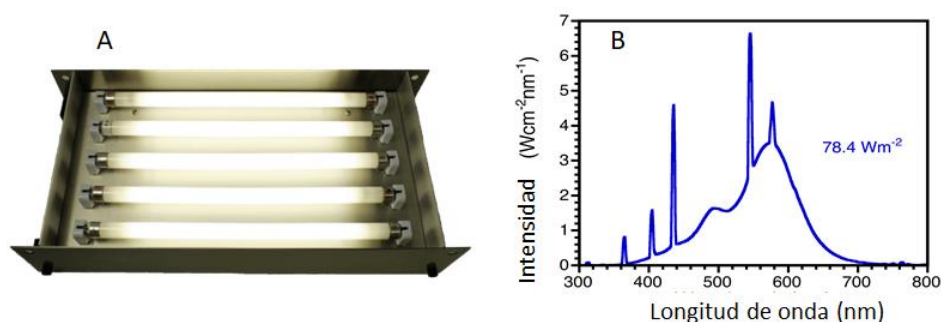
#### 7.6 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) de lignina@AgNP en cultivos planctónicos

Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) por el método de microdilución en caldo, de acuerdo a las normas internacionales propuestas por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), con pequeñas modificaciones, en cepas de referencia de *Staphylococcus aureus* meticilino sensible ATCC 25923 (*S. aureus* ATCC 25923) y *Escherichia coli* CF073 (*E. coli* CF073). El inóculo bacteriano se preparó colocando cuatro o cinco colonias de cada cepa en caldo LB y se comparó la turbidez con el tubo 0,5 de la escala de Mc Farland. Finalmente, se diluyó para ajustar el inóculo a 10<sup>6</sup> UFC/mL. En placa multiwell de 96 pocillos se colocaron 100 µL de los inóculos bacterianos y 100 µL de lignina@AgNP a diferentes concentraciones (partiendo de la solución stock) y se incubó a 37°C durante 24 h. La absorbancia a 600 nm fue medida en

un lector de placa SpectraMax M5, y se determinó como la CIM a la concentración más baja en la cual la absorbancia a 600 nm fue inferior a 0,03 (Alarcon y col., 2012). Todas las mediciones fueron ejecutadas por triplicado. Los controles sin antimicrobianos se realizaron en paralelo.

### 7.7 Actividad antimicrobiana de lignina@AgNP. Curvas de muerte bacterianas

La actividad antibacteriana de lignina@AgNP fue ensayada en cepas de *S.aureus* ATCC 25923 y *E.coli* CF073. Se prepararon inóculos bacterianos de concentración de  $10^6$  UFC/mL en caldo LB a partir de una colonia. Usando una placa multiwell de 96 pocillos, 100  $\mu$ L de cada inóculo bacteriano y 100  $\mu$ L de lignina@AgNP a la concentración CIM y subCIM fueron incubadas a 37°C bajo irradiación con luz blanca proveniente de un panel LuzChem de irradiancia total  $\sim 78 \text{ Wm}^{-2}$  (Figura 3) y en condiciones de oscuridad durante 0, 15, 30, y 60 min. Todas las muestras fueron ensayadas por triplicado. Luego, se tomaron alícuotas de 10  $\mu$ L de cada muestra y se realizaron diluciones seriadas 1/10 en caldo LB, para su posterior siembra en placas de agar MH, mediante la técnica de siembra por microgota (Naghili y col., 2013). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 h. Las curvas de muerte bacteriana se construyeron representando gráficamente el  $\log_{10}$  de UFC/mL, en función del tiempo.



**Figura 3.** (A) Panel LuzChem utilizado en PACT. (B) Espectro de emisión de las lámparas de luz blanca utilizadas para la iluminación. Irradiancia total  $78 \text{ Wm}^{-2}$ .

### 7.8 Formación de biofilm bacteriano y eficacia de lignina@AgNP en la disminución de la viabilidad celular en biofilm maduro

Para la formación de un biofilm maduro de *S.aureus* ATCC 29253, se preparó un inóculo de  $10^6$  UFC/mL a partir de una colonia, en caldo LB suplementado con glucosa al 0,25% p/v, se colocaron 200  $\mu$ L del inóculo en cada pocillo de una placa de 96 wells, se incubó durante 24 h a 37°C y luego fue enjuagado dos veces con buffer PBS para eliminar las bacterias planctónicas. Luego, 100  $\mu$ L de caldo LB y 100  $\mu$ L de álcali@AgNP 0,02 nM, Al@AgNP 2,9 nM, ZHL@AgNP 9,8 nM y muestras sin NP como control de crecimiento fueron agregadas por triplicado, incubadas e irradiadas con luz blanca durante 3 h a 37°C, las mismas condiciones en paralelo fueron realizadas en oscuridad como control. La viabilidad bacteriana se determinó usando el ensayo de MTT. Los biofilms tratados con lignina@AgNP y sin tratar se lavaron una vez con buffer PBS. Una alícuota de 200  $\mu$ L de solución de MTT (200 mg/mL) se añadió a cada pocillo y se incubó en oscuridad

durante 3 h 37°C. La absorbancia a 570 nm se midió en un lector de placa SpectraMax M5. El porcentaje de viabilidad en el biofilm fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

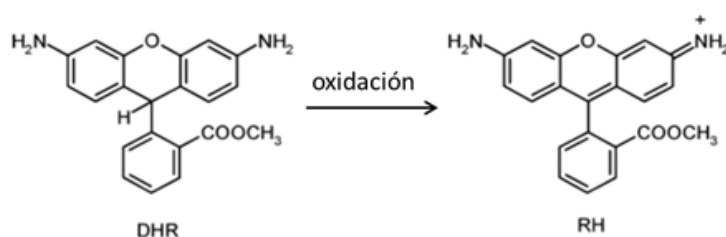
$$\text{Biofilm}\% = \frac{\text{Abs}_{t_0}^{570} - \text{Abs}_{t_x}^{570}}{\text{Abs}_{t_0}^{570}} \times 100\%$$

Donde  $\text{Abs}_{t_0}^{570}$  es la absorción en el tiempo 0 h, antes tratamiento con las NP, y  $\text{Abs}_{t_x}^{570}$  es la absorción en presencia de las NP en cualquier tiempo específico.

## 7.9 Estudio del mecanismo de acción de amoxi@AuNP

### 7.9.1 Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y especies reactivas del nitrógeno (ERNs) por espectrofluorimetría utilizando la sonda 1,2,3-Dihidrorodamina (DHR)

Se eligió la sonda DHR por su alta sensibilidad para cuantificar EROs totales y ERNs (Dikalov y col., 2014). La molécula de DHR (Figura 1) en presencia de EROs y ERNs se oxida a su forma fluorescente hidrorodamina (HR) (especie catiónica y altamente lipofílica). Esta se excita a 505 nm y emite a la longitud de onda de 530 nm (Bortolami y col., 2009). Se preparó un cultivo fresco de la cepa clínica SAMR 9455 en 10 mL de caldo MH y se incubó por 18 h a 37°C ( $\text{DO}_{600} \approx 1$ ), luego se centrifugó a 2000 rpm por 10 min y se procedió a resuspender el pellet en 5 mL de buffer PBS ( $10^9$  UFC/mL). En una placa multiwell negra de poliestireno, de 96 pocillos con fondo plano transparente, se incubaron 100  $\mu\text{L}$  del inóculo bacteriano con 100  $\mu\text{L}$  de amoxi@AuNP 1,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por triplicado, las muestras fueron irradiadas con luz LED blanca durante 10, 30, 60 y 90 min. Posterior al período de incubación, se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de la sonda DHR (concentración final 1  $\mu\text{M}$ , solubilizada en 100  $\mu\text{L}$  de DMSO y PBS) y se conservó en oscuridad por 20 min a 37°C. La intensidad fluorescente se midió en un lector de microplacas Synergia Biotek.



**Figura 1.** Oxidación de la molécula no fluorescente DHR a su especie fluorescente HR.

### 7.9.2 Actividad antimicrobiana de amoxi@AuNP en cultivos planctónicos de cepas anaerobias facultativas

El estudio del mecanismo se profundizó mediante la actividad antimicrobiana de las NP testada en cultivos planctónicos de cepas anaerobias facultativas de *Streptococcus mutans*, *S. mitis*, y *Lactobacillus* spp. Los inóculos iniciales ( $10^6$  UFC/mL) de cada cepa fueron preparados en buffer PBS 37,5% a partir de una colonia.

En placa multiwell de 96 pocillos se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de los inóculos bacterianos y 100  $\mu\text{L}$  de amoxi@AuNP 1,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por triplicado, las muestras fueron incubadas e irradiadas con luz LED blanca durante 30 min a 37°C en jarra de anaerobiosis. Después de este período, se tomaron alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra y se realizaron diluciones seriadas 1/10 en buffer PBS, para su posterior siembra en placas de Petri de agar sangre, mediante la técnica de siembra por microgota (Naghili y col., 2013). Las placas fueron incubadas durante 24 h a 37°C en jarra de anaerobiosis. Las curvas de muerte bacteriana se construyeron representando gráficamente el  $\log_{10}$  de UFC/mL en función del tiempo.

### *7.9.3 Análisis del daño inducido por amoxi@AuNP en la PACT mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)*

Para este estudio se realizaron co-cultivos de SAMR 9455 y PAE 191150 con células sanguíneas provenientes de donantes voluntarios sanos de Córdoba capital, Argentina, y se empleó Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) para obtener imágenes de células bacterianas y glóbulos rojos. Las cepas SAMR 9455 y PAE 191150 se cultivaron en caldo MH (24 h a 37°C), estas suspensiones bacterianas se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min, y el pellet resultante se diluyó en buffer PBS 37,5% para ajustar los inóculos a una concentración de  $10^8$  UFC/mL ( $\text{DO}_{600} \approx 0,1$ ). Los co-cultivos se realizaron agregando 100  $\mu\text{L}$  de sangre fresca anticoagulada con EDTA, y 50  $\mu\text{L}$  de cultivo bacteriano, y se trataron con 50  $\mu\text{L}$  de amoxi@AuNP 1,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por un periodo de 10 min a 37°C, bajo irradiación con luz LED blanca y en paralelo otra muestra con las mismas condiciones fue incubada en oscuridad como control. Luego de 10 min de incubación, las muestras se centrifugaron 3 veces consecutivas por 5 min a 3000 rpm y se lavaron con buffer PBS. Los pellets obtenidos se fijaron con una solución de glutaraldehído al 2 % y formaldehído al 4 %, en la proporción 1:1. Posterior a la fijación se trataron nuevamente con tetróxido de osmio al 1% en buffer cacodilato 0,1 M por un periodo de 2 h. Luego se deshidrataron y embebieron en un taco de resina (Araldite) para ser cortadas con ultramicrotomo JEOL JUM-7 y montadas sobre una rejilla de níquel. Las muestras se examinaron con un microscopio Nikon Zeiss LEO 906E del Centro de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina de la UNC (Zheng y col., 2015).

### *7.10 Investigación de la actividad hemolítica de amoxi@AuNP*

Se evaluó la capacidad de amoxi@AuNP de producir hemólisis en glóbulos rojos obtenidos de sangre periférica humana proveniente de voluntarios sanos de Córdoba capital, Argentina, posterior a la extracción se añadió EDTA como agente anticoagulante. Inmediatamente, 10 mL de las muestras fueron centrifugadas por 10 min a 2000 rpm y lavadas una vez con buffer PBS. El pellet se resuspendió en 10 mL de buffer PBS y se tomaron alícuotas de 500  $\mu\text{L}$ , las que fueron incubadas con 500  $\mu\text{L}$  de las siguientes soluciones: amoxi@AuNP 1,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (tratamiento), agua MilliQ (control positivo de hemólisis, representando el 100% de hemólisis) y solución acuosa de NaCl 0,9% (blanco, representando el grado de hemólisis basal que pudiera haber por interferencias en la técnica). Las muestras fueron irradiadas con luz LED blanca y en oscuridad durante 0, 2, 5 y 24 h a 37°C. Las muestras incubadas se centrifugaron por 10 min a 1000 rpm, se transfirieron 150  $\mu\text{L}$  del sobrenadante a una placa de poliestireno transparente y se midió la absorbancia a 540 nm por triplicado (Choi y col., 2011), en un lector de



microplacas Synergia Biotek. Los resultados se obtuvieron al restar el blanco a las absorbancias (Abs) obtenidas de las muestras con NP y en referencia al 100 % de hemólisis establecido con agua MilliQ:

- Abs final de la muestra con amoxi@AuNP = Abs inicial de la muestra con amoxi@AuNP - Blanco
- Abs final de la muestra control positivo hemólisis = Abs inicial de la muestra control positivo hemólisis - Blanco

$$\% \text{ de hemólisis de la muestra con amoxi@AuNP} = (\text{Abs}_{540} \text{ amoxi@AuNP} \times 100) / \text{Abs}_{540} \text{ control positivo hemólisis}$$

### 7.11 Viabilidad celular de amoxi@AuNP en fibroblastos 3T3

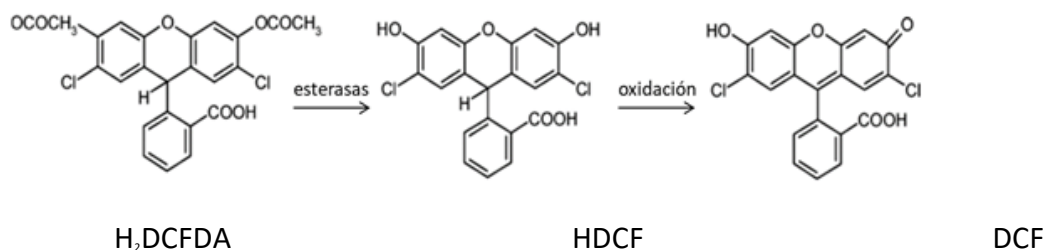
Los fibroblastos 3T3 se cultivaron en Dulbecco 's Modified Eagle's Medium (DMEM) con 10% de suero de ternera a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Las células se cultivaron hasta obtener un 85-95% de confluencia, luego se lavaron con solución buffer fosfato (Invitrogen) y fueron tripsinizadas con 1 mL de tripsina al 0,05%, ácido etilendiaminotetraacético 0,53 mM, y rojo de fenol. La tripsinización se detuvo agregando medio fresco a la reacción. Las células se lavaron dos veces por centrifugación con DMEM sin suero, fueron resuspendidas en medio sin suero, y aproximadamente 10<sup>5</sup> células fueron colocadas por pocillo en placa multiwell de 96 pocillos, después del recuento adecuado de células en cámara Neubauer. Las células fueron incubadas durante la noche a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% humedad para permitir la fijación y luego fueron tratadas, por triplicado, con amoxi@AuNP 1,5 µg/mL, amoxicilina trihidrato 32 µg/mL, AuNP 0,2 mM, buffer PBS al 37,5%, y medio DMEM e irradiadas con luz LED blanca y en paralelo en condiciones de oscuridad como control, durante 24 h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% humedad. El ensayo con 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) basado en la reducción de la sal de tetrazolio a cristales de formazán en células vivas se realizó de acuerdo con un protocolo Sigma para determinar el porcentaje de supervivencia (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11465007001?lang=en%2%AEion=CA>). Los medios y los diferentes tratamientos fueron descartados, se colocaron 100 µL de medio sin suero, ni rojo fenol. Se añadieron 50 µL de MTT (mg/mL) en solución buffer libre de calcio y magnesio, y la placa fue incubada por 4 h a 37°C para permitir la formación de cristales de formazán. Luego, el sobrenadante fue descartado y se añadió DMSO para disolver los cristales de formazán. El producto obtenido se cuantificó mediante un lector de placa SpectraMax M5 a 540 nm. El porcentaje de viabilidad se obtuvo de la siguiente forma:

$$\% \text{ Viabilidad} = (\text{DO células tratadas} / \text{DO células control}) \times 100$$

## 7.12 Estudio del mecanismo de acción de lignina@AgNP.

### 7.12.1 Cuantificación de EROs y ERNs en cultivos planctónicos por espectrofluorimetría utilizando la sonda fluorescente diacetato 2',7'-dicloro-hidro-fluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA)

Utilizando la técnica de microscopía de fluorescencia se cuantificó la producción, en general, tanto de EROs como de ERNs (Wrona y col., 2005). Los colorantes fluorescentes presentan la capacidad de oxidarse o reducirse frente a diversas especies reactivas y emitir fluorescencia. El colorante fluorescente H<sub>2</sub>DCFDA (figura 2) se oxida en presencia de EROs y ERNs, excitándose a 490 nm y emitiendo luz a 520 nm (Tamosiune y col., 2018). En caldo LB (10 mL) se prepararon cultivos frescos de las cepas *S.aureus* ATCC 25923 y *E.coli* CF073 por 24 h a 37°C (DO<sub>600</sub>≈1), los cuales se centrifugaron a 1100 rpm por 10 min y se procedió a resuspender los pellets en buffer PBS (5 mL) para obtener una concentración de bacterias de ≈ 10<sup>9</sup> UFC/mL. En una placa multiwell negra de poliestireno, de 96 pocillos con fondo plano transparente, se colocaron 100 μL del inóculo bacteriano con 100 μL de álcali@AgNP 0,02 nM, Al@AgNP 2,9 nM, ZHL@AgNP 9,8 nM, por triplicado, las muestras fueron incubadas en condiciones de luz y oscuridad a 37°C durante 10, 30 y 60 min. Luego del período de incubación, se añadieron 20 μL de la solución de H<sub>2</sub>DCFDA (2 μM) y posteriormente se incubó en oscuridad por 25 min a 37°C. La intensidad fluorescente se obtuvo mediante la excitación de las muestras a 490 nm y recolectando la emisión fluorescente a 520 nm, utilizando un lector de placa SpectraMax M5. En paralelo, se realizaron controles positivos con peróxido de hidrógeno 2% v/v y negativos con las cepas no tratadas.



**Figura 2.** La sonda H<sub>2</sub>DCFDA es degradada por esterasas una vez que ingresa a la célula pasando a su forma 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína (HDCF) la cual en presencia de ERO y ERN es oxidada a la especie emisora 2',7'-diclorofluoresceína (DCF).

### 7.13 Viabilidad celular de lignina@AgNP en fibroblastos 3T3

Los fibroblastos 3T3 se cultivaron en Dulbecco's Medio de Eagle modificado (DMEM) con suero de ternera al 10%. Las células se cultivaron y agruparon usando poli-L-lisina, y luego se lavaron con buffer PBS y con 1 mL de tripsina al 0,05%. La tripsinización se detuvo agregando medio fresco a la reacción. Las células se lavaron una vez por centrifugación con DMEM sin suero, resuspendido en medio sin suero, y se sembraron aproximadamente 100 μL de 10<sup>5</sup> células por pocillo en placa multiwell, después de recuento de células en una cámara de Neubauer. Se incubaron durante la noche para permitir la fijación y luego se trataron con 100 μL de álcali@AgNP 0,02 nM,

Al@AgNP 2,9 nM, ZHL@AgNP 9,8 nM, lignina a una concentración de 0,1 mg/mL, AgNO<sub>3</sub> 0,1 mg/mL y medio DMEM, las muestras fueron irradiadas con luz blanca durante 1 hora. Paralelamente, se probaron las mismas condiciones en oscuridad. Las células se mantuvieron en ese período a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Se llevó a cabo el ensayo MTT basado en la reducción de la sal de tetrazolio a formazan (absorbancia a 570 nm) en células vivas según un protocolo Sigma (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11465007001?lang=en%2%A&ion=CA>) para determinar el porcentaje de supervivencia.

## **7.14 Desarrollo y caracterización de formulaciones tópicas de amoxi@AuNP**

### *7.14.1 Desarrollo de gel de amoxi@AuNP para aplicación tópica*

Los geles de amoxi@AuNP fueron formulados a partir del método de dispersión (Sareen y col., 2011). En este método se utilizaron dos polímeros reticulados del ácido poliacrílico, Carbopol® 934 y Carbopol® ultrez 10, en donde concentraciones de 0,5 y 1% p/v de cada polímero fueron dispersadas lentamente sobre una suspensión de amoxi@AuNP de concentración 1,5 ug/mL. La dispersión obtenida se dejó durante 24 h a temperatura ambiente en vial de vidrio tapado para favorecer la hidratación del polímero Carbopol® 934, y 30 min para el polímero Carbopol® ultrez 10, posteriormente se agitaron las dispersiones y se agregó gota a gota trietanolamina (neutralizador no iónico) hasta alcanzar pH 7. Esta reacción de neutralización en medio acuoso permite que el carbopol incremente su volumen y simultáneamente su viscosidad (Desfrançois y col., 2018). En paralelo, como control, se realizaron formulaciones con ambos polímeros al 0,5 y 1% p/v en agua milliQ sin NP.

### *7.14.2 Estabilidad de geles de amoxi@AuNP para aplicación tópica*

Se realizaron estudios de estabilidad acelerada de los geles de amoxi@AuNP y los geles sin NP como control, durante 12 semanas. Las formulaciones fueron almacenadas en viales de vidrio sellados, y colocados en gabinete de estabilidad a 40 ± 2°C y 75% de humedad relativa (L.I.A.D.E). Cada dos semanas del primer mes y luego una vez al mes, las muestras fueron analizadas para determinar la claridad, la estabilidad coloidal de amoxi@AuNP, el pH y las propiedades reológicas de las formulaciones (Sareen y col., 2011).

Para evaluar la estabilidad coloidal de amoxi@AuNP en las formulaciones, la absorción del plasmón de superficie de las NP fue medido mediante espectrofotometría. La estabilidad es el tiempo en el que se obtiene una disminución del 20% en la absorción del plasmón a la longitud de onda de la absorbancia máxima inicial (Weerasekera y col., 2017). Las medidas de estabilidad se llevaron a cabo usando un lector de placa BioTek durante 3 meses. Aquellas formulaciones donde se detectaron cambios en el máximo de absorción de las NP en las primeras semanas, fueron descartadas para estudios posteriores.

El pH de cada lote de gel se determinó utilizando un medidor digital de pH precalibrado marca HANNA Corp. Para ello, 1 gr de cada formulación de gel fue dispersado en 30 mL de agua MQ y se almacenó durante 2 h, luego el electrodo del medidor de pH fue sumergido en la suspensión hasta obtener una lectura constante. Las

mediciones de pH de cada formulación se realizaron por triplicado y se calcularon valores promedio (El-Housiny y col., 2018).

Se llevaron a cabo estudios reológicos de las formulaciones de geles, mediante un reómetro del Departamento de Química Orgánica de la FCQ-UNC. Se realizaron dos mediciones, una oscilatoria, que nos brinda información de cómo se encuentra el sistema en estado de equilibrio, y una medición rotacional que brinda información acerca del historial de desestructuración del sistema. En la medición oscilatoria se realizó un barrido de deformación de la muestra a temperatura constante de 20°C (gráfico de los módulos  $G'$  y  $G''$  vs deformación), donde se analizó el rango viscoelástico lineal de la muestra, a partir de las curvas  $G'$  (parte elástica) y  $G''$  (parte viscosa). A partir de este gráfico se seleccionó un porcentaje de deformación del 2 % y se realizó un barrido de frecuencia analizando las curvas de los módulos  $G'$  y  $G''$  (Tuncay Tanriverdi y col., 2018).

### *7.15 Síntesis in situ de nanoplacas de oro como recubrimiento antifouling para dispositivos médicos*

#### *7.15.1 Síntesis y caracterización de nanoplacas de oro*

Para la síntesis de nanoplacas de oro se utilizó como precursor de oro al ácido tetracloroaurico trihidrato ( $AuHCl_4 \cdot 3H_2O$ ) y como agente reductor un antibiótico aminoglucósido. Se prepararon soluciones de  $AuHCl_4 \cdot 3H_2O$  0,1 M y del antibiótico aminoglucósido 1 M disolviendo directamente los sólidos en agua MilliQ. Luego, iguales cantidades de cada solución (500  $\mu$ L) se colocaron gota a gota en un tubo Falcon que contenía 4,5 mL de agua MilliQ, agitando la solución con la ayuda de un vórtex. La solución final se calentó durante pocos minutos en un baño de agua termostatzado a temperatura constante. El calentamiento por microondas también fue probado con un aparato de microondas doméstico de uso convencional (calentado durante 3 ciclos de 10 segundos cada uno, dejando que la mezcla descanse a temperatura ambiente durante 30 segundos luego de cada ciclo). Todas las soluciones fueron preparadas en el momento antes de la síntesis y se estabilizaron a temperatura ambiente durante 1 minuto antes de calentar. Posteriormente, para obtener un producto sólido lo más puro posible, el contenido de Falcon se transfirió a Eppendorf limpio y se centrifugó a 3500 rpm durante 45 min. El antibiótico aminoglucósido usado en la síntesis se caracterizó usando resonancia magnética nuclear de protón ( $RMN-H^1$ ), los espectros se registraron en  $D_2O$  utilizando un espectrómetro Bruker Avance II – 400 de alta resolución en (INFIQC-CONICET - Dpto. Qca. Orgánica -FCQ-UNC). Las nanoplacas de oro obtenidas se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), equipo Carl Zeiss-Sigma del laboratorio de Microscopía y Análisis por Rayos X (LAMARX) de la UNC, con el fin de evaluar formas y tamaños de las nanoplacas. Para la determinación de estructuras cristalinas, composición y pureza de las nanoplacas se realizó espectrometría de rayos X de dispersión de energía (EDS) y difracción de rayos X (XRD) mediante un equipo Philips-PW 1800. El análisis estadístico del tamaño y forma de las nanoplacas de oro se realizaron con el software ImageJ® (Rueden y col., 2017).

### 7.15.2 Recubrimiento *in situ* con nanoplacas de oro en catéteres y prótesis de silicona

La deposición homogénea de nanoplacas de oro en un catéter urinario y prótesis de silicona se realizó mediante síntesis *in situ*, aplicando el procedimiento detallado anteriormente. Para ello, 100  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{AuHCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0,1 M, 100  $\mu\text{L}$  del antibiótico aminoglucósido 1 M y 900  $\mu\text{L}$  de agua MilliQ fueron añadidos en el interior del catéter urinario y se llevó a calentamiento en un baño termostatzado a 70°C durante 15 min. Finalmente, el catéter se lavó dos veces con agua MilliQ. Para el recubrimiento de la prótesis, fue necesaria su total inmersión en las soluciones de  $\text{AuHCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  y del antibiótico aminoglucósido.

### 7.16 Estudio de durabilidad y resistencia del recubrimiento con nanoplacas de oro

Los catéteres se sometieron a erosión líquida, gota a gota o por flujo constante, por lo que la durabilidad y resistencia del revestimiento con nanoplacas de oro se evaluaron simulando las condiciones de uso real para fines clínicos, utilizando una técnica de erosión hídrica. Con ayuda de una jeringa se bombearon 500 mL de solución fisiológica dentro de muestras de catéter recubiertas, por triplicado (Hurst y col., 2011). Se tomaron fotografías utilizando un microscopio óptico (10x, 40x y 100x), antes y después de la erosión líquida. Se utilizó el software Image J® para cuantificar el área superficial recubierta.

### 7.17 Capacidad antifouling del recubrimiento con nanoplacas de oro

Muestras de catéteres de silicona recubiertos y no recubiertos se incubaron con tres cepas bacterianas formadoras de biofilm: cepas clínicas SAMR 9455 y PAE 191150, y cepa de referencia E.coli 25922. Los catéteres se cortaron a lo largo por la mitad (longitud 1 cm, diámetro 0,015 cm) usando un bisturí afilado y se esterilizaron con luz UV en campana de flujo laminar durante 30 min (15 min en cada lado). Luego, las muestras de catéteres se incubaron en 2 mL de caldo TS suplementado con glucosa al 0,25% p/v (para promover la formación de biofilms) y se agregaron suspensiones bacterianas de cada cepa a una concentración final de  $10^6$  UFC/mL durante 24 h a 37°C con agitación constante a 130 rpm. Las muestras se retiraron y se lavaron dos veces con buffer PBS estéril para eliminar las bacterias planctónicas (Aiassa y col., 2016). Luego, las muestras de catéteres se deshidrataron con porcentajes crecientes de etanol: agua (50, 70, 80, 90 y 100%) durante 15 min en cada solución, y se secaron a temperatura ambiente. Mediante microscopía electrónica de barrido con detector EDS (SEM/EDS) utilizando un equipo Carl Zeiss-Sigma, se evaluó la formación de biofilms bacterianos en las muestras de catéteres recubiertos con nanoplacas de oro y muestras sin recubrir como control. Las muestras fueron recubiertas con oro y montadas sobre una película de carbono. El aumento seleccionado fue suficiente para apreciar en detalle la morfología general de las muestras en estudio. El análisis EDS se utilizó para determinar la distribución del recubrimiento con nanoplacas de oro y para diferenciar las partículas de oro de las bacterias. La formación de biofilms sobre la superficie de los catéteres recubiertos y sin recubrir se midió mediante el uso del software Image J®.

## BIBLIOGRAFÍA

### A

- Aadil KR, Barapatre A, Meena AS, Jha H. Hydrogen peroxide sensing and cytotoxicity activity of Acacia lignin stabilized silver nanoparticles. *Int J Biol Macromol*. 2016 Jan; 82:39-47.
- Aadil KR, Barapatre A, Sahu S, Jha H, Tiwary BN. Free radical scavenging activity and reducing power of Acacia nilotica wood lignin. *Int J Biol Macromol*. 2014 Jun; 67:220-7.
- Aadil KR, Mussatto SI, Jha H. Synthesis and characterization of silver nanoparticles loaded poly (vinyl alcohol)-lignin electrospun nanofibers and their antimicrobial activity. *Int J Biol Macromol*. 2018 Dec; 120(Pt A):763-767.
- Abedon ST. Phage therapy of pulmonary infections. *Bacteriophage*. 2015 Apr 18; 5(1):e1020260.
- Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*. 2011 Mar; 1(2):66-85.
- Aguayo-Reyes A, Quezada-Aguiluz M, Mella S, Riedel G, Opazo-Capurro A, Bello-Toledo H, Domínguez M, González-Rocha G. Bases moleculares de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus* [Molecular basis of methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*]. *Rev Chilena Infectol*. 2018; 35(1):7-14.
- Ahamed M, Alsalhi MS, Siddiqui MK. Silver nanoparticle applications and human health. *Clin Chim Acta*. 2010 Dec 14; 411(23-24):1841-8.
- Aiassa V, Barnes AI, Albesa I. Macromolecular oxidation in planktonic population and biofilms of *Proteus mirabilis* exposed to ciprofloxacin. *Cell Biochem Biophys*. 2014 Jan; 68 (1):49-54.
- Aiassa V, Zoppi A, Becerra MC, Albesa I, Longhi MR. Enhanced inhibition of bacterial biofilm formation and reduced leukocyte toxicity by chloramphenicol: $\beta$ -cyclodextrin: N - acetylcysteine complex. *Carbohydrate Polymers* 2016; 152:672–8.
- Akaighe N, Maccuspie RI, Navarro DA, Aga DS, Banerjee S, Sohn M, Sharma VK. Humic acid-induced silver nanoparticle formation under environmentally relevant conditions. *Environ Sci Technol*. 2011 May 1; 45(9):3895-901.
- Alarcon EI, Udekwu K, Skog M, Pacioni NL, Stamplecoskie KG, González-Béjar M, Poliseti N, Wickham A, Richter-Dahlfors A, Griffith M, Scaiano JC. The biocompatibility and antibacterial properties of collagen-stabilized, photochemically prepared silver nanoparticles. *Biomaterials*. 2012 Jun; 33(19):4947-56.
- Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu X-H, Childs CJ, Sibata CH. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiag Photodynam Ther*. 2004; 1:27–42.
- Almog M, Yanovskay A, Edelstein H, Schwartz N, Colodner R, Chazan B. Increasing antimicrobial resistance in long-term care facility patients with bacteremia: A 5 Year's Surveillance. *J Am Med Dir Assoc*. 2018 Nov; 19(11):1024-1026.e1.
- Alomari E, Bruno S, Ronda L, Paredi G, Bettati S, Mozzarelli A. Protein carbonylation detection methods: A comparison. *Data Brief*. 2018 Jul 3; 19:2215-2220.
- Amoxicillin, Disponible en URL: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01060>, último acceso junio 2020).
- Andersen R, Loebel N, Hammond D and Wilson M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planning. *J Clin Dent*. 2007, 18, 34–38.
- Andersson DI, Hughes D, Kubicek-Sutherland JZ. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resist Updat*. 2016 May; 26:43-57.
- Antonelli M, De Pascale G, Ranieri VM, Peláia P, Tufano R, Piazza O, Zangrillo A, Ferrario A, De Gaetano A, Guaglianone E, Donelli G. Comparison of triple-lumen central venous

catheters impregnated with silver nanoparticles (AgTive®) vs conventional catheters in intensive care unit patients. *J Hosp Infect.* 2012 Oct; 82(2):101-7.

- Arafa MG, El-Kased RF, Elmazar MM. Thermo-responsive gels containing gold nanoparticles as smart antibacterial and wound healing agents. *Sci Rep.* 2018 Sep 12; 8(1):13674.
- Arruda MDM, da Paz Leôncio Alves S, da Cruz Filho IJ, de Sousa GF, de Souza Silva GA, do Nascimento Santos DKD, do Carmo Alves de Lima M, de Moraes Rocha GJ, de Souza IA, de Melo CML. Characterization of a lignin from *Crataeva tapia* leaves and potential applications in medicinal and cosmetic formulations. *Int J Biol Macromol.* 2021 Mar 15; 180:286-298.
- Artini M, Papa R, Cellini A, Tilotta M, Barbato G, Koverech A, Selan L. Effect of betamethasone in combination with antibiotics on gram positive and gram negative bacteria. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2014 Oct-Dec; 27(4):675-82.
- AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano.* 2009 Feb 24; 3(2):279-90.
- Au L, Lim B, Colletti P, Jun YS, Xia Y. Synthesis of gold microplates using bovine serum albumin as a reductant and a stabilizer. *Chem Asian J.* 2010 Jan 4; 5(1):123-9.
- Azevedo MM, Lisboa C, Cobrado L, Pina-Vaz C, Rodrigues A. Hard-to-heal wounds, biofilm and wound healing: an intricate interrelationship. *Br J Nurs.* 2020 Mar 12; 29(5):S6-S13.
- Aziz W, Jassim HA. A novel study of pH influence on Ag nanoparticles size with antibacterial and antifungal activity using green synthesis. *World Sci News.* 2018; 97:139–152.

## B

- Bakshi MS. Nanoshape Control Tendency of Phospholipids and Proteins: Protein Nanoparticle Composites, Seeding, Self-Aggregation, and Their Applications in Bionanotechnology and Nanotoxicology. *J Phys Chem C.* 2011; 115, 29, 13947-13960.
- Baltazar LM, Ray A, Santos DA, Cisalpino PS, Friedman AJ, Nosanchuk JD. Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections. *Front Microbiol.* 2015 Mar 13; 6:202.
- Banerjee I, Pangule RC, Kane RS. Antifouling coatings: recent developments in the design of surfaces that prevent fouling by proteins, bacteria, and marine organisms. *Adv Mater.* 2011 Feb 8; 23(6):690-718.
- Banfi S, Caruso E, Buccafurni L, Battini V, Zazzaron S, Barbieri P, Orlandi V. Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: an in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria. *J Photochem Photobiol B.* 2006 Oct 2; 85(1):28-38.
- Bebbington C, Yarranton G. Antibodies for the treatment of bacterial infections: current experience and future prospects. *Curr Opin Biotechnol.* 2008 Dec; 19(6):613-9.
- Begun J, Gaiani JM, Rohde H, et al. Staphylococcal biofilm exopolysaccharide protects against *Caenorhabditis elegans* immune defenses. *PLoS Pathog.* 2007; 3(4):e57.
- Belbekhouche S, Bousserrhine N, Alphonse V, Le Floch F, Charif Mechiche Y, Menidjel I, Carbonnier B. Chitosan based self-assembled nanocapsules as antibacterial agent. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2019 Sep 1; 181:158-165.
- Belbekhouche S, Bousserrhine N, Alphonse V, Le Floch F, Charif Mechiche Y, Menidjel I, Carbonnier B. Chitosan based self-assembled nanocapsules as antibacterial agent. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2019 Sep 1; 181:158-165.
- Benoit DSW, Sims KR Jr, Fraser D. Nanoparticles for oral biofilm treatments. *ACS Nano.* 2019 May 28; 13(5):4869-4875.

- Berghel J, Frodeson S, Granstrom K, Renstrom R, Stahl M, Nordgren D and Tomani P. The effects of kra lignin additives on wood fuel pellet quality, energy use and shelf life. *Fuel Process Technol.* 2013; 112, 64.
- Bhaskar K, Krishna Mohan C, Lingam M, Jagan Mohan S, Venkateswarlu V, Madhusudan Rao Y, Bhaskar K, Anbu J, Ravichandran V. Development of SLN and NLC enriched hydrogels for transdermal delivery of nitrendipine: in vitro and in vivo characteristics. *Drug Dev Ind Pharm.* 2009 Jan; 35(1):98-113.
- Bhattacharjee S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J Control Release.* 2016 Aug 10; 235:337-351.
- Bilecka I, Niederberger M. Microwave chemistry for inorganic nanomaterials synthesis. *Nanoscale.* 2010 Aug; 2(8):1358-74.
- Bisson-Boutelliez C, Fontanay S, Finance C, Kedzierewicz F. Preparation and physicochemical characterization of amoxicillin beta-cyclodextrin complexes. *AAPS PharmSciTech.* 2010 Jun; 11(2):574-81.
- Björling G, Johansson D, Bergström L, Strekalovsky A, Sanchez J, Frostell C, Kalman S. Evaluation of central venous catheters coated with a noble metal alloy-A randomized clinical pilot study of coating durability, performance and tolerability. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2018 Aug; 106(6):2337-2344.
- Bönnemann H, Richards R. Nanoscopic Metal Particles – Synthetic Methods and Potential Applications. *Europ J of Inorg Chem.* 2001; 10, P2455-2480
- Bortolami S, Cavallini L. Enhanced detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cells expressing horseradish peroxidase. *Free Radic Res.* 2009 May; 43(5):446-56.
- Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 2005 Mar; 3(3):238-50.
- Brown AN, Smith K, Samuels TA, Lu J, Obare SO, Scott ME. Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78(8):2768-2774.
- Bryers JD. Medical biofilms. *Biotechnol Bioengin.* 2008; 100(1), 1–18.
- Bui LM, Turnidge JD, Kidd SP. The induction of *Staphylococcus aureus* biofilm formation or small colony variants is a strain-specific response to host-generated chemical stresses. *Microbes Infect.* 2015; 17(1):77–82.

## C

- Campos EVR, Pereira AES, de Oliveira JL, Carvalho LB, Guilger-Casagrande M, de Lima R, Fraceto LF. How can nanotechnology help to combat COVID-19? Opportunities and urgent need. *J Nanobiotechnology.* 2020 Sep 5; 18(1):125.
- Cardoso-Avila PE, Pichardo-Molina JL, Krishna CM. Photochemical transformation of silver nanoparticles by combining blue and green irradiation. *J Nanopart Res.* 2015; 17, 160.
- Carnovale C, Bryant G, Shukla R, Bansal V. Size, shape and surface chemistry of nano-gold dictate its cellular interactions, uptake and toxicity. *Progress in Mater Science.* 2016 Oct; 83, 152-190.
- Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2004 Dec; 1(4):279-93.
- Ceriana P, Guerriero L, Pasterán F, Callejo R, Prieto M, Tuduri E et al. Programa Nacional de Control de Calidad en Bacteriología: desempeño de laboratorios de Argentina en la detección de mecanismos de resistencia emergentes (Abstract). VII Congreso SADEBAC, Buenos Aires, Argentina, 27-29 junio, 2012.



- Chamakura K, Perez-Ballester R, Luo Z, Bashir S, Liu J. Comparison of bactericidal activities of silver nanoparticles with common chemical disinfectants. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011 May 1; 84(1):88-96.
- Chamundeeswari M, Sobhana SS, Jacob JP, Kumar MG, Devi MP, Sastry TP, Mandal AB: Preparation, characterization and evaluation of a biopolymeric gold nanocomposite with antimicrobial activity. *Biotechnol Appl Biochem*. 2010, 55(1):29-35.
- Chang SF, Yang YT, Li WL, Lin CT, Tsai T. Enhancement of 5-aminolevulinic acid-induced photodynamic therapy by a bioadhesive polymer. *J Dent Res*. 2010 Mar; 5(1):30–35.
- Chaudhary AS. A review of global initiatives to fight antibiotic resistance and recent antibiotics' discovery. *Acta Pharm Sin B*. 2016 Nov; 6(6):552-556.
- Chen F, Li X, Hihath J, Huang Z, Tao N. Effect of anchoring groups on single-molecule conductance: comparative study of thiol-, amine-, and carboxylic-acid-terminated molecules. *J Am Chem Soc*. 2006 Dec 13; 128(49):15874-81.
- Chen M, Yu Q, Sun H. Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections. *Int J Mol Sci*. 2013 Sep 6; 14(9):18488-501.
- Cheng Y, Yin L, Lin S, Wiesner M, Bernhardt E, Liu J. Toxicity Reduction of Polymer-Stabilized Silver Nanoparticles by Sunlight. *The J of Phys Chem C*. 2011; 115 (11), 4425-4432.
- Choi J, Reipa V, Hitchins VM, Goering PL, Malinauskas RA. Physicochemical characterization and in vitro hemolysis evaluation of silver nanoparticles. *Toxicol Sci*. 2011 Sep; 123(1):133-43.
- Christaki E, Marcou M, Tofarides A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *J Mol Evol*. 2020 Jan; 88(1):26-40.
- Cieplik F, Deng D, Crielaard W, Buchalla W, Hellwig E, Al-Ahmad A, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. *Crit Rev Microbiol*. 2018 Sep; 44(5):571-589.
- Ciofu O, Rojo-Molinero E, Macià MD, Oliver A. Antibiotic treatment of biofilm infections. *APMIS*. 2017 Apr; 125(4):304-319.
- Clement JL, Jarrett PS. Antibacterial silver. *Met. Based Drugs*. 1994; 1(5–6), 467–482.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard—7 th Edition*. CSLI document M7–A7, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, U.S.A., 2012.
- Coates AR, Halls G, Hu Y. Novel classes of antibiotics or more of the same?: new antibiotic classes are urgently needed. *Br J Pharmacol*. 2011; 163, 184–194.
- Cordero J, Munuera L, Folgueira MD. The influence of the chemical composition and surface of the implant on infection. *Injury*. 1996; 27 Suppl 3:SC34-7.
- Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol*. 2013 Feb; 11(2):95-105.
- Cox JAG, Worthington T. The 'Antibiotic Apocalypse' - Scaremongering or Scientific Reporting? *Trends Microbiol*. 2017 Mar; 25(3):167-169.
- Crisante F, Taresco V, Donelli G, Vuotto C, Martinelli A, D'Ilario L, Pietrelli L, Francolini I, Piozzi A. Antioxidant hydroxytyrosol-based polyacrylate with antimicrobial and antiadhesive activity versus *Staphylococcus epidermidis*. *Adv Exp Med Biol*. 2016; 901:25-36.

## D

- D'Agostino A, Taglietti A, Grisoli P, Dacarro G, Cucca L, Patrinic M, Pallavicini P. Seed mediated growth of silver nanoplates on glass: exploiting the bimodal antibacterial effect by near IR photo-thermal action and Ag<sup>+</sup> release. *RSC Adv*. 2016 Jul 19; 6, 70414.

- Dai T, Tegos GP, Lu Z, Huang L, Zhiyentayev T, Franklin MJ, Baer DG, Hamblin MR. Photodynamic therapy for *Acinetobacter baumannii* burn infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Sep; 53(9):3929-34.
- Dai T, Huang YY, Sharma SK, Hashmi JT, Kurup DB, Hamblin MR. Topical antimicrobials for burn wound infections. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2010 Jun; 5(2):124-51.
- Das A, Kumar A, Patil NB, Viswanathan C, Ghosh D. Preparation and characterization of silver nanoparticle loaded amorphous hydrogel of carboxymethylcellulose for infected wounds. *Carbohydr Polym*. 2015; 130:254–261.
- Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*. 2003; 2:114-22. Review.
- de Alteriis E, Maselli V, Falanga A, Galdiero S, Di Lella FM, Gesuele R, Guida M, Galdiero E. Efficiency of gold nanoparticles coated with the antimicrobial peptide indolicidin against biofilm formation and development of *Candida* spp. clinical isolates. *Infect Drug Resist*. 2018 Jul 3; 11:915-925.
- Decraene V, Pratten J, Wilson M. Cellulose acetate containing toluidine blue and rose bengal is an effective antimicrobial coating when exposed to white light. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Jun; 72(6):4436-9.
- Dees CH, Scott TC, Wachter EA, Fisher WG, Smolik J. Intracorporeal Medicaments for Photodynamic Treatment of Disease. 2011:20110097280.
- Degitz K, Plewig G, Gollnick H. Ergänzende Verfahren in der Aknetherapie--Aktualisierung 2010 [Adjunctive acne therapies--2010]. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2010 Mar; 8 Suppl 1:S75-80. German.
- Del Pozo JL, Alonso M, Serrera A, Hernaez S, Aguinaga A, Leiva J. Effectiveness of the antibiotic lock therapy for the treatment of port-related enterococci, Gram-negative, or Gram-positive bacilli bloodstream infections. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009 Feb; 63(2):208-12.
- Del Pozo JL, Rodil R, Aguinaga A, Yuste JR, Bustos C, Montero A, Espinosa G, García-Fernández N. Daptomycin lock therapy for grampositive long-term catheter-related bloodstream infections. *Int J Clin Pract*. 2012 Mar; 66(3):305-8.
- Del Pozo JL. Biofilm-related disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2018 Jan; 16(1):51-65.
- Del Pozo JL, Patel R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clin Pharmacol Ther*. 2007; 82:204–209.
- Desfrancois C, Auzély R, Texier I. Lipid nanoparticles and their hydrogel composites for drug delivery: a review. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2018 Nov 1; 11(4). pii: E118.
- Detty MR, Gibson SL, Wagner SJ. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J Med Chem*. 2004; 47:3897—915.
- Deubner R, Schollmayer C, Wiene F, Holzgrabe U. Assignment of the major and minor components of gentamicin for evaluation of batches. *Magnetic Resonance in Chem*. 2003; 41:589–98.
- Devi US, Ganesan M, Mohanta GP. Design and evaluation of tetracycline hydrochloride gels. *Indian Drugs*. 2002; 39(10), 552-54.
- Diez-Escudero A, Hailer NP. The role of silver coating for arthroplasty components. *Bone Joint J*. 2021 Mar; 103-B (3):423-429.
- Dikalov SI, Harrison DG. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Jan 10; 20(2):372-82.
- Dinache A, Boni M, Alexandru T, Radu E, Stoicu A, Andrei IR, Staicu A, Liggieri L, Nastasa V, Pascu ML, Ferrari M. Surface properties of Vancomycin after interaction with laser beams. *Colloids Surf Physicochem En. Asp*. 2015; 480, 328–335.
- Ding H, Yu H, Dong Y, Tian R, Huang G, Boothman DA, Sumer BD, Gao J. Photoactivation switch from type II to type I reactions by electron-rich micelles for improved

photodynamic therapy of cancer cells under hypoxia. *J Control Release*. 2011 Dec 20;156(3):276-80.

- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15:167-93. Review.
- Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis*. 2001 Mar-Apr; 7(2):277-81.
- Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis*. 2001; 338:1387– 1392.
- Dönmez Güngüneş Ç, Şeker Ş, Elçin AE, Elçin YM. A comparative study on the in vitro cytotoxic responses of two mammalian cell types to fullerenes, carbon nanotubes and iron oxide nanoparticles. *Drug Chem Toxicol*. 2017 Apr; 40(2):215-227.
- Dreaden EC, Alkilany AM, Huang X, Murphy CJ, El-Sayed MA. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem Soc Rev*. 2012 Apr 7; 41(7):2740-79.
- Dupont CL, Grass G, Rensing C. Copper toxicity and the origin of bacterial resistance-- new insights and applications. *Metallomics*. 2011 Nov; 3(11):1109-18.
- Durán N, Durán M, de Jesus MB, Seabra AB, Fávaro WJ, Nakazato G. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine*. 2016 Apr; 12(3):789-799.

## E

- El-Housiny S, Shams Eldeen MA, El-Attar YA, Salem HA, Attia D, Bendas ER, El-Nabarawi MA. Fluconazole-loaded solid lipid nanoparticles topical gel for treatment of pityriasis versicolor: formulation and clinical study. *Drug Deliv*. 2018 Nov; 25(1):78-90.
- Engin AB, Engin A. Nanoantibiotics: A Novel Rational Approach to Antibiotic Resistant Infections. *Curr Drug Metab*. 2019; 20(9):720-741.
- Errecalde L, Ceriana P, Galletti P, Erbín M, Duarte A, J Rolón M, Cuatz D, Corso A, Kaufman S. *Rev Argent Microbiol*. 2013 Apr-Jun; 45(2):99-103.

## F

- Fan W, Duan M, Sun Q, Fan B. Simvastatin enhanced antimicrobial effect of Ag<sup>+</sup> against *E. faecalis* infection of dentine through PLGA co-delivery submicron particles. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2020 Dec; 31(18):2331-2346.
- Fakhri A, Tahami S, Naji M. Synthesis and characterization of core-shell bimetallic nanoparticles for synergistic antimicrobial effect studies in combination with doxycycline on burn specific pathogens. *J Photochem Photobiol B*. 2017 Apr; 169:21-26.
- Fan Y, Pauer AC, Gonzales AA, Fenniri H. Enhanced antibiotic activity of ampicillin conjugated to gold nanoparticles on PEGylated rosette nanotubes. *Int J Nanomedicine*. 2019 Sep 9; 14:7281-7289.
- Fasciani C, Silvero MJ, Anghel MA, Argüello GA, Becerra MC, Scaiano JC. Aspartame-stabilized gold-silver bimetallic biocompatible nanostructures with plasmonic photothermal properties, antibacterial activity, and long-term stability. *J Am Chem Soc*. 2014 Dec 17; 136(50):17394-7.
- Fayaz AM, Balaji K, Girilal M, Yadav R, Kalachelvan PT, Venketesan R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Nanomedicine*. 2010; 6(1), 103–109.
- FDA Approved Drugs in Infections and Infectious Diseases, CenterWatch, (n.d.). <http://www.centerwatch.com/drug-information/fda-approved-drugs/therapeuticarea/25/infections-and-infectious-diseases>.

- Feneley RC, Hopley IB, Wells PN. Urinary catheters: history, current status, adverse events and research agenda. *J Med Eng Technol*. 2015; 39(8):459-70.
- Fernández-Canigia L, Dowzicky MJ. Susceptibility of important Gram-negative pathogens to tigecycline and other antibiotics in Latin America between 2004 and 2010. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2012; 11:29.
- Fjell CD, Jenssen H, Hilpert K, Cheung WA, Panté N, Hancock RE, Cherkasov A. Identification of novel antibacterial peptides by chemoinformatics and machine learning. *J Med Chem*. 2009 Apr 9; 52(7):2006-15.
- Fouladgar M, Hadjmohammadi MR, Khalilzadeh MA, Biparva P, Teymoori N, Beitollah H. Voltammetric Determination of Amoxicillin at the Electrochemical Sensor Ferrocenedicarboxylic Acid Multi Wall Carbon Nanotubes Paste Electrode. *Int J Electrochem Sci*. 2011; 6, 1355–1366.
- Foulston L, Elsholz AK, DeFrancesco AS, Losick R. The extracellular matrix of *Staphylococcus aureus* biofilms comprises cytoplasmic proteins that associate with the cell surface in response to decreasing pH. *mBio*. 2014 Sep 2; 5(5):e01667-14.
- Franci G, Falanga A, Galdiero S, Palomba L, Rai M, Morelli G, Galdiero M. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*. 2015 May 18; 20(5):8856-74.
- Fresno MJ, Ramírez AD, Jiménez MM. Systematic study of the flow behaviour and mechanical properties of Carbopol Ultrez 10 hydroalcoholic gels. *Eur J Pharm Biopharm*. 2002; 54(3):329-335.
- Fujii M, Rose AL, Waite TD, Omura T. Oxygen and superoxide-mediated redox kinetics of iron complexed by humic substances in coastal seawater. *Environ Sci Technol*. 2010 Dec 15; 44(24):9337-42.

## G

- Gaberell M, Chin YP, Hug SJ, Sulzberger B. Role of dissolved organic matter composition on the photoreduction of Cr (VI) to Cr(III) in the presence of iron. *Environ Sci Technol*. 2003 Oct 1; 37(19):4403-9.
- Gad El-Rab SMF, Halawani EM, Hassan A. Formulation of Ceftriaxone Conjugated Gold Nanoparticles and Their Medical Applications against Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Producing Bacteria and Breast Cancer. *J Microbiol Biotechnol*. 2018 Sep 28; 28(9):1563-1572.
- Gao W, Vecchio D, Li J, et al. Hydrogel containing nanoparticle-stabilized liposomes for topical antimicrobial delivery. *ACS Nano*. 2014; 8(3):2900-2907.
- Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Núñez SC, Jorge AO, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med*. 2007 Jan; 39(1):59-66.
- Gebauer JS, Malissek M, Simon S, Knauer SK, Maskos M, Stauber RH, Peukert W, Treuel L. Impact of the nanoparticle-protein corona on colloidal stability and protein structure. *Langmuir*. 2012 Jun 26; 28(25):9673-9.
- Ghosh C, Sarkar P, Issa R, Haldar J. Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends Microbiol*. 2019 Apr; 27(4):323-338.
- Gillies M, Ranakusuma A, Hoffmann T, Thorning S, McGuire T, Glasziou P, Del Mar C. Common harms from amoxicillin: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials for any indication. *CMAJ*. 2015 Jan 6; 187(1):E21-E31.
- Giménez RE, Vargová V, Rey V, Turbay MB, Abatedaga I, Morán Vieyra FE, Paz Zanini VI, Mecchia Ortiz JH, Katz NE, Ostatná V, Borsarelli CD. *Free Radic Biol Med*. 2016; S0891-5849 (16) 00065-4.
- Gloag ES, German GK, Stoodley P, Wozniak DJ. Viscoelastic properties of *Pseudomonas aeruginosa* variant biofilms. *Sci Rep*. 2018 Jun 26; 8(1):9691.

- Gohel MC, Jani GK, Amin A, Bajaj S, Dave BS. Application of simplex lattice design for the development of transdermal gels of diclofenac sodium. *Indian J Pharm Sci.* 2000; 62(2), 108-14.
- Gominet M, Compain F, Beloin C, Lebeaux D. Central venous catheters and biofilms: where do we stand in 2017? *APMIS.* 2017 Apr; 125(4):365-375.
- Gu H, Ho PL, Tong E, Wang L, Xu B: Presenting vancomycin on nanoparticles to enhance antimicrobial activities. *Nano Lett.* 2003; 3(9):1261-1263.
- Guilhelmelli F, Vilela N, Albuquerque P, Derengowski Lda S, Silva-Pereira I, Kyaw CM. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front Microbiol.* 2013 Dec 9; 4:353.
- Guo L, Yuan W, Lu Z, Li CM. Polymer/nanosilver composite coatings for antibacterial applications. *Colloids Surf A Phys Eng Aspects.* 2013; 439:69–83.
- Gupta A, Moyano DF, Parnsubsakul A, Papadopoulos A, Wang LS, Landis RF, Das R, Rotello VM. Ultrastable and Biofunctionalizable Gold Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016 Jun 8; 8(22):14096-101.
- Guyomard A, T. Jouenne ED , Malandain JJ , Muller G, Glinel K. Incorporation of a Hydrophobic Antibacterial Peptide into Amphiphilic Polyelectrolyte Multilayers: A Bioinspired Approach to Prepare Biocidal Thin Coatings. *Adv Funct Mater.* 2008 Mar 11; 18(5), 758-765.

## H

- Haidar G, Philips NJ, Shields RK, Snyder D, Cheng S, Potoski BA, Doi Y, Hao B, Press EG, Cooper VS, Clancy CJ, Nguyen MH. Ceftolozane-Tazobactam for the Treatment of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections: Clinical Effectiveness and Evolution of Resistance. *Clin Infect Dis.* 2017 Jul 1; 65(1):110-120.
- Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2017 May 1; 41(3):276-301.
- Hallett-Tapley GL, Silvero MJ, González Béjar M, Grenier M, Netto-Ferreira JC, Scaiano JC. Plasmon-Mediated Catalytic Oxidation of sec-Phenethyl and Benzyl Alcohols. *J Phys Chem C.* 2011 May 10; 115, 10784–10790.
- Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 2004 May; 3(5):436-50.
- Hancock RE, Speert DP. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist Updat.* 2000 Aug; 3(4):247-255.
- Hancock RE, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol.* 2006 Dec; 24(12):1551-7.
- Hauser, A. R. *Antibiotic Basics for Clinicians: Choosing the Right Antibacterial Agent*; Wolters Kluwer: Philadelphia, 2007.
- Hausner M, Wuertz S. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65(8): 3710–3713.
- Henderson LM, Chappell JB. Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? *Eur J Biochem.* 1993; 217(3):973-980.
- Hernández-Jiménez E, Del Campo R, Toledano V, Vallejo-Cremades MT, Muñoz A, Largo C, Arnalich F, García-Río F, Cubillos-Zapata C, López-Collazo E. Biofilm vs. planktonic bacterial mode of growth: which do human macrophages prefer? *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Nov 29; 441(4):947-52.
- Hetrick EM, Schoenfisch MH. Reducing implant-related infections: active release strategies. *Chem Soc.* 2006; 35(9), 780–789.

- Ho CH, Odermatt EK, Berndt I, Tiller JC. Long-term active antimicrobial coatings for surgical sutures based on silver nanoparticles and hyperbranched polylysine. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2013; 24(13):1589-600.
- Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2010 Apr; 35(4):322-32.
- Horie M, Shimizu K, Tabei Y. Validation of metallothionein, interleukin-8, and heme oxygenase-1 as markers for the evaluation of cytotoxicity caused by metal oxide nanoparticles. *Toxicol Mech Methods.* 2018; 28(8):630-638.
- Hrubanova K, Krzyzanek V, Nebesarova J, Ruzicka F, Pilat Z, Samek O. Monitoring *Candida parapsilosis* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms by a Combination of Scanning Electron Microscopy and Raman Spectroscopy. *Sensors (Basel).* 2018 Nov 22; 18(12). pii: E4089.
- Hsu LC, Fang J, Borca-Tasciuc DA, Worobo RW, Moraru CI. Effect of micro- and nanoscale topography on the adhesion of bacterial cells to solid surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Apr; 79(8):2703-12.
- [http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf](http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf). Last acces November 21, 2019.
- Hu D, Li H, Wang B, Ye Z, Lei W, Jia F, Jin Q, Ren KF, Ji J. Surface-adaptive gold nanoparticles with effective adherence and enhanced photothermal ablation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *ACS Nano.* 2017 Sep 26; 11(9):9330-9339.
- Huang J, Lin L, Sun D, Chen H, Yang D, Li Q. Bio-inspired synthesis of metal nanomaterials and applications. *Chem Soc Rev.* 2015 Oct 7; 44(17):6330-74.
- Huang X, El-Sayed MA. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *J Adv Res.* 2010; 1, 13–28.
- Hughes G, Webber MA. Novel approaches to the treatment of bacterial biofilm infections. *Br J Pharmacol.* 2017 Jul; 174(14):2237-2246.
- Huh AJ, Kwon YJ. "Nanoantibiotics": a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J Control Release.* 2011 Dec 10; 156(2):128-45.
- Humphries RM, Yang S, Hemarajata P, Ward KW, Hindler JA, Miller SA, Gregson A. First Report of Ceftazidime-Avibactam Resistance in a KPC-3-Expressing *Klebsiella pneumoniae* Isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Oct; 59(10):6605-7.
- Hunyadi A, Danko B, Boni M, Militaru A, Alexandru T, Nastasa V, Andrei IR, Pascu ML, Amaral L. Rapid, laser-induced conversion of 20-hydroxyecdysone and its diacetone - - experimental set-up of a system for photochemical transformation of bioactive substances. *Anticancer Res.* 2012 Apr; 32(4):1291-7.
- Hurst KM, Ansari N, Roberts CB, Ashurst WR. Self-Assembled Monolayer-Immobilized Gold Nanoparticles as Durable, Anti-Stiction Coatings for MEMS. *J of Microelectromechanical Systems* 2011; 20:424–35.
- Huttner A, Bielicki J, Clements MN, Frimodt-Møller N, Muller AE, Paccaud JP, Mouton JW. Oral amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid: properties, indications and usage. *Clin Microbiol Infect.* 2019 Dec 4; pii: S1198-743X (19)30630-5.

## I

- Ickenstein LM, Garidel P. Hydrogel formulations for biologicals: current spotlight from a commercial perspective. *Ther Deliv.* 2018; 9(3):221-230.
- Ilić K, Hartl S, Galić E, Tetyczka C, Pem B, Barbir R, Milić M, Vinković Vrček I, Roblegg E, Pavičić I. Interaction of differently coated silver nanoparticles with skin and oral mucosal cells. *J Pharm Sci.* 2021 Feb 2:S0022-3549(21)00072-1.

## J

- Jacquart S, Siadous R, Henocq-Pigasse C, Bareille R, Roques C, Rey C, Combes C. Composition and properties of silver-containing calcium carbonate-calcium phosphate bone cement. *J Mater Sci Mater Med*. 2013 Dec; 24(12):2665-75.
- Jadhav K, Dhamecha D, Bhattacharya D, Patil M. Green and ecofriendly synthesis of silver nanoparticles: Characterization, biocompatibility studies and gel formulation for treatment of infections in burns. *J Photochem Photobiol B*. 2016; 155:109-115.
- Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, Hussain T, Ali M, Rafiq M, Kamil MA. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc*. 2018 Jan; 81(1):7-11.
- Jan A, Liu C, Deng H, Li J, Ma W, Zeng X, Ji Y. In vitro photodynamic inactivation effects of hypocrellin B on azole-sensitive and resistant *Candida albicans*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019 Sep; 27:419-427.
- Jena P, Mohanty S, Mallick R, Jacob B, Sonawane A. Toxicity and antibacterial assessment of chitosan-coated silver nanoparticles on human pathogens and macrophage cells. *Int J Nanomedicine*. 2012; 7:1805-18.
- Ji Z, Jin X, George S, Xia T, Meng H, Wang X, Suarez E, Zhang H, Hoek EM, Godwin H, Nel AE, Zink JJ. Dispersion and stability optimization of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in cell culture media. *Environ Sci Technol*. 2010 Oct 1; 44(19):7309-14.
- Jiale Z, Jian J, Xinyi T, Haoji X, Xueqin H, Xiao W. Design of a novel antimicrobial peptide 1018M targeted ppGpp to inhibit MRSA biofilm formation. *AMB Express*. 2021 Mar 26; 11(1):49.
- Jin R, Cao Y, Mirkin CA, Kelly KL, Schatz GC, Zheng JG. Photoinduced conversion of silver nanospheres to nanoprisms. *Science*. 2001 Nov 30; 294(5548):1901-3.
- Johnson JR, Kuskowski MA, Wilt TJ. Systematic review: antimicrobial urinary catheters to prevent catheter-associated urinary tract infection in hospitalized patients. *Ann Intern Med*. 2006 Jan 17; 144(2):116-26.
- Johnston JH, Nilsson T. Nanogold and nanosilver composites with lignin-containing cellulose bres. *J Mater Sci*. 2012; 47 (3), 1103-1112.
- Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, Fantetti L, Chiti G, Roncucci G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med*. 2006 Jun; 38(5):468-81.
- Jung WK, Koo HC, Kim KW, Shin S, Kim SH, Park YH. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74:2171–8.

## K

- Kadajji V. G, Betageri G. V. Water soluble polymers for pharmaceutical application. *Polymers*. 2011; 3, 1972-2009.
- Kai D, Tan MJ, Chee PL, Chua Y, Yap YL, Loh XJ. Towards lignin-based functional materials in a sustainable world. *Green Chem*. 2016 Jan 08; 18, 1175-1200.
- Karinja SJ, Spector JA. Treatment of infected wounds in the age of antimicrobial resistance: contemporary alternative therapeutic options. *Plast Reconstr Surg*. 2018; 142(4):1082-1092.
- Kazemzadeh-Narbat M, Cheng H, Chabok R, Alvarez MM, de la Fuente-Nunez C, Phillips KS, Khademhosseini A. Strategies for antimicrobial peptide coatings on medical devices: a review and regulatory science perspective. *Crit Rev Biotechnol*. 2021 Feb; 41(1):94-120.

- Kelly KL, Coronado E, Zhao L, Schatz L. The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment. *J Phys Chem.B*. 2003; 107, 668–677.
- Khalil MMH, Ismail EH, El-Baghdady KZ, Mohamed D. Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity. *Arab J Chem*. 2014 Dec; 7(6), 1131–1139.
- Khan AU, Yuan Q, Wei Y, Khan GM, Khan ZUH, Khan S, Ali F, Tahir K, Ahmad A, Khan FU. Photocatalytic and antibacterial response of biosynthesized gold nanoparticles. *J Photochem Photobiol B*. 2016 Sep; 162:273-277.
- Khan F, Lee JW, Manivasagan P, Pham DTN, Oh J, Kim YM. Synthesis and characterization of chitosan oligosaccharide-capped gold nanoparticles as an effective antibiofilm drug against the *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microb Pathog*. 2019 Jul 17; 135:103623.
- Khan I, Khalid S, Idrees K. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*. 2019 Nov; 12(7), 908-931.
- Kirui DK, Weber G, Talackine J, Millenbaugh NJ. Targeted laser therapy synergistically enhances efficacy of antibiotics against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nanomedicine*. 2019 Aug; 20:102018.
- Klapiszewski Ł, Rzemieniecki T, Krawczyk M, Malina D, Norman M, Zdarta J, Majchrzak I, Dobrowolska A, Czaczyk K, Jesionowski T. Kraft lignin/silica-AgNPs as a functional material with antibacterial activity. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015 Oct 1; 134:220-8.
- Klouda L, Mikos AG. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008; 68(1):34-45.
- Knetsch MLW, Koole LH. New strategies in the development of antimicrobial coatings: the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. *Polymers*. 2011; 3(1):340–366.
- Kohut A, Voronov A, Peukert W. An effective way to stabilize colloidal particles dispersed in polar and nonpolar media. *Langmuir*. 2007; 23, 504–508.
- Krajczewski J, Rucińska K, Townley HE, Kudelski A. Role of various nanoparticles in photodynamic therapy and detection methods of singlet oxygen. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019 Jun; 26:162-178.
- Kruszewski KM, Nistico L, Longwell MJ, Hynes MJ, Maurer JA, Hall-Stoodley L, Gawalt ES. Reducing *Staphylococcus aureus* biofilm formation on stainless steel 316L using functionalized self-assembled monolayers. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013 May 1; 33(4):2059-69.
- Kumar M, Tegge W, Wangoo N, Jain R, Sharma RK. Insights into cell penetrating peptide conjugated gold nanoparticles for internalization into bacterial cells. *Biophys Chem*. 2018; 237:38-46.
- Kumar P, Shivam P, Mandal S, Prasanna P, Kumar S, Prasad SR, Kumar A, Das P, Ali V, Singh SK, Mandal D. Synthesis, characterization, and mechanistic studies of a gold nanoparticle-amphotericin B covalent conjugate with enhanced antileishmanial efficacy and reduced cytotoxicity. *Int J Nanomedicine*. 2019 Aug 20; 14:6073-6101.
- Kumara P, Chandra Prakas NK, Lokesh S, Manral K. Viscoelastic properties and rheological characterization of carbormers. *Inter J of Latest Res in Eng and Tech*. 2015 Nov; 1(6), 17-30.
- Kyrsting A, Bendix PM, Stamou DG, Oddershede LB. Heat profiling of three-dimensionally optically trapped gold nanoparticles using vesicle cargo release. *Nano Lett*. 2011 Feb 9; 11(2):888-92.



- Lali Raveendran R, Kumar Sasidharan N, Devaki SJ. Design of Macroscopically Ordered Liquid Crystalline Hydrogel Columns Knitted with Nanosilver for Topical Applications. *Bioconjug Chem*. 2017 Apr 19; 28(4):1005-1015.
- Lanterna A, Pino E, Doménech-Carbó A, González-Béjar M, Pérez-Prieto J. Enhanced catalytic electrochemical reduction of dissolved oxygen with ultraclean cucurbituril[7]-capped gold nanoparticles. *Nanoscale*. 2014 Aug 21; 6(16):9550-3.
- Lara HH, Ayala-Núñez NV, Padilla CR. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*. 2010; 26(4):615–621.
- Laudano JB. Ceftaroline fosamil: a new broad-spectrum cephalosporin. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Apr; 66 Suppl 3:iii11-8.
- Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, Muller RN. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev*. 2008 Jun; 108(6):2064-110.
- Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE. Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol*. 1991 Oct; 173(20):6558-67.
- Lazovski J, Corso A, Pasteran F, Monsalvo M, Frenkel J, Cornistein W, Corral G, Nacinovich F. Estrategia de control de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Argentina. *Rev Panam Salud Pública*. 2017 Jun 19; 41:e88.
- Lee K, Yoon SS. Pseudomonas aeruginosa Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *J Microbiol Biotechnol*. 2017 Jun 28; 27(6):1053-1064.
- Lee SW, Chang SH, Lai YS, Lin CC, Tsai CM, Lee YC, Chen JC, Huang CL. Effect of Temperature on the Growth of Silver Nanoparticles Using Plasmon-Mediated Method under the Irradiation of Green LEDs. *Materials (Basel)*. 2014 Dec 5; 7(12):7781-7798.
- Leeds JA, Sachdeva M, Mullin S, Barnes SW, Ruzin A. In vitro selection, via serial passage, of Clostridium difficile mutants with reduced susceptibility to fidaxomicin or vancomycin. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Jan; 69(1):41-4.
- Leff DV, Brandt L, Heath JR. Synthesis and Characterization of Hydrophobic, Organically Soluble Gold Nanocrystals Functionalized with Primary Amines. *Langmuir*. 1996; 12, 4723-4730.
- Leibiger C, Kosyakova N, Mkrtychyan H, Gleib M, Trifonov V, Liehr T. First molecular cytogenetic high resolution characterization of the NIH 3T3 cell line by murine multicolor banding. *J Histochem Cytochem*. 2013 Apr; 61(4):306-12.
- Lesniak A, Salvati A, Santos-Martinez MJ, Radomski MW, Dawson KA, Åberg C. Nanoparticle adhesion to the cell membrane and its effect on nanoparticle uptake efficiency. *J Am Chem Soc*. 2013 Jan 30; 135(4):1438-44.
- Li H, Cui S, Yang Q, Song X, Wang D, Hu J, Zhou Y, Liu Y. AgNPs-incorporated nanofiber mats: Relationship between AgNPs size/content, silver release, cytotoxicity, and antibacterial activity. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021 Jan; 118:111331.
- Li M, Jiang X, Wang D, Xu Z, Yang M. In situ reduction of silver nanoparticles in the lignin based hydrogel for enhanced antibacterial application. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019 May 1; 177:370-376.
- Li X, Robinson SM, Gupta A, Saha K, Jiang Z, Moyano DF, Sahar A, Riley MA, Rotello VM. Functional gold nanoparticles as potent antimicrobial agents against multi-drug-resistant bacteria. *ACS Nano*. 2014 Oct 28; 8(10):10682-6.
- Li Z, Guo Z. Bioinspired surfaces with wettability for antifouling application. *Nanoscale*. 2019 Dec 21; 11(47):22636-22663.
- Liang H, Xu J, Liu Y, Zhang J, Peng W, Yan J, Li Z, Li Q. Optimization of hydrogel containing toluidine blue O for photodynamic therapy by response surface methodology. *J Photochem Photobiol B*. 2017 Aug; 173:389-396.
- Liang HY, Wang WZ, Huang YZ, Zhang SP, Wei H, Xu HX. Controlled synthesis of uniform silver nanospheres. *J Phys Chem*. 2010; 114, 7427-31.

- Liangwei D, QiuHong X, Meiyong H, Liang X, Jia-Xun F. Synthesis of small silver nanoparticles under light radiation by fungus *Penicillium oxalicum* and its application for the catalytic reduction of methylene blue. *Mat Chem and Phy.* 2015 Jun 15; 160, 40-47.
- Liedberg H, Ekman P, Lundeberg T. *Pseudomonas aeruginosa*: adherence to and growth on different urinary catheter coatings. *Int Urol Nephrol.* 1990; 22(5):487-92.
- Lim WQ, Zhiqiang G. *Nano Today.* 2016, 11, 168-188.
- Lin CC, Metters AT. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006; 58, 1379–1408.
- Lippens E, Swennen I, Gironès J, Declercq H, Vertenten G, Vlaminck L, Gasthuys F, Schacht E, Cornelissen R. Cell survival and proliferation after encapsulation in a chemically modified Pluronic(R) F127 hydrogel. *J Biomater Appl.* 2013 Mar; 27(7):828-39.
- Liu J, Hurt RH. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. *Environ Sci Technol.* 2010; 44(6):2169–75.
- Liu L, Liu T, Tade M, Wang S, Li X, Liu S. Less is more, greener microbial synthesis of silver nanoparticles. *Enzyme Microb Technol.* 2014 Dec; 67:53-8.
- Liu J, Li X, Liu L, Bai Q, Sui N, Zhu Z. Self-assembled ultrasmall silver nanoclusters on liposome for topical antimicrobial delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2021 Apr; 200:111618.
- Lofton C, Sigmund, W. Mechanisms controlling crystal habits of gold and silver colloids. *Adv Funct Mater.* 2005; 15, 1197–1208.
- Loganathan V, Jaswanth A, Sulaiman A, Rajaseskaran A, Manimaran S, Kumar SB. The effects of polymers and permeation enhancers on release of flurbiprofen from gel formulation. *Indian J Pharm Sci.* 2001; 200-204.
- Loo CY, Rohanzadeh R, Young PM, Traini D, Cavaliere R, Whitchurch CB, Lee WH. Combination of Silver Nanoparticles and Curcumin Nanoparticles for Enhanced Anti-biofilm Activities. *J Agric Food Chem.* 2016 Mar 30; 64(12):2513-22.
- Love W, Brundish D, Rhys-williams W, Feng XD, Pugin B. Porphyrin derivatives and their use in photodynamic therapy. 2011:8084602.
- Low A, Bansal V. A visual tutorial on the synthesis of gold nanoparticles. *Biomed Imaging Interv J.* 2010 Jan-Mar; 6(1):e9.
- Łusiak-Szelachowska M, Weber-Dąbrowska B, Górski A. Bacteriophages and Lysins in Biofilm Control. *Virol Sin.* 2020 Apr; 35(2):125-133.

## M

- Mahmoud NN, Hikmat S, Abu Ghith D, et al. Gold nanoparticles loaded into polymeric hydrogel for wound healing in rats: Effect of nanoparticles' shape and surface modification. *Int J Pharm.* 2019; 565:174-186.
- Maisch T, Szeimies RM, Jori G, Abels C. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. *Photochem Photobiol Sci.* 2004 Oct; 3(10):907-17.
- Malikova N, Pastoriza-Santos I, Schierhorn M, Kotov NA, Liz-Marzán LM. Layer-by-Layer Assembled Mixed Spherical and Planar Gold Nanoparticles: Control of Interparticle Interactions. *Langmuir* 2002; 18:3694–7.
- Maliszewska I, Kałas W, Wysokińska E, Tylus W, Pietrzyk N, Popko K, Palewska K. Enhancement of photo-bactericidal effect of tetrasulfonated hydroxyaluminum phthalocyanine on *Pseudomonas aeruginosa*. *Lasers Med Sci.* 2018 Jan; 33(1):79-88.
- Manosalva N, Tortella G, Cristina Diez M, Schalchli H, Seabra AB, Durán N, Rubilar O. Green synthesis of silver nanoparticles: effect of synthesis reaction parameters on antimicrobial activity. *World J Microbiol Biotechnol.* 2019 May 27; 35(6):88.
- Mao C, Xiang Y, Liu X, Zheng Y, Yeung KWK, Cui Z, Yang X, Li Z, Liang Y, Zhu S, Wu S. Local photothermal/photodynamic synergistic therapy by disrupting bacterial membrane to

- accelerate reactive oxygen species permeation and protein leakage. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019 May 15; 11(19):17902-17914.
- Martínez SR, Rocca DM, Aiassa V, Becerra M C. Linezolid as an eradication agent against assembled methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *RSC Adv*. 2016; 6, 101023.
  - Martinez-Gutierrez F, Boegli L, Agostinho A, Sánchez EM, Bach H, Ruiz F, James G. Antibiofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms. *Biofouling*. 2013; 29(6):651-60.
  - Marulasiddeshwara MB, Dakshayani SS, Sharath Kumar MN, Chethana R, Raghavendra Kumar P, Devaraja S. Facile-one pot-green synthesis, antibacterial, antifungal, antioxidant and antiplatelet activities of lignin capped silver nanoparticles: A promising therapeutic agent. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017 Dec 1; 81:182-190.
  - Maslamani M, Sedeqi F. Antibiotic and analgesic prescription patterns among dentists or management of dental pain and infection during endodontic treatment. *Med Princ Pract*. 2018; 27(1):66-72.
  - May-Masnou A, Soler L, Torras M, Salles P, Llorca J, Roig A. Fast and simple microwave synthesis of TiO<sub>2</sub>/Au nanoparticles for gas-phase photocatalytic hydrogen generation. *Front Chem*. 2018 Apr 12; 6:110.
  - McConoughey SJ, Howlin R, Granger JF, Manring MM, Calhoun JH, Shirliff M, Kathju S, Stoodley P. Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future Microbiol*. 2014; 9(8):987-1007.
  - Medina D, Walke JB, Gajewski Z, Becker MH, Swartwout MC, Belden LK. Culture Media and Individual Hosts Affect the Recovery of Culturable Bacterial Diversity from Amphibian Skin. *Front Microbiol*. 2017 Aug 24; 8:1574.
  - Meeker DG, Jenkins SV, Miller EK, Beenken KE, Loughran AJ, Powless A, Muldoon TJ, Galanzha EI, Zharov VP, Smeltzer MS, Chen J. Synergistic Photothermal and Antibiotic Killing of Biofilm-Associated *Staphylococcus aureus* Using Targeted Antibiotic-Loaded Gold Nanoconstructs. *ACS Infect Dis*. 2016 Apr 8; 2(4):241-250.
  - Meije Y, Almirante B, Del Pozo JL, et al. Daptomycin is effective as antibiotic-lock therapy in a model of *Staphylococcus aureus* catheter-related infection. *J Infect*. 2014; 68(6):548–552.
  - Mekkawy AI, El-Mokhtar MA, Nafady NA, Yousef N, Hamad MA, El-Shanawany SM, Ibrahim EH, ElSabahy M. In vitro and in vivo evaluation of biologically synthesized silver nanoparticles for topical applications: effect of surface coating and loading into hydrogels. *Int J Nanomedicine*. 2017 Jan 23; 12:759-777.
  - Meng Y, Lu J, Cheng Y, Li Q, Wang H. Lignin-based hydrogels: A review of preparation, properties, and application. *Int J Biol Macromol*. 2019 Aug 15; 135:1006-1019.
  - Millenbaugh NJ, Baskin JB, DeSilva MN, Elliott WR, Glickman RD. Photothermal killing of *S. aureus* using antibody – targeted gold nanoparticles. *Inter J Nanomed* 2015; 10:1953–60.
  - Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA, Kurachi C, Bagnato VS. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Mar; 109(3):392-401.
  - Mogoşanu GD, Grumezescu AM, Bejenaru C, Bejenaru LE. Polymeric protective agents for nanoparticles in drug delivery and targeting. *Int J Pharm*. 2016 Aug 30; 510(2):419-29.
  - Mohamed MA. Myco-engineered gold nanoparticles from *Jahnula aquatica* coated with ampicillin/amoxicillin and their antibacterial and anticancer activity against cancer cells. *Biotechnol Lett*. 2020 Jan; 42(1):151-170.

- Mohamed MM, Fouad SA, Elshoky HA, Mohammed GM, Salaheldin TA. Antibacterial effect of gold nanoparticles against *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Int J Vet Sci Med.* 2017; 5(1):23-29.
- Mondal A, Devine R, Estes L, Manuel J, Singha P, Mancha J, Palmer M, Handa H. Highly hydrophobic polytetrafluoroethylene particle immobilization via polydopamine anchor layer on nitric oxide releasing polymer for biomedical applications. *J Colloid Interface Sci.* 2021 Mar; 585:716-728.
- Moormeier DE, Bayles KW. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Mol Microbiol.* 2017 May; 104(3):365-376.
- Mu L, Wu J, Matsakas L, Chen M, Vahidi A, Grahn M, Rova U, Christakopoulos P, Zhu J, Shi Y. Lignin from Hardwood and Softwood Biomass as a Lubricating Additive to Ethylene Glycol. *Molecules.* 2018 Feb 28; 23(3):537.

## N

- Nagata JY, Hioka N, Kimura E, Batistela VR, Terada RSS, Graciano AX, Baesso ML, Hayacibara MF. 2012. Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 9:122–131.
- Naghili H, Tajik H, Mardani K, Razavi Rouhani SM, Ehsani A, Zare P. Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. *Vet Res Forum.* 2013 Summer; 4(3):179-83.
- Naik K, Srivastava P, Deshmukh K, Monsoor MS, Kowshik M. Nanomaterial-Based approaches for prevention of biofilm-associated infections on medical devices and implants. *J Nanosci Nanotechnol.* 2015 Dec; 15(12):10108-19. doi: 10.1166/jnn.2015.11688. PMID: 26682456.
- Naik K., A. Chatterjee, H. Prakash, and M. Kowshik, *J. Biomed. Nanotechnol.* 9, 664 (2013).
- Namasivayam S. K. R. , B. B. Christo, S. M. K. Arasu, K. A. M. Kumar, and K. Deepak, *Global Journal of Medical Research B* 13, 2249 (2013)
- Narayana JL, Mishra B, Lushnikova T, Golla RM, Wang G. Modulation of antimicrobial potency of human cathelicidin peptides against the ESKAPE pathogens and in vivo efficacy in a murine catheter-associated biofilm model. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2019 Sep 1; 1861(9):1592-1602. doi:10.1016/j.bbmem.2019.07.012. -Neal AL. What can be inferred from bacterium-nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles? *Ecotoxicology* 2008; 17(5):362–71.
- Neu, H. C. Clinical Use of the Quinolones. *Lancet* 1987, 2, 1319–1322.
- Nirmala GA, Pandian K: Antibacterial efficacy of aminoglycosidic antibiotics protected gold nanoparticles—A brief study. *Coll Surf A: Physicochem Eng Aspects* 2007, 297(1):63-70.

## O

- O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations / the Review on Antimicrobial Resistance chaired by Jim O'Neill. Review on Antimicrobial Resistance, May 2016. <https://wellcomecollection.org/works/thwvsuba>.
- Oliveira VC, Steixner S, Nascimento CD, Pagnano VO, Silva-Lovato CH, Paranhos HFO, Wilflingseder D, Coraça-Huber D, Watanabe E. Expression of virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* biofilm after bacteriophage infection. *Microb Pathog.* 2021 Mar 7; 154:104834.

- Otto CC, Cunningham TM, Hansen MR, Haydel SE. Effects of antibacterial mineral leachates on the cellular ultrastructure, morphology, and membrane integrity of *Escherichia coli* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2010; 9:26.

## P

- Pacioni NL, González-Béjar M, Alarcón E, McGilvray KL, Scaiano JC. Surface plasmons control the dynamics of excited triplet states in the presence of gold nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 2010 May 12; 132(18):6298-9.
- Page K, Wilson M, Parkin IP. Antimicrobial surfaces and their potential in reducing the role of the inanimate environment in the incidence of hospital-acquired infections. *J Mater Chem*. 2009 Feb 18; 19, 3819-3831.
- Pallavicini P, Donà A, Taglietti A, Minzioni P, Patrini M, Dacarro G, Chirico G, Sironi L, Bloise N, Visai L, Scarabelli L. Self-assembled monolayers of gold nanostars: a convenient tool for near-IR photothermal biofilm eradication. *Chem Commun (Camb)*. 2014 Feb 25; 50(16):1969-71.
- Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*. 2019 Jan - Feb; 37(1):177-192.
- Pansara C, Chan WY, Parikh A, Trott DJ, Mehta T, Mishra R, Garg S. Formulation Optimization of Chitosan-Stabilized Silver Nanoparticles Using In Vitro Antimicrobial Assay. *J Pharm Sci*. 2019 Feb; 108(2):1007-1016.
- Papa R, Artini M, Cellini A, Tilotta M, Galano E, Pucci P, Amoresano A, Selan L. A new anti-infective strategy to reduce the spreading of antibiotic resistance by the action on adhesion-mediated virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog*. 2013 Oct; 63:44-53.
- Pascu O, Carenza E, Gich M, Estrade S, Peiro F, Herranz G, Roig A. Surface Reactivity of Iron Oxide Nanoparticles by Microwave-Assisted Synthesis; Comparison with the Thermal Decomposition Route. *J Phys Chem C*. 2012 Jun 20; 116, 15108–15116.
- Patel KK, Surekha DB, Tripathi M, Anjum MM, Muthu MS, Tilak R, Agrawal AK, Singh S. Antibiofilm Potential of Silver Sulfadiazine-Loaded Nanoparticle Formulations: A Study on the Effect of DNase-I on Microbial Biofilm and Wound Healing Activity. *Mol Pharm*. 2019 Sep 3; 16(9):3916-3925.
- Paiva-Santos AC, Herdade AM, Guerra C, Peixoto D, Pereira-Silva M, Zeinali M, Mascarenhas-Melo F, Paranhos A, Veiga F. Plant-mediated green synthesis of metal-based nanoparticles for dermopharmaceutical and cosmetic applications. *Int J Pharm*. 2021 Mar 15; 597:120311.
- Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods*. 2008 Feb; 72(2):157-65.
- Pelling H, Nzakizwanayo J, Milo S, Denham EL, MacFarlane WM, Bock LJ, Sutton JM, Jones BV. Bacterial biofilm formation on indwelling urethral catheters. *Lett Appl Microbiol*. 2019 Apr; 68(4):277-293.
- Perea A, Alguaci FJ, Adeva P, García-Vuelta O. Contaminación y conservación de piezas de orfebrería prehistórica. ¿Es el oro un metal sin tiempo?. *Rev Meta. Madrid*. 2003; 39(1), 3-8.
- Pérez-Díaz M, Alvarado-Gomez E, Magaña-Aquino M, Sánchez-Sánchez R, Velasquillo C, Gonzalez C, Ganem-Rondero A, Martínez-Castañón G, Zavala-Alonso N, Martínez-Gutierrez F. Anti-biofilm activity of chitosan gels formulated with silver nanoparticles

and their cytotoxic effect on human fibroblasts. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016 Mar; 60:317-323.

- Pérez-Laguna V, García-Malinis AJ, Aspiroz C, Rezusta A, Gilaberte Y. Antimicrobial effects of photodynamic therapy. *G Ital Dermatol Venereol*. 2018 Dec; 153(6):833-846.
- Permana AD, Anjani QK, Sartini, Utomo E, Volpe-Zanutto F, Paredes AJ, Evary YM, Mardikasari SA, Pratama MR, Tuany IN, Donnelly RF. Selective delivery of silver nanoparticles for improved treatment of biofilm skin infection using bacteria-responsive microparticles loaded into dissolving microneedles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021 Jan; 120:111786.
- Perni S, Piccirillo C, Pratten J, Prokopovich P, Chrzanowski W, Parkin IP, Wilson M. The antimicrobial properties of light-activated polymers containing methylene blue and gold nanoparticles. *Biomaterials*. 2009 Jan; 30(1):89-93.
- Pierre S, Liew S, Bernardin A. Basics of dermal filler rheology. *Dermatol Surg*. 2015 Apr; 41 Suppl 1:S120-6.
- Piskorz J, Porolnik W, Kucinska M, Dlugaszewska J, Murias M, Mielcarek J. BODIPY-Based photosensitizers as potential anticancer and antibacterial agents: role of the positive charge and the heavy atom effect. *Chem Med Chem*. 2021 Jan 19; 16(2):399-411.
- Polte J, Ahner TT, Delissen F, Sokolov S, Emmerling F, Thünemann AF, Kraehnert R. Mechanism of gold nanoparticle formation in the classical citrate synthesis method derived from coupled in situ XANES and SAXS evaluation. *J Am Chem Soc*. 2010 Feb 3; 132(4):1296-301.
- Pornpattananangkul D, Zhang L, Olson S, Aryal S, Obonyo M, Vecchio K, Huang C-M, Zhang L: Bacterial toxin-triggered drug release from gold nanoparticle-stabilized liposomes for the treatment of bacterial infection. *J Am Chem Soc*. 2011; 133(11):4132-4139.
- Post SJ, Shapiro JA, Wuest WM. Connecting iron acquisition and biofilm formation in the ESKAPE pathogens as a strategy for combating antibiotic resistance. *Medchemcomm*. 2019 Mar 21; 10(4):505-512.
- Powers JH. Antimicrobial drug development--the past, the present, and the future. *Clin Microbiol Infect*. 2004 Nov; 10 Suppl 4:23-31.
- Prabhakara R, Harro JM, Leid JG, Keegan AD, Prior ML, Shirtliff ME. Suppression of the inflammatory immune response prevents the development of chronic biofilm infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2011 Dec; 79(12):5010-8.
- Pradeepa, Vidya SM, Mutalik S, Udaya Bhat K, Huilgol P, Avadhani K. Preparation of gold nanoparticles by novel bacterial exopolysaccharide for antibiotic delivery. *Life Sci*. 2016; 153:171-179.
- Preda VG, Săndulescu O. Communication is the key: biofilms, quorum sensing, formation and prevention. *Discoveries (Craiova)*. 2019 Sep 30; 7(3):e100.

## Q

- Qiu Y, Park K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001 Dec 31; 53(3):321-39.
- Quintero-Quiroz C, Acevedo N, Zapata-Giraldo J, Botero LE, Quintero J, Zárate-Triviño D, Saldarriaga J, Pérez VZ. Optimization of silver nanoparticle synthesis by chemical reduction and evaluation of its antimicrobial and toxic activity. *Biomater Res*. 2019 Dec 19; 23:27.
- Quiñones Muñoz TA, Navarrete NS, Acosta DFC, Gurrola ÉEC, Carbajal GRH, Santos EDCV. The Effect of Growth Substrate and Extraction Solvent on Biological Activities of

Oyster Culinary Medicinal Mushroom *Pleurotus ostreatus* (Agaricomycetes). *Int J Med Mushrooms*. 2018; 20(10):989-1001.

## R

- Raghavendra M, Koregol A, Bhola S. Photodynamic therapy: a targeted therapy in periodontics. *Aust Dent J*. 2009 Sep; 54 Suppl 1:S102-9.
- Rahimi H, Roudbarmohammadi S, Delavari H H, Roudbary M. Antifungal effects of indolicidin-conjugated gold nanoparticles against fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* isolated from patients with burn infection. *Int J Nanomedicine*. 2019 Jul 17; 14:5323-5338.
- Rahman A, Kumar S, Bafana A, Lin J, Dahoumane SA, Jeffryes C. A Mechanistic View of the Light-Induced Synthesis of Silver Nanoparticles Using Extracellular Polymeric Substances of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecules*. 2019 Sep 27; 24(19):3506.
- Rajchakit U, Sarojini V. Recent Developments in Antimicrobial-Peptide-Conjugated Gold Nanoparticles. *Bioconjug Chem*. 2017 Nov 15; 28(11):2673-2686.
- Rak MJ, Friščić T, Moores A. Mechanochemical synthesis of Au, Pd, Ru and Re nanoparticles with lignin as a bio-based reducing agent and stabilizing matrix. *Faraday Discuss*. 2014; 170:155-67.
- Ramasamy M, Lee SS, Yi DK, Kim K. Magnetic, optical gold nanorods for recyclable photothermal ablation of bacteria. *J Mater Chem B*. 2014 Feb 28; 2(8):981-988.
- Rao H, Choo S, Rajeswari Mahalingam SR, Adisuri DS, Madhavan P, Md Akim A, Chong PP. Approaches for Mitigating Microbial Biofilm-Related Drug Resistance: A Focus on Micro- and Nanotechnologies. *Molecules*. 2021 Mar 26; 26(7):1870.
- Rastogi L, Kora AJ, J A. Highly stable, protein capped gold nanoparticles as effective drug delivery vehicles for amino-glycosidic antibiotics. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2012 Aug 1; 32(6):1571-7.
- Ray TR, Lettiere B, de Rutte J, Pennathur S. Quantitative characterization of the colloidal stability of metallic nanoparticles using UV-vis absorbance spectroscopy. *Langmuir*. 2015 Mar 31; 31(12):3577-86.
- Reddy SM, Mutalik S, Rao VG. Preparation and evaluation of minoxidil gel for topical application in alopecia. *Indian J Pharm Sci*. 2006 Jul 08; 68(4), 432-436.
- Ribeiro MS, de Melo LSA, Farooq S, Baptista A, Kato IT, Núñez SC, de Araujo RE. Photodynamic inactivation assisted by localized surface plasmon resonance of silver nanoparticles: In vitro evaluation on *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018 Jun; 22:191-196.
- Rizzello L, Sorce B, Sabella S, Vecchio G, Galeone A, Brunetti V, Cingolani R, Pompa PP. Impact of nanoscale topography on genomics and proteomics of adherent bacteria. *ACS Nano*. 2011; 5, 1865–76.
- Rocca DM, Aiassa V, Zoppi A, Silvero Compagnucci J, Becerra MC. Nanostructured gold coating for prevention of biofilm development in medical devices. *J Endourol*. 2020 Mar; 34(3):345-351.
- Rodrigues LR. Inhibition of bacterial adhesion on medical devices. *Adv Exp Med Biol*. 2011; 715, 351–367.
- Roe D, Karandikar B, Bonn-Savage N, Gibbins B, Roullet JB. Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 61(4), 869–876.
- Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods*. 1991 Sep 13; 142(2):257-65.

- Rónavári A, Igaz N, Adamecz DI, Szerencsés B, Molnar C, Kónya Z, Pfeiffer I, Kiricsi M. Green silver and gold nanoparticles: biological synthesis approaches and potentials for biomedical applications. *Molecules*. 2021 Feb 5; 26(4):844.
- Rose, A. L.; Waite, D. Role of Superoxide in the Photochemical Reduction of Iron in Seawater. *Geochim Cosmochim Acta*. 2006 Aug 01; 70(15), 3869–3882.
- Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. 2018 Jan 1; 9(1):522-554.
- Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, Eliceiri KW. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*. 2017 Nov 29; 18(1):529.

## S

- Saber M, Hayaei-Tehrani RS, Mokhtari S, Hoorzad P, Esfandiari F. In vitro cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles in mouse ovarian germ cells. *Toxicol In Vitro*. 2021 Feb; 70:105032.
- Saha B, Bhattacharya J, Mukherjee A, Ghosh AK, Santra CR, Dasgupta AK, Karmakar P. In vitro structural and functional evaluation of gold nanoparticles conjugated antibiotics. *Nanoscale Res Lett*. 2007; 2(12):614-622.
- Saleem MA, Sanaullah S, Purohit MG. Antimicrobial and wound healing activity of prepared gatifloxacin topical gels. *Indian Drugs*. 2005; 43(4), 292-95.
- Saleh S, Taha MO, Haddadin RN, Marzooqa D, Hodali H. Preparation of Silver- and Zinc-Doped Mullite-Based Ceramics Showing Anti-Bacterial Biofilm Properties. *Molecules*. 2011 Mar 21; 16 (4), 2862-2870.
- Samberg ME, Oldenburg SJ, Monteiro-Riviere NA. Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin in vivo and keratinocytes in vitro. *Environ Health Perspect*. 2010 Mar; 118(3):407-13.
- Sanchez-Barcelo EJ, Mediavilla MD. Recent patents on light-based therapies: photodynamic therapy, photothermal therapy and photoimmunotherapy. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*. 2014; 8(1):1-8.
- Sareen R, Kumar S, Gupta GD. Meloxicam carbopol-based gels: characterization and evaluation. *Curr Drug Deliv*. 2011 Jul; 8(4):407-15.
- Sarma TK, Chattopadhyay A. Starch-Mediated Shape-Selective Synthesis of Au Nanoparticles with Tunable Longitudinal Plasmon Resonance. *Langmuir* 2004; 20:3520–4.
- Sarwar A, Katas H, Samsudin SN, Zin NM. Regioselective sequential modification of chitosan via azide-alkyne click reaction: synthesis, characterization, and antimicrobial activity of chitosan derivatives and nanoparticles. *PLoS One*. 2015; 10(4):e0123084.
- Sathiyabama M, Manikandan A. Application of Copper-Chitosan Nanoparticles Stimulate Growth and Induce Resistance in Finger Millet (*Eleusine coracana* Gaertn.) Plants against Blast Disease. *J Agric Food Chem*. 2018 Feb 28; 66(8):1784-1790.
- Savoldi A, Carrara E, Gladstone BP, Azzini AM, Göpel S, Tacconelli E. Gross national income and antibiotic resistance in invasive isolates: analysis of the top-ranked antibiotic-resistant bacteria on the 2017 WHO priority list. *J Antimicrob Chemother*. 2019 Dec 1; 74(12):3619-3625.
- Saylor C, Dadachova E, Casadevall A. Monoclonal antibody-based therapies for microbial diseases. *Vaccine*. 2009 Dec 30; 27 Suppl 6:G38-46.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak



- P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jun 28; 9(7):676-82.
- Schneider WDH, Dillon AJP, Camassola M. Lignin nanoparticles enter the scene: A promising versatile green tool for multiple applications. *Biotechnol Adv*. 2021 Mar-Apr; 47:107685.
  - Schrag SJ, Peña C, Fernández J, Sánchez J, Gómez V, Pérez E, Feris JM, Besser RE. Effect of short-course, high-dose amoxicillin therapy on resistant pneumococcal carriage: a randomized trial. *JAMA*. 2001 Jul 4; 286(1):49-56.
  - Scott RD. The direct medical costs of healthcare-associated infections in US hospitals and the benefits of prevention. Division of Healthcare Quality Promotion National Center for Preparedness, Detection, and Control of Infectious Diseases Coordinating Center for Infectious Diseases Centers for Disease Control and Prevention March 2009. Available at [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/Scott\\_Cost\\_Paper.PDF](http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/Scott_Cost_Paper.PDF).
  - Segets D, Marczak R, Schäfer S, Paula C, Gnichwitz JF, Hirsch A, Peukert W. Experimental and theoretical studies of the colloidal stability of nanoparticles-a general interpretation based on stability maps. *ACS Nano*. 2011 Jun 28; 5(6):4658-69.
  - Selan L, Papa R, Tilotta M, Vrenna G, Carpentieri A, Amoresano A, Pucci P, Artini M. Serratiopeptidase: a well-known metalloprotease with a new non-proteolytic activity against *S. aureus* biofilm. *BMC Microbiol*. 2015 Oct 9; 15:207.
  - Seo H, Han SI, Song KI, Seong D, Lee K, Kim SH, Park T, Koo JH, Shin M, Baac HW, Park OK, Oh SJ, Han HS, Jeon H, Kim YC, Kim DH, Hyeon T, Son D. Durable and fatigue-resistant soft peripheral neuroprosthetics for in vivo bidirectional signaling. *Adv Mater*. 2021 Mar 19:e2007346.
  - Shah M, Badwaik V, Kherde Y, Waghwanani HK, Modi T, Aguilar ZP, Rodgers H, Hamilton W, Marutharaj T, Webb C, Lawrenz MB, Dakshinamurthy R. Gold nanoparticles: various methods of synthesis and antibacterial applications. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2014 Jun 1; 19:1320-44. Review.
  - Shankar S, Rhim JW, Won K. Preparation of poly (lactide)/lignin/silver nanoparticles composite films with UV light barrier and antibacterial properties. *Int J Biol Macromol*. 2018 Feb; 107(Pt B):1724-1731.
  - Shannahan JH, Lai X, Ke PC, Podila R, Brown JM, Witzmann FA. Silver nanoparticle protein corona composition in cell culture media. *PLoS One*. 2013 Sep 9; 8(9):e74001.
  - Shao C, Zhang X, Ye J, Li YC, Bao YJ, Li ZH, Huang Y, Liu Y. Surface functionalization of titanium substrates with Deoxyribonuclease I inhibit peri-implant bacterial infection. *Dent Mater J*. 2021 Mar 31; 40(2):322-330.
  - Sharma VK, Siskova KM, Zboril R, Gardea-Torresdey JL. Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: fate, stability and toxicity. *Adv Colloid Interface Sci*. 2014 Feb; 204:15-34.
  - Sharma VK. Oxidation of amino acids, peptides, and proteins. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.; 2013.
  - Shen Z, Luo Y, Wang Q, Wang X, Sun R. High-value utilization of lignin to synthesize Ag nanoparticles with detection capacity for Hg<sup>2+</sup>. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014 Sep 24; 6(18):16147-55.
  - Shin SC, Kim JY, Oh IJ. Mucoadhesive and physicochemical characterization of Carbopol-Poloxamer gels containing triamcinolone acetonide. *Drug Dev Ind Pharm*. 2000 Mar; 26(3):307-12.
  - Shukla SK, Rao TS. Staphylococcus aureus biofilm removal by targeting biofilm-associated extracellular proteins. *Indian J Med Res*. 2017 Jul; 146(Supplement):S1-S8.
  - Sigma Cell Proliferation Kit I (MTT) 11465007001. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11465007001?lang=en%2CAEion=CA>.

- Silvero C MJ, Rocca DM, de la Villarmois EA, et al. Selective photoinduced antibacterial activity of amoxicillin-coated gold nanoparticles: from one-step synthesis to in vivo cytocompatibility. *ACS Omega*. 2018; 3(1):1220-1230.
- Silvero C. MJ, Argüello GA, Becerra MC. photodynamic antibacterial chemotherapy (pact) against staphylococcus aureus and escherichia coli using gold nanoparticles and LED's irradiation. *J Nanoph Drug Del*. 2014; 2, 148-152.
- Silvero MJ, Weerasekera Has de Alwis, Scaiano JC, Becerra MC. Macromolecular oxidation in Photodynamic Antibacterial Chemotherapy with Nanoparticles. 25<sup>th</sup> IAPS Meeting. Santiago de Chile, May 24-27, 2016.
- Silvero MJ, Becerra MC. Plasmon-induced oxidative stress and macromolecular damage in pathogenic bacteria. *RSC Adv*. 2016; 6, 100203–100208.
- Silvero MJ. Desarrollo de nuevos fotosensibilizadores para la terapia fotodinámica antibacteriana (Tesis doctoral). FCQ-UNC. Córdoba, Argentina, 2016.
- Singh VK, Anis A, Banerjee I, Pramanik K, Bhattacharya MK, Pal K. Preparation and characterization of novel carbopol based bigels for topical delivery of metronidazole for the treatment of bacterial vaginosis. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014 Nov; 44:151-8.
- Slavin YN, Asnis J, Häfeli UO, Bach H. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J Nanobiotechnology*. 2017 Oct 3; 15(1):65.
- Smarandache A. Laser beams interaction with polidocanol foam: molecular background. *Photomed Laser Surg*. 2012 May; 30(5):262-7.
- Smarandache A, Trelles M, Pascu ML. Measurement of the modifications of Polidocanol absorption spectra after exposure to NIR laser radiation. *J Optoelectron Adv Mater*. 2010; 12, 1942–1945.
- Smekalova M, Aragon V, Panacek A, Pucek R, Zboril R, Kvitek L. Enhanced antibacterial effect of antibiotics in combination with silver nanoparticles against animal pathogens. *Vet J*. 2016 Mar; 209:174-9.
- Sofokleous P, Stride E, Edirisinghe M. Preparation, characterization, and release of amoxicillin from electrospun fibrous wound dressing patches. *Pharm Res*. 2013 Jul; 30(7):1926-38.
- Song J, Hu H, Jian C, Wu K, Chen X. New Generation of Gold Nanoshell-Coated Esophageal Stent: Preparation and Biomedical Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2016; 8:27523–9.
- Song SH, Lee KM, Kang JB, Lee SG, Kang MJ, Choi YW. Improved skin delivery of voriconazole with a nanostructured lipid carrier-based hydrogel formulation. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2014; 62(8):793-8.
- Sperandio FF, Huang YY, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2013 Aug; 8(2):108-20.
- St Denis TG, Huang L, Dai T, Hamblin MR. Analysis of the bacterial heat shock response to photodynamic therapy-mediated oxidative stress. *Photochem Photobiol*. 2011 May-Jun; 87(3):707-13.
- Stacpoole PW, Martyniuk CJ, James MO, Calcutt NA. Dichloroacetate-induced peripheral neuropathy. *Int Rev Neurobiol*. 2019;145:211-238.
- Stamplecoskie KG, Scaiano JC. Light emitting diode irradiation can control the morphology and optical properties of silver nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 2010. Feb 17; 132(6):1825-7.
- Stenzelius K, Persson S, Olsson UB, Stjärneblad M. Noble metal alloy-coated latex versus silicone Foley catheter in short-term catheterization: a randomized controlled study. *Scand J Urol Nephrol*. 2011 Sep; 45(4):258-64.

- Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2000 Apr; 40(2):175-9.
- Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by Staphylococci. *APMIS*. 2007 Aug; 115(8):891-9.
- Stewart S, Barr S, Engiles J, Hickok NJ, Shapiro IM, Richardson DW, Parvizi J, Schaer TP. Vancomycin-modified implant surface inhibits biofilm formation and supports bone-healing in an infected osteotomy model in sheep: a proof-of-concept study. *J Bone Joint Surg Am*. 2012 Aug 1; 94(15):1406-15.
- Stojiljkovic N, Ilic S, Veljkovic M, Todorovic J, Mladenovic M.  $\alpha$ -Tocopherol reduces morphological changes and oxidative stress during gentamicin-induced acute renal failure. *Bull Exp Biol Med*. 2018 Mar; 164(4):442-445.
- Suci PA, Berglund DL, Liepold L, Brumfield LS, Pitts B, Davison W, Oltrogge L, Hoyt KO, Codd S, Stewart PS, Young M, Douglas T. High-density targeting of a viral multifunctional nanoplatform to a pathogenic, biofilm-forming bacterium. *Chem Biol*. 2007; 14(4):387-398.

## T

- Tacconelli E, Magrini N, Carmeli Y, Harbarth S, Kahlmeter G, Kluytmans J, Mendelson M, Pulcini C, Singh N, Theuretzbacher U. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *World Health Organization* (2017), pp.1-7
- Taglietti A, Diaz Fernandez YA, Amato E, et al. Antibacterial activity of glutathione-coated silver nanoparticles against Gram Positive and Gram Negative bacteria. *Langmuir*. 2012; 28(21):8140–8148.
- Taglietti A, Arciola CR, D'Agostino A, Dacarro G, Montanaro L, Campoccia D, Cucca L, Vercellino M, Poggi A, Pallavicini P, Visai L. Antibiofilm activity of a monolayer of silver nanoparticles anchored to an amino-silanized glass surface. *Biomaterials*. 2014 Feb; 35(6):1779-88.
- Tamošiūnė I, Stanienė G, Haimi P, Stanys V, Rugienius R, Baniulis D. Endophytic *Bacillus* and *Pseudomonas* spp. Modulate apple shoot growth, cellular redox balance, and protein expression under *in vitro* conditions. *Front Plant Sci*. 2018 Jun 28; 9:889.
- Tang B, Sun L, Li J, Zhang M, Wang X. Sunlight-driven synthesis of anisotropic silver nanoparticles. *Chem Eng J*. 2015 Jan 15; 260, 99-106.
- Tavares LJ, Pavarina AC, Vergani CE, de Avila ED. The impact of antimicrobial photodynamic therapy on peri-implant disease: What mechanisms are involved in this novel treatment?. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017; 17:236-244.
- Thorat ND, Dworniczek E, Brennan G, Chodaczek G, Mouras R, Gascón Pérez V, Silien C, Tofail SAM, Bauer J. Photo-responsive functional gold nanocapsules for inactivation of community-acquired, highly virulent, multidrug-resistant MRSA. *J Mater Chem B*. 2021 Jan 28; 9(3):846-856.
- Tiwari JN, Tiwari RN, Kim KS. Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices. *Prog Mater Sci*. 2012 57(4), 724–803.
- Tolker-Nielsen T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: from molecular biofilm biology to new treatment possibilities. *APMIS Suppl*. 2014 Dec; (138):1-51.

- Tolker-Nielsen T. Biofilm Development. *Microbiol Spectr.* 2015 Apr; 3(2):MB-0001-2014.
- Torras M, Roig A. From silver plates to spherical nanoparticles: snapshots of microwave-assisted polyol synthesis. *ACS Omega.* 2020 Mar 10; 5(11):5731-5738.
- Tozar T, Nastasa V, Stoicu A, Chifiriuc MC, Popa M, Kamerzan C, Pascu ML. In vitro antimicrobial efficacy of laser exposed chlorpromazine against Gram-positive bacteria in planktonic and biofilm growth state. *Microb Pathog.* 2019 Apr; 129, 250-256.
- Trafny EA, Lewandowski R, Zawistowska-Marciniak I, Stępińska M. Use of MTT assay for determination of the biofilm formation capacity of microorganisms in metalworking fluids. *World J Microbiol Biotechnol.* 2013 Sep; 29(9), 1635-43.
- Trovagunta R, Zou T, Österberg M, Kelley SS, Lavoine N. Design strategies, properties and applications of cellulose nanomaterials-enhanced products with residual, technical or nanoscale lignin-A review. *Carbohydr Polym.* 2021 Feb 15; 254,117480.
- Tsai TT, Huang TH, Chang CJ, Yi-Ju Ho N, Tseng YT, Chen CF. Antibacterial cellulose paper made with silver-coated gold nanoparticles. *Sci Rep.* 2017 Jun 9; 7(1):3155.
- Tsuji A, Nakashima E, Hamano S, Yamana T. Physicochemical properties of amphoteric beta-lactam antibiotics I: Stability, solubility, and dissolution behavior of amino penicillins as a function of pH. *J Pharm Sci.* 1978 Aug; 67(8):1059-66.
- Tuncay Tanrıverdi S, Cheaburu-Yilmaz CN, Carbone S, Özer Ö. Preparation and in vitro evaluation of melatonin-loaded HA/PVA gel formulations. *Pharm Dev Technol.* 2018 Oct; 23(8):815-825.

## V

- Vanaja M, Annadurai G. *Coleus aromaticus* leaf extract mediated synthesis of silver nanoparticles and its bactericidal activity. *Appl Nanosci.* 2013; 3,217–223.
- Vašková S, Slobodníková L, Fajtl D, Blažíčková S, Botek R, Melicháčková V. Biofilm-producing potential of urinary pathogens isolated from chronic and recurrent urinary tract infections and impact of biofilm on gentamicin and colistin in vitro efficacy. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2020 Winter; 69(1):3-9.
- Venkatesan Savunthari K, Arunagiri D, Shanmugam S, Ganesan S, Arasu MV, Al-Dhabi NA, Chi NTL, Ponnusamy VK. Green synthesis of lignin nanorods/g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanocomposite materials for efficient photocatalytic degradation of triclosan in environmental water. *Chemosphere.* 2021 Jun; 272,129801.
- Vestergaard M, Frees D, Ingmer H. Antibiotic resistance and the MRSA problem. *Microbiol Spectr.* 2019 Mar; 7(2).
- Vigderman L, Zubarev ER. Therapeutic platforms based on gold nanoparticles and their covalent conjugates with drug molecules. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013 May; 65(5):663-76.
- Vincent M, Duval RE, Hartemann P, Engels-Deutsch M. Contact killing and antimicrobial properties of copper. *J Appl Microbiol.* 2018 May; 124(5):1032-1046.
- Vujovic M, Kostic E. Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: a review of toxicological data. *J Cosmet Sci.* 2019; 70(5):223-234.

## W

- Wan W, Yeow JTW. Antibacterial properties of poly (quaternary ammonium) modified gold and titanium dioxide nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol.* 2012; 12(6), 4601-4606.
- Wang L, Hu C, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int J Nanomedicine.* 2017 Feb 14; 12:1227-1249.

- Wang SG, Chen YC, Chen YC. Antibacterial gold nanoparticle-based photothermal killing of vancomycin-resistant bacteria. *Nanomedicine (Lond)*. 2018; 13(12):1405-1416.
- Wang Y, Ouyang J, Luo X, Zhang M, Jiang Y, Zhang F, Zhou J, Wang Y. Identification and characterization of novel bi-functional cathelicidins from the black-spotted frog (*Pelophylax nigromaculata*) with both anti-infective and antioxidant activities. *Dev Comp Immunol*. 2021 Mar; 116,103928.
- Wang Y, Li Z, Yang D, Qiu X, Xie Y, Zhang X. Microwave-mediated fabrication of silver nanoparticles incorporated lignin-based composites with enhanced antibacterial activity via electrostatic capture effect. *J Colloid Interface Sci*. 2021 Feb 1; 583:80-88.
- Warren MR, Sun H, Yan Y, Cremer J, Li B, Hwa T. Spatiotemporal establishment of dense bacterial colonies growing on hard agar. *Elife*. 2019 Mar 11; 8:e41093.
- Weerasekera HA, Silvero MJ, Regis Correa da Silva D, Scaiano JC. A database on the stability of silver and gold nanostructures for applications in biology and biomolecular sciences. *Biomater Sci*. 2016 Dec 20; 5 (1):89-97.
- Wijesiri N, Ozkaya-Ahmadov T, Wang P, Zhang J, Tang H, Yu X, Ayres N, Zhang P. Photodynamic inactivation of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* using hybrid photosensitizers based on amphiphilic block copolymer-functionalized gold nanoparticles. *ACS Omega*. 2017; 2, 5364–5369.
- Wilson BC, Patterson MS. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol*. 2008 May 7; 53(9):R61-109.
- Witzler M, Alzagameem A, Bergs M, Khaldi-Hansen BE, Klein SE, Hielscher D, Kamm B, Kreyenschmidt J, Tobiasch E, Schulze M. Lignin-derived biomaterials for drug release and tissue engineering. *molecules*. 2018 Jul 27; 23(8):1885.
- Wrona M, Patel K, Wardman P. Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med*. 2005 Jan 15; 38(2):262-70.
- Wu H, Moser C, Wang HZ, Høiby N, Song ZJ. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int J Oral Sci*. 2015 Mar 23; 7(1):1-7.

## X

- Xia Y, Halas N. Shape-controlled synthesis and surface plasmonic properties of metallic nanostructures. *MRS Bulletin*. 2005; 30(5), 338-348.
- Xu Y, Larsen LH, Lorenzen J, Hall-Stoodley L, Kikhney J, Moter A, Thomsen TR. Microbiological diagnosis of device-related biofilm infections. *APMIS*. 2017 Apr; 125(4):289-303.
- Xu Z, Liang Y, Lin S, Chen D, Li B, Li L, Deng Y. Crystal violet and XTT assays on *Staphylococcus aureus* biofilm quantification. *Curr Microbiol*. 2016 Oct; 73(4):474-82.

## Y

- Yachia D, Lask D, Rabinson S. Self-retaining intraurethral stent: an alternative to long-term indwelling catheters or surgery in the treatment of prostatism. *AJR Am J Roentgenol*. 1990 Jan; 154(1):111-3.
- Yang K, Han Q, Chen B, Zheng Y, Zhang K, Li Q, Wang J. Antimicrobial hydrogels: promising materials for medical application. *Int J Nanomedicine*. 2018 Apr 12; 13:2217-2263.
- Yang W J, Fortunati E, Gao DQ, Balestra GM, Giovanale G, He XY, Torre, Kenny JM, Puglia D. Valorization of acid isolated high yield lignin nanoparticles as innovative antioxidant/antimicrobial organic materials. *ACS Sustainable Chem Eng*. 2018; 6, 3502.

- Yang X, Wei Q, Shao H, Jiang X. Multivalent aminosaccharide-based gold nanoparticles as narrow-spectrum antibiotics in vivo. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019 Feb 27; 11(8):7725-7730.
- Yao W, Kuan EC, Francis NC, St John MA, Grundfest WS, Taylor ZD. Laser-generated shockwaves enhance antibacterial activity against biofilms in vitro. *Lasers Surg Med*. 2017 Jul; 49(5):539-547.
- Yassin MA, Elkhooly TA, Elsherbiny SM, Reicha FM, Shokeir AA. Facile coating of urinary catheter with bio-inspired antibacterial coating. *Heliyon*. 2019 Dec 13; 5(12):e02986.
- Yin Y, Liu J, Jiang G. Sunlight-induced reduction of ionic Ag and Au to metallic nanoparticles by dissolved organic matter. *ACS Nano*. 2012 Sep 25; 6(9):7910-9.
- Yin Y, Shen M, Zhou X, Yu S, Chao J, Liu J, Jiang G. Photoreduction and stabilization capability of molecular weight fractionated natural organic matter in transformation of silver ion to metallic nanoparticle. *Environ Sci Technol*. 2014 Aug 19; 48(16):9366-73.
- Yin Y, Yu S, Liu J, Jiang G. Thermal and photoinduced reduction of ionic Au (III) to elemental Au nanoparticles by dissolved organic matter in water: possible source of naturally occurring Au nanoparticles. *Environ Sci Technol*. 2014; 48(5):2671-9.
- Yu Q, Li J, Zhang Y, Wang Y, Liu L, Li M. Inhibition of gold nanoparticles (AuNPs) on pathogenic biofilm formation and invasion to host cells. *Sci Rep*. 2016 May 25; 6:26667.
- Yu S, Hachtel JA, Chisholm MF, Pantelides ST, Laromaine A, Roig A. Magnetic gold nanotriangles by microwave-assisted polyol synthesis. *Nanoscale*. 2015 Sep 7; 7(33):14039-46.

## Z

- Zevallos Torres LA, Woiciechowski AL, Oliveira de Andrade Tanobe V, Zandoná Filho A, Alves de Freitas R, Nosedá MD, Saito Szameitat E, Faulds C, Coutinho P, Bertrand E, Soccol CR. Lignin from oil palm empty fruit bunches: Characterization, biological activities and application in green synthesis of silver nanoparticles. *Int J Biol Macromol*. 2021 Jan 15; 167:1499-1507.
- Zhan G, Ke L, Li Q, Huang J, Hua D, Ibrahim AR, Sun D. Synthesis of gold nanoplates with bioreducing agent using syringe pumps: a kinetic control. *Ind Eng Chem Res*. 2012; 51, 15753–15762.
- Zhanell GG, Calic D, Schweizer F, Zelenitsky S, Adam H, Lagacé-Wiens PR, Rubinstein E, Gin AS, Hoban DJ, Karlowsky JA. New lipoglycopeptides: a comparative review of dalbavancin, oritavancin and telavancin. *Drugs*. 2010 May 7; 70(7):859-86.
- Zhang X, Xia LY, Chen X, Chen Z, Wu FG. Hydrogel-based phototherapy for fighting cancer and bacterial infection. *SCMs*. 2017 Feb 24; 60(6), 487–503.
- Zhang Y, Peng H, Huang W, Zhou Y, Yan D: Facile preparation and characterization of highly antimicrobial colloid Ag or Au nanoparticles. *J Colloid Interface Sci*. 2008; 325(2), 371-376.
- Zhang Y, Shareena Dasari TP, Deng H, Yu H. Antimicrobial activity of gold nanoparticles and ionic gold. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2015; 33(3):286-327.
- Zhang LJ, Gallo RL. Antimicrobial peptides. *Curr Biol*. 2016 Jan 11; 26(1):R14-9.
- Zhang H, Chen S, Jia X, Huang Y, Ji R, Zhao L. Comparison of the phytotoxicity between chemically and green synthesized silver nanoparticles. *Sci Total Environ*. 2021 Jan 15; 752:142264.
- Zhao M, Shan T, Wu Q, Gu L. The antibacterial effect of graphene oxide on *Streptococcus mutans*. *J Nanosci Nanotechnol*. 2020 Apr 1; 20(4):2095-2103.

- Zhao Y, Tian Y, Cui Y, Liu W, Ma W, Jiang X. Small molecule-capped gold nanoparticles as potent antibacterial agents that target Gram-negative bacteria. *J Am Chem Soc.* 2010 Sep 8; 132(35):12349-56.
- Zhao G, Stevens SE Jr. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. *Biometals.* 1998 Jan; 11(1):27-32.
- Zharov VP, Mercer KE, Galitovskaya EN, Smeltzer MS. Photothermal nanotherapeutics and nanodiagnostics for selective killing of bacteria targeted with gold nanoparticles. *Biophys J.* 2006 Jan 15; 90(2):619-27.
- Zheng Y, Yu E, Weng Q, Zhou L, Li Q. Optimization of hydrogel containing toluidine blue O for photodynamic therapy in treating acne. *Lasers Med Sci.* 2019 Oct; 34(8):1535-1545.
- Zheng H, Meng YS, Zhu Y. Frontiers of in situ electron microscopy. *MRS Bulletin.* 2015 Jan 13; 40(01), 12–18.
- Zhou Y, Kong Y, Kundu S, Cirillo JD, Liang H. Antibacterial activities of gold and silver nanoparticles against *Escherichia coli* and *Bacillus Calmette-Guérin*. *J Nanobiotechnology.* 2012 May 6; 10:19.
- Zhu YJ, Chen F. Microwave-assisted preparation of inorganic nanostructures in liquid phase. *Chem Rev.* 2014 Jun 25; 114(12):6462-555.
- Zohuriaan-Mehr M J, Pourjavadi A, Salimi H, Kurdtabar M. Protein- and homo poly(amino acid)-based hydrogels with super-swelling properties. *Polym Adv Technol.* 2009 Mar 04; 20, 655– 671.

## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

### Publicaciones científicas

- ❖ Silvero C MJ, Rocca DM, de la Villarmois EA, Fournier K, Lanterna AE, Pérez MF, Becerra MC, Scaiano JC. *"Selective Photoinduced Antibacterial Activity of Amoxicillin-Coated Gold Nanoparticles: From One-Step Synthesis to in Vivo Cytocompatibility"*. ACS Omega. 2018 Jan 31; 3(1):1220-1230.
- ❖ Rocca DM, Vanegas JP, Fournier K, Becerra MC, Scaiano JC, Lanterna A. *"Biocompatibility and photo-induced antibacterial activity of lignin-stabilized noble metal nanoparticles"*. RSC Advances. 2018; 8: 40454- 40463.
- ❖ Rocca DM, Aiassa V, Zoppi A, Silvero Compagnucci J, Becerra MC. Nanostructured Gold Coating for Prevention of Biofilm Development in Medical Devices. J Endourol. 2020 Mar; 34(3):345-351.
- ❖ Rocca DM, Silvero C MJ, Aiassa V, Cecilia Becerra M. Rapid and effective photodynamic treatment of biofilm infections using low doses of amoxicillin-coated gold nanoparticles. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2020 Sep; 31:101811.

### Presentaciones a congresos

#### Nacionales:

- ❖ VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas (COIFFA). XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina Farmacología Experimental (SAFE). III Congreso Sudamericano de Biofarmacia y Farmacocinética (BFFC).  
Denominación del trabajo: *"Producción de especies reactivas del oxígeno en Staphylococcus aureus meticilino resistente y leucocitos generadas por linezolid"*.  
Denominación del trabajo: *"Cloranfenicol: β-ciclodextrina: N-acetilcisteína: un nuevo sistema ternario como estrategia para mejorar propiedades desfavorables del antimicrobiano"*. Período: Noviembre de 2015.
- ❖ XVI Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología SADI, Mendoza.  
Denominación del trabajo: Producción de especies reactivas del oxígeno en *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y leucocitos generadas por linezolid.  
Denominación del trabajo: *"Cloranfenicol: β-ciclodextrina: N-acetilcisteína: un nuevo sistema ternario como estrategia para mejorar propiedades desfavorables del antimicrobiano"*. Período: Mayo de 2016.



- ❖ III Reunión de fotobiólogos moleculares argentinos. GRAFOB del Bicentenario. San Miguel de Tucumán. Seleccionado para presentación oral.

Denominación del trabajo: *“Erradicación de biofilms resistentes a antibióticos mediante Terapia Fotodinámica Antibacteriana utilizando nanopartículas de oro”*. Período: agosto de 2016.

- ❖ XXIII Congreso Latinoamericano y Argentino de Microbiología. ALAM-CAM. Rosario de Santa Fe.

Denominación del trabajo: *“LINEZOLID: un superhéroe en la erradicación de biofilms bacterianos”*. Período: septiembre de 2016.

- ❖ XLVIII Reunión anual de Asociación Argentina de Farmacología Experimental. Mar del Plata. Premio Simposio Jovenes Investigadores safe 2016.

Denominación del trabajo: *“Desarrollo de estrategias farmacéuticas para la reducción de la toxicidad leucocitaria, incremento de la actividad antibiofilm y mejora de las propiedades fisicoquímicas de cloranfenicol”*.

Coordinado por: Dra. Virginia Aiassa.

Integrantes: Dra. Ariana Zoppi: *“Mejora de las propiedades fisicoquímicas de cloranfenicol mediante acomplejación con ciclodextrinas y aminoácidos”*. Dra. Virginia Aiassa: *“Estrategias farmacéuticas para prevenir el estrés oxidativo inducido por cloranfenicol en leucocitos”*. Farm. Diamela Rocca: *“Aumento de la actividad antibiofilm del sistema multicomponente Cloranfenicol:  $\beta$ -ciclodextrina: N-acetilcisteína”*. Período: noviembre de 2016.

- ❖ IV NANOCÓRDOBA. Villa Carlos Paz.

Denominación del trabajo: *“Síntesis de nanopartículas conjugadas con antimicrobianos”*. Diamela M. Rocca; M. Jazmín Silvero, Virginia Aiassa; M. Cecilia Becerra. Período: abril de 2017.

- ❖ REUNION CONJUNTA DE SOCIEDADES DE BIOCENCIAS.

Denominación del trabajo: *Biocompatibility and biodistribution of amoxicillin coated gold*. Silvero MJ, Rocca D, Artur de la Villarmois E, Perez MF, Becerra MC. Período: 13 al 17 noviembre de 2017. Buenos Aires. Argentina.

- ❖ Congreso Argentino de Microscopía SAMIC.

Denominación del trabajo: *“Erradicación de biofilm bacteriano resistente a antibiótico por nanopartículas de oro selectivas”*. M. Jazmín Silvero; Diamela M. Rocca; Virginia Aiassa; M. Cecilia Becerra. Período: mayo 2018.

- ❖ IV Reunión de fotobiólogos moleculares argentinos. GRAFOB. Bariloche. Argentina.

Denominación del trabajo: *“Erradicación de biofilm bacteriano mediante Terapia Fotodinámica Antibacteriana (PACT)”*. Diamela Rocca, M. Jazmín Silvero, Virginia Aiassa, M. Cecilia Becerra. Período: octubre 2018.

- ❖ XV Congreso Argentino de Microbiología 2019. Buenos Aires. Argentina.  
Denominación del trabajo: “Actividad antimicrobiana de Amoxicilina@AUNP en *Pseudomonas aeruginosa*”. Rocca D, Silvero MJ, Becerra MC. Período: Septiembre de 2019. Poster.
- ❖ XV Congreso Argentino de Microbiología 2019. Buenos Aires. Argentina.  
Denominación del trabajo: “Mecanismos de acción de nanopartículas de oro Para Terapia Fotodinámica Antimicrobiana”. Silvero C., María Jazmín; Rocca, Diamela M.; Angel Villegas, Natalia; Becerra, M. Cecilia. Período: Septiembre de 2019. Poster.
- ❖ V Reunión GRAFOB 2020.  
Denominación del trabajo: “Amoxicillin-conjugated gold nanoparticles used in Antimicrobial Photodynamic Therapy. Formulation of gel for topical application”. Diamela M. Rocca, M. Jazmín Silvero, Virginia Aiassa, M. Cecilia Becerra. Septiembre 2020. Modalidad virtual.

#### **Internacionales:**

- ❖ 3<sup>rd</sup> International Caparica Conference in Antibiotic Resistance.  
Denominación del trabajo: “Gold nanoparticles as alternative therapy for antibiotic-resistant bacterial strains”. María Cecilia Becerra, María Jazmín Silvero, Diamela Rocca, Virginia Aiassa, Juan C. Scaiano. Junio 2019. Caparica. Portugal.
- ❖ XIII ELAFOT, 2017. Seleccionado para presentación oral.  
Denominación del trabajo: “Amoxicillin coated gold nanoparticles with photo-antibacterial action on antibiotic resistant strains”. Diamela María Rocca, María Jazmín Silvero, Virginia Aiassa, Juan C. Scaiano, María Cecilia Becerra. Septiembre 2017, Carlos Paz, Córdoba.
- ❖ 2<sup>nd</sup> International Caparica Conference in Antibiotic Resistance.  
Denominación del trabajo: “A new antimicrobial strategy involving gold nanoparticles and green leds”. Silvero MJ, Rocca DM, Aiassa V, Artur de la Villarmois E, Scaiano JC, Pérez MF, Becerra MC. Junio 2017. Caparica. Portugal.
- ❖ VII Congreso Internacional de Comunicación Pública de la Ciencia y Tecnología. COPUCI 2019.  
Denominación del trabajo: “Creando conciencia ambiental sobre reciclaje”. Bravi Viviana S, Cano Aristizábal Viviana, Rocca Diamela M, Zoppi Ariana, Aiassa Virginia. Período: octubre 2019.