



Biosíntesis de nanopartículas metálicas.
Estudio de la actividad antimicrobiana y de su relación
con la generación de estrés oxidativo en bacterias
multirresistentes

Farm. Melisa de los Ángeles Quinteros
Tesis de Doctorado en Química
Año 2017

IMBIV-CONICET
Departamento de Ciencias Farmaceuticas
Facultad de Ciencias Quimicas
Universidad Nacional de Córdoba

DIRECTORA:

Prof. Dra. Páez Paulina Laura

COMISIÓN ASESORA:

Prof. Dr. Allemandi Daniel

Prof. Dra. Sola Claudia

Prof. Dr. Wunderlin Daniel

EVALUADOR EXTERNO:

Prof. Dra. Nora Lía Padola

(Fac. de Ciencias Veterinarias - UNICEN).

Dedicada a Luz e Isabella

*“Disfruta del pánico que te provoca
tener la vida por delante.
Vívela intensamente,
sin mediocridad.
Piensa que en ti está el futuro
y encara la tarea con orgullo y sin miedo”*

W. W

Agradecimientos,

Al Departamento de Ciencias Farmacéuticas por darme el lugar para desarrollar este Doctorado y a todos los que forman parte del mismo.

A CONICET por la financiación de este trabajo de Tesis.

A la comisión asesora, Dr. Allemandi, a la Dra. Sola y el Dr. Wunderlin, por haberme acompañado en el desarrollo de esta tesis y los grandes aportes realizados.

A Paulina, brillas por tu calidad como profesional pero lo que realmente te distingue es la grandeza de tu corazón y la empatía que te caracteriza, sos una persona excepcional. Gracias infinitas por guiarme en este camino, por tus consejos, comprensión y tu compañía.

A mi querida Doc. Albesa, gracias por aceptarme desde un principio en su laboratorio, ha sido un honor para mí ser parte de su equipo.

A mis compas del Labo, Ceci, Ana, Vir (tus mates son lo mejor del mañana), Sil, Ara, Mariano, Agus, nada hubiera sido lo mismo sin ustedes, gracias por ser parte de mi vida.

A todas las genias que forman parte de los seminarios de Microbiología: Gaby, Mari P., Maripi, Iva, Pame, gracias por la buena onda de siempre.

A Pablo e Ivana, por las contribuciones realizadas en este tiempo.

A todo el grupo de Farmacognosia, pero sobre todo a Jesi, Pame, Juli, Dani, por recibirme siempre con una sonrisa en su labo y por darme una mano cuando la necesite...las quiero!!!!

A Diame, por tu alegría, tu bondad y la solidaridad que te caracteriza..nunca cambies!!!

A Vivi, mi mano derecha, mi ricurita exótica, sos la prolongación de mi risa, sos lo mejor que tiene Colombia (junto al café obvio), siempre juntas compañera!!!!

A Jaz, amiga de mi alma, sos pura fortaleza, irradas energia...amiga incondicional con todas las letras.

A Solchu, esta amistad nació el primer dia que empezó este Doctorado y no tiene fecha de caducidad, me llenas de alegría y felicidad, gracias por tu lealtad y tu espíritu de grandeza....te quiero amiga.

A mi prima Mari, gracias por ser incondicional, por acompañarme y apoyarme siempre, sos mi hermana del alma.

A mis amigos que me sacan de la ciencia y me alegran todos los días!!! : Marce, Emi, Jaz, Lean, Musta, Lucho, Luca, Colo, Grillo y Maxi!!!!!!

A mi mamá, sos la persona que mas admiro en esta vida....te amo con todo mi corazón.

A mi papá, por cuidarme desde el cielo.

A mis hermanos:

Seba por protegerme desde niña, por tu paz y tu calidez,

Eva por ser mi ángel guardián, la mujer que más me enseñó a luchar y por guiarme desde niña, te amo hermana siempre estás en mi corazón.

A Flopi, por tu alegría, tu locuras, tu risa, por ser mi primera amiga, te adoro.

A Eli y Leo, por ser lo mejor que me regalaron mis hermanos, los quiero!!!!

A Isabella, por ser una luchadora desde la pancita de mi hermana, te amo ahijada, sos mi fuente de energía.

A Martín, mi compañero en esta montaña rusa que llamamos vida...gracias por alentarme a empezar este camino, por enseñarme a ser perseverante y luchar por mis sueños, por tu paciencia y tu increíble corazón, te amo muchísimo.

A Luz, princesa de mis sueños, gracias hija por enseñarme a encontrar la felicidad en las pequeñas cosas, por tus mimos y abrazos, por tu sonrisa y tus ojos que iluminan mi vida.

Resumen

La resistencia de los microorganismos a los antibióticos de primera línea para uso clínico es un problema global conocido desde hace muchos años. La gran capacidad que las bacterias han desarrollado para enfrentar la acción de los antimicrobianos ha generado en los científicos la necesidad de encontrar nuevos compuestos bioactivos que posean actividad antimicrobiana frente a las diferentes especies bacterianas. Debido a las innumerables propiedades que presentan las nanopartículas, se espera que la plata en su forma elemental y en tamaño nanométrico actúe como un antimicrobiano con mejores destrezas con respecto a su forma iónica. De todos los métodos de fabricación de nanomateriales se ha creado un gran interés por el término biosíntesis, que se caracteriza por utilizar la maquinaria proveniente de microorganismos y/o plantas y por ser eficiente desde el punto de vista energético y no tóxica. En este contexto, se plantea en este trabajo de tesis obtener nanopartículas de plata (NPsAg) a través de un método ecoamigable y evaluar su actividad como agente antimicrobiano, como así también, su capacidad para modificar el metabolismo oxidativo de bacterias y su toxicidad en células humanas, con el propósito de contribuir al conocimiento sobre diversos aspectos involucrados en el posible mecanismo de acción de las mismas. Se encontró que la biosíntesis de NPsAg a partir del sobrenadante de *P. aeruginosa* fue exitosa, obteniéndose NPsAg de tamaño homogéneo y estables. Las mismas fueron efectivas como antimicrobianos frente a diferentes especies bacterianas, superando la acción de la plata en su forma iónica y antibióticos de actual uso clínico. Se observó que las NPsAg produjeron un estado de estrés oxidativo en las células bacterianas estudiadas, mediante el aumento de las especies reactivas del

oxígeno y un desbalance en los sistemas antioxidantes protectores. Se logró cuantificar la oxidación de proteínas, lípidos y el daño al ADN, y se expusieron como evidencia del estrés oxidativo producido por las NPsAg. Se propone el uso de las NPsAg biosintetizadas como un potencial antimicrobiano para ser utilizado en aquellas infecciones donde el tratamiento con los antibióticos existentes no es viable.

1. INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS	22
2. MATERIALES Y MÉTODOS	23
2.1 Biosíntesis y caracterización de nanopartículas metálicas	24
2.1.1 Obtención de nanopartículas de plata	24
2.1.2 Caracterización de NPs biosintetizadas	25
2.1.2.1 Cambio de color del medio de reacción	25
2.1.2.2 Espectroscopia de absorción de luz ultravioleta y visible	25
2.1.2.2 Potencial Z y tamaño de partícula	25
2.1.2.3 Microscopia electrónica de transmisión	26
2.1.2.4 Espectroscopia infrarroja	26
2.1.2.5 Difracción de Rayos X	26
2.1.2.6 Caracterización del <i>capping</i>	27
2.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana	28
2.2.1 Determinación de la actividad antibacteriana	28
2.2.1.1 Concentración inhibitoria mínima y Concentración bactericida mínima	29
2.2.1.2 Efecto sobre el crecimiento bacteriano	29
2.2.2 Determinación de la actividad antifúngica	30
2.3. Efecto de nanopartículas de plata sobre el metabolismo oxidativo	31
2.3.1 Determinación de especies reactivas del oxígeno	31
2.3.1.1 Método espectrofotométrico de NBT	31
2.3.1.2 Método espectrofluorométrico utilizando la sonda 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate diacetoximetil	

ester	32
2.3.1.2.1 En presencia de secuestrantes de ERO	32
2.3.1.3 Microscopía de Fluorescencia	33
2.3.2 Determinación de ERN por el método de Griess	33
2.3.3 Determinación de proteínas por el método de Bradford	34
2.4. Efecto de nanopartículas de plata sobre macromoléculas	34
2.4.1 Preparación de muestra	35
2.4.2 Evaluación de la peroxidación lipídica	35
2.4.2.1 En presencia de secuestrantes de ERO	35
2.4.3 Determinación de la oxidación de proteínas	36
2.4.3.1 En presencia de secuestrantes de ERO	36
2.4.4 Determinación del potencial de membrana	36
2.4.5 Determinación del daño al ADN	37
2.4.5.1 Extracción y Purificación	37
2.4.5.2 Cuantificación del nucleósido oxidado 8-OH-Dg	38
2.4.5.3 Interacción nanopartículas-ADN	38
2.5. Efecto de nanopartículas de plata sobre sistemas antioxidantes	38
2.5.1 Sistemas antioxidantes enzimáticos	39
2.5.1.1 Determinación cuantitativa de la actividad de catalasa	39
2.5.1.2 Determinación cuantitativa de la actividad de superóxido dismutasa	39
2.5.2 Evaluación de sistemas antioxidantes no enzimáticos	40
2.5.2.1 Determinación cuantitativa de glutatión reducido	40
2.5.3 Determinación de la capacidad antioxidante total	41
2.6. Efecto de nanopartículas de plata sobre células eucariotas	41
2.6.1 Obtención de leucocitos polimorfonucleares	41

2.6.2 Determinación de la viabilidad de leucocitos mediante técnicas espectrofotométricas.	42
2.6.2.1 Ensayo con Resazurina	42
2.6.2.2 Ensayo con XTT	42
2.6.3 Determinación de especies reactivas del oxígeno	43
2.6.4 Microscopia electrónica de transmisión	43
2.6.5 Obtención de eritrocitos	44
2.6.5.1 Actividad hemolítica de nanopartículas de plata	44
2.7. Análisis estadístico	44
3. RESULTADOS	45
3.1 Biosíntesis y caracterización de nanopartículas metálicas	46
3.1.1 Obtención de nanopartículas de plata	46
3.1.2 Caracterización de NPsAg biosintetizadas	51
3.1.2.1 Cambio de color del medio de reacción	51
3.1.2.2 Espectroscopia de absorción de luz ultravioleta y visible	51
3.1.2.3 Potencial Z y tamaño de partícula	52
3.1.2.4 Microscopia electrónica de transmisión	52
3.1.2.5 Espectroscopia infrarroja	54
3.1.2.6 Difracción de Rayos X	56
3.1.2.7 Caracterización del <i>capping</i>	57
3.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana	60
3.2.1 Determinación de la actividad antibacteriana	60
3.2.1.1 Efecto sobre el crecimiento bacteriano	63
3.2.2 Determinación de la actividad antifúngica	64
3.3. Efecto de nanopartículas de plata sobre el metabolismo oxidativo	66

3.3.1 Determinación de especies reactivas del oxígeno	66
3.3.1.1 Método espectrofotométrico de NBT	66
3.3.1.2 Método espectrofluorométrico utilizando la sonda 6-carboxy-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato diacetoximetil éster	68
3.3.1.2.1 En presencia de secuestrantes de ERO	70
3.3.1.3 Microscopia de Fluorescencia	73
3.3.2 Determinación de ERN por el método de Griess	74
3.4. Efecto de nanopartículas de plata sobre macromoléculas	78
3.4.1 Evaluación de la peroxidación lipídica	78
3.4.1.1 En presencia de secuestrantes de ERO	81
3.4.2 Determinación de la oxidación de proteínas	82
3.4.2.1 En presencia de secuestrantes de ERO	84
3.4.3 Determinación del potencial de membrana	86
3.4.4 Determinación del daño al ADN	89
3.4.4.1 Cuantificación del nucleósido oxidado 8-OH-dG	89
3.4.4.2 Interacción nanopartículas-ADN	90
3.5. Efecto de nanopartículas de plata sobre sistemas antioxidantes	94
3.5.1 Sistemas antioxidantes enzimáticos	94
3.5.1.1 Determinación cuantitativa de la actividad de catalasa	94
3.5.1.2 Determinación cuantitativa de la actividad de superóxido dismutasa	96
3.5.2 Evaluación de sistemas antioxidantes no enzimáticos	98
3.5.2.1 Determinación cuantitativa de glutatión reducido	98
3.5.3 Determinación de la capacidad antioxidante total	100
3.6. Efecto de nanopartículas de plata sobre células eucariotas	103

3.6.1 Determinación de la viabilidad de leucocitos mediante técnicas espectrofotométricas.	103
3.6.2 Determinación de especies reactivas del oxígeno	104
3.6.3 Microscopia electrónica de transmisión	104
3.6.2. Actividad hemolítica de nanopartículas de plata	105
4. DISCUSIÓN	108
5. CONCLUSIÓN	123
6. BIBLIOGRAFÍA	126
PROYECCIONES	145
APÉNDICE 1 MEDIOS DE CULTIVO Y BUFFERS	146
APÉNDICE 2 PUBLICACIONES REALIZADAS Y PRESENTACIONES	
A CONGRESOS	152

ABREVIATURAS

8-OHdG	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina
ADN	ácido desoxirribonucleico
AgNO ₃	nitrate de plata
AMH	agar Mueller Hinton
ANS	1-anilino-8-naftaleno sulfonato
AOPP	productos proteicos de oxidacion avanzada
ATCC	American Type Culture Collection
ATS	agar tripteína soya
CAT	catalasa
CBM	concentración bactericida mínima
CIM	concentración inhibitoria mínima
CIP	ciprofloxacina
CMH	caldo Mueller Hinton
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CPD	caldo papa dextrosa
CTS	caldo tripteína soya
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DLS	dispersión dinámica de la Luz
DMSO	dimetilsulfóxido
DO	densidad óptica
DRX	difracción de rayos X
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
ERN	especies reactivas del nitrógeno
ERO	especies reactivas del oxígeno
FRAP	ferric reducing antioxidant power assay
GSH	glutación reducido
GPx	glutación peroxidasa
GRs	glutación reductasa
GSSG	glutación oxidado
H ₂ -DCFDA	6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceina diacetato diacetoximetil ester
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogeno
HOO·	hidroperoxil radical

IR	espectroscopia infrarroja
LB	caldo luria-bertani
meq	miliequivalentes
MDA	malondialdehído
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a la meticilina
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido reducida
NaNO ₂	nitrito de sodio
NADPH	dihidro nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
NBT	azul de nitrotetrazolio
NM	nanomateriales
NPs	nanopartículas
NPsAg	nanopartículas de plata
O ₂	oxígeno molecular
¹ O ₂	oxígeno singlete
O ₂ ^{-•}	radical anión superóxido
HO [•]	radical hidroxilo
OH	anión hidroxilo
ON [•]	óxido nítrico
ONOO ⁻	anión peroxinitrito
PBS	buffer fosfato
ROO [•]	radical peroxilo
SOD	superóxido dismutasa
TEM	microscopia electrónica de transmisión
Trx	tioredoxina
UFC	unidades formadoras de colonias
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfofenil)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilida



CAPÍTULO 1

Introducción



1. Introducción

La resistencia de los microorganismos a los antibióticos de primera línea para uso clínico es un problema global conocido desde hace muchos años¹. La identificación de especies bacterianas que sobreviven a la acción de aquellos antimicrobianos que se utilizan en última instancia para la recuperación del paciente es inmensurable. Algunos casos reportados son, por ejemplo, la detección de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenemes en toda Latinoamérica^{2,3}, la aparición de cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a colistin⁴ y de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina⁵, que están produciendo en el ámbito de la salud una gran incertidumbre acerca de la elección en los tratamientos para este tipo de infecciones. La gran capacidad que las bacterias han desarrollado para enfrentar la acción de los antimicrobianos ha generado en los científicos la necesidad de encontrar nuevos compuestos bioactivos que posean actividad antimicrobiana frente a las diferentes especies bacterianas.

Takeuchi Naboru definió a la Nanociencia como el estudio de los procesos fundamentales que ocurren en las estructuras de un tamaño entre 1 y 100 nm, las cuales se conocen como nanoestructuras y a la Nanotecnología como al área de investigación que estudia, diseña y fabrica materiales o sistemas a escalas nanoscópicas y les da alguna aplicación práctica⁶. Los grandes avances que se han realizado en Nanociencia han permitido descubrir las excelentes propiedades fisicoquímicas de la materia cuando se encuentran en tamaño nanométrico y sus diferencias de cuando se encuentran en un estado macro/micrométrico. Cuando una partícula disminuye en tamaño, una mayor proporción de átomos se

encuentra en la superficie en comparación con su interior. Una mayor relación superficie/área cambia o mejora las propiedades de las nanopartículas (NPs) tales como reactividad, resistencia y características eléctricas. En el área de la Biomedicina, hay dos características relevantes de las NPs que las distingue de los demás materiales: i) debido a su tamaño pueden llegar con mayor rapidez y efectividad a un blanco elegido luego de ser administrados y, ii) la relación área/volumen es mayor que en un material macroscópico, lo cual permite modificar su superficie con una mayor cantidad de moléculas activas y ofrece una mayor exposición ante el blanco elegido⁷. Por lo tanto, si reducimos las dimensiones de un material, modificaremos sus propiedades y en consecuencia podremos diseñar materiales con propiedades deseadas. Todos estos factores establecieron la posibilidad de considerar a la nanotecnología como una alternativa prometedora a los enfoques basados solo en antibióticos, principalmente en áreas como la entrega de fármacos antimicrobianos, diagnóstico y control de infecciones cruzadas, pero sobre todo en la superación de los patógenos resistentes a los antibióticos⁸.

La plata en sus diferentes formas, plata metálica, nitrato de plata y plata sulfadiazina, se ha utilizado como tratamiento antimicrobiano en heridas por quemaduras, en odontología, en catéteres y en el control de infecciones bacterianas desde hace muchos años⁹. Sin embargo, en la actualidad se estudia la posibilidad de que ejerza su acción antimicrobiana como plata elemental.

Síntesis de nanomateriales

Los métodos de fabricación de los nanomateriales (NM), en general, se dividen en dos categorías: “*top-down*” (de arriba hacia abajo) o “*bottom-up*” (de abajo hacia arriba)¹⁰ (Fig.1). El método “*top-down*” se lleva a cabo a partir de materiales de grandes dimensiones que se reducen hasta alcanzar tamaños de pocos nanómetros empleando técnicas como la molienda o desgaste. El método “*bottom-up*” consiste en la construcción de estructuras a partir de átomos o moléculas en fase gaseosa o en solución, a semejanza de lo que ocurre en la síntesis de proteínas, ADN o estructuras celulares en los seres vivos. Este último método es el más utilizado para la fabricación de NM. A partir de este concepto, se han desarrollado diversos métodos químicos, físicos y biológicos que permiten la síntesis de NPs.

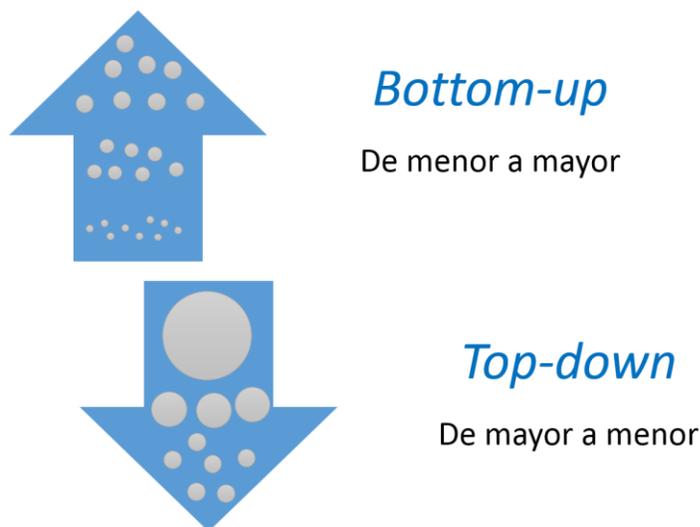


Fig.1. Mecanismos posibles de formación de NPs. *Bottom-up* de átomos a moléculas y posteriormente a NPs. *Top-down* del material bulk a molienda fina y posteriormente a NPs.

Síntesis química vs síntesis green:

La metodología *bottom-up* se caracteriza por iniciar el proceso con la reducción de los iones metálicos a átomos metálicos, seguido por la agregación controlada de estos átomos. En el caso de los métodos químicos, se utiliza la reducción química, técnicas electroquímicas y fotoquímicas, siendo la primera la estrategia más empleada en el caso de nanopartículas de plata (NPsAg)¹¹. Los métodos químicos poseen algunas desventajas que incluyen el uso de solventes tóxicos, la generación de subproductos peligrosos y el alto consumo de energía. En consecuencia, existe una necesidad esencial de desarrollar procedimientos ambientalmente benignos para la síntesis de NPs metálicas. En los últimos años, se ha creado un gran interés por el término “biosíntesis” y básicamente consiste en la utilización de plantas, algas, hongos, bacterias y virus para la producción de NM de bajo costo, eficientes desde el punto de vista energético y no tóxicos¹².

Las NPsAg biosintetizadas son más aceptables para aplicaciones médicas debido a una biocompatibilidad superior que las sintetizadas químicamente¹³. Esta biocompatibilidad estaría mediada por las biomoléculas que actúan como estabilizantes naturales de las NPs, impidiendo no sólo la agregación a lo largo del tiempo sino también otorgándoles una estabilización adicional¹⁴.

Biosíntesis de NPs por bacterias

El mecanismo preciso de la síntesis de NPs que emplean agentes biológicos no ha sido aún definido. Muchos microorganismos producen materiales inorgánicos intra o extracelularmente, pero el mecanismo para la síntesis intra y extracelular de NPs (Fig. 2) es diferente para cada tipo de agente biológico

(bacterias, hongos y plantas). En el procedimiento intracelular se añade, al medio de cultivo que contiene células bacterianas, la sal de plata y se incuba en condiciones apropiadas. El método de síntesis intracelular requiere de pasos adicionales para recuperar las NPs acumuladas en el interior de las células por lo que es el menos utilizado para la obtención de las mismas¹⁵. La síntesis extracelular de NPs se produce fuera de la célula bacteriana e involucra la reducción de los iones metálicos a NP en presencia de enzimas y compuestos reductores generados por la actividad de la célula¹⁵.

Un mecanismo propuesto por muchos autores es que las enzimas reductasas extracelulares producidas por los microorganismos reducen los iones plata a escala nanométrica. Mediante un ensayo de identificación de proteínas se ha descubierto que la enzima reductasa dependiente de NADH está implicada en la biorreducción de iones de plata a NPsAg¹⁶.

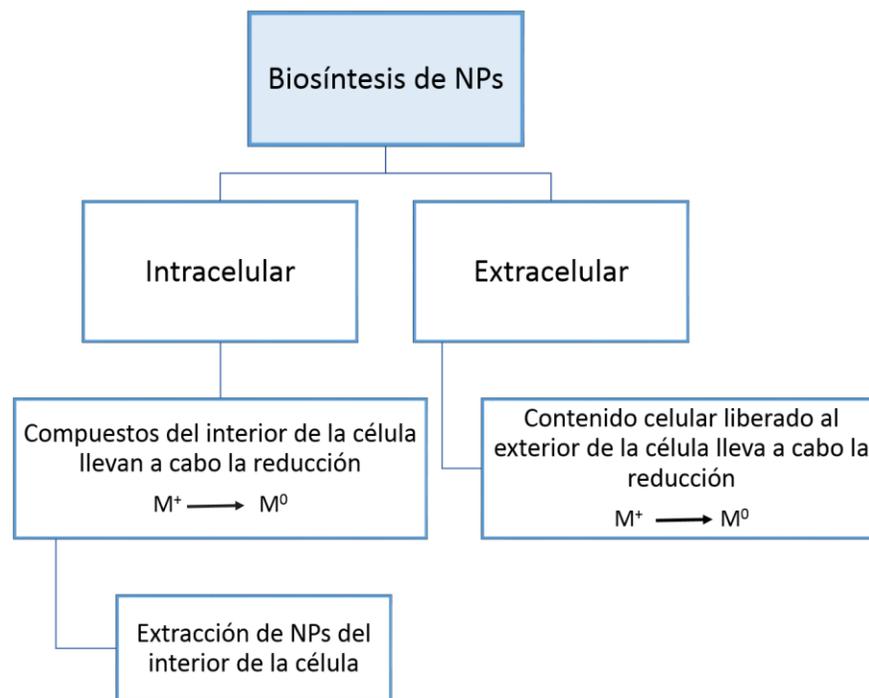


Fig.2. Mecanismos de síntesis biológica de NPs a partir de bacterias

Actividad antibacteriana de NPsAg

La plata ha sido utilizada desde la antigüedad por sus propiedades microbicidas. La sal de plata y sus formulaciones coloidales han sido propuestas para el tratamiento de úlceras, quemaduras y heridas crónicas, sepsis aguda, epididimitis, amigdalitis e infecciones y para prevenir enfermedades oculares en los lactantes^{17,18}. Su uso fue reemplazado por los efectos adversos encontrados a largo plazo gracias al desarrollo de nuevos antibióticos más eficaces.

Una ventaja de las NPs biosintetizadas es que presentan una gran interacción con las moléculas biológicas, en su mayoría proteínas, azúcares e incluso células enteras, que las estabilizan y permiten fácilmente que interactúen con otras biomoléculas, lo que podría aumentar su actividad antimicrobiana mejorando las interacciones con los microorganismos patógenos¹⁹. Muchos estudios han reportado que las NPsAg poseen una potente actividad antimicrobiana, mediada por la inhibición de la división celular bacteriana que finalmente conduce a la muerte celular a través de la destrucción de la membrana bacteriana²⁰. Otra opción que se considera es que las NPs podrían causar una rápida generación de radicales libres mediante reacciones redox en las cuales, por ejemplo, el Fe^0 reacciona con el oxígeno (O_2) o el agua y libera Fe^{2+} generando especies reactivas del oxígeno (ERO) vía la reacción de Fenton²¹. El aumento de las ERO en la célula puede resultar en la generación de estrés oxidativo^{22,23}. Las células sometidas a estrés oxidativo presentan diversas disfunciones en la membrana lipídica, las proteínas y el ADN lo cual podría resultar en la muerte de los microorganismos²⁴.

Estrés oxidativo

Los organismos aeróbicos utilizan el O_2 en la respiración u oxidación de nutrientes para obtener energía. Los subproductos de la reducción del O_2 , tales como el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^{\cdot}), se generan continuamente en células cultivadas aeróbicamente. Los radicales libres representan especies químicas reactivas que poseen un electrón no apareado en la órbita externa y son, al mismo tiempo, capaces de existir con independencia²⁵. Es por ello que son considerados altamente reactivos, ya que pueden reaccionar con diversos sustratos biológicos interaccionando directamente con estructuras celulares como lípidos y proteínas²⁶.

Para mantener el equilibrio redox, las células presentan mecanismos de defensa cuya función principal es mantener la concentración de los radicales derivados de O_2 en niveles aceptables o de reparar los daños oxidativos que se producen²⁷. Entre ellas, podemos mencionar a las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasas, y a algunas moléculas como glutatión reducido (GSH), vitamina C, entre otros.

Cuando ocurre un desequilibrio entre los agentes oxidantes y antioxidantes en favor de los primeros o por reducción de los segundos, se produce una interrupción de la señalización redox y control y/o daño molecular y ocurre lo que se denomina “estrés oxidativo”²⁸.

Especies Reactivas del Oxígeno

Una de las características interesantes del O_2 es el hecho de que tiene dos electrones desapareados (que no están unidos cada uno con otro electrón)

ocupando cada uno de ellos dos diferentes orbitales moleculares externos (en el orbital π^*). Este tipo de estructura es llamado estado basal o estado triplete y significa que el oxígeno es un birradical, pues los radicales son usualmente más reactivos tratando de encontrar otro electrón con quien establecer un par²⁹.

Las principales radicales que se originan de la reducción parcial del O_2 son:

❖ Oxígeno singlete:

Es un estado electrónicamente excitado del O_2 y es un agente fuertemente oxidante. La generación fotoquímica del oxígeno singlete (1O_2) consiste en la transferencia de energía desde una molécula electrónicamente excitada debido a la absorción de un cuanto de luz, denominada comúnmente fotosensibilizador, al O_2 ³⁰.

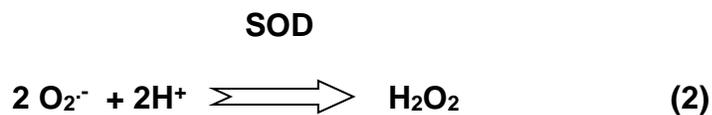
❖ Radical anión superóxido:

La formación del $O_2^{\cdot -}$ ocurre por la reducción univalente del O_2 , es decir, cuando el O_2 acepta un electrón, por lo que el $O_2^{\cdot -}$ contiene un electrón no apareado en un orbital externo antienlazamiento (1). Esta especie radicalaria resulta del metabolismo del O_2 por varias oxidasas, tales como dihidro nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa), xantina oxidasa y ciclooxigenasa²⁹. Si bien su reactividad es baja, es importante ya que es la especie que da lugar a la formación de otras ERO. El $O_2^{\cdot -}$ se convierte en forma espontánea o enzimáticamente en H_2O_2 .



❖ Peróxido de hidrógeno

Aunque no es un radical libre, tiene una gran lipofilidad que le permite atravesar membranas celulares y reaccionar con el $O_2^{\cdot-}$ en presencia de metales de transición para generar el HO^{\cdot} . Por esta razón, se lo considera un oxidante importante en las células de organismos aerobios²⁹. Las enzimas SOD, glucosa oxidasa, D-aminoácido oxidasa, xantina oxidoreductasa son algunas de las enzimas que catalizan la formación del H_2O_2 y también puede producirse por reacciones químicas, como la autooxidación del ácido ascórbico catalizada por el cobre³¹ (2).

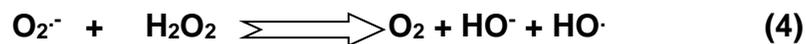


La reducción de H_2O_2 conduce a la formación de HO^{\cdot} y anión hidroxilo (HO^-).

❖ Radical hidroxilo

La reducción del H_2O_2 lleva a la formación de la ERO más reactiva, que es el HO^{\cdot} , quien posee una semivida en solución acuosa de menos de 1 ns³². La alta reactividad se debe a que no existe un sistema enzimático para defender a los organismos vivos contra el HO^{\cdot} y, por lo tanto, la prevención de su formación es la forma más eficaz de protección contra esta especie oxidante.

La reacción de Fenton (3) y de Haber-Weiss (4) son los procesos de formación del HO^{\cdot} más importantes en medios biológicos^{33,34}.

Reacción de Fenton**Reacción de Haber-Weiss**

❖ Radical peroxilo

Otros radicales que se pueden formar en los organismos vivos son los radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$). Los radicales de peróxidos son especies de alta energía, con un potencial de reducción de +0,77 a +1,44 V, dependiendo del grupo R^{35} . El $\text{ROO}\cdot$ más simple es el radical dioxil(hidroperoxilo) ($\text{HOO}\cdot$), que es el ácido conjugado de su peróxido.

❖ Óxido nítrico

El óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) es un radical libre gaseoso, un potente oxidante que actúa como una importante molécula de señalización biológica en una gran variedad de diversos procesos fisiológicos, incluyendo la neurotransmisión, la regulación de la presión arterial, los mecanismos de defensa, la relajación del músculo liso y la regulación inmune³⁶. El $\text{NO}\cdot$ tiene una vida media de sólo unos pocos segundos en un medio acuoso, sin embargo en ambientes donde la concentración de O_2 es baja la vida media es $>15 \text{ s}^{37}$. El $\text{NO}\cdot$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$ pueden reaccionar juntos para producir cantidades significativas de una molécula mucho más oxidante que es el anión peroxinitrito (ONOO^-), quien puede causar la fragmentación del ADN y la oxidación

de gran cantidad de lípidos³⁸. La producción de $O_2^{\cdot-}$ y NO^{\cdot} , *in vivo*, es diferente espacio temporalmente y se solapa escasamente, por lo cual la producción de $ONOO^-$ ocurre siempre con exceso de uno o de otro³⁹.

Marcadores de estrés oxidativo

Las ERO pueden modificar la mayoría de los tipos de biomoléculas incluyendo proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. La determinación de la oxidación de macromoléculas tales como lípidos, proteínas y ADN es una estrategia factible que permite comprobar si el estrés oxidativo está o no involucrado en la actividad antibacteriana de un determinado compuesto.

❖ Peroxidación lipídica:

Las ERO pueden iniciar la peroxidación de lípidos, que comienza por la eliminación de un hidrógeno en una cadena de ácido graso insaturado. El radical de ácido graso resultante puede reaccionar con O_2 para generar radicales lipídicos que se propagan en una reacción en cadena⁴⁰. Esta lipoperoxidación trae como consecuencia alteraciones en la estructura de la membrana, afectando su fluidez y provocando daño en su integridad. La peroxidación de los lípidos genera especies como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-2-nonenal, los cuales son considerados citotóxicos, ya que pueden funcionar como agentes electrofílicos capaces de interactuar con otros componentes celulares, principalmente proteínas y ADN²⁹.

❖ Efecto sobre proteínas

Las consecuencias de la acción de las ERO sobre las proteínas son la oxidación de los residuos de aminoácidos, el rompimiento de los enlaces peptídicos y agregación²⁹. Desde 1996 comenzaron a utilizarse como marcadores de estrés oxidativo los denominados productos proteicos de oxidación avanzada (o sus siglas en inglés AOPP), quienes fueron detectados en el plasma de pacientes urémicos crónicos⁴¹. Sus características espectrales corresponden a varios cromóforos entre los que se incluyen ditirosina, carbonilos y pentosidinas. El uso de los AOPP y carbonilos como marcadores de estrés oxidativo es importante ya que permite estimar el grado de daño a la proteína mediada por oxidantes⁴². Las ERO pueden atacar la columna vertebral de una proteína para causar fragmentación y cambios conformacionales en la estructura secundaria y terciaria de la proteína. Disulfuro, ditirosina y otros compuestos intermoleculares puentes inducidos por la oxidación pueden resultar en agregación de proteínas y polimerización para cambiar sus propiedades proteolíticas⁴³.

❖ Acciones sobre los ácidos nucleicos

Las ERO dañan al ADN al reaccionar con las bases nitrogenadas y con la desoxirribosa. Se ha observado que en presencia de las ERO, el ADN puede fragmentarse y pueden aparecer fragmentos internucleosomales formados por la ruptura de ADN entre los nucleosomas (estructuras fundamentales para la organización del ADN dentro de los cromosomas), ocasionando con ello problemas en la compactación y enrollamiento del mismo²⁹. Se sabe que el HO[•]

reacciona con todos los componentes de la molécula de ADN dañando tanto las bases de purina como las de pirimidina y también el esqueleto de desoxirribosa ⁴⁴.

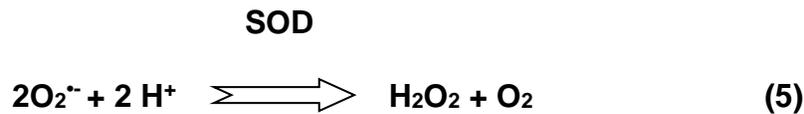
Existen múltiples métodos para medir el daño oxidativo al ADN, de los cuales uno de los más populares emplea la digestión enzimática del ADN acoplado a HPLC para la detección de los compuestos oxidados⁴⁵. La 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) es buen biomarcador de estrés oxidativo de un organismo y un biomarcador potencial de la carcinogénesis ya que es uno de los principales productos de la oxidación del ADN³⁶.

Sistemas de defensas contra ERO: Sistemas antioxidantes

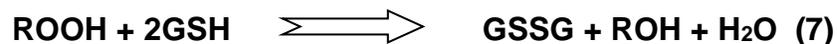
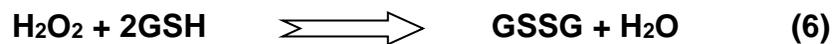
Bajo condiciones de estrés oxidativo las células activan algunos mecanismos que le facilitan la supervivencia. Estos mecanismos están basados en la regulación de diferentes sistemas antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos. Los antioxidantes reaccionan de manera segura con los radicales libres y terminan las reacciones en cadena antes de que se produzca daño celular por lo que cumplen una importante función homeostática. Los sistemas enzimáticos son responsables de la eliminación de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 y, por lo tanto, de la prevención de la formación de HO^{\cdot} . Entre ellos se destacan las enzimas SOD, CAT y glutatión peroxidasa (GPx)⁴⁶. Los antioxidantes no enzimáticos pueden reaccionar directamente con las ERO o servir de sustrato de enzimas defensivas. Los antioxidantes no enzimáticos implican vitamina C, vitamina E, carotenoides, antioxidantes tiol (GSH, tioredoxina y ácido lipoico), flavonoides naturales, entre otros⁴⁷.

❖ Antioxidantes enzimáticos

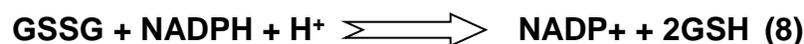
Superóxido dismutasa: la SOD cataliza la conversión del $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (5). Es una enzima que puede encontrarse en el citoplasma y/o en el fluido extracelular (Cu-Zn SOD) y en mitocondria en el caso de células eucariotas (Mn-SOD). Todos los miembros de la familia SOD utilizan metales de transición en su sitios activos como cofactores, por ejemplo, mononucleares Fe, Mn, Ni o CuZn dinuclear^{48,49}.



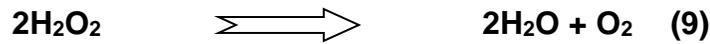
Glutación peroxidasa y reductasa: la primera es una selenoenzima presente en varias isoformas (GPx citosólica, GPx plasmática y GPx de fosfolípidos) y cataliza la reducción de peróxidos empleando dos moléculas de GSH (6 y 7). Los productos de la reacción son el glutación oxidado (GSSG) y el agua.



Como GPx necesita de GSH para ejercer su función, las células disponen de una vía capaz de regenerarlo. Glutación reductasa (GR) es una enzima que se encuentra en citoplasma y tiene a la coenzima FAD en su sitio activo. Esta enzima cataliza la reducción de GSSG empleando la coenzima NADPH (8).



Catalasa: cataliza la reducción del H₂O₂ a H₂O (9), aunque también tiene actividad peroxidasa (10)



La constante de la reacción (K_m) es relativamente baja (posee una alta afinidad por el H₂O₂) sin embargo su velocidad máxima de reacción (V_{max}) es muy alta por lo que sólo es activa cuando se encuentran altas concentraciones de H₂O₂.

Tiorredoxina: la Tiorredoxina (Trx) es un polipéptido con un peso molecular de 12 kDa y está presente en todos los organismos, tanto en procariotas (descrita inicialmente en el citoplasma de *E. coli*)⁵⁰ como en eucariotas (en el retículo endoplásmico)⁵¹. Esta proteína contiene dos grupos tiol adyacentes en su forma reducida (SH) que se pueden oxidar a su forma disulfuro (S₂ o S—S) (10):



❖ Antioxidantes no enzimáticos

Glutatión: reducido protege los grupos sulfhidrilo de las proteínas de la acción oxidante de las ERO y tiene la capacidad de reaccionar con el H₂O₂, el O₂^{•-} y el HO[•]. Se considera que es el mayor tampón redox tiol-disulfuro de la célula⁵². El GSH es muy abundante en el citosol (1-11 mM), núcleos (3-15 mM) y mitocondrias (5-11 mM)³⁶. En *E. coli* se encuentra en una concentración 5 mM⁵³.

Vitaminas:

Vitamina E: la isoforma más abundante es el α -tocoferol. Es el antioxidante más distribuido en los seres vivos. Se encuentra en las membranas biológicas y tiene la capacidad de interrumpir la lipoperoxidación en la fase de propagación.

Vitamina C: también se conoce con el nombre de ácido ascórbico. Se localiza en el citosol y en los fluidos extracelulares. Tiene la capacidad de aceptar electrones y reaccionar directamente con el $O_2^{\cdot-}$ y el HO^{\cdot} .

Vitamina A: se encuentra en las membranas e impide la lipoperoxidación al reaccionar principalmente con el 1O_2 y el HO^{\cdot} ³⁴.

En la Fig. 3 puede observarse la reducción del O_2 para formar H_2O , las ERO y los sistemas antioxidantes que participan en la misma.

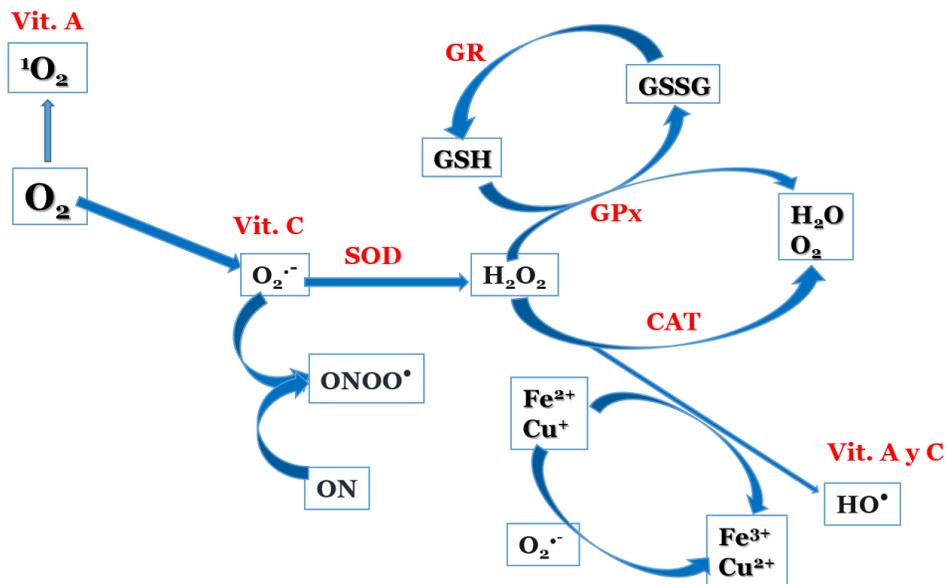


Fig.3: Generación de ERO y sistemas antioxidantes.

Secuestrantes de ERO

Se define como secuestrantes a aquellos compuestos que cumplen con la función de “atrapar”, ya sea física o químicamente, a las ERO producidas en la célula, mientras que los inhibidores serían aquellos capaces de “bloquear” las vías de producción de las ERO o de acelerar sus procesos de catálisis. Sin embargo, a los fines prácticos ambos términos (secuestrantes o inhibidores) pueden utilizarse de manera indistinta, cuando el objetivo es reducir la cantidad de ERO presentes. Los agentes secuestrantes de ERO pueden ser específicos de una especie o pueden ser generales. Como agentes específicos se pueden encontrar: TIRON secuestrante físico de $O_2^{\cdot-}$, 2,2'-dipiridil agente quelante de Fe^{2+} (indispensable en la reacción de Fenton) inhibe indirectamente al HO^{\cdot} , MANITOL secuestrante químico específico de HO^{\cdot} y la enzima CAT para acelerar la catálisis de H_2O_2 . Por último, GSH como un secuestrante redox general de ERO⁵⁴⁻⁵⁶ (Fig. 4).

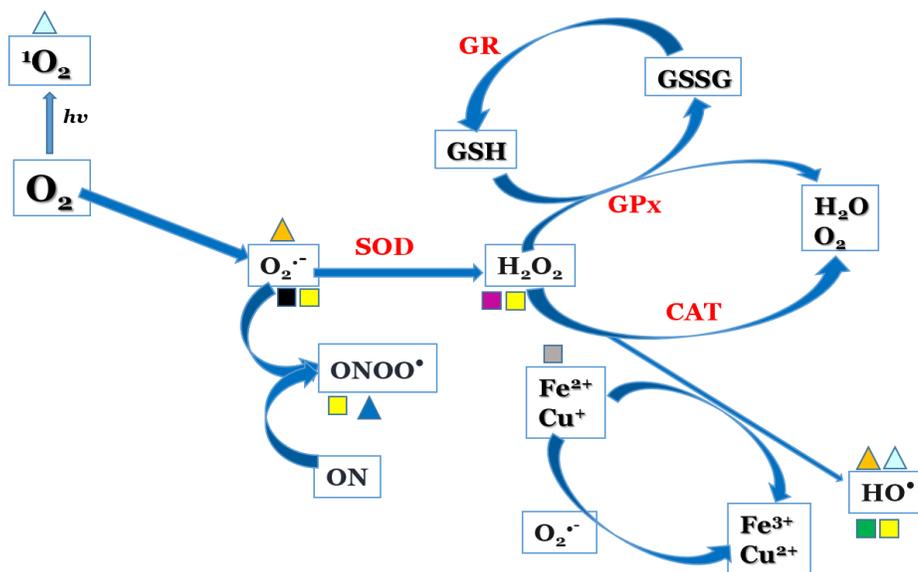


Fig. 4. Generación de ERO y sitios de acción de los diferentes secuestrantes:

▲ Vit. A, ▲ Vit.C, ▲ Vit. E, ■ GSH, ■ Manitol, ■ 2,2 Dipiridil, ■ tirón, ■ CAT.

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, se manifiesta la importancia de poder encontrar nuevos agentes antibacterianos y que tengan la capacidad de actuar frente a microorganismos multirresistentes o frente a aquellos en los cuales no es posible la utilización de los antimicrobianos ya descritos. En este contexto se plantea en este trabajo de tesis, obtener NPsAg a través de un método ecoamigable y evaluar su actividad como agente antimicrobiano, como así también, su capacidad para modificar el metabolismo oxidativo de bacterias y la toxicidad en células humanas, con el propósito de contribuir al conocimiento sobre diversos aspectos involucrados en el posible mecanismo de acción de las mismas.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



Hipótesis:

- 1- Las nanopartículas de plata biosintetizadas podrían ser una alternativa terapéutica en bacterias multirresistentes y en aquellas especies bacterianas en las que no es posible utilizar un tratamiento con antibióticos de uso clínico.
- 2- Las nanopartículas podrían interactuar con la membrana bacteriana alterando el metabolismo respiratorio y llevando a la célula a una condición de estrés oxidativo lo cual conduciría a la muerte bacteriana.
- 3- La diferente susceptibilidad del huésped y de la célula bacteriana al estrés generado por nanopartículas metálicas permitirá establecer si existe toxicidad selectiva de las mismas en base a la alteración de promotores y biomarcadores de oxidación.

Objetivo general

Contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas evaluando la actividad antimicrobiana de nanopartículas de plata y su relación con la generación de estrés oxidativo en bacterias multirresistentes.

Objetivos específicos

- 1- Investigar la potencialidad de nanopartículas como agentes antibacterianos en bacterias multirresistentes.
- 2- Investigar la capacidad de las nanopartículas de generar especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en bacterias.
- 3- Evaluar modificaciones del metabolismo oxidativo bacteriano mediante la determinación de marcadores de estrés, tales como oxidación de ADN, lípidos y proteínas.
- 4- Comparar los cambios generados en los sistemas antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos, en condiciones basales o bajo condiciones de estrés oxidativo.
- 5- Indagar la toxicidad de nanopartículas sobre células sanguíneas.



CAPÍTULO 2

Materiales y Métodos



2.1 Biosíntesis y caracterización de NPs metálicas

A partir de un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en agar tripteína soya (ATS), se preparó una suspensión bacteriana en diferentes tipos de medios de cultivo líquidos (Luria Bertani, Mueller Hinton y Tripteína Soya), previamente esterilizados. Luego de 18 h de incubación, los cultivos se centrifugaron por separado a 10.000 rpm por 20 min recuperando el sobrenadante y descartando el pellet resultante. Cada sobrenadante obtenido se filtró utilizando una membrana estéril de 0,22 μm con el objetivo de eliminar aquellas células que no hayan sido separadas por centrifugación. Los filtrados resultantes fueron utilizados para la biosíntesis de NPs_{Ag}.

2.1.1 Obtención de nanopartículas de plata

El proceso de biosíntesis se realizó adaptando el protocolo de Ahmad y col⁵⁷. Se puso en contacto el sobrenadante del cultivo de *P. aeruginosa* con una solución de nitrato de plata (AgNO_3) de 1 a 10 mM y como control negativo de síntesis se utilizó agua destilada estéril. Ambos medios de reacción fueron protegidos de la luz y llevados a incubar en una estufa con agitación constante en diferentes condiciones de tiempo y temperatura.

Se evaluaron modificaciones en los parámetros de síntesis con el objetivo de optimizar las condiciones de la misma y de esta manera, obtener nanopartículas estables, de tamaño y forma homogéneos. Los parámetros valorados fueron los siguientes: Relación de volumen entre la solución de AgNO_3 y el sobrenadante de *P. aeruginosa* (90/10, 70/30 y 50/50, respectivamente), concentración de la solución de AgNO_3 (1, 5 y 10 mM), temperatura (37, 50 y 100 °C) y tiempo de síntesis (1 o 24 h).

Como control de la reducción de los iones plata a plata elemental, se tomaron muestras cada una hora y se leyó la absorbancia entre 200 y 1000 nm hasta la aparición del plasmón de resonancia característico de NPsAg.

2.1.2 Caracterización de NPs biosintetizadas

2.1.2.1 Cambio de color del medio de reacción

De acuerdo al tamaño, forma y concentración de NPsAg, su color puede variar desde el amarillo al negro; es por esto que el cambio de color del medio de reacción es el primer indicio de la formación de NPS. El mismo va a depender no solo del tamaño sino también de la forma y de la concentración de nanopartículas obtenidas⁵⁸.

2.1.2.2 Espectroscopia de absorción de luz ultravioleta y visible

La bio-reducción de los iones plata fue monitoreada a intervalos regulares mediante la toma de muestras de la mezcla de reacción, a las cuales se les realizó el espectro de absorción UV-vis. Las muestras fueron colocadas en cubetas de cuarzo y la absorbancia fue medida entre 200 y 1000 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-vis a temperatura ambiente⁵⁹.

2.1.2.3 Potencial Z y tamaño de partícula

La estabilidad y la dispersidad de NPsAg biosintetizadas fueron evaluadas mediante la técnica dispersión dinámica de la luz (DLS). Se trabajó en un instrumento Delsa_Nano C (Beckman Coulter). Las muestras fueron colocadas en una cubeta de cuarzo y las lecturas se realizaron a temperatura ambiente⁶⁰.

2.1.2.4 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

El análisis morfológico de las NPsAg fue llevado a cabo en un microscopio a JEM-JEOL 1120 EXII operado a 80 kV. Se tomaron 10 μ L de las muestras y se colocaron sobre una rejilla de carbono recubierta de cobre y se dejaron secar a temperatura ambiente, protegidas de la luz⁶¹. Las imágenes obtenidas fueron analizadas por el programa ImageJ para la determinación del tamaño y la elaboración de un histograma.

2.1.2.5 Espectroscopia infrarroja (IR)

Las muestras fueron preparadas mediante el método de disco de bromuro de potasio (método en fase sólida). Cada muestra se llevó a liofilizar durante 24 h. A 2 mg de la muestra sólida se le adicionaron 50 mg de bromuro de potasio y se pulverizaron en un mortero de ágata, teniendo precaución respecto a la absorción de humedad. Se comprimió la mezcla en un molde adecuado para las formación de las pastillas por IR. Los discos obtenidos que no eran uniformes fueron descartados para el análisis⁶². Las muestras fueron analizadas en un equipo FT-IR (Avatar 360).

2.1.2.6 Difracción de Rayos X

La estructura cristalina y composición química de las NPsAg fueron determinadas por la técnica difracción de rayos X (DRX) usando un difractómetro PANalytical X-Pert Pro que opera con radiación $K\alpha$ Cu, geometría 2θ rango de $30-70^\circ$ y a 40 kV - 40mA⁶³.

2.1.2.7 Caracterización del *capping* de NPsAg

2.1.2.7.1 Medición de contenido proteico en las muestras

Se utilizó el método de Bradford para cuantificar las proteínas totales. Para ello, se colocaron 800 μL de la muestra y 200 μL del reactivo de Bradford (BIO-RAD) dentro de un tubo eppendorf de 1,5 mL. Se dejó estabilizar durante 2 min el color desarrollado debido a la interacción del colorante azul de coomassie G-250 con las proteínas a través de grupos ionizados y se procedió a leer la absorbancia a 595 nm. Se construyó una curva de calibración a partir de soluciones de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de 0 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de concentración final.

Las lecturas de absorbancia de las muestras y de los estándares se corrigieron restando la absorbancia de un blanco de reactivo que fue preparado del mismo modo utilizando H_2O destilada en lugar de las muestra.

2.1.2.7.2 SDS-PAGE

A partir de los datos obtenidos de concentración proteica en las muestras evaluadas, se calculó el volumen necesario de cada una de ellas para obtener 15 μg para ser sembrados en los geles. Se sembró el volumen total de la preparación de muestra en cada uno de los carriles de los geles. El gel de apilamiento (5 % de poliacrilamida al 30 % p/v) se corrió a 80 v durante 20min. Luego, el voltaje se aumentó a 120 v para la corrida del gel de resolución (12 % de poliacrilamida al 30 % p/v) durante 2 h. Una vez concluida la corrida electroforética, se procedió a realizar la coloración del gel.

2.1.2.7.3 Tinción con plata

Se colocaron los geles en solución de fijación durante 15 min en agitación suave. Esto se realizó por duplicado. Se agregó la solución de sensibilización durante 30 min en agitación. Se realizaron tres lavados con agua bidestilada durante 5 min. Se añadió la solución de plata y se incubó durante 20 min. Se realizaron dos lavados con agua bidestilada de 1 min cada uno. Se agregó la solución de revelado y en el momento de aparición de spots definidos se añadió inmediatamente la solución de stop para frenar la tinción. Finalmente, los geles se conservaron en agua destilada hasta la escisión de las bandas seleccionadas para su identificación proteica, realizada por la Dra. Silvia Moreno en el CEQUIBIEM de la Universidad de Buenos Aires.

2.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana

2.2.1 Determinación de la actividad antibacteriana

La actividad antimicrobiana de NPsAg fue valorada en diferentes especies bacterianas.

Los microorganismos de estudio fueron: Gram-positivos: *S. aureus* ATCC 29213, cepa clínica 1 de *S. aureus* sensible a la meticilina (MSSA), cepa clínica 2 MSSA, cepa clínica 3 de MSSA, *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA), *S. epidermidis* ATCC 12228, y *Enterococcus faecalis* ATCC 28212. Entre las bacterias Gram-negativas se estudió el efecto en una cepa clínica de *Proteus mirabilis*, cepa clínica de *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* ATCC 25922, cepa clínica 1 de *E. coli*, cepa clínica 2 de *E. coli*, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

El método estándar de dilución en tubo fue utilizado para evaluar la eficacia antimicrobiana de NPsAg siguiendo las indicaciones del *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI)⁶⁴. Diferentes cepas provenientes de cultivos de 24 h en medio agar MH se diluyeron hasta ajustar el inóculo a una concentración de 10^6 UFC/mL y se incubaron por 10 min a 37 °C. Las concentraciones de NPsAg utilizadas fueron de 0,025 a 51,2 pM. El crecimiento bacteriano fue observado a las 18 h de incubación.

2.2.1.1 Concentración inhibitoria mínima y Concentración bactericida mínima

La concentración más baja de NPsAg que inhibió el crecimiento bacteriano se consideró la concentración inhibitoria mínima (CIM). La concentración bactericida mínima (CBM) fue considerada como la concentración más baja que redujo en un 99.9 % el inóculo inicial de trabajo. La determinación de la CIM/CBM permitió conocer la actividad bactericida o bacteriostática del compuesto en estudio⁶⁴.

2.2.1.2 Efecto sobre el crecimiento bacteriano

Este ensayo fue llevado a cabo en 3 cepas de referencia: *S. aureus* 29213, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. El inóculo inicial de trabajo para las 3 cepas fue de 10^6 UFC/mL en CMH. Luego de 2,5 h de incubación a 37 °C con agitación constante, cada inóculo se dividió en 2 (de 1 ml cada uno). A una de las alícuotas se le agregó 500 μ L de NPsAg 15 pM. A los respectivos controles negativos se les adicionó buffer fosfato (PBS) pH 7,2. Las mismas se llevaron a incubar a 37 °C con agitación a 140 rpm. Se tomaron muestras cada 30 min,

tanto del control como de los cultivos que tenían NPs y se midió la densidad óptica a 600 nm⁶³. Los resultados fueron expresados como OD₆₀₀ vs tiempo.

2.2.2 Determinación de la actividad antifúngica

La actividad de NPsAg fue valorada en diferentes especies de hongos filamentosos. Los microorganismos de estudio fueron: *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum*, *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*. Todas las cepas crecieron aeróbicamente en Caldo Papa Dextrosa (CPD) durante 3 - 5 días a 28 °C.

Se utilizó el método de microdilución en caldo para evaluar la eficacia fungicida de NPsAg de diferente origen de síntesis. Las cepas se diluyeron hasta ajustar el inóculo a una concentración entre 10⁵-10³ esporas/mL. Las concentraciones de NPsAg utilizadas fueron de 0,0015 a 15 pM. Se tomaron 100 µL de una solución estéril de cloruro de sodio al 0,9 % y se adiciono 100 µL de NPsAg (15 pM) provenientes del sobrenadante de *P. aeruginosa*. Luego se realizaron diluciones seriadas en el medio. Posteriormente, se agregaron 100 µL de CMH y 10 µL del inóculo inicial a cada pocillo. El mismo procedimiento se realizó para las NPsAg provenientes del extracto del hongo *B. cinerea*. Las muestras se llevaron a incubar durante 3 a 5 días a 28 °C.

La concentración más baja de NPsAg que inhibió el crecimiento de los hongos se consideró la CIM⁶⁵.

2.3. Efecto de nanopartículas de plata sobre el metabolismo oxidativo

Microorganismos de estudio: Los ensayos se realizaron con las cepas de *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

2.3.1 Determinación de especies reactivas del oxígeno

Se obtuvieron cultivos de 18 h de las 3 cepas de estudio, se centrifugaron y resuspendieron en PBS estéril. De cada inóculo obtenido, se tomó una alícuota de 500 μL y se puso en contacto con 500 μL de NPsAg de diferente concentración (1,29 a 12,9 μM) durante 4 h a 37 °C. Como control se utilizó PBS estéril.

2.3.1.1 Método espectrofotométrico de NBT

Esta prueba se basa en la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT incoloro) a su forma reducida (NBTH), formándose un precipitado (azul de formazán)⁶⁶. Se tomaron muestras de 200 μL (punto 2.3.1) a tiempo 0, 1, 2, 3,4 hs y se le agregó 50 μL de NBT (SIGMA) 1 mg/mL y se incubaron durante 30 min a 37 °C en oscuridad. Posteriormente, se agregó a cada una 10 μL de HCl 0,1 N (Cicarelli) para detener la reacción. Luego se agregó 40 μL de dimetilsulfóxido (DMSO, Cicarelli) para extraer el NBT reducido (ERO intracelular). El azul de formazán obtenido se midió espectrofotométricamente a 575 nm en un espectrofotómetro UV-visible SHIMADZU-160A. Los resultados fueron expresados como absorbancia por mg de proteínas vs tiempo para cada cepa.

2.3.1.2 Método espectrofluorométrico utilizando la sonda 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato diacetoximetil ester

La sonda H₂-DCFDA (Sigma-Aldrich ,St. Louis, MO,USA) es un compuesto no fluorescente de naturaleza hidrofóbica que, al entrar en la célula, puede desacetilarse por la acción de las enzimas esterasas intracelulares dando lugar al compuesto no fluorescente 2',7'-dihidroclorofluoresceína. A continuación, este compuesto reacciona con las ERO y se convierte en 2'7'-diclorofluoresceína (DCF) el cual posee un elevado componente fluorescente (520 nm) y se puede medir por técnicas fluorométricas⁶⁷.

Para la obtención de las muestras se procedió de igual manera que en el punto 2.3.1. A cada muestra (200 µL) se le agrego 20 µL de sonda H₂-DCFDA 20 µM y se incubaron por 30 minutos a 37 °C en condiciones de oscuridad. Transcurrido este tiempo, se midió la fluorescencia de la muestra en un espectrofluorímetro Biotek Synergy HT. Las longitudes de onda de excitación y emisión de la sonda fueron 480/520, respectivamente⁶⁸. Los resultados se expresaron como Fluorescencia por mg de proteínas vs tiempo.

2.3.1.2.1 En presencia de secuestrantes de ERO

Los inóculos de trabajo se obtuvieron siguiendo la metodología descrita en el punto 2.3.1, con una concentración 15 pM de NPsAg y se agregó 500 uL de secuestrantes de ERO (Tirón 10 mM, Dipiridil 250 µM, GSH 1 mM, manitol 40 mM, CAT 9 mg/ml). Se procedió a realizar la experiencia de la manera descrita anteriormente en el punto 2.3.1.2⁶⁸. Los resultados se expresaron como porcentaje de variación con respecto al control sin NPs.

2.3.1.3 Microscopia de Fluorescencia

La microscopia de fluorescencia fue utilizada para monitorear la generación de ERO intracelular. El microscopio usado fue un NIKON TE-2000U y las longitudes de onda de trabajo fueron: excitación, 490 nm; emisión, 519 nm; espejo 500 nm; emisión Japón, LP 515 nm⁶⁹. Se obtuvieron cultivos de 18 h de incubación de una cepa Gram-negativa (*E. coli* ATCC 25922) y una Gram-positiva (*S. aureus* ATCC 29213), se centrifugaron y resuspendieron en PBS estéril (este proceso se repitió 3 veces) hasta un volumen final de 500 μ L.

De cada inóculo obtenido, se tomó una alícuota de 100 μ L y se puso en contacto con 100 μ L de NPsAg (concentración 12,9 pM) durante 1 h para *S. aureus* y 4 h para *E. coli* a 37 °C. Como control se utilizó PBS.

A cada muestra se le agrego 20 μ L de sonda H₂-DCFDA 20 μ M y se incubó por 30 minutos a 37 °C, en condiciones de oscuridad. Transcurrido este tiempo, se tomó una alícuota de 50 μ L y se colocó sobre un portaobjeto nuevo. Inmediatamente se observó la fluorescencia emitida tanto del control como de la muestra problema⁶⁸.

2.3.2 Determinación de especies reactivas del nitrógeno por el método de Griess

Se prepararon los cultivos de acuerdo a la metodología descrita en el punto 2.3.1, las concentraciones de NPsAg utilizadas fueron de 2,1 a 21 pM. Cada 1 h se tomaron muestras de 100 μ L y se agregaron 50 μ L de sulfanilamida al 2 % en HCl 5 % (v/v) y 50 μ L de solución acuosa al 0,1 % de diclorhidrato de naftilendiamina. Las mismas se llevaron a incubar a 37 °C por 15 min en

oscuridad. Luego se leyó la absorbancia a 540 nm en un elisómetro Biotek Synergy 2 multimodo operado a una resolución de 1 nm.

La absorbancia medida es proporcional a la cantidad de nitritos presentes en la muestra con respecto a la solución estándar tomada como parámetro⁶⁹.

Los resultados se expresaron como μM de NaNO_2 por mg de proteínas vs tiempo.

Curva de solución estándar de NaNO_2 .

Se realizó una curva de calibrado con una solución de NaNO_2 a diferentes concentraciones (0,21 a 100 μM) partiendo de una solución de NaNO_2 10 mM, solución stock. Las determinaciones se realizaron a 540 nm.

2.3.3 Determinación de proteínas por el método de Bradford

La concentración de proteínas en todas las muestras fue determinada por el método de Bradford. Para calcular la concentración de proteínas se construyó una curva patrón o de calibrado a partir del suero patrón Proti 2 Wiener Lab (de 0,036 a 0,156 mg/mL). A 100 μL de la muestra se le adicionó 100 μL de reactivo de Bradford y se midió la absorbancia en un elisómetro a 595 nm⁶⁷. La concentración de proteínas fue determinada por interpolación de los valores de absorbancia de las muestras en la curva patrón.

2.4. Efecto de nanopartículas de plata sobre macromoléculas

Microorganismos de estudio: Los ensayos se realizaron con las cepas de referencia de *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

2.4.1 Preparación de muestra

Se obtuvieron cultivos de 18 h de incubación de las 3 cepas de estudio, se centrifugaron y resuspendieron en PBS estéril. De cada inóculo obtenido, se tomó una alícuota de 500 μ L y se puso en contacto con 500 μ L de NPsAg (15, 7,5 y 3 pM) o con 500 μ L de PBS (control) y se llevaron a incubar a 37 °C.

2.4.2 Evaluación de la peroxidación lipídica

Entre los diferentes aldehídos que se pueden formar durante la peroxidación lipídica el más estudiado es el MDA. Este se forma por la descomposición de ácidos grasos poliinsaturados y se utiliza como indicador del grado de peroxidación lipídica.

La oxidación de lípidos se evaluó a diferentes tiempos: 0, 1, 3, 4 y 24 h de incubación según la cepa analizada. A cada muestra se le agregó 1 mL de ácido tricloroacético 35 % v/v y se llevaron a incubar a temperatura ambiente durante 20 min en oscuridad. Luego, se añadió 1 mL de ácido tiobarbitúrico y se colocaron en un baño de agua a 80 °C durante 30 min. Posteriormente se enfriaron en baño de hielo, se centrifugaron y se midió la absorbancia del sobrenadante a 535 nm. Los resultados se expresaron como nmol de MDA por mg de proteína vs tiempo^{70,71}. Para realizar la curva de calibración se prepararon soluciones en agua destilada del testigo MDA (SIGMA).

2.4.2.1 En presencia de secuestrantes de ERO

Las muestras se obtuvieron de acuerdo a lo descrito en el punto 2.4.1. Además, se les adicionó 500 μ L de secuestrantes o inhibidores de ERO (Tirón 10 mM, GSH 1 mM y CAT 9 mg/ml) o 1000 μ L de PBS estéril (control).

Se procedió a medir oxidación de lípidos de acuerdo a lo descrito en el punto 2.4.2^{70,71}.

2.4.3 Determinación de la oxidación de proteínas

Los niveles de los AOPP se determinaron por un método espectrofotométrico que utiliza Cloramina T como testigo en presencia de yoduro de potasio (KI) y que absorbe a 340 nm.

Las muestras se obtuvieron de acuerdo a lo descrito en el punto 2.4.1.

Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos (0,1, 3, 4 y 24 h). A cada muestra se le agregó 50 µL de IK (1,16 M) y 50 µL de ácido acético. La absorbancia se midió a 340 nm. Las concentraciones de AOPP se expresaron como mequivalentes (meq) de Cloramina-T por mg de proteínas vs tiempo⁷².

2.4.3.1 En presencia de secuestrantes de ERO

Las muestras se obtuvieron de acuerdo a lo descrito en el punto 2.4.2.1. Se procedió a cuantificar los AOPP de acuerdo a lo descrito en el punto 2.4.3. luego del agregado de secuestrantes descritos en el punto 2.3.1.2.1.

2.4.4 Determinación del potencial de membrana

Las modificaciones en el potencial de membrana se determinaron mediante la medición de la fluorescencia de la sonda 1-anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS), la cual es una sonda fluorescente utilizada para detectar cambios conformacionales en proteínas y estudiar membranas biológicas⁷².

Las muestras se obtuvieron de acuerdo a lo descrito en el punto 2.4.2.1.

Se tomaron alícuotas de 160 μL de las muestras a diferentes tiempos (0, 1, 3, 4 y 24 h). A cada una se le agregó 40 μL de sonda ANS (60 μM) y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. La fluorescencia fue medida en un espectrofluorímetro Biotek sinergia HT a las longitudes de onda de excitación y emisión, 360 y 520 nm, respectivamente. Para realizar la curva de calibración, se tomaron fracciones de 1 mL y se les agregó ANS en diferentes concentraciones (0-240 μM)⁷³. Los resultados fueron expresados como fluorescencia por mg de proteínas vs tiempo.

2.4.5 Determinación del daño en el ADN

Se obtuvieron suspensiones de 18 h de incubación de las 3 cepas estudiadas, las cuales fueron centrifugadas y resuspendidas en PBS estéril. Se tomaron 500 μL de los inóculos obtenidos y se pusieron en contacto con 500 μL de NPsAg 15 μM o con PBS (control). Las muestras se incubaron a diferentes tiempos: 1 h para *S. aureus*, 3 h para *P. aeruginosa* y 4 h para *E. coli*.

2.4.5.1 Extracción y Purificación

Se utilizó el kit de EasyPure bacterial genomic DNA para la extracción y se siguieron las instrucciones del fabricante hasta la obtención de ADN libre de impurezas (relación $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280} > 1,8$). 100 μg del ADN obtenido se resuspendió en 200 μL de buffer TRIS-HCl 0,01 M (pH 7). Luego se le agregó 5 U de la enzima nucleasa y se llevó a incubar durante 1 h en oscuridad a 37 °C. Inmediatamente se le agregó a cada muestra 3 U de la enzima fosfatasa alcalina y se llevaron a incubar durante 1 h a 37 °C.

2.4.5.2 Cuantificación del nucleósido oxidado 8-OH-dG

Finalmente, las muestras (control y tratadas) fueron procesadas para ser analizadas mediante HPLC. Los testigos utilizados fueron 1 mM de dG y 8-OHdG (nucleósido no oxidado y oxidado, respectivamente).

Los resultados se expresaron mediante la relación de 8-OHdG/dG^{74,75}.

2.4.5.3 Interacción NPsAg-ADN

Con el objetivo de analizar la interacción entre el ADN bacteriano y las nanopartículas biosintetizadas se observaron las variaciones en el espectro del ADN ante la adición de pequeñas cantidades de NPsAg.

En primer lugar, se realizó la extracción de ADN de *E. coli* 25922 utilizando el kit EasyPure bacterial genomic DNA kit siguiendo las instrucciones del fabricante.

Luego se tomó una muestra de 200 μ L y se realizó la curva espectral entre 200 y 1000 nm (muestra inicial) para determinar el pico correspondiente al ADN de *E. coli*. Se realizaron 20 adiciones de 10 μ L de NPsAg 15 pM o de PBS (muestra control) en forma consecutiva. Ante cada agregado se midió la absorbancia de cada muestra para observar modificaciones en la curva espectral del ADN bacteriano⁷⁵.

2.5. Efecto de nanopartículas de plata sobre sistemas antioxidantes

Microorganismos de estudio: Los ensayos se realizaron con las cepas de referencia de *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. Preparación de las muestras: Se obtuvieron cultivos de 18 h de incubación de las 3 cepas de estudio, se centrifugaron y resuspendieron en PBS estéril.

Se tomaron 1500 μL de los inóculos obtenidos y se pusieron en contacto con 1500 μL de NPsAg (15, 7 y 1,5 μM) o con PBS (control) y se llevaron a incubar a 37 °C. Las muestras se tomaron a diferentes tiempos, 0, 1, 3, 4 y 24 h.

2.5.1 Sistemas antioxidantes enzimáticos

2.5.1.1 Determinación cuantitativa de la actividad de catalasa

Las muestras se prepararon de acuerdo a lo descrito en el punto 2.5. A 2 ml de solución de H_2O_2 0,2 M se le agregaron 2,5 mL de PBS y a continuación se agregó 1 mL de la mezcla (bacteria + NPsAg o buffer). Se tomó 1 mL de cada mezcla y se le agregaron 2 mL de reactivo (dicromato de potasio al 2 % en ácido acético glacial) y se llevaron a incubar 100 °C durante 2 min. Luego se enfriaron en un baño de hielo y se determinó la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro UV-visible SHIMADZU-160A. Una U CAT desdobra 1 μM de H_2O_2 por min a 25 °C y pH 7,0^{76,77}.

Los resultados fueron expresados como % de activación de la enzima CAT con respecto al control (100%).

2.5.1.2 Determinación cuantitativa de la actividad de superóxido dismutasa

Para la reacción de determinación de SOD se utiliza riboflavina la cual pierde un electrón en presencia de luz y dispara una serie de reacciones que generan $\text{O}_2^{\cdot-}$. El NBT agregado compite con la SOD presente en la muestra por el $\text{O}_2^{\cdot-}$ formado. La reducción de NBT, por lo tanto, disminuye en presencia de SOD ya que esta enzima dismuta del $\text{O}_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 . La medición del azul de formazán formado por la oxidación del NBT, es una medida indirecta de la cantidad de SOD presente.

Las muestras se prepararon de acuerdo al punto 2.5. A cada tiempo las muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 15 min y se separó el sobrenadante (SOD extracelular). Los precipitados se resuspendieron en 0,5 mL de PBS estéril (SOD intracelular). Posteriormente, a 100 μ L de la fracción intracelular o extracelular se le agregaron 100 μ L de NBT en DMSO (Anedra) 75 μ M, 300 μ L de metionina (SIGMA) 13 mM, 300 μ L de EDTA 100 nM, 300 μ L de riboflavina (SIGMA) 2 μ M en PBS. Las muestras fueron expuestas a luz fluorescente de 20 W durante 6 min para desencadenar la reacción. La lectura del color final se determinó espectrofotométricamente a 560 nm. Se definió como una unidad de actividad SOD a la cantidad de enzima requerida para disminuir en un 50 % la producción de NBT reducido⁷⁸.

Los resultados se expresaron como % activación de enzima SOD con respecto al control (100%) .

2.5.2 Evaluación de sistemas antioxidantes no enzimáticos

2.5.2.1 Determinación cuantitativa de glutatión reducido

En esta técnica se utiliza el reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico, DTNB), el cual en presencia de GSH reacciona formando un complejo que se determina espectrofotométricamente a 412 nm⁷⁹. Las muestras se prepararon de acuerdo al punto 2.5. Se tomaron 100 μ L de las muestras y fueron incubadas a temperatura ambiente con 20 μ L de glutatión reductasa (6 U/mL), 50 μ L de NADPH (4 mg/mL) y 20 μ L de ácido DTNB 1,5 mg/mL. Los resultados fueron expresados como % de aumento de GSH con respecto al control (100%).

2.5.3 Determinación de la capacidad antioxidante total

Para determinar la capacidad antioxidante total bacteriana se adaptó un método de determinación en fluidos biológicos. El ensayo *ferric reducing antioxidant power* (FRAP) mide el poder reductor de los antioxidantes⁸⁰. Esta técnica, se basa en la reducción del complejo Fe^{3+} -2,4,6-tris (2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ, SIGMA) a su forma ferrosa el cual tiene un color azul intenso, que puede ser monitoreado espectrofotométricamente a 593 nm.

Las muestras se prepararon de acuerdo a lo descrito en el punto 2.5. Se preparó una solución de trabajo con 2,5 mL de buffer acetato 300 mM pH 3,6 con 0,25 mL de solución de TPTZ 10 mM en HCl 40 mM y 0,25 mL de $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM (relación 10:1:1). Se incubaron 50 μL de las muestras tomadas a cada tiempo con 150 μL de la solución de trabajo preparada y se llevaron a incubar por 10 min a temperatura ambiente. La absorbancia de la muestra se determinó a 593 nm. Se prepararon soluciones acuosas de concentraciones conocidas de Fe^{2+} ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) como testigos para realizar la curva de calibración.

Los resultados se expresaron como $\mu\text{M FeSO}_4/\text{mg}$ proteína.

2.6. Efecto de nanopartículas de plata sobre células eucariotas

2.6.1 Obtención de Leucocitos polimorfonucleares

En primer lugar, se tomó una muestra de 20 mL de sangre heparinizada de donantes voluntarios sanos por punción venosa. Por cada 3 mL de sangre entera obtenida se agregó 1 mL de dextrán (SIGMA) al 6 % y se dejó sedimentar durante 30 min a temperatura ambiente. De esta manera se pudo separar el plasma rico en leucocitos de los eritrocitos. Se agregó 1 mL de Ficoll-Hypaque (Histopaque 1077, SIGMA) cada 3 mL de plasma obtenido. Se separó

cuidadosamente el plasma con leucocitos (región central) y se lo coloco en un tubo cónico. Las muestras se llevaron a centrifugar a 2000 rpm durante 10 min para separar los leucocitos polimorfonucleares (PMN) de las células mononucleares. Las células se lavaron dos veces con HBSS-albúmina (SIGMA) 0,1 mg/mL y se resuspendieron en 1 mL del mismo buffer⁸¹.

2.6.2 Determinación de la viabilidad de leucocitos mediante técnicas espectrofotométricas.

2.6.2.1 Ensayo con Resazurina

Los leucocitos obtenidos se incubaron con NPsAg (0,15 pM) o con HBSS-albúmina (SIGMA) 0,1 mg/mL como control, durante 1,3 y 4 h. A cada tiempo se tomó una muestra de 100 μ L y se le agregó 50 μ L de rezasurina 1 mg/ml. Las muestras se llevaron a incubar durante 30 min a 37 °C. Luego se determinó la absorbancia a 570 nm y 600 nm⁸². Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad con respecto al control (100 %).

2.6.2.2 Ensayo con 2,3-Bis-(2-Methoxi-4-Nitro-5-Sulfofenil)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilida (XTT)

Los leucocitos obtenidos se incubaron con NPs (0,15 pM) durante 1,3 y 4 h. Como control se utilizó HBSS-albúmina (SIGMA) 0,1 mg/mL. A cada tiempo se tomó una muestra de 100 μ L y se le agregó 50 μ L del colorante XTT. Las muestras se llevaron a incubar durante 30 min a 37 °C. Luego se determinó la absorbancia a 450 y 650 nm⁸³. Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad con respecto al control (100 %).

2.6.3 Determinación de especies reactivas del oxígeno

Los leucocitos obtenidos, de acuerdo a la metodología descrita en el punto 2.6.1, se incubaron con NPsAg 0,15 pM o con HBSS-albúmina (SIGMA) 0,1 mg/mL como control, durante 1,3 y 4 h. A cada tiempo se tomó una muestra de 200 µL y se le agregó 20 µL de la sonda H₂-DCFDA 20 µM. Las muestras se llevaron a incubar durante 30 min a 37 °C en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se midió la fluorescencia de la muestra en un espectrofluorímetro Biotek Synergy HT. Las longitudes de onda de excitación y emisión de la sonda fueron 480/520, respectivamente⁸¹. Los resultados se expresaron como porcentaje de fluorescencia con respecto al control sin NPsAg (100 %).

2.6.4 Microscopia electrónica de transmisión

Los leucocitos obtenidos, de acuerdo a la metodología descrita en el punto 2.6.1, se incubaron con NPsAg (0,15 pM) durante 4 h. Las imágenes se obtuvieron de un microscopio a JEM-JEOL 1120 EXII operado a 80 kV. Se tomaron 10 µL de la muestra de leucocitos y se colocaron sobre una rejilla de carbono recubierta de cobre y se dejaron secar a temperatura ambiente, protegidas de la luz⁶¹. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el objetivo de detectar modificaciones en la morfología de los leucocitos tratados con NPsAg.

2.6.5 Obtención de Eritrocitos

Se realizó la extracción de sangre a donantes voluntarios sanos por punción venosa. La sangre entera obtenida se diluyó al 1 % v/v en PBS estéril.

2.6.5.1 Actividad hemolítica de NPsAg

Se tomaron muestras de 500 µL de sangre al 1% y llevaron a incubar durante 4 h con 500 µL de NPsAg (0,15 pM) o AgNO₃ (10mM) o agua destilada estéril como control positivo del 100 % de hemólisis y PBS estéril como control negativo.

Transcurrido el tiempo de incubación, se le agregó a cada muestra 250 µL de CaCl₂ 0,5 mM y se llevaron a incubar de nuevo durante 1 h a temperatura ambiente. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 min.

Se leyó la absorbancia del sobrenadante a 540 nm⁸⁴.

El porcentaje de hemólisis se calculó mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ HEMÓLISIS} = \frac{(\text{abs de la muestra} - \text{abs control negativo})}{(\text{abs control positivo} - \text{abs control negativo})} \times 100$$

2.7. Análisis estadístico

Los datos fueron representados como la media ± la desviación estándar (DE).

Los ensayos fueron realizados por triplicado. En todos los casos, las diferencias fueron consideradas significativas para una probabilidad (p) menor a 0,05.



CAPÍTULO 3

Resultados



3.1 Biosíntesis y caracterización de nanopartículas metálicas

Un número creciente de estudios han demostrado la gran utilidad de organismos y biomoléculas para producir materiales nanoestructurados⁸⁵.

La biosíntesis o síntesis green, se caracteriza por ser un proceso amigable con el medio ambiente debido a que no se utilizan solventes orgánicos ni deja residuos tóxicos⁸⁶.

La investigación en curso tiene por objetivo buscar la optimización de un protocolo de síntesis de NPsAg, ganando control sobre el tamaño y la forma de las mismas, para que la obtención de las mismas mediante un proceso biológico pueda competir con éxito con la síntesis química y física de nanoestructuras.

La evaluación del uso de NPs en ciencias biomédicas es indispensable ya que podrían desempeñar un papel importante en la administración de fármacos, diagnóstico, imágenes y detección, entre otros. Por lo tanto, en este campo, el uso de NP ecológicamente producidas podría ser sumamente relevante como alternativa para la obtención de las mismas.

3.1.1 Obtención de nanopartículas de plata

Utilizando el medio extracelular de la bacteria *P. aeruginosa* se biosintetizaron NPsAg. Las condiciones de síntesis empleadas fueron: AgNO₃ 10 mM, relación de volúmenes entre la solución de AgNO₃ y el sobrenadante bacteriano de 50/50 v/v, respectivamente, incubación de 24 h a 37 °C con agitación y en oscuridad.

Optimización de la síntesis:

Se analizaron diferentes condiciones para la obtención de las NPsAg. En la Tabla 1 se pueden observar los resultados obtenidos modificando la concentración de la sal metálica y el porcentaje final de sobrenadante utilizado en el medio de reacción.

Tabla 1: Valores obtenidos de la modificación de la concentración de la sal de plata y de la relación de volúmenes entre la solución de AgNO₃ y el sobrenadante de *P. aeruginosa*.

Concentración de AgNO ₃	Porcentaje de sobrenadante (v/v)	Pico máx. (long. de onda)	Absorbancia
1mM	10 %	-----	-----
	30%	-----	-----
	50%	423 nm	0,224
5 mM	10%	440 nm	0,050
	30%	441 nm	0,221
	50%	443 nm	0,253
10 mM	10 %	430 nm	0,200
	30%	504 nm	0,591
	50%	496 nm	0,774

Se descartaron las concentraciones más bajas de AgNO_3 debido a que las absorbancias leídas luego de 24 h de incubación fueron muy bajas.

Utilizando una concentración 10 mM de sal se obtuvo la síntesis más eficiente, observándose que la relación 70/30 v/v entre la solución de AgNO_3 y el sobrenadante era la más conveniente. Considerando los valores de relación 70/30 de v/v y sal de plata 10 mM, se modificaron otros parámetros como medio de cultivo, temperatura y tiempo de incubación, obteniéndose los siguientes resultados:

1) Medio de cultivo para la obtención del sobrenadante bacteriano:

Tal como se puede observar en la Fig. 5, si utilizamos CTS o LB, la concentración de NPsAg obtenida es mayor que si se utiliza CMH. Por lo que el medio de cultivo utilizado para obtención del sobrenadante de *P. aeruginosa*, produce modificaciones en la obtención de NPsAg

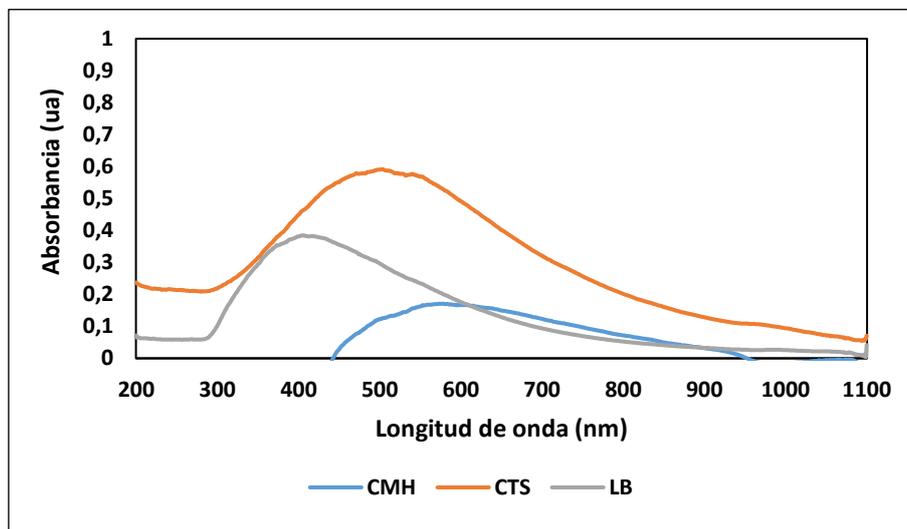


Fig. 5. Espectro UV-Vis de NPsAg biosintetizadas a partir de diferentes medios de cultivo: A sobrenadante obtenido a partir de CMH, sobrenadante obtenido a partir de CTS y LB.

Otro de los cambios que también pudieron observarse es que en medio LB, el pico del plasmón de NPs se desplazó hacia longitudes de ondas más cortas, indicando una modificación en el tamaño (más chicas) y en la forma (más esféricas) de las NPsAg⁸⁷. Esto puede deberse a que los nutrientes que forman parte de cada medio, probablemente, modifican el crecimiento y el metabolismo de la bacteria y por consiguiente, se ve alterado el medio extracelular que se utiliza para la síntesis.

2) Temperatura y tiempo de síntesis (en medio LB)

En la Fig. 6 se graficaron 3 de las modificaciones en estos parámetros donde se observaron los cambios más significativos en la síntesis de NPsAg:

Tiempo de síntesis: 1 h o 24 h

Temperatura de síntesis: 37 °C, 50 °C o 100 °C.

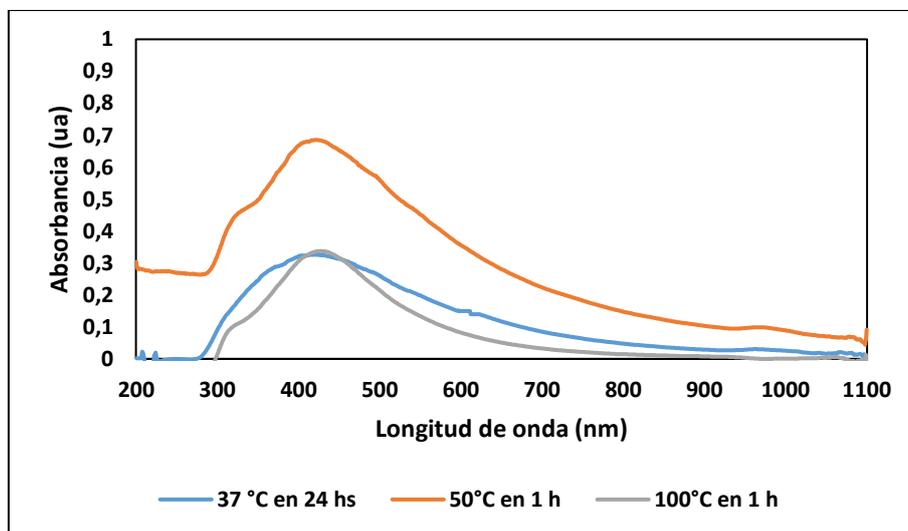


Fig. 2. Espectro UV-Vis de NPsAg biosintetizadas a diferentes temperaturas: A 37 °C durante 24 h, a 50 °C durante 1 h y a 100 °C durante 1 h.

El aumento en la temperatura aceleró el proceso de síntesis, como así también, la absorbancia del pico del plasmón de NPsAg. Se observó una gran

diferencia entre 24 h de incubación a 37 °C y 1 h de incubación a 50 °C. A partir de esta temperatura, la eficiencia de la síntesis comenzó a decaer, la absorbancia obtenida a 100 °C fue la misma que la obtenida para 37 °C. Esto probablemente nos indique que existe algún proceso enzimático participando de la bio-reducción de los iones plata, por lo que la temperatura sería un factor clave para controlar durante la síntesis.

En conclusión, las condiciones finales utilizadas para la biosíntesis fueron:

- a) Medio LB para la obtención del sobrenadante de *P. aeruginosa*.
- b) Relación 70/30 v/v entre la solución de AgNO₃ y el sobrenadante.
- c) Temperatura de 50 °C durante 1 h.
- d) Agitación 150 rpm y oscuridad.

En la Fig. 7 pueden observarse las imágenes correspondientes a la obtención de NPsAg.



(A)



(B)

Fig. 7. Biosíntesis de NPsAg (A) obtención del cultivo de *P. aeruginosa* (B) muestras de sobrenadante de cultivo de *P. aeruginosa* (control) y de sobrenadante de cultivo de *P. aeruginosa* con AgNO₃ 10 mM, en oscuridad.

3.1.2 Caracterización de NPs biosintetizadas

Las NPs_{Ag} obtenidas fueron caracterizadas por diferentes técnicas que permitieron estudiar su morfología y composición así como también establecer su estabilidad en medio líquido.

3.1.2.1 Cambio de color del medio de reacción

El primer registro correspondiente a la formación de NPs_{Ag} fue, tal como se ve en la Fig. 8, el cambio del color del medio de reacción de verde (correspondiente a la presencia de pigmentos provenientes del cultivo de *P. aeruginosa*) a marrón oscuro.

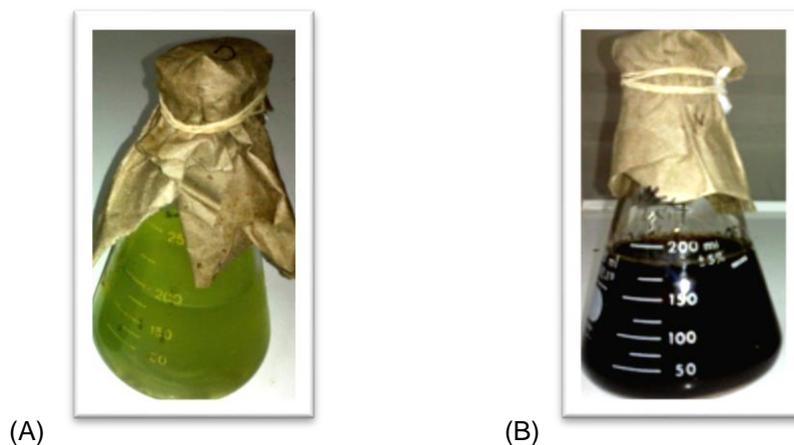


Fig. 8. Biosíntesis de NPs_{Ag} (A) sobrenadante de cultivo de *P. aeruginosa* antes del agregado de la solución AgNO₃ 10 mM. (B) sobrenadante de cultivo de *P. aeruginosa* con AgNO₃ 10 mM luego de 24 h de incubación.

3.1.2.2 Espectroscopia de absorción de luz ultravioleta y visible

La reducción de los iones plata (Ag⁺) fue monitoreada por espectroscopia UV-visible y los espectros se registraron a temperatura ambiente (28 °C) en

función del tiempo (Fig. 9). Las NPsAg exhibieron un pico máximo de absorción alrededor de 450 nm luego de 24 h de reacción. El pico obtenido es característico de la resonancia del plasmón de superficie (SPR) de NPsAg. Esto probablemente se deba a la vibración longitudinal de los plasmones en la solución^{88,89}. No se observó aumento en la intensidad de la banda de resonancia luego de 24 h de incubación, lo que nos sugirió la finalización de la reacción.

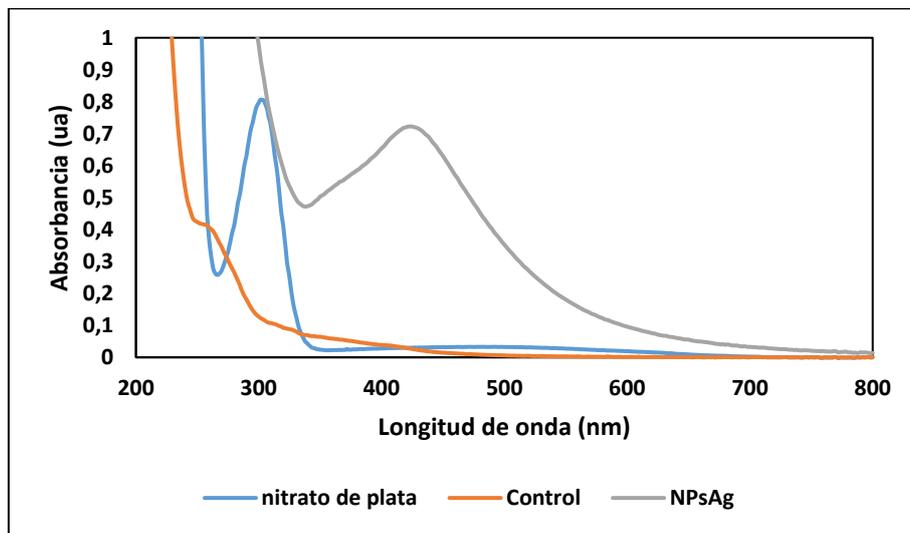


Fig. 9. Espectro UV-Vis de NPsAg biosintetizadas, solución de AgNO_3 y el sobrenadante del cultivo de *P. aeruginosa*.

3.1.2.3 Potencial Z y tamaño de partícula

El potencial zeta de las NPs biosintetizadas fue de -18 mV lo que sugiere que las fuerzas repulsivas entre las nanopartículas pueden ser las responsables de la estabilidad electrostática y de que las NPsAg se hayan podido dispersar en el medio donde se encuentran. Se obtuvo una polidispersidad de 0,3, lo que nos indicia que la población de NPsAg fue relativamente homogénea (Tabla 2).

Tabla 2: Parámetros obtenidos por *dynamic lighth scattering*.

Tamaño	40 ± 2
Polidispersidad	$0,298 \pm 0,07$
Potencial Z	-18 ± 1

3.1.2.4 Microscopía electrónica de transmisión

La morfología y la distribución del tamaño de las NPs obtenidas fueron analizadas por TEM. Se observó que las mismas tienen forma pseudoesferoidal (Fig. 10) y un diámetro relativamente uniforme entre 30 y 40 nm (Fig. 11).

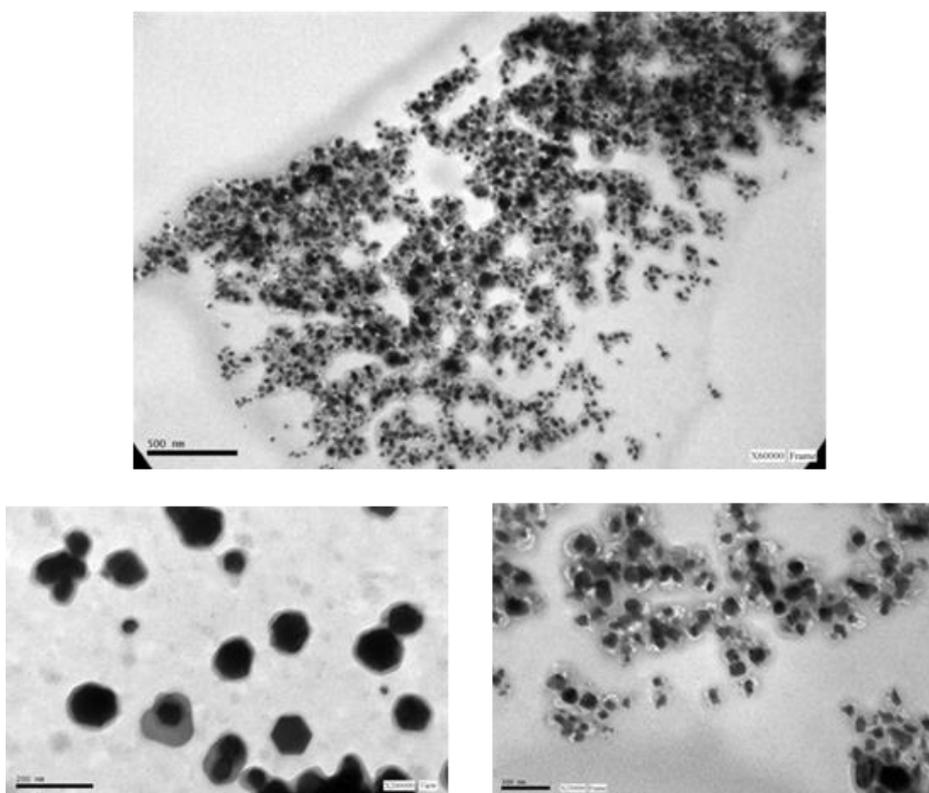


Fig. 10. Imágenes TEM representativas de NPs_{Ag} biosintetizadas a partir del sobrenadante de cultivo de *P. aeruginosa*.

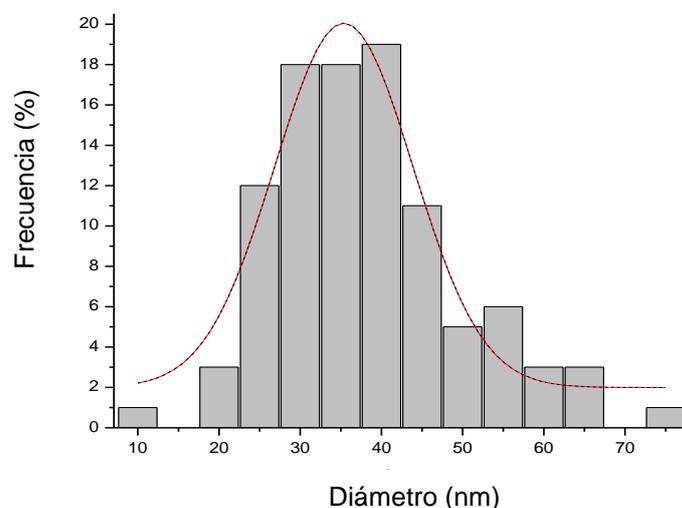


Fig. 11. Histograma que muestra la distribución de tamaño de unas 100 NPsAg a partir de la imagen de TEM obtenida.

3.1.2.5 Espectroscopia infrarroja

En las imágenes obtenidas por TEM se observó que las NPs se encuentran rodeadas por una envoltura, probablemente, proveniente del sobrenadante del cultivo de *P. aeruginosa*. Se decidió estudiar las NPsAg por espectroscopia infrarroja para identificar las posibles biomoléculas responsables de la cobertura y de la estabilidad. Se analizó el sobrenadante de la bacteria y las NPsAg biosintetizadas por separado. Una vez que las muestras fueron liofilizadas, fueron examinadas en un equipo FT-IR (Avatar 360) y se obtuvo lo siguiente: para la muestra del sobrenadante se observó la aparición de picos a 3417 correspondientes a la presencia de grupos Amidas (vibraciones de tensión del enlace N-H) ,1663 perteneciente a las vibraciones de la tensión del enlace C=O, 1401 vibración de flexión de C-OH, 1074 correspondientes a la vibración del enlace C-O-C en grupos de polisacáridos. La aparición de estas bandas

características hace suponer la presencia de carbohidratos y proteínas en sobrenadante de la bacteria (Fig.12).

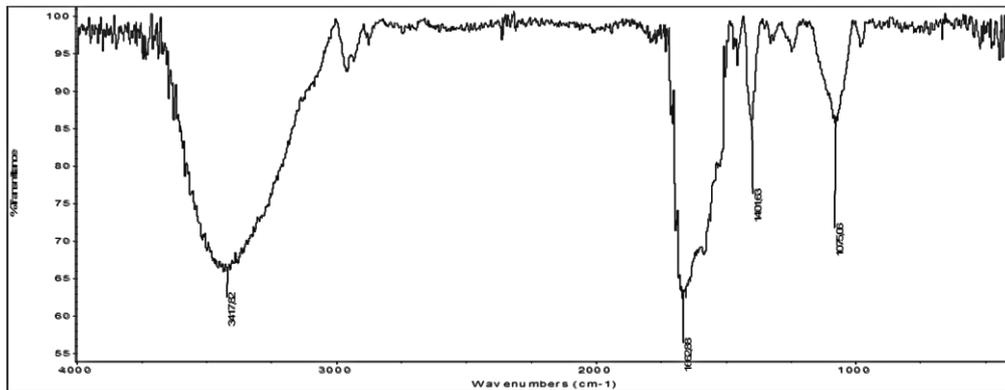


Fig.12. Espectro infrarrojo de sobrenadante de la bacteria *P. aeruginosa*.

Al comparar el espectro IR de las NPsAg (Fig. 13) con el espectro del sobrenadante, se pueden observar algunos corrimientos y disminuciones de las distintas bandas anteriormente descritas. Principalmente la disminución de la banda observada 3417 nm, que podría considerarse como principal grupo funcional del compuesto que actúa como agente reductor y el aumento de la banda a 1401, que podría pertenecer a las moléculas que forman parte del agente estabilizante de la NPsAg. Con estos resultados se puede inferir que las NPsAg se encuentran interaccionando con los distintos grupos funcionales de proteínas y carbohidratos que se encuentran presentes en el sobrenadante de *P. aeruginosa*. Estas interacciones serían las principales responsables de la estabilidad características de las NPsAg biosintetizadas.

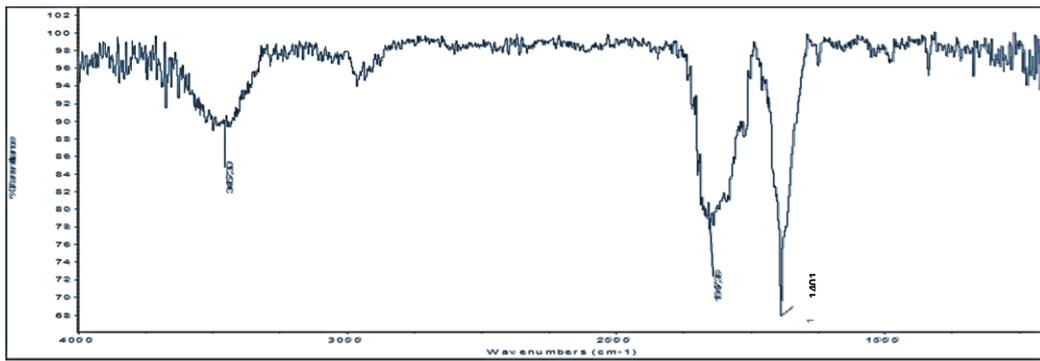


Fig. 13. Espectro infrarrojo de NPsAg biosintetizadas.

3.1.2.6. Difracción de Rayos X

Se obtuvo el patrón de difracción de rayos X que se muestra en la Fig. 14. Se confirmaron tres picos a $38,1^\circ$, $44,2^\circ$ y $64,5^\circ$ correspondientes a los planos (111), (200) y (220) de plata, utilizando datos de difracción de polvo estándar de JCPDS número 04-0783. Todos los picos correspondían a una simetría cúbica centrada en la cara (fcc). Además de estos picos representativos de nanocrystal de plata fcc, otros picos se pueden observar en el patrón de rayos X, lo que sugiere la cristalización de una fase bioorgánica en la superficie NPsAg.

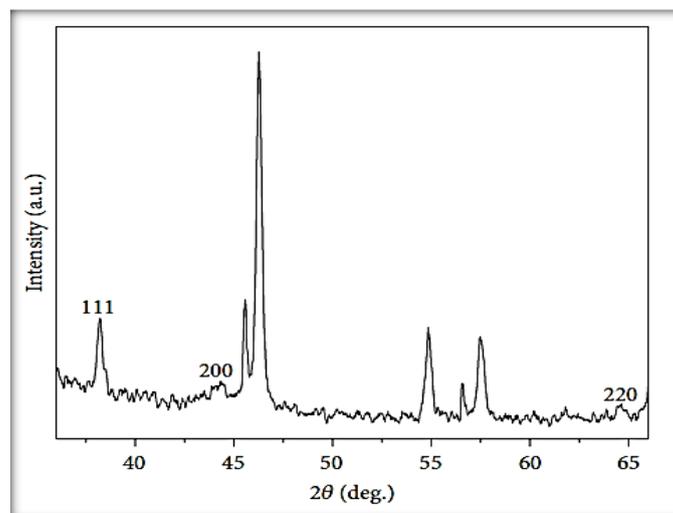


Fig. 14. Espectro de DRX de NPs Ag biosintetizadas

3.1.2.7 Caracterización del *capping* de NPsAg

Para profundizar los resultados obtenidos por TEM e IR, se analizó mediante electroforesis en gel de 1D de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) la composición de la cobertura observada en las NPsAg biosintetizadas. Se analizaron las muestras de sobrenadante de *P. aeruginosa* y las NPsAg biosintetizadas. Se observaron 2 bandas en el carril correspondiente al sobrenadante de *P. aeruginosa*, indicando la presencia de proteínas de diferente peso molecular. Mientras que en el carril de NPsAg se divisaron 6 bandas de diferente intensidad (Fig. 15). Las muestras fueron enviadas al centro CEQUIBIEM de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales en la Universidad de Buenos Aires para ser analizadas mediante nanoHPLC acoplado a un espectrómetro de masa.

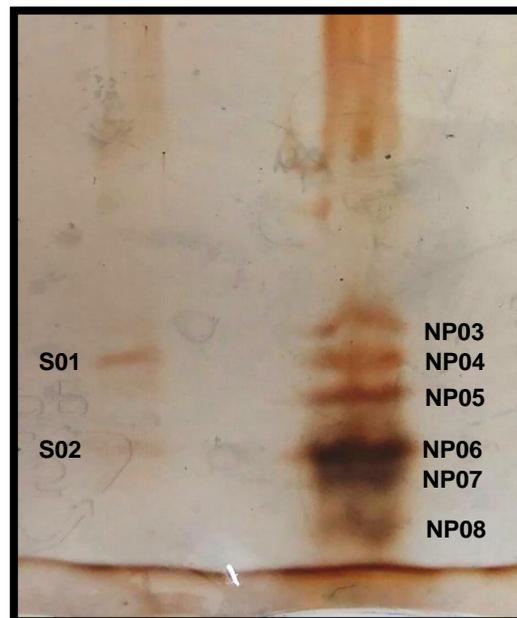


Fig. 15. Corrida electroforética: carril 1 corresponde al sobrenadante de *P. aeruginosa* (2 bandas: S01 y S02) y carril 2 corresponde a NPsAg (6 bandas: NP03, NP04, NP05, NP06, NP07, NP08.)

Esta técnica permitió identificar 26 proteínas en el *capping* de NPsAg, de las cuales 5 no pudieron ser caracterizadas (ver tabla 3). Dos segmentos fueron observados tanto en el sobrenadante como en el recubrimiento de las NPsAg, una lipoproteína de membrana externa de 8,8 kDa y una de 20,8 kDa de origen extracelular. Estos resultados son precursores en la identificación de proteínas en el *capping* de NPs, los cuales sugieren cuales serían las responsables de la estabilidad y/o biocompatibilidad de las NPsAg biosintetizadas extracelularmente por *P. aeruginosa*.

Tabla 3: Proteínas identificadas en NPsAg mediante nanoHPLC acoplado a MS

N° de banda	Nombre	N° de acceso	score	PM	IP
NP03	Outer membrane protein OprG OS= <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Q9HWW1	4,45	25,2	5,12
NP04	PhoP/Q and low Mg ²⁺ inducible outer membrane protein H1 OS= <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	G3XD11	21,68	21,6	9,03
	UPF0312 protein PA0423 OS= <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Q9I690	14,31	20,8	6,55
	Major outer membrane lipoprotein OS= <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P11221	4,63	8,8	8,18
	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C OS= <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Q9I6Z3	2,16	20,5	6,33
NP06	Azurin OS= <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P00282	8,82	16	6,92
	Lipid A deacylase PagL OS= <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Q9HVD1	3,37	18,4	6,3
	60 kDa chaperonin OS= <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P30718	2,25	57,1	5,14
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS= <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Q9HZK4	2,02	50,1	7,9
	Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase OS= <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Q9HZK4	2,02	50,1	7,9
NP07	Trigger factor OS= <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Q9I2U2	4,5	48,6	4,87
	UPF0339 protein PA0329 OS= <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Q9I6G2	2,51	11,8	9,28
	Motility protein FimV OS= <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Q9HZA6	2,42	96,9	4,36
	Glycine cleavage system H protein 1 OS= <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Q9I136	2,23	13,8	4,3
	30S ribosomal protein S20 OS= <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Q9HVM1	1,96	9,9	11,14
	Single-stranded DNA-binding protein OS= <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P40947	1,93	18,5	5,66
NP08	Probable cold-shock protein OS= <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Q9I4H8	13,58	7,7	7,42
	Periplasmic serine endoprotease DegP-like OS= <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	G3XD20	2,1	50,3	7,58
	Lysine--tRNA ligase OS= <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Q9HXU0	2,1	57,3	5,38
	Bacteriohemerythrin OS= <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Q9I352	1,95	17,8	6,21
	RNA-binding protein Hfq OS= <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Q9HUM0	1,94	9,1	9,52

N° de acceso: identificador único asignado a la proteína mediante la base de datos utilizada;
score: muestra la puntuación de proteína, que es la suma de las puntuaciones de los péptidos individuales;
PM: peso molecular; IP: punto isoeléctrico teórico.

3.2.1 Determinación de la actividad antibacteriana

La selección continua de bacterias que son resistentes a una amplia gama de antibióticos ha llevado al resurgimiento en la investigación de nuevas fuentes no convencionales de antibióticos. Las propiedades medicinales de la plata se conocen desde hace mucho tiempo, siendo utilizada en diferentes aplicaciones con fines antimicrobianos (odontología, dispositivos médicos y en tratamiento de quemaduras). Sin embargo, el uso de iones de plata tiene sus limitaciones, por lo que el reemplazo por NPsAg puede ser una alternativa viable.

Las propiedades físico químicas de la Ag como nanopartículas son diferentes que en su forma iónica ya que no tienen carga, son de pequeño tamaño, tienen una alta relación superficie-masa, lo que mejora su interacción con el medio circundante⁹⁰⁻⁹². Por consiguiente, se exploraron las propiedades antimicrobianas de los NPsAg biosintetizadas frente a patógenos bacterianos Gram-positivos y Gram-negativos. Se desafiaron cepas clínicas y de referencia de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *P. mirabilis*, *A. baumannii*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* con diferentes concentraciones de NPsAg (de 0,1 a 51,2 pM) determinando la CIM y la CBM (Tabla 4). Se puede observar que las NPsAg biosintetizadas fueron eficaces contra todas las especies bacterianas estudiadas.

Tabla 4: CIM y CBM de NPsAg biosintetizadas en diferentes especies bacterianas

Cepa	NPsAg		Ciprofloxacina	
	CIM (pM)	CBM (pM)	CBM/CIM	CIM (μ M)
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,2	0,2	1	1,3
SAMS cepa clínica 1	0,8	0,8	1	0,8
SAMS cepa clínica 2	0,4	0,4	1	0,8
SAMS cepa clínica 3	0,4	0,8	2	0,4
SAMR cepa clínica	3,1	3,1	1	99,1
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	3,1	6,2	2	3,1
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,8	0,8	1	0,8
<i>P. mirabilis</i> cepa clínica	0,4	0,4	1	0,4
<i>A. baumannii</i> cepa clínica	0,8	0,8	1	1,6
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,1	0,1	1	0,4
<i>E. coli</i> cepa clínica 1	1,6	1,6	1	0,8
<i>E. coli</i> cepa clínica 2	3,1	3,1	1	1
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,02	0,02	1	3,1
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	0,8	1,6	2	0,4

Los valores de CIM determinados se encontraron en concentraciones picomolar, entre 0,02 y 3,1 pM. En comparación con un antibiótico de uso clínico como CIP, las NPsAg mostraron un mayor efecto de inhibición del crecimiento frente a todas las especies bacterianas ensayadas a concentraciones significativamente más bajas (μ M y pM para CIP y NPsAg, respectivamente). El valor de CIM observado para *S. epidermidis* fue mayor que para otras cepas

bacterianas, lo cual podría explicarse por su capacidad para formar biofilms, lo que se tradujo en una reducción de la acción antimicrobiana mediada por NPsAg. Sin embargo, la CIM hallada para *P. aeruginosa* (especie bacteriana formadora de biofilms) fue la más baja (0,02 μM). Una explicación para este resultado sería que como las NPsAg son sintetizadas por el sobrenadante de esta cepa y se encuentra rodeada por compuestos provenientes de la misma, la bacteria la reconocería como algo propio sin ofrecer resistencia a la misma. Este comportamiento facilitaría la acción de las NPsAg como antimicrobianos.

Se consideró la relación CBM / CIM como medida del poder bactericida de un agente antimicrobiano (agente bactericida: CBM / CIM ≤ 2 , agente bacteriostático: CBM / CIM > 2), los resultados permiten señalar una actividad bactericida de NPsAg en las especies bacterianas analizadas.

También, se analizó la actividad antibacteriana del AgNO_3 en *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus*. Los resultados obtenidos pueden observarse en la Tabla 5.

Tabla 5: CIM y CBM de AgNO_3 en 3 especies bacterianas

Cepas	AgNO_3	
	CIM (μM)	CBM (μM)
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	78	78
<i>E. coli</i> ATCC 25922	78	78
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	10	10

Como puede observarse, la CIM y CBM de AgNO_3 para las tres cepas estudiadas se encuentra en concentraciones μM , mientras que las

correspondientes a NPsAg están en el orden del pM. Los resultados obtenidos afirman que el efecto antibacteriano de NPsAg biosintetizadas es superior a la sal de plata de la cual se parte para la biosíntesis de las mismas

3.2.1.1 Efecto sobre el crecimiento bacteriano

Se analizó el efecto del agregado de las NPsAg en el crecimiento de las cepas de referencia de *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus*. La Fig. 16 muestra que las NPsAg redujeron drásticamente la densidad óptica (DO) de la suspensión bacteriana durante 5 h de incubación después de añadirlas al cultivo de las tres especies bacterianas estudiadas respecto al control. La DO_{600} con el tratamiento fue 4,5 veces menor que el control (sin tratamiento) para *S. aureus* y *E. coli*, mientras que para *P. aeruginosa* fue 6 veces menor.

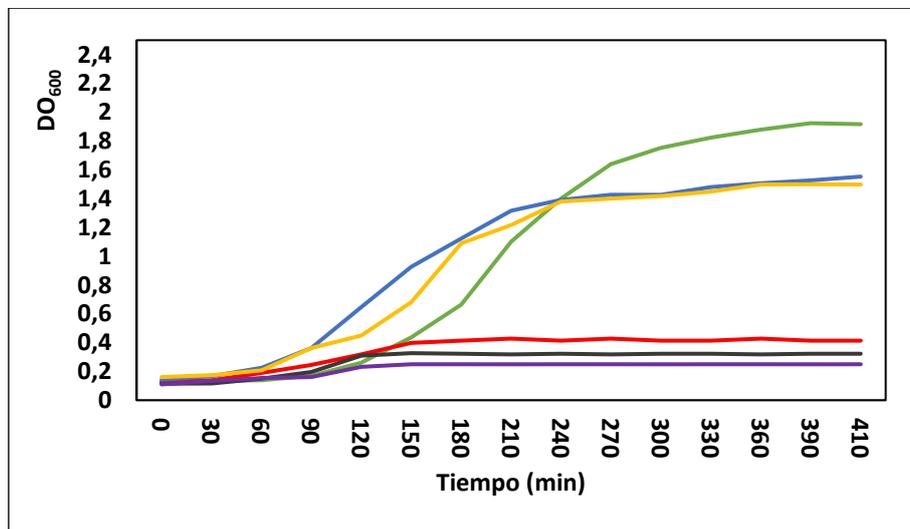


Fig. 16. Curva de crecimiento de *P. aeruginosa* (— amarillo —), *E. coli* (— azul —) y *S. aureus* (— verde —) y las tratadas con NPsAg 0,6 pM a los 150 min de incubación en CMH *P. aeruginosa* (— morado —), *E. coli* (— negro —) y *S. aureus* (— rojo —).

El efecto bactericida de NPsAg se estudió mediante TEM en *S. aureus* ATCC 29213. En la figura 17 (A, B y C) se puede observar cómo las NPsAg se adhieren a la pared de *S. aureus* después de 1 h de incubación, mientras que después de 6 h se puede observar la lisis de las células.

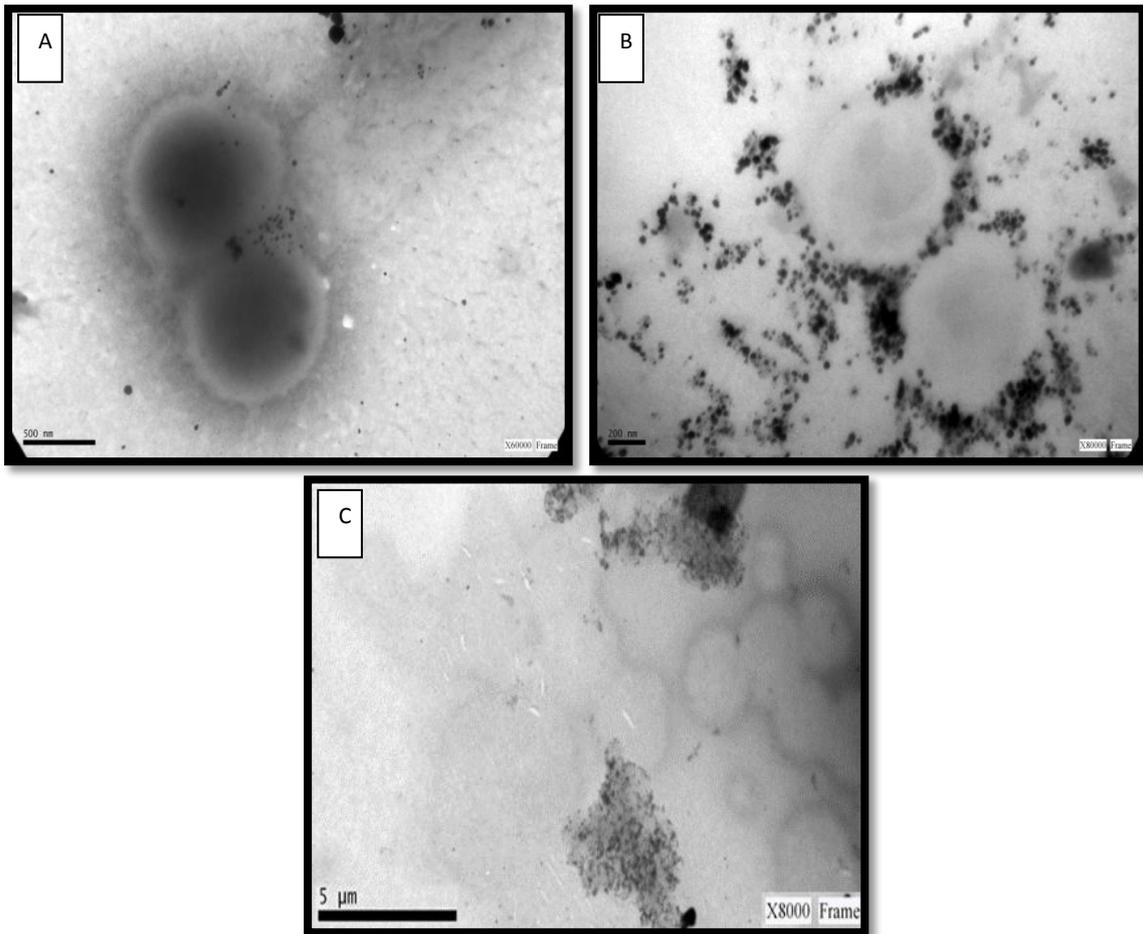


Fig. 17. *S. aureus* ATCC 29213 incubada con NPsAg por 0 h (A) ,1 h (B) y 6 h (C).

3.2.2 Determinación de la actividad antifúngica

La falta de control sobre los fitopatógenos ocasiona la pérdida total de cosechas, afectan la calidad y durabilidad del cultivo, siendo una de las principales causas de inestabilidad en la industria agrícola generando un enorme impacto económico y social. Además, el desarrollo de resistencia a diferentes

fármacos, así como los efectos adversos que ocasionan los antifúngicos utilizados actualmente, hacen necesaria la búsqueda de estrategias alternativas para el tratamiento de enfermedades producidas en plantas. Se estudió la capacidad fungicida de las NPsAg biosintetizadas frente a diferentes fitopatógenos importantes a diferentes concentraciones de NPsAg (de 0,0025 a 15 pM).

Se puede observar en la Tabla 6 que las NPsAg biosintetizadas fueron eficaces contra todas las especies fúngicas estudiadas.

Tabla 6: CIM de NPsAg biosintetizadas en diferentes fitopatógenos.

Cepa	NPsAg
	CIM (pM)
<i>Aspergillus niger</i>	0,005
<i>Alternaria alternata</i>	0,02
<i>Fusarium graminearum</i>	0,02
<i>Rhizopus stolonifer</i>	0,04
<i>Botrytis cinerea</i>	0,17
<i>Penicillium expansum</i>	0,34

De acuerdo a los resultados obtenidos cabe destacar que los valores de CIM para hongos también se encontraron en el orden de picomolar, pero en comparación con las halladas para bacterias, son muchos menores entre 0,005 y 0,4 pM. Los valores obtenidos permiten considerar a las NPsAg biosintetizadas como potenciales agentes antimicrobianos y sugieren la naturaleza de amplio espectro de su actividad.

3.3. Efecto de NPsAg sobre el metabolismo oxidativo

El mecanismo de acción de NPsAg como agentes antimicrobianos se ha convertido en foco de estudio en los últimos años. Algunos antecedentes que se conocen es que la plata en su forma iónica interacciona con las proteínas de la membrana bacteriana, aumentando la permeabilidad de la misma, disminuyendo la movilidad celular y el flujo de nutrientes, produciendo la ruptura de la bicapa lipídica y reaccionando con el ADN bacteriano, inhibiendo su replicación⁹³.

Debido a lo anteriormente expuesto, y considerando que la cadena respiratoria se ubica en la membrana celular, se podría pensar que las NPsAg podrían interactuar con la membrana bacteriana alterando el metabolismo respiratorio y llevando a la célula a una condición de estrés oxidativo lo cual conduciría a la muerte bacteriana.

3.3.1 Determinación de especies reactivas del oxígeno

3.3.1.1 Método espectrofotométrico de NBT

Esta técnica se utiliza desde hace muchos años como una manera de determinar espectrofotométricamente la cantidad de la especie $O_2^{\cdot -}$ generada durante el metabolismo aerobio en bacterias.

Se estudió la generación de ERO en tres especies bacterianas: como modelos de Gram negativas: *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *E. coli* ATCC 25922 y como modelo de Gram positivas: *S. aureus* ATCC 29213.

Se observó que para el caso de *P. aeruginosa*, la generación de ERO fue dependiente de la concentración de NPsAg y del tiempo de incubación, siendo máxima a una concentración de NPsAg 17 pM durante 3 h de contacto con el inóculo (Fig.18)

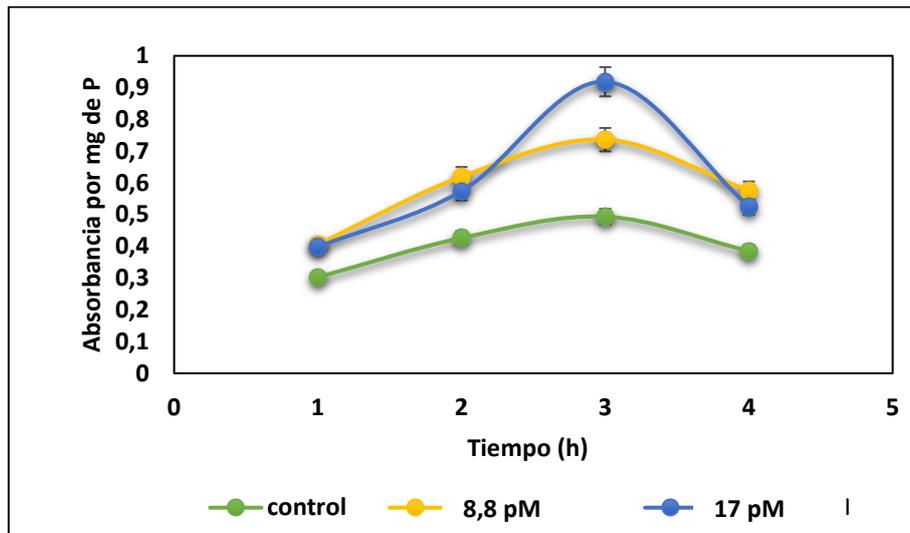


Fig. 18. Cinética de generación de ERO para *P. aeruginosa*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPs a 17 pM durante 4 h presentan un incremento significativo de ERO a las 3 h de contacto respecto del control sin NPs.

En *E. coli*, la generación de ERO también fue concentración y tiempo dependiente. El máximo estímulo se obtuvo a las 4 h de incubación con la máxima concentración de NPs analizada (12,9 pM) (Fig. 19).

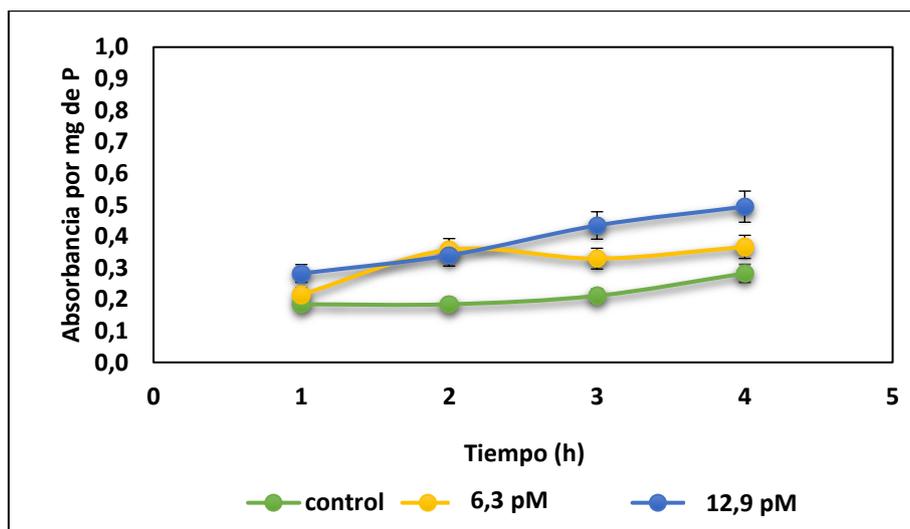


Fig. 19. Cinética de generación de ERO en *E. coli*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPs 12,9 pM durante 4 h presentan un incremento significativo de ERO respecto del control sin NPs.

Para el caso de *S. aureus* ATCC 29213 se observó que la cantidad de ERO generadas fue dependiente de la concentración de NPs agregada y del tiempo de incubación hasta las 3 h de incubación, y posteriormente, se mantuvo constante hasta las 4 h de contacto en las dos concentraciones de NPsAg estudiadas. El máximo estímulo se encontró para la concentración de NPsAg 12,9 pM con 1 h de contacto con el inóculo (Fig. 20)

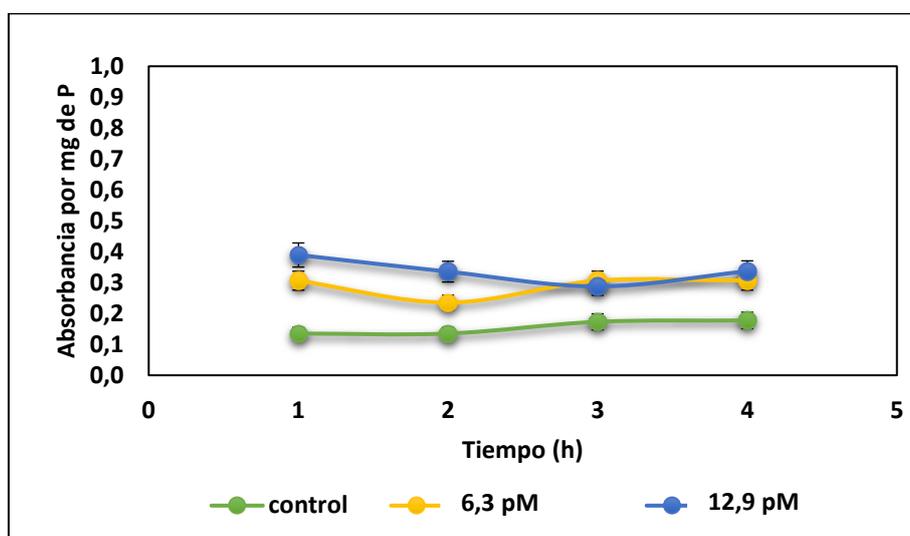


Fig. 20. Cinética de generación de ERO en *S. aureus*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPs a 12,9 pM durante 4 h presentaron un incremento significativo de ERO a una 1 h de contacto respecto del control sin NPs.

3.3.1.2 Método espectrofluorométrico utilizando la sonda 6-carboxy-2',7'-dichlorodihidrofluoresceína diacetato diacetoximetilester

Para complementar los resultados obtenidos en el ensayo de reducción de NBT se cuantificaron las ERO por fluorimetría utilizando la sonda H₂-DCFDA. Los resultados obtenidos por espectrofluorimetría coincidieron con los observados en el ensayo de NBT. La máxima generación de ERO se observó

con la mayor concentración de NPs analizada durante 4 y 1 h de incubación para *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente (Fig. 21 y Fig. 22).

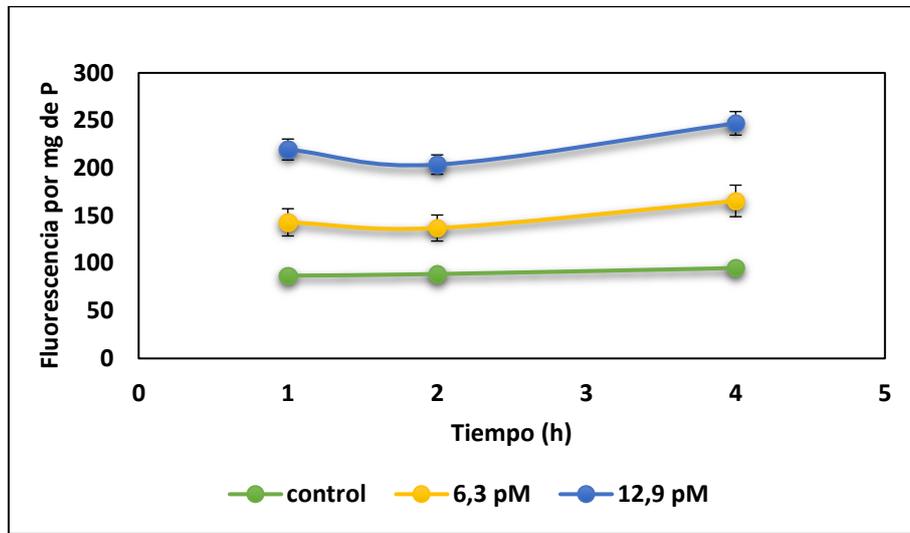


Fig. 21. Determinación de ERO en *E. coli* por espectrofluorometría. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPsAg 12,9 pM durante 4 h presentan un incremento significativo de ERO a las 4 h de contacto respecto del control sin NPs.

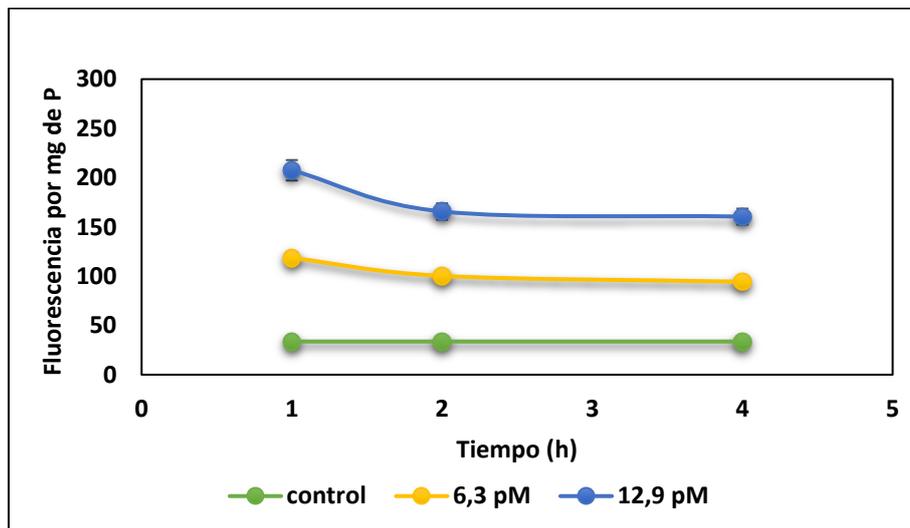


Fig. 22. Determinación de ERO en *S. aureus* por espectrofluorometría. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPsAg a 12,9 pM durante 4 h presentan un incremento significativo de ERO a 1 h de contacto respecto del control sin NPs.

Los resultados obtenidos estarían indicando que la presencia de NPs en la célula bacteriana estimula la formación de ERO, dicho estímulo es dependiente de la concentración y del tiempo de exposición. Pudo observarse que para las especies bacterianas Gram-negativas, la generación de ERO fue más lenta en comparación con la cepa Gram-positiva y esto puede deberse a que, claramente, cada especie bacteriana posee una maquinaria de defensa antioxidante diferencial para responder a la acción de NPsAg.

3.3.1.2.1 En presencia de secuestrantes de ERO

Con el objetivo de profundizar el estudio de la capacidad de las NPsAg para estimular la generación de ERO en bacterias, se decidió incorporar agentes secuestrantes de ERO. De esta manera, se podría determinar que ERO se encuentra más involucrada en la acción de las NPsAg. Los resultados obtenidos indican que para el caso de *P. aeruginosa* se produce una reducción en la generación de ERO en presencia de todos los secuestrantes evaluados; a las 3 h de incubación (que es la máxima generación de ERO para esta especie bacteriana) tirón y GSH logran disminuir la cantidad de ERO en un 44 % y 40 %, respectivamente (Fig. 23). Como GSH es un antioxidante general de ERO, se podría considerar que la especie $O_2^{\cdot-}$, sería la principal especie involucrada en el estrés oxidativo producido por NPsAg a este tiempo. En menor proporción participarían H_2O_2 y HO^{\cdot} , ya que puede observarse que la adición de CAT y manitol reducen en menor medida la generación de ERO.

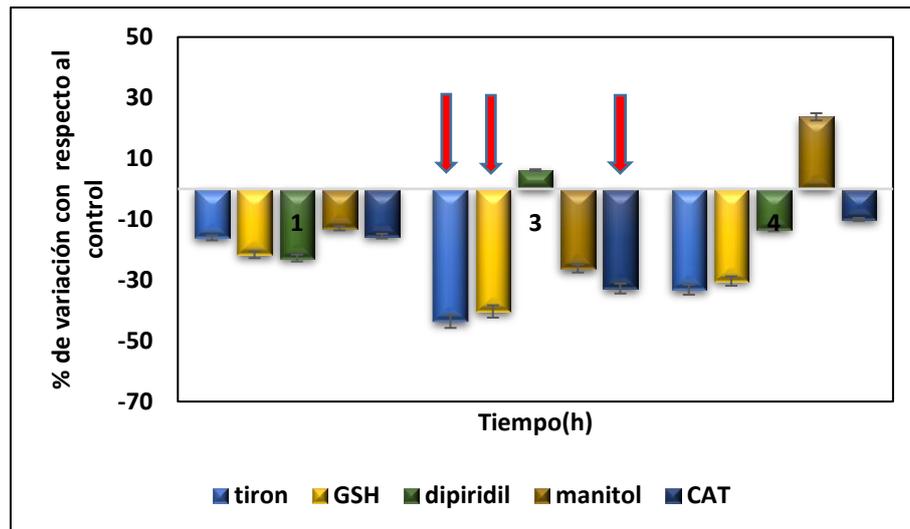


Fig. 23. Determinación de ERO en *P. aeruginosa* en presencia de secuestrantes: Los ensayos fueron realizados por triplicado. A las 3 h de incubación con 15 pM de NPsAg se produce la máxima generación de ERO y los secuestrantes tirón, GSH y CAT logran reducir los valores por debajo de la muestra con NPsAg sin el agregado de secuestrantes (100%).

En la Fig. 24 se observa que, para el caso de *E. coli*, el agregado de GSH redujo los niveles de ERO en todos los tiempos evaluados, inclusive hasta un 80 % en el máximo de ERO (4 h). A tiempos cortos, se destaca el agregado de la enzima CAT que reduce en un 75 % los niveles de ERO en presencia de NPsAg y de manitol a las 2 h que reduce un 78 %, mientras que a tiempos prolongados se acentúa la acción de los secuestrantes tirón (disminución del 71 %) y dipiridil (disminución del 54 %). Estos resultados podrían indicar que las principales especies involucradas a tiempos cortos son H_2O_2 y HO^\bullet (mediante la vía de Fenton), mientras que a las 4 h de contacto la especie que más participarían serían $O_2^{\bullet-}$ y el HO^\bullet (por la reacción de Haber-Weiss).

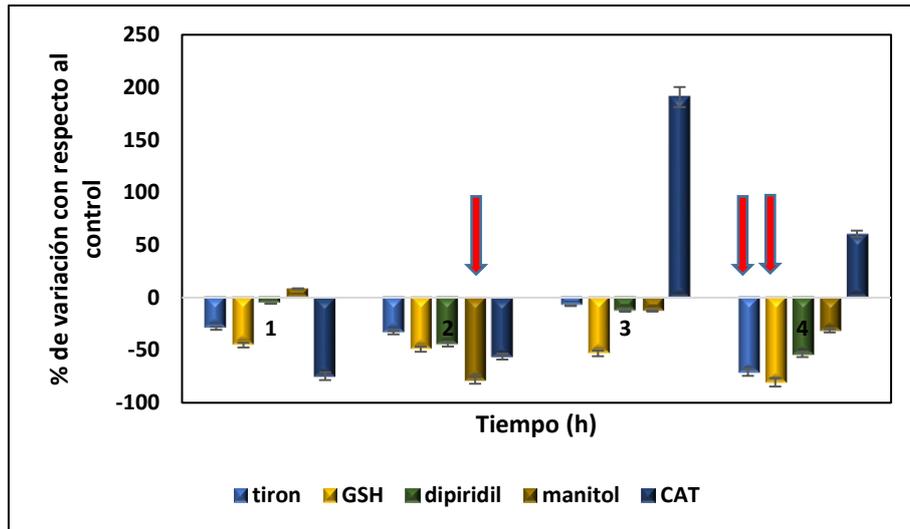


Fig. 24. Determinación de ERO en *E. coli* en presencia de secuestrantes. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPsAg a 15 pM presentan una disminución significativa de ERO respecto del control con NPs (100%)

En *S. aureus*, se observó que a la hora de máxima generación de ERO todos los secuestrantes lograron reducir el nivel de estres oxidativo generado, sin embargo, CAT fue la más efectiva disminuyendo un 63 % las ERO en presencia de NPsAg. En segundo lugar GSH con un 61 % y tirón con un 48 % por debajo del control con NPsAg. Estos resultados evidencian que la especie H_2O_2 sería la más estimulada en el aumento de las ERO y en menor proporción el $HO\cdot$ (mediante la vía de Fenton) (Fig. 25).

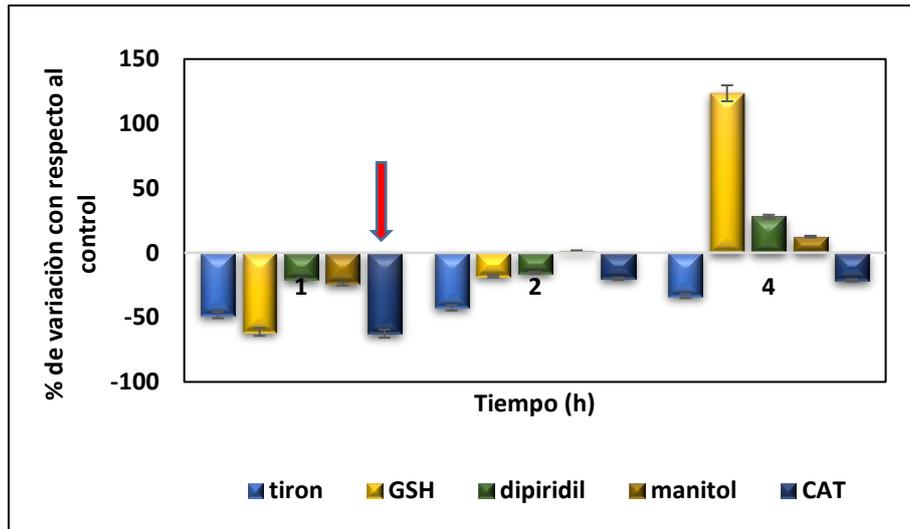


Fig. 25. Determinación de ERO en *S. aureus* en presencia de secuestrantes. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPs a 15 pM presentan una disminución significativa de ERO respecto a las muestras tratadas con NPs sin secuestrantes.

El uso de secuestrantes de ERO permitió analizar en profundidad acerca del posible mecanismo de acción de las NPsAg como agentes antimicrobianos.

3.3.1.3 Microscopia de Fluorescencia

Mediante Microscopia de Fluorescencia pudo detectarse en forma cualitativa el aumento de las ERO, utilizando como modelos a *E. coli* (Fig. 26) y *S. aureus* (Fig. 27). A los tiempos en los que se halló el máximo estímulo de ERO, se tomó una muestra de ambas cepas incubadas con y sin NPsAg. En las imágenes puede observarse como la fluorescencia de la sonda aumenta en las muestras tratadas con NPs respecto al control sin tratamiento. Esta técnica permitió verificar el incremento de las ERO en presencia de NPsAg biosintetizadas.

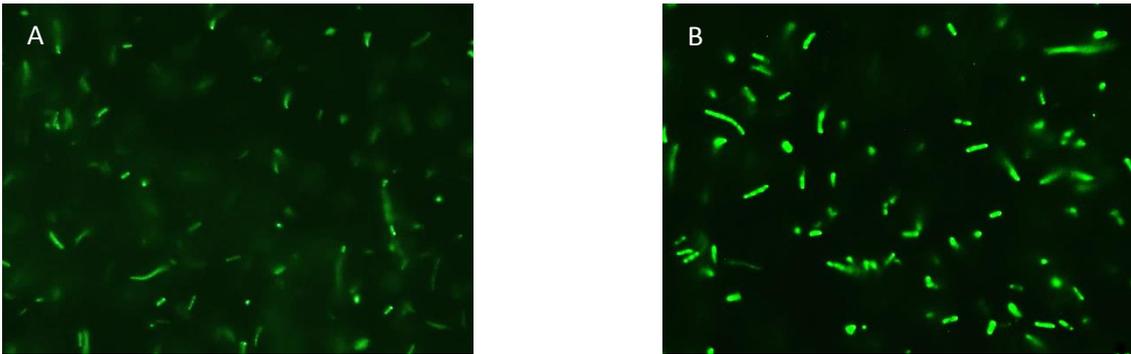


Fig. 26. *E. coli*: A) Control sin tratar B) muestra tratada con NPsAg durante 4 h.

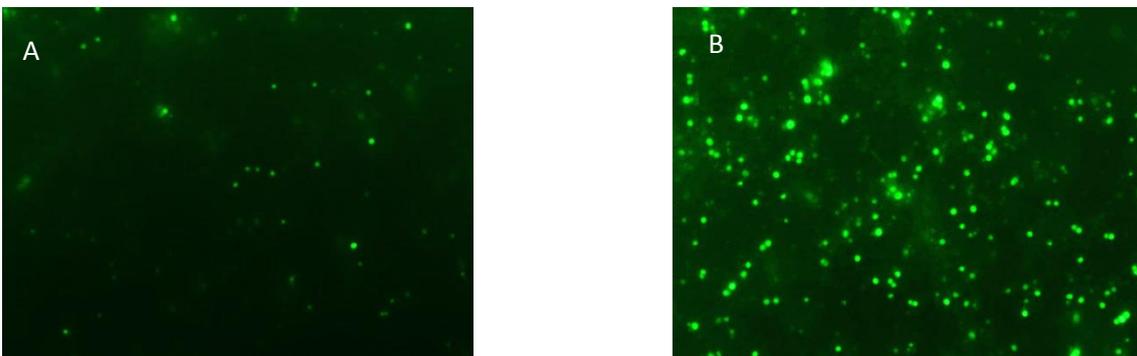


Fig.27. *S. aureus*: A) Control sin tratar B) muestra tratada con NPsAg durante 1 h.

3.3.2 Determinación de especies reactivas del nitrógeno por el método de Griess

Nitratos y nitritos son productos estables provenientes de la degradación del óxido nítrico (NO^\cdot) que se acumulan en el sobrenadante de muestras biológicas, por lo tanto, se puede utilizar el nitrito total como indicador de la concentración de NO^\cdot . De manera similar a los resultados obtenidos en la determinación de las ERO, los niveles de ERN fueron dependientes del tiempo y de la concentración cuando las cepas bacterianas ensayadas se incubaron con NPsAg. Para el caso de *P. aeruginosa* se encontró la máxima generación de NO^\cdot a 1 h de contacto con la concentración más alta de NPsAg (21 μM), siendo el aumento de un 268 % más que el control sin NPsAg (Fig. 28). En *E. coli*, la

generación de NO^\cdot fue mayor en presencia de NPsAg con respecto al control sin NPs e independiente de la concentración de NPsAg evaluada. A 1 h de contacto a la máxima concentración de NPs los niveles de ERO superaron en un 644 % al control, seguido de una disminución de los niveles de nitritos y aumentando de nuevo hacia las 3 h de contacto (Fig. 29). En *S. aureus* (Fig. 30) el estímulo máximo se obtuvo después de 2 h de incubación con la mayor concentración de NPsAg analizada, aumentando los niveles de NO^\cdot un 107 % por encima del control. Posteriormente disminuyó en un pequeño porcentaje, hacia las 4 h de contacto.

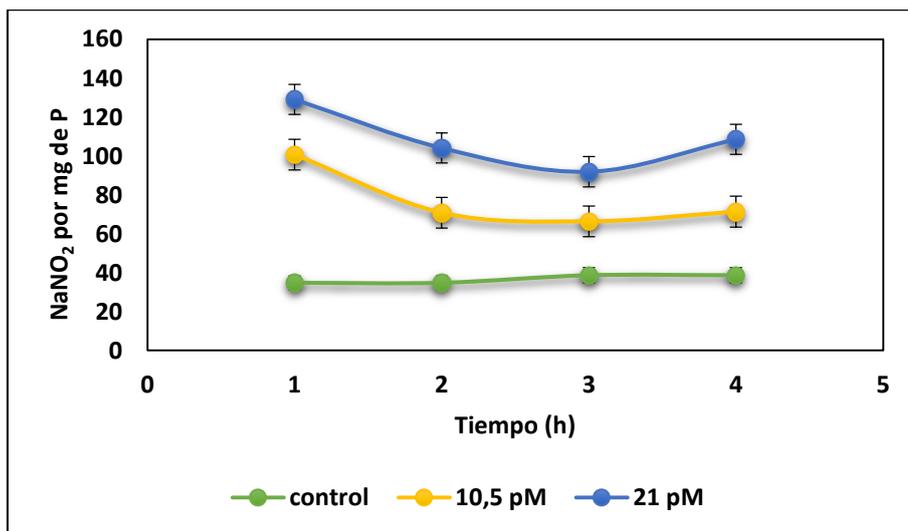


Fig. 28. Determinación de NO^\cdot en *P. aeruginosa*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPsAg presentaron un incremento significativo de NO^\cdot respecto del control sin NPs.

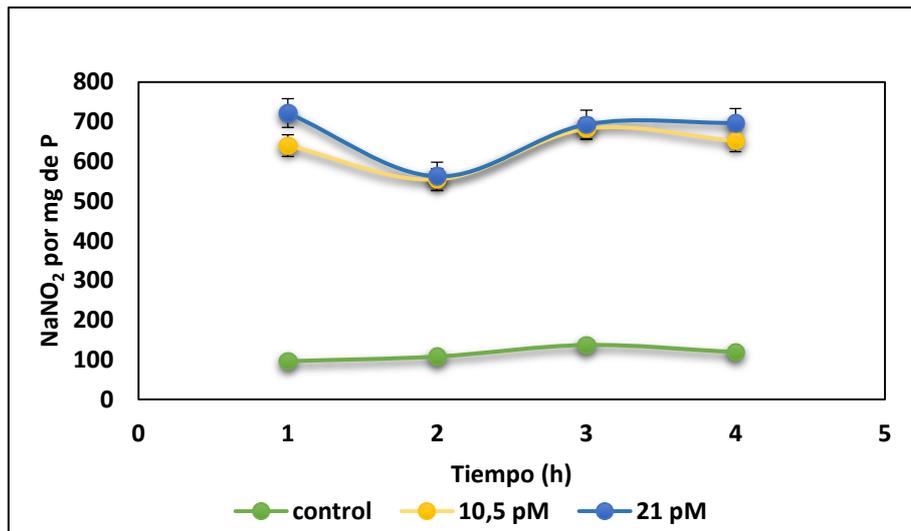


Fig. 29. Determinación de NO⁻ en *E. coli*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPs durante 4 h presentan un incremento significativo de NO⁻ respecto del control sin NPsAg .

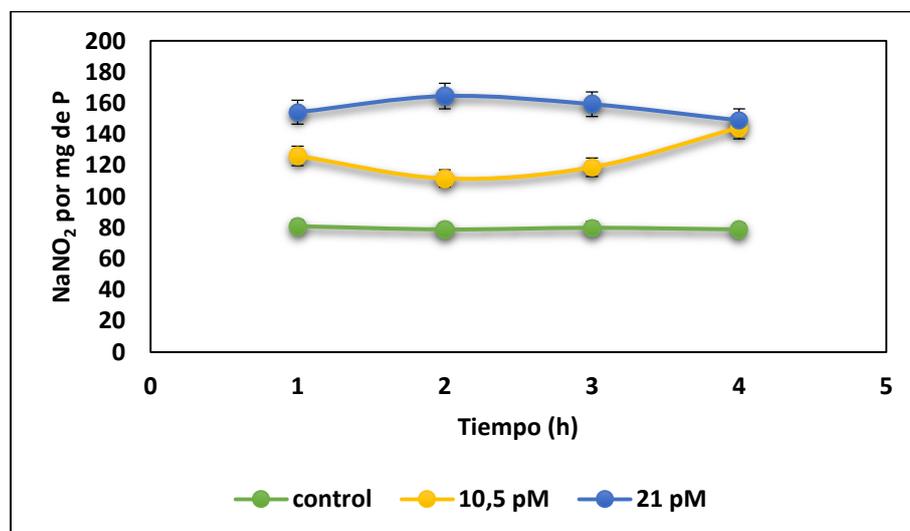


Fig. 30. Determinación de NO⁻ en *S. aureus*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPsAg presentan un incremento significativo de las NO⁻ respecto del control sin NPs.

Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que, en presencia de NPsAg, la generación de ERN se ve afectada en las tres cepas estudiadas. Se observó que, en *P. aeruginosa* la presencia de NPsAg produce un aumento en los niveles de nitritos, y por consiguiente de NO[•]. Posteriormente disminuye hacia las 3 h de contacto, coincidiendo con el máximo estímulo en las ERO. Este efecto puede explicarse, ya que se sabe que dependiendo de la concentración de NO[•] presente, el mismo puede actuar como antioxidante (a bajas concentraciones) o como prooxidante (altas concentraciones)⁹⁴. El mismo efecto puede observarse en *S. aureus*, donde en el tiempo máximo de ERO coincide con una disminución en los valores de NO[•] cuantificados. La especie *E. coli* se comporta de manera particular, aumenta progresivamente los niveles de ERO mientras que el NO[•] aumenta rápidamente independientemente de la concentración de NPsAg. Estos resultados sugieren que el estrés oxidativo causado por NPsAg modifica el balance entre el estímulo de las ERO y la producción NO[•]. Podríamos decir que las modificaciones en el estrés oxidativo y nitrosativo halladas podrían estar relacionadas con la actividad antibacteriana de NPsAg biosintetizadas en las tres especies bacterianas estudiadas, por lo que se propone profundizar en el desbalance oxidativo producido por NPsAg.

3.4. Efecto de nanopartículas de plata sobre macromoléculas

3.4.1 Evaluación de la peroxidación lipídica

Los ensayos se realizaron con las cepas de referencia de *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213.

Los resultados que se encontraron indican que en *P. aeruginosa*, la peroxidación lipídica fue dependiente de la concentración de NPsAg evaluada y del tiempo de incubación. Aumentó en un 60 % a las 3 h de contacto y posteriormente los valores de MDA disminuyeron por debajo del control a las 24 h en todas las concentraciones de NPs ensayadas (Fig. 31).

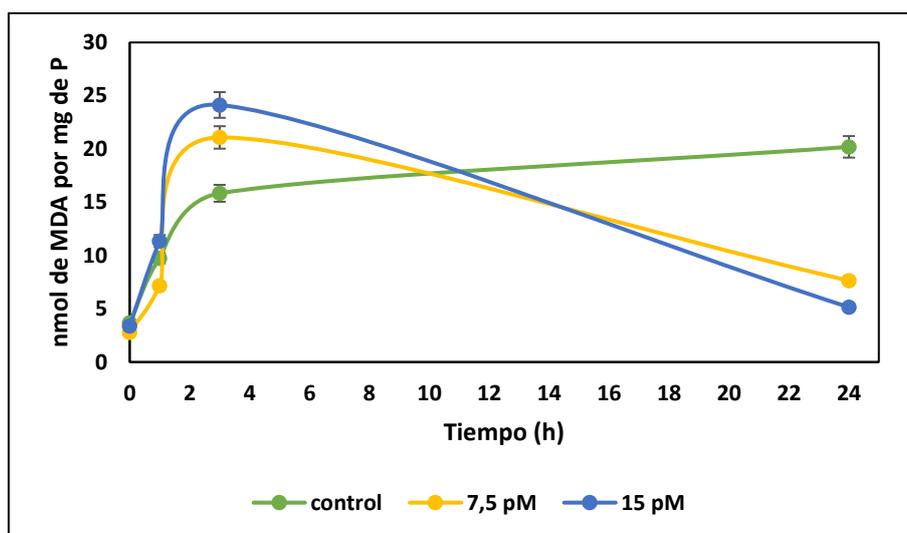


Fig. 31. Peroxidación lipídica en *P. aeruginosa*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPsAg a 15 pM durante 24 h presentan un incremento significativo de MDA a las 3 h de contacto respecto del control sin NPs.

Para el caso de *E. coli* la oxidación de lípidos fue dependiente de la concentración de NPsAg y del tiempo de exposición. En el tiempo máximo de estímulo de ERO (4 h) la peroxidación lipídica se encontró en un 60 % por encima

del valor del control sin NPs aumentando a un 150 % a las 24 h de contacto. Por lo que, a diferencia de *P. aeruginosa*, ninguna concentración de NPsAg permitió la recuperación de la oxidación de lípidos a los valores de MDA del control (Fig. 32).

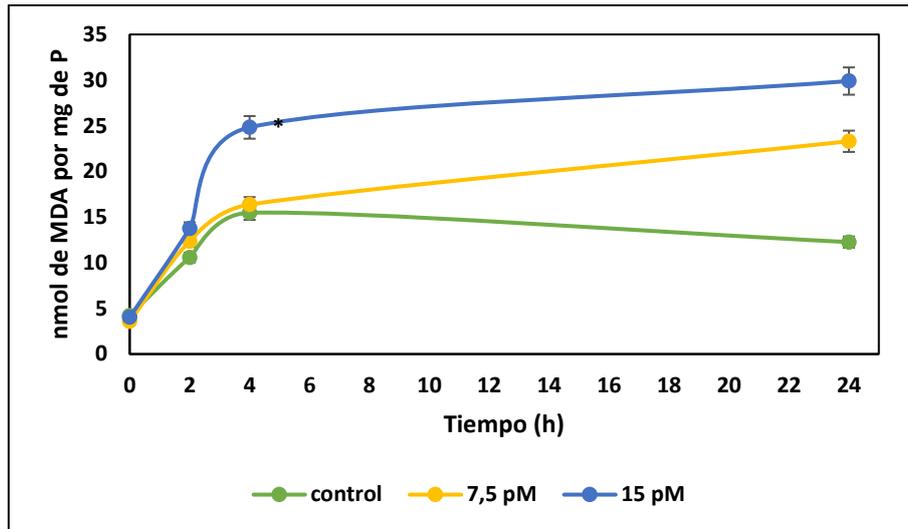


Fig. 32. Peroxidación lipídica en *E. coli*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPsAg a 15 pM durante 24 h presentaron un incremento significativo de MDA a las 24 h de contacto respecto del control sin NPs.

En *S. aureus* la peroxidación lipídica fue dependiente del tiempo solo a la máxima concentración de NPsAg analizada y aumentó progresivamente hacia las 24 h de incubación (Fig. 33). En el tiempo máximo de estimulación de ERO, la oxidación de los lípidos fue de un 50 % por encima del valor del control, sin embargo, el valor máximo de MDA se detectó a las 24 h donde el incremento es de un 110 % con respecto al control sin NPs. En la menor concentración de NPs analizada, los valores de MDA se mantuvieron constantes luego de las 4 h de contacto.

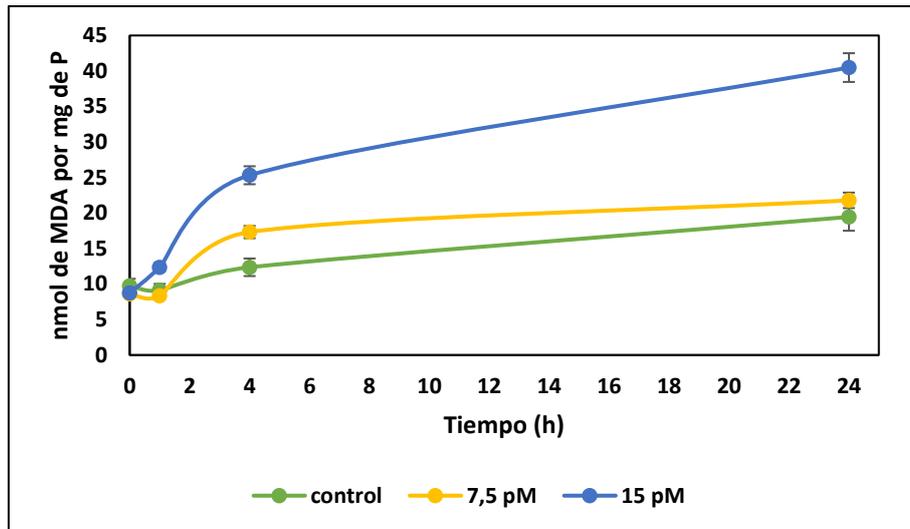


Fig. 33. Peroxidación lipídica en *S. aureus*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPsAg a 15 pM durante 24 h presentaron un incremento significativo de MDA a partir de 1 h de contacto respecto del control sin NPs.

Los resultados expuestos demuestran que la presencia de NPsAg produjo un aumento en la oxidación de los lípidos que fue concentración y tiempo dependiente. Se observó que cada cepa respondió de manera particular, evidenciándose la gran capacidad de la bacteria *P. aeruginosa* para remediar la injuria oxidativa reduciendo los niveles de MDA a los originalmente observados en el control.

3.4.1.1 En presencia de secuestrantes de ERO

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de la generación de ERO en las tres especies bacterianas estudiadas, se investigó cómo se modificaba la oxidación de lípidos en presencia de secuestrantes de ERO.

En la Tabla 4 pueden observarse los porcentajes de variación en el tiempo de la peroxidación lipídica de las cepas bacterianas estudiadas ante el agregado de los secuestrantes tirón, GSH y CAT, con respecto a las muestras con NPsAg sin secuestrantes. De esta manera, se podrá inferir que especie radicalaria posee una mayor participación en la oxidación de lípidos y profundizar aún más en el mecanismo de acción de las NPsAg.

Ante el agregado del secuestrante tirón, los valores de MDA en *P. aeruginosa* se redujeron en un 48 % en el tiempo máximo de generación de ERO (3 h) y un 20 % en *E. coli* (4 h) indicando que el $O_2^{\cdot-}$ sería una de las principales especies responsables de la oxidación de lípidos, luego los valores aumentan progresivamente. El agregado de GSH produjo la reducción de los valores de MDA con respecto al control, tanto en *P. aeruginosa* como en *E. coli*, en un 36 % y 47 % respectivamente.

No se observaron cambios significativos en *S. aureus* con respecto a las muestras sin secuestrantes. Evidentemente la oxidación de lípidos en esta cepa supera la capacidad de los secuestrantes, por lo que la inhibición de una sola especie radicalaria no produciría cambios cuantificables en la oxidación general de lípidos.

Tabla 7. Modificaciones en los niveles de MDA ante el agregado de secuestrantes de ERO en *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. (*p<0,05)

Tiempo (h)	0	1	3	4	24
cepa	Tirón				
<i>P. aeruginosa</i>	4	-45	-31	-48*	150
<i>E. coli</i>	-7	12	---	-20	43
<i>S. aureus</i>	19	-10	---	47	-14
	GSH				
<i>P. aeruginosa</i>	10	-37	-36*	95	280
<i>E. coli</i>	-24	-9	--	-47*	-12
<i>S. aureus</i>	-7	-11	--	53	-4
	CAT				
<i>P. aeruginosa</i>	26	-9	-26	-1	726
<i>E. coli</i>	-26	-17	--	-5	58
<i>S. aureus</i>	-5	-3	--	66	-6

3.4.2 Determinación de la oxidación de proteínas

Los niveles de AOPP se determinaron por un método espectrofotométrico, que utiliza la Cloramina T como testigo. Los resultados obtenidos indicaron que la generación de AOPP en presencia de NPsAg, tanto en *P. aeruginosa* como en *E. coli*, fueron dependientes de la concentración de NPsAg y del tiempo de incubación. Mientras que en *S. aureus* la generación de AOPP fue solo concentración dependiente. En la Fig.34 se observa un aumento del 300 % de los AOPP a las 2 h de contacto con NPsAg 15 pM en *P. aeruginosa* con respecto al control sin NPs, sin embargo hacia las 24 h la oxidación de proteínas se reduce hasta alcanzar los valores del control.

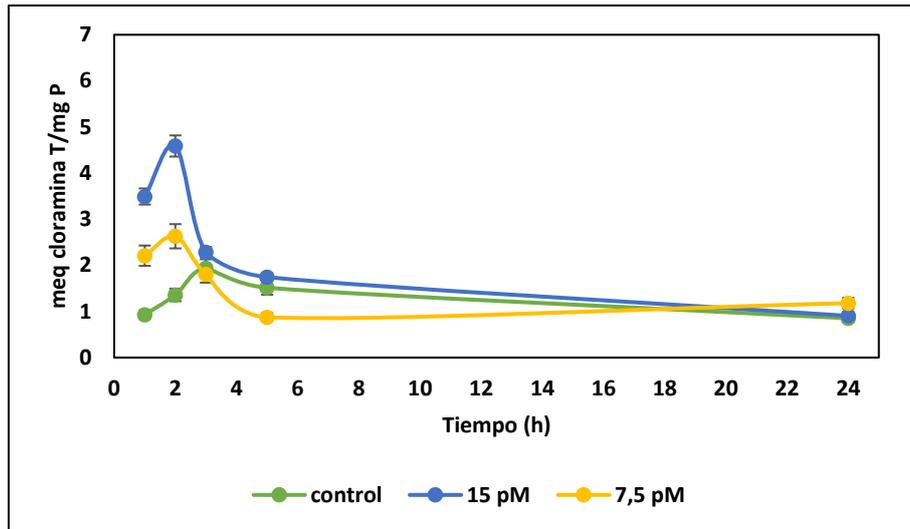


Fig. 34. Oxidación de proteínas en *P. aeruginosa*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPsAg a 15 pM durante 24 h presentaron un incremento significativo en los valores de AOPP a las 2 h de contacto respecto del control sin NPs.

En la Fig. 35, se observó que en *E. coli* a las 2 h de contacto con NPsAg 15 pM se produce un aumento del 460 % en los niveles de AOPP con respecto al control. Posteriormente disminuyen en el máximo de ERO (4 h) y luego aumentan progresivamente hacia las 24 h de contacto con NPsAg.

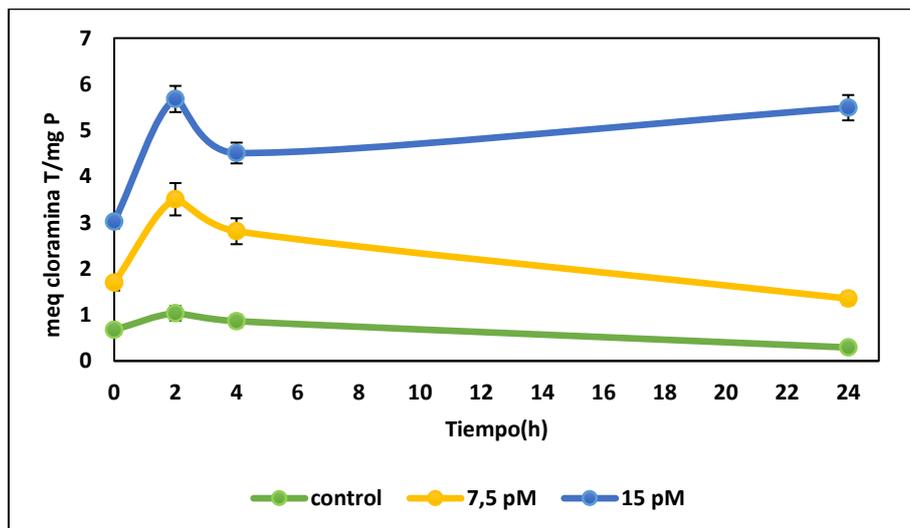


Fig. 35. Oxidación de proteínas en *E. coli*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPs a 15 pM durante 24 h presentaron un incremento significativo en los valores de AOPP a las 2 h de contacto respecto del control sin NPs.

Para el caso de *S. aureus* (Fig. 36) se observó un incremento inicial del 600 % en los niveles de AOPP en presencia de NPsAg 15 pM. Posteriormente los valores se mantuvieron en un 415 % por encima del control.

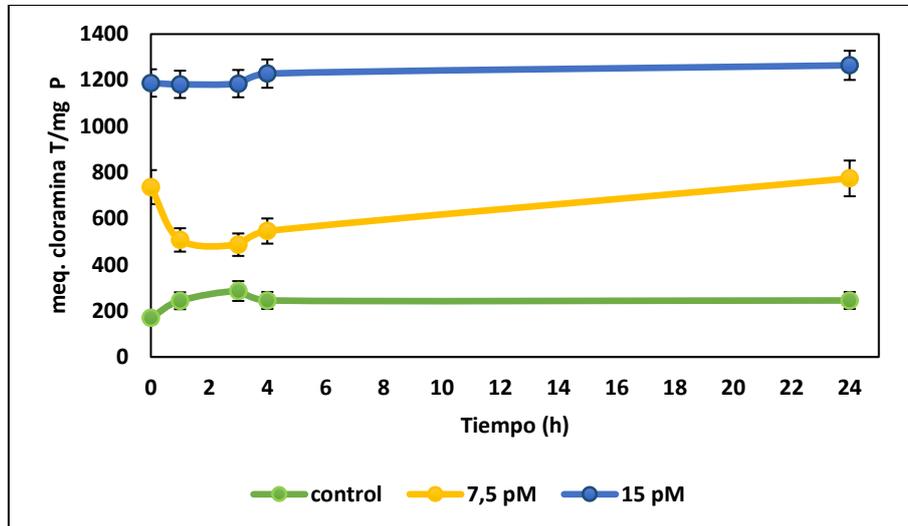


Fig. 36. Oxidación de proteínas en *S. aureus*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPsAg a 15 pM durante 24 h presentaron un incremento significativo en los valores de AOPP que se mantuvo en el tiempo respecto del control sin NPs.

Se observó que la injuria oxidativa producida por NPsAg en proteínas es mayor en *S. aureus* que en *P. aeruginosa* y *E. coli*. Probablemente la diferencia en la composición de la pared entre cepas Gram-negativas y Gram-positivas influya en la acción de las NPsAg. Nuevamente, se observa que *P. aeruginosa* demuestra su gran capacidad para responder al daño producido por NPsAg en proteínas volviendo los valores de AOPP a los iniciales.

3.4.2.1 En presencia de secuestrantes de ERO.

La adición de secuestrantes de ERO produjo modificaciones en el daño oxidativo a proteínas. La Tabla 8 se resalta como el secuestrante tirón solo

produjo disminución (27 % en presencia de NPsAg) en los niveles de AOPP en *P. aeruginosa*, mientras que en *E. coli* y *S. aureus* no se observaron modificaciones significativas. Por el contrario, el agregado de GSH produjo una reducción marcada de los AOPP producidos en *E. coli* a la hora de máxima de generación de ERO (50 %) y un 32 % en *S. aureus*. La enzima CAT disminuyó los valores de AOPP en todos los tiempos evaluados, tanto en *E. coli* como en *S. aureus*. Entre las 4 y 24 h CAT redujo en un 52 % los AOPP en *E. coli* y en promedio un 30 % en todos los tiempos en *S. aureus*. Estos resultados podrían indicar que H_2O_2 y HO^\bullet , cumplirían un papel primordial en la oxidación de proteínas mediada por NPsAg.

Tabla 8. Modificaciones en los niveles de AOPP ante el agregado de secuestrantes de ERO en *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus* a diferentes tiempos. Los ensayos fueron realizados por triplicado. (* $p < 0,05$)

Tiempo (h)	0	1	3	4	24
cepa	Tirón				
<i>P. aeruginosa</i>	-8	8	-27*	8	-11
<i>E. coli</i>	-17	-8	---	11	21
<i>S. aureus</i>	4	-2	19	-5	-3
	GSH				
<i>P. aeruginosa</i>	-2	-5	-16	8	63
<i>E. coli</i>	-3	-26	--	-50*	-57*
<i>S. aureus</i>	-3	-6	1	-2	-32*
	CAT				
<i>P. aeruginosa</i>	-23	0	-6	-13	301
<i>E. coli</i>	-27	-21	--	-29	-52*
<i>S. aureus</i>	-29	-30	-25	-35*	-36*

3.4.3 Determinación del potencial de membrana

Las modificaciones en el potencial de membrana se determinaron mediante la medición de la fluorescencia de la sonda ANS, la cual es una sonda fluorescente utilizada para detectar cambios conformacionales en proteínas y estudiar membranas biológicas. Se propone que una modificación en la fluorescencia de ANS sugeriría cambios en la superficie celular de la bacteria debido a la presencia de NPsAg.

Se pudo evidenciar que la presencia de NPsAg biosintetizadas produjo un cambio conformacional en la membrana de las 3 cepas de estudio debido a que la fluorescencia de la sonda aumentó con respecto al control sin NPs.

La fluorescencia inicial de la sonda en las cepas Gram-negativas evaluadas fue superior al control sin NPsAg. Se observó un incremento de la fluorescencia del 100 % por encima del control para *P. aeruginosa* y del 160 % para *E. coli*. Estos resultados muestran una respuesta rápida de estas especies bacterianas en la conformación de la membrana ante la presencia de NPsAg. En *P. aeruginosa* la fluorescencia aumenta progresivamente hacia las 24 h de incubación indicando un ambiente más apolar o lipofílico en los alrededores de la membrana, lo que podría traducirse como una mayor sobreexposición de lípidos en presencia de NPsAg (Fig. 37). En *E. coli*, la fluorescencia disminuye hacia las 4 h de contacto, revelando un ambiente más polar a este tiempo (Fig. 38). Este resultado podría explicarse como una reducción en la cantidad de lípidos expuestos en la membrana. Posteriormente, la fluorescencia vuelve a aumentar al igual que en *P. aeruginosa*. En la cepa Gram positiva la fluorescencia aumenta en el tiempo máximo de estímulo de ERO en un 100 % respecto del control sin NPsAg (ambiente más polar, menos lípidos expuestos),

sin embargo, el potencial se recupera alrededor de las 24 h retornando al valor del control (Fig. 39).

Estos resultados podrían indicar que las modificaciones producidas en la estructura de la membrana (relación entre lípidos y proteínas) de *S. aureus* por la presencia de las NPsAg serían reversibles en el tiempo mientras que los cambios ocurridos en las Gram-negativas permanecerían constantes hasta las 24 h de incubación.

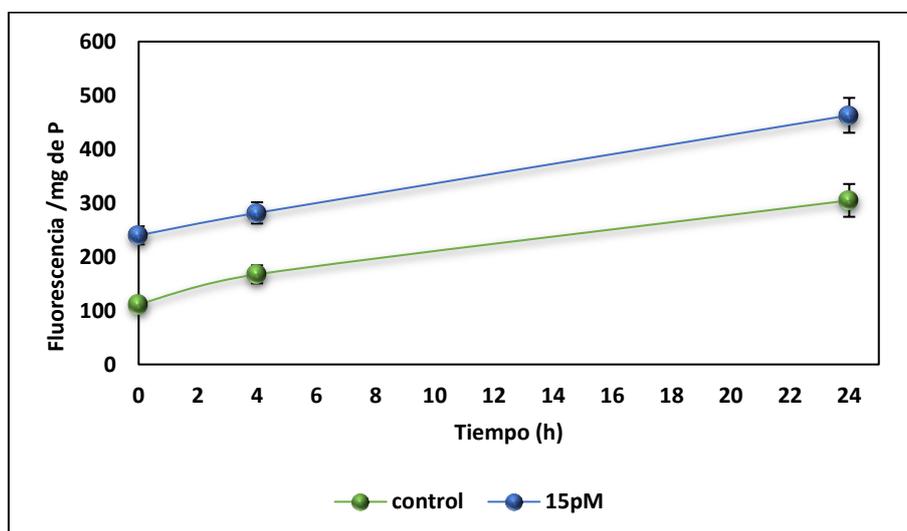


Fig. 37. Fluorescencia de la sonda ANS en *P. aeruginosa*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPsAg a 15 pM durante 24 h presentaron un incremento significativo en la fluorescencia que se mantuvo en el tiempo respecto del control sin NPs.

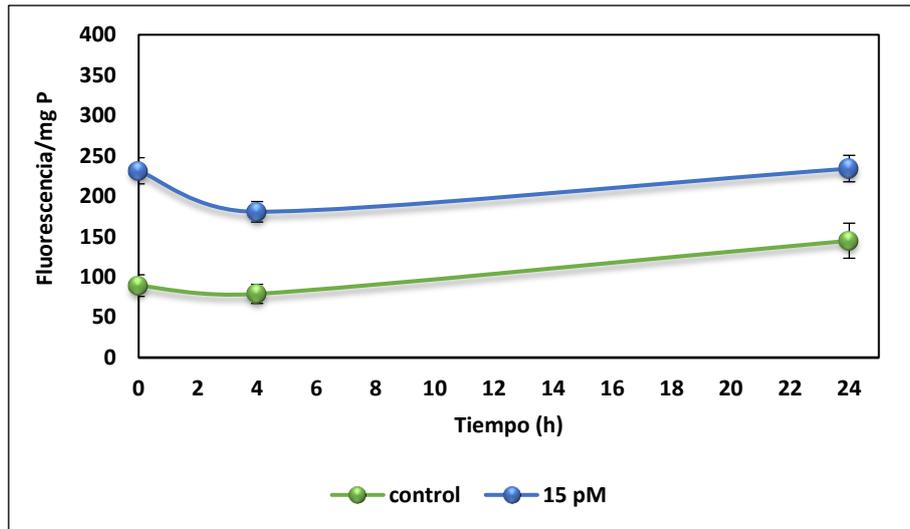


Fig. 38. Fluorescencia de la sonda ANS en *E. coli*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPtAg a 15 pM durante 24 h presentaron una disminución de la fluorescencia hacia las 4 h.

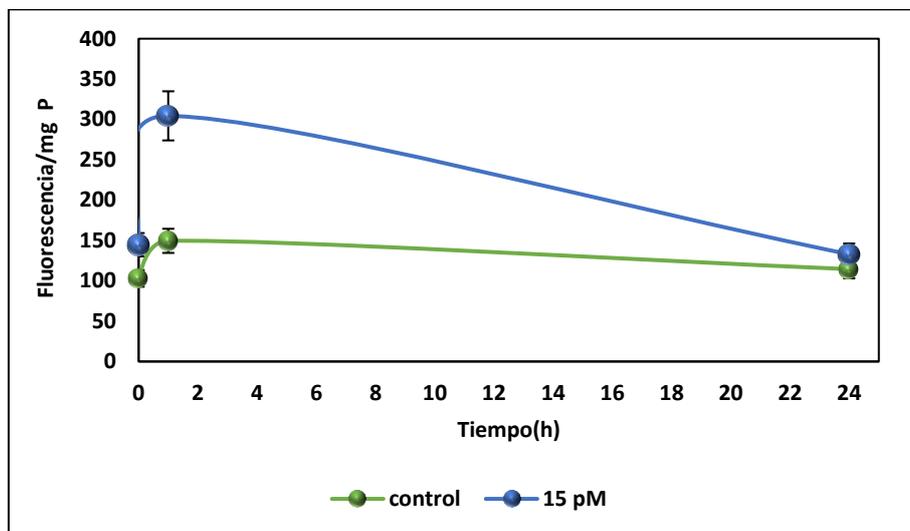


Fig. 39. Fluorescencia de la sonda ANS en *S. aureus*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPtAg a 15 pM durante 24 h presentaron un aumento de la fluorescencia a 1 h de contacto con NPs.

Las alteraciones en la membrana bacteriana en presencia de NPsAg producirían modificaciones en el potencial eléctrico, las cuales se traducirían en cambios estructurales en la célula y contribuirían a los daños originados por las NPs.

La acción diferencial de las NPsAg podría deberse a las diferencias existentes en la composición de la membrana entre las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas como así también a la carga de la misma.

3.4.4 Determinación del daño al ADN

3.4.4.1 Cuantificación del nucleósido oxidado 8-OH-dG

La cuantificación de la 8-OH-dG en el interior de las células es la técnica más ampliamente utilizada para evaluar el daño oxidativo de la molécula de ADN. En *E. coli*, se observó un aumento de 8-OH-dG en un 56 % con respecto al control sin NPsAg, mientras que no se pudieron cuantificar los nucleosidos (no oxidado y oxidado) en *P. aeruginosa* o *S. aureus*. Este resultado podría indicar la fragmentación o destrucción total del ADN en el tiempo evaluado (Tabla 9).

Tabla 9. Relación entre la cantidad de nucleosido oxidado y no oxidado en *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus* a las 4 h de contacto. Los ensayos fueron realizados por triplicado. (* $p < 0,05$)

8-OHdG/dG			
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Control	0,21	0,87	0,73
NPsAg 15 pM	--	1,39*	--

3.4.4.2 Interacción NPsAg-ADN

A partir de los resultados obtenidos del punto anterior se procedió a analizar por espectrofotometría la interacción entre el ADN bacteriano y las nanopartículas biosintetizadas. Se observó que ante la adición de pequeñas cantidades de NPsAg se produjeron variaciones en el espectro UV- Vis del ADN de *E. coli*. Posterior a la extracción del ADN, se midió la muestra espectrofotométricamente entre 200 y 600 nm, obteniéndose un pico a 260 nm con una relación de la absorbancia medida a 260 y 280 nm de 1,8 lo que indica que el ADN extraído se encuentra libre de contaminantes como proteínas, ARN u otros (control 1). Como control 2 se midió la absorbancia de las NPsAg biosintetizadas puras entre 200 y 600 nm.

Se observó que ante el agregado de los dos primeros volúmenes de NPsAg, el pico correspondiente al ADN no se corrió sino que sólo aumentó su absorbancia (Fig. 40). Con los siguientes agregados de NPsAg (de 15 a 140 μ L), la curva espectral del ADN se transformó en otra completamente diferente, donde se observó la desaparición del pico a 260 nm hasta la aparición de dos

picos, uno pequeño a 250 nm aproximadamente, el cual correspondería a la fragmentación del ADN, y otro gran pico a 290 nm, lo que podría corresponder a la oxidación de las NPsAg a plata iónica (Fig. 41). Finalmente, el pico a 250 nm desapareció completamente, indicando la destrucción total del ADN. Solo se observó el corrimiento del pico a 290 nm a longitudes de onda próximas a 400 nm, el cual correspondería a un exceso de NPsAg (Fig. 42).

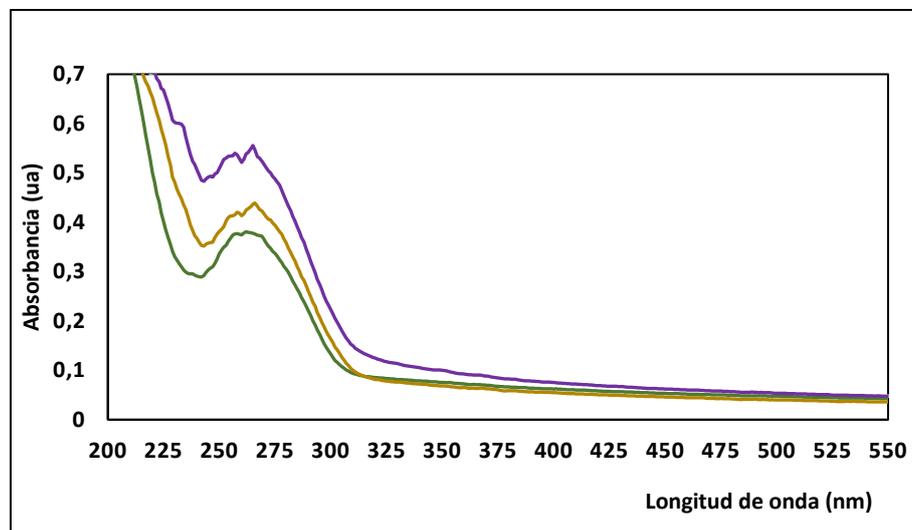


Fig. 40. Modificaciones del espectro UV-Vis del ADN de *E. coli* por la adición de NPsAg. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Curva verde corresponde al ADN puro (control 1), curva marrón al agregado de 5 µL de NPsAg 15 pM, curva morada a la adición de 10 µL de NpsAg 15 pM.

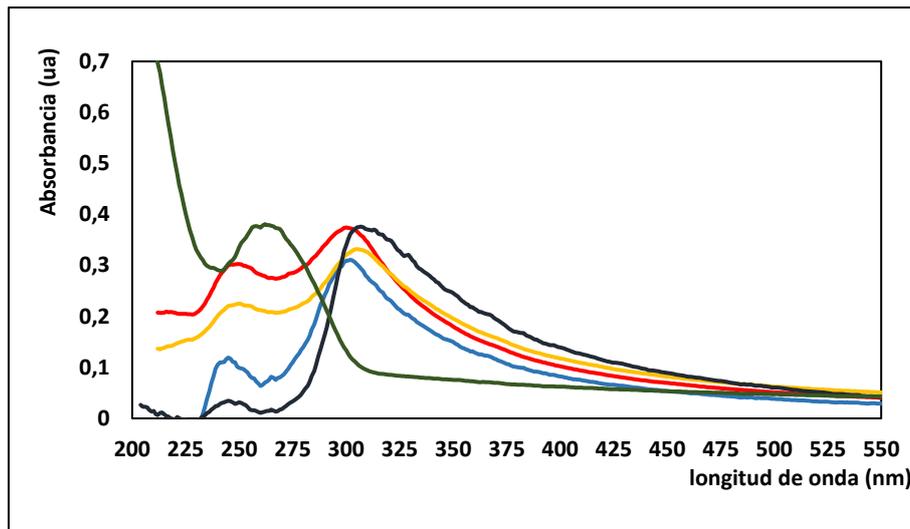


Fig. 41. Modificaciones del espectro UV-Vis del ADN de *E. coli* por la adición de NPsAg.

Los ensayos fueron realizados por triplicado. Curva verde corresponde al ADN puro (control 1), curva roja al agregado de 80 μL de NPsAg 15 pM, curva amarilla a la adición de 90 μL de NPsAg y curva celeste a la adición de 110 μL de NPsAg.

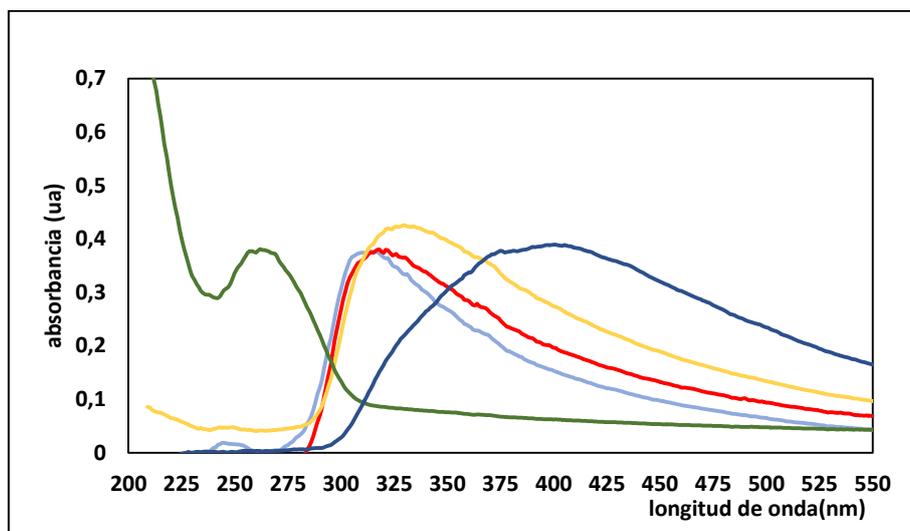


Fig. 42. Modificaciones del espectro UV-Vis del ADN de *E. coli* por la adición de NPsAg.

Los ensayos fueron realizados por triplicado. Curva verde corresponde al ADN puro (control 1), curva azul al espectro de NPsAg 15 pM puras (control 2), curva celeste al agregado de 140 μL de NPsAg 15 pM, curva roja a la adición de 160 μL de NPsAg 15 pM, curva amarilla a la adición de 210 μL de NPsAg 15 pM.

Los resultados obtenidos de la adición NPsAg al ADN demuestran que las NPsAg producen modificaciones en las bases del mismo, que dependen de la cantidad de NPs agregada. El daño que se produce sobre el ADN está siendo estudiado para comprender no solo su toxicidad en células procariotas sino también para analizar sus efectos sobre células eucariotas.

Previamente, se describió que la presencia de NPsAg en *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus* produjo un aumento en los niveles de ERO de las células. Ahora se demostró cómo junto a este aumento de ERO se produjo daño sobre diferentes macromoléculas esenciales para la célula como son los lípidos y proteínas, lo que llevo también a alteraciones en la membrana, como por ejemplo modificaciones en su potencial redox. Finalmente, se pudo observar el daño directo sobre el ADN por acción de las NPsAg.

3.5. Efecto de nanopartículas de plata sobre sistemas antioxidantes

Estudios previos han demostrado como los sistemas antioxidantes de diferentes especies bacterianas se ven afectados en presencia de antibióticos, como CIP o cloranfenicol, mediante el estrés oxidativo que generan^{42,95}. Considerando que se ha observado que la exposición a NPsAg en las especies bacterianas estudiadas resultaron en un aumento en la generación de ERO y una modificación en los niveles de ERN con respecto a los controles sin NPs, se decidió comparar los cambios generados en los sistemas antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos, en condiciones basales o bajo condiciones de estrés oxidativo.

3.5.1 Sistemas antioxidantes enzimáticos

3.5.1.1 Determinación cuantitativa de la actividad de catalasa

Se determinó la actividad de la enzima CAT en las cepas ATCC de *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus*. Como puede apreciarse en la Fig. 43, la inducción de la actividad CAT en *P. aeruginosa* fue lenta, observándose la máxima activación de la enzima luego de 24 h de incubación con 15 pM de NPs, con un incremento de 49 % en la actividad con respecto al control de la bacteria sin NPsAg. Tanto en *E. coli* como en *S. aureus*, se observaron cambios significativos de la actividad CAT a tiempos cortos de incubación con NPsAg. En *E. coli* la actividad CAT aumentó un 50 % con respecto al control sin NPsAg en el tiempo máximo de incubación (4 h) y se mantuvo hacia las 24 h (Fig. 44), mientras que en *S. aureus* la activación de CAT fue del 70 % con respecto al control sin NPs a 1 h de contacto (máximo de generación de ERO) para posteriormente disminuir en forma gradual (Fig. 45).

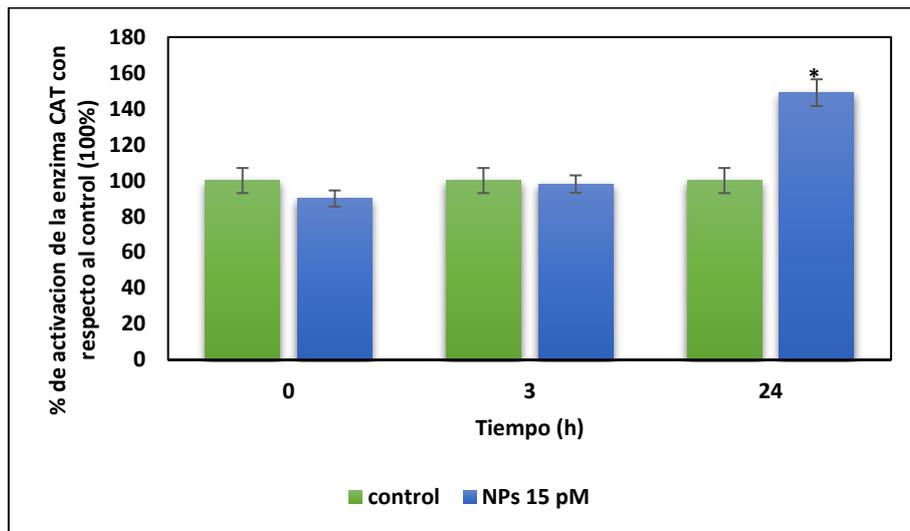


Fig. 43. Cinética de activación de CAT en *P. aeruginosa*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPsAg 15 pM durante 24 h presentan un incremento significativo de la enzima CAT a las 24 hs de incubación con respecto al control sin NPsAg (* $p < 0,05$).

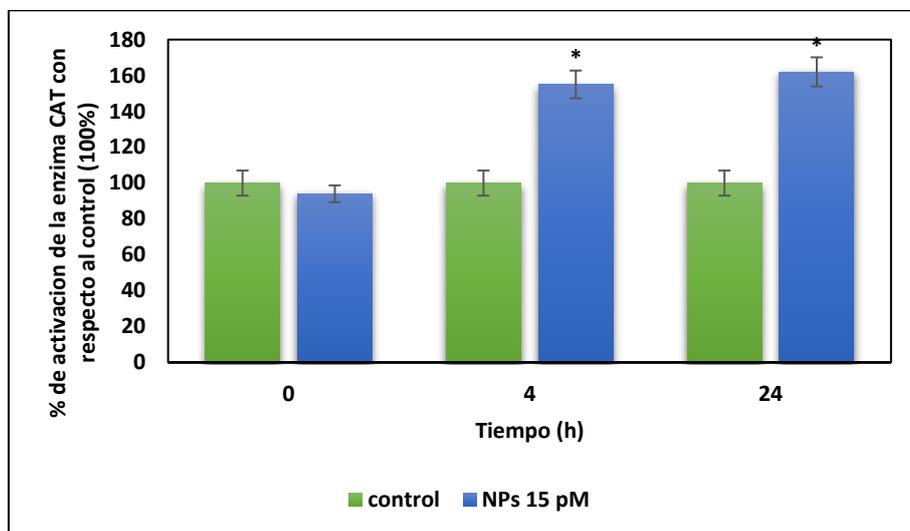


Fig. 44. Cinética de activación de la enzima CAT en *E. coli*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPsAg 15 pM durante 24 h presentan un incremento significativo de la enzima CAT a las 4 h de incubación con respecto al control sin NPs (* $p < 0,05$).

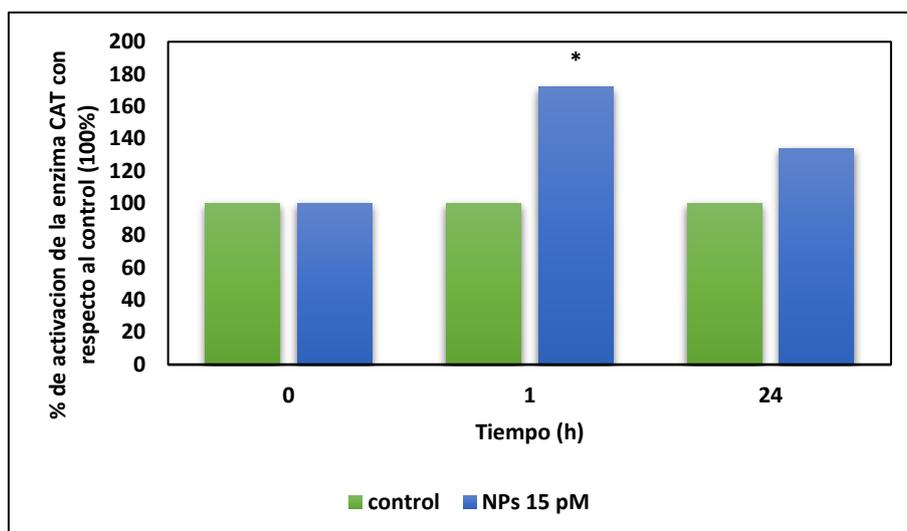


Fig. 45. Cinética de activación de CAT en *S. aureus*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPsAg 15 pM durante 24 h presentan un incremento significativo de la enzima CAT a la 1 h de incubación con respecto al control sin NPs (* $p < 0,05$).

3.5.1.2 Determinación cuantitativa de la actividad de superóxido dismutasa

Se pudo observar que en *P. aeruginosa* en presencia de NPsAg se estimula la enzima SOD hacia las 24 h, siendo más activa la SOD extracelular en el máximo tiempo de generación de ERO (3 h) e invirtiéndose el comportamiento con la SOD intracelular hacia las 24 h (Fig. 46). En *E. coli*, no se observan cambios significativos de la SOD intracelular a tiempos cortos (4 h) con respecto al control, a diferencia de la SOD extracelular en la cual se observó un aumento de la actividad (Fig. 47). *S. aureus* presentó un aumento de la actividad tanto de la SOD intra como extracelular hasta 1 h de contacto (máximo de ERO), manteniéndose elevada la SOD extra por encima del control hacia las 24 h de contacto con NPsAg (Fig. 48).

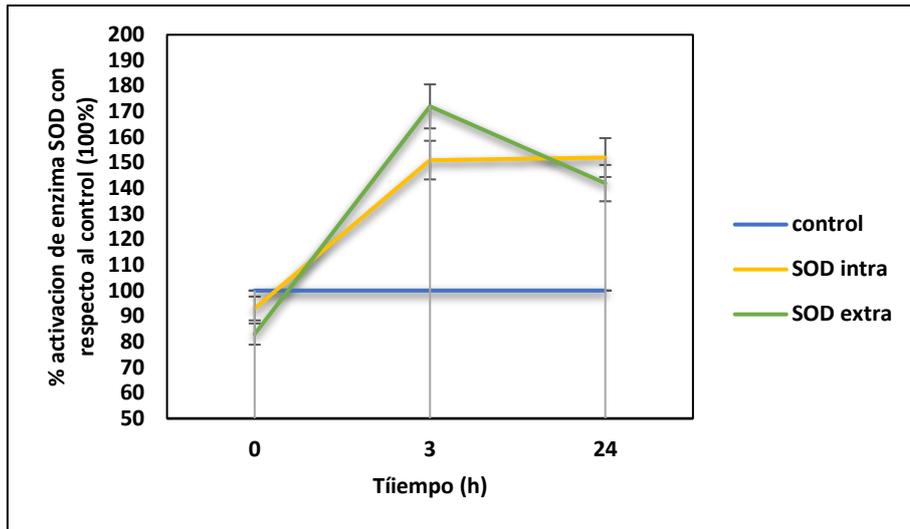


Fig. 46. Cinética de activación de SOD en *P. aeruginosa*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPsAg 15 pM durante 24 h presentaron un incremento significativo de la enzima SOD (intra y extra) a las 3 h de incubación con respecto al control sin NPs.

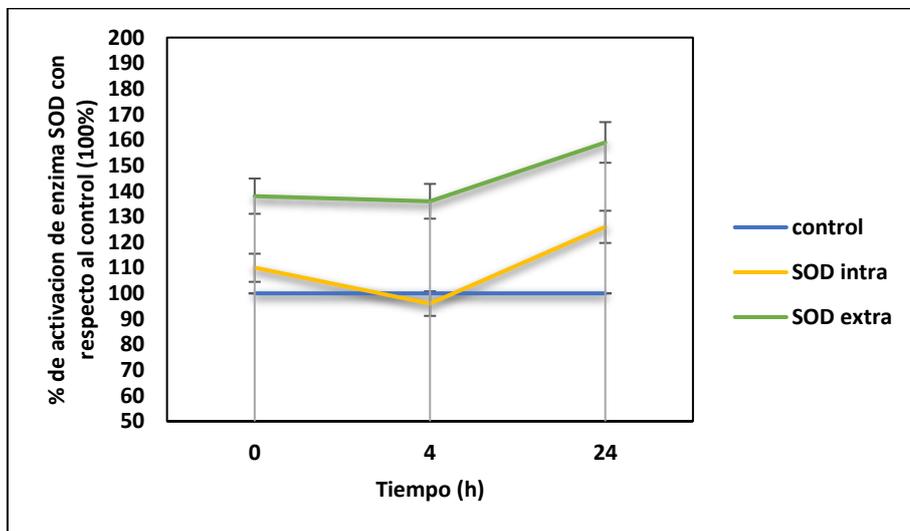


Fig. 47. Cinética de activación de SOD en *E. coli*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPsAg 15 pM durante 24 h presentaron un incremento significativo de la enzima SOD extracelular con respecto al control sin NPs.

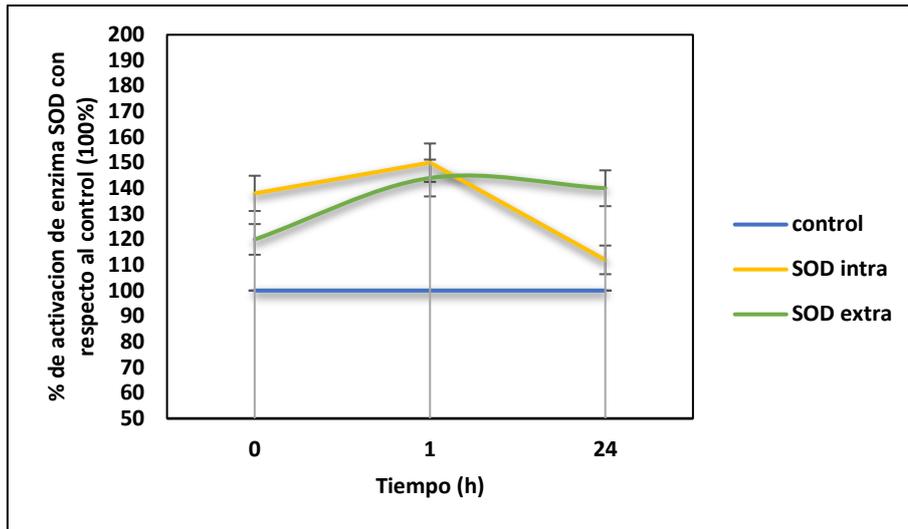


Fig. 48. Cinética de activación de SOD en *S. aureus*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPsAg 15 pM durante 24 h presentaron un incremento significativo de la enzima intra y extracelular con respecto al control sin NPs a 1 h de incubación.

3.5.2 Evaluación de sistemas antioxidantes no enzimáticos

3.5.2.1 Determinación cuantitativa de glutatión reducido

Se encontró que *P. aeruginosa* responde a la presencia de NPs aumentando la cantidad de GSH producido con respecto al control sin NPs en un 600 % a 1 h de contacto y posteriormente disminuye hacia las 24 h (Fig. 49), mientras que *E. coli* eleva sus niveles de GSH en un 141 % por encima del control en el tiempo de máxima generación de ERO, disminuyendo gradualmente hacia las 24 h de incubación (Fig. 50). *S. aureus* estimula la producción de GSH hacia las 24 h, aumentando en 500 % por encima del control sin NPsAg (Fig. 51).

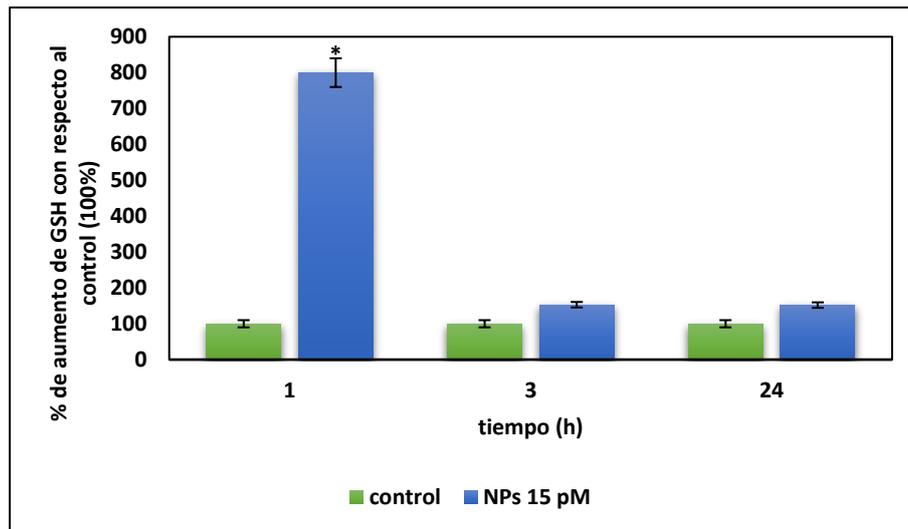


Fig. 49. Cuantificación de GSH a diferentes tiempos en *P. aeruginosa*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPs a 15 pM durante 24 h presentan un incremento significativo del GSH a 1 h de contacto respecto al control sin NPs (* $p < 0,05$).

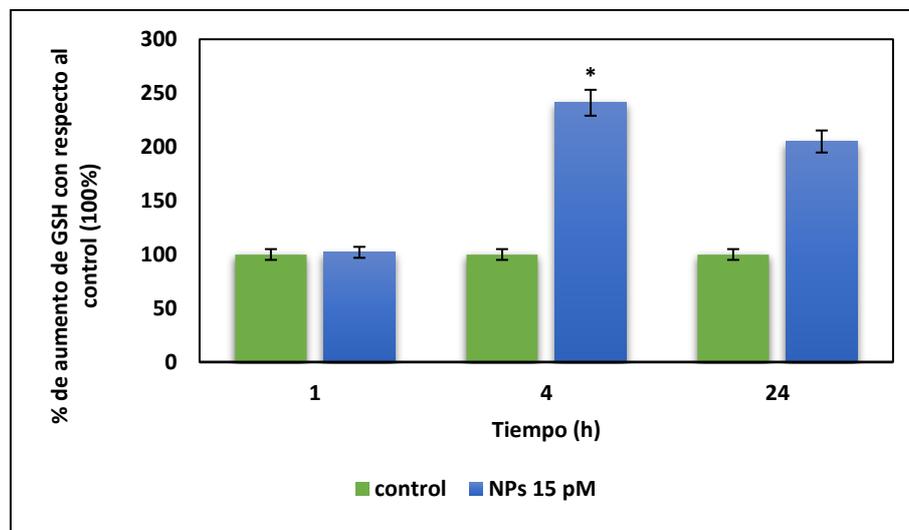


Fig. 50. Cuantificación de GSH a diferentes tiempos en *E. coli*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPs a 15 pM durante 24 h presentan un incremento significativo del GSH a las 3 h de incubación con respecto al control sin NPs (* $p < 0,05$).

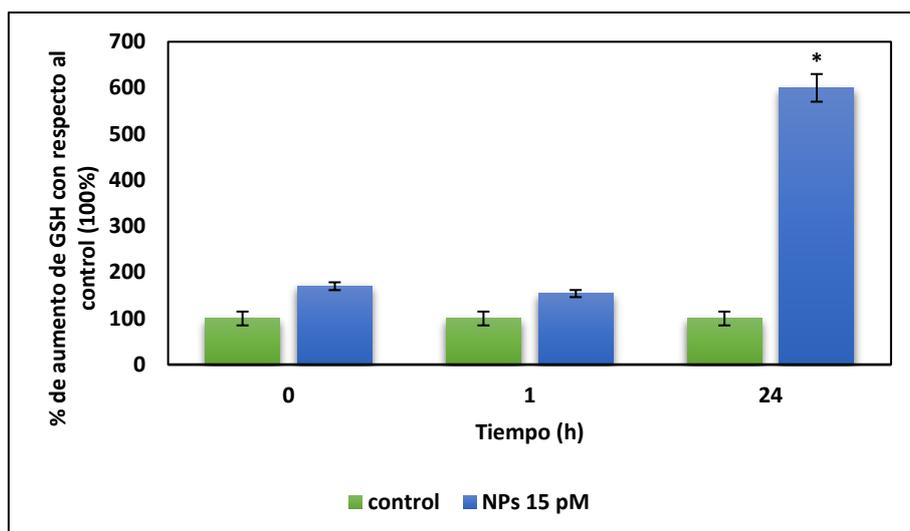


Fig. 51. Cuantificación de GSH a diferentes tiempos en *S. aureus*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPs a 15 pM presentan un incremento significativo del GSH a las 24 h de incubación con respecto al control sin NPs (* $p < 0,05$).

3.5.3 Determinación de la capacidad antioxidante total

A partir del ensayo FRAP se pudo observar que *P. aeruginosa* responde rápidamente al efecto oxidante de NPsAg, aumentando su maquinaria antioxidante un 136 % en el tiempo de máxima producción de ERO (Fig. 52). En *E. coli* el aumento es de un 33 % más que el control sin NPsAg a las 4 h de contacto que se mantiene hasta las 24 h de incubación (Fig. 53) mientras que en *S. aureus* el aumento va desde el 140 % por encima del control a 1 h de contacto con NPsAg hasta un 3000 % hacia las 24 h de contacto (Fig. 54).

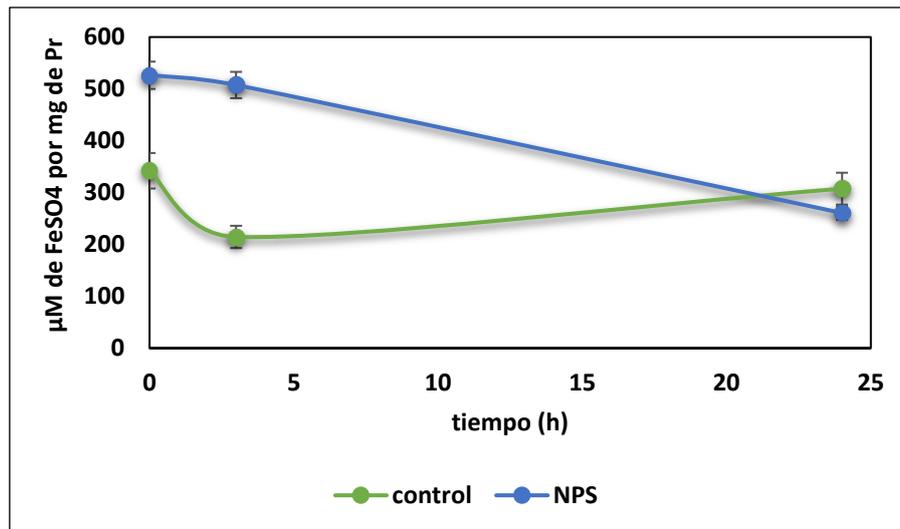


Fig. 52. Capacidad antioxidante total de *P. aeruginosa*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPsAg 15 pM durante 24 h presentaron un incremento con respecto al control sin NPs que disminuye hacia las 24 h de incubación.

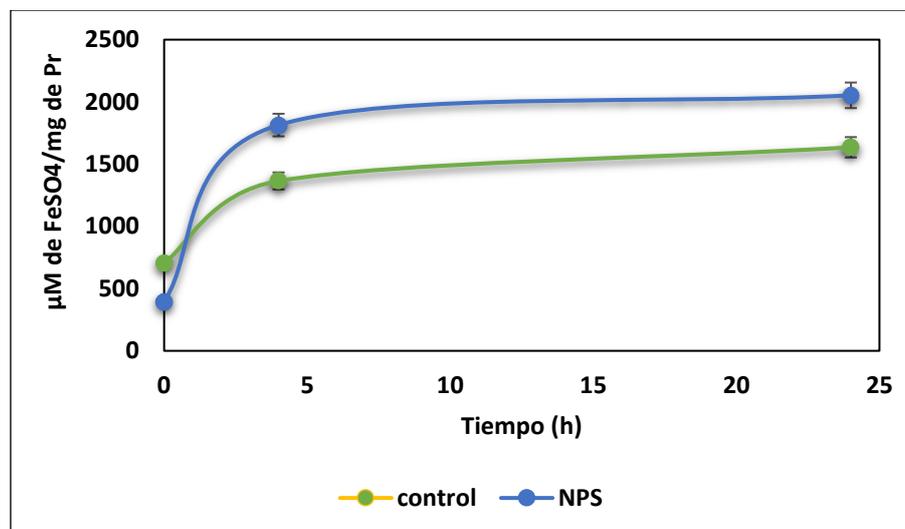


Fig. 53. Capacidad antioxidante total en *E. coli*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPsAg 15 pM durante 24 h presentaron un incremento con respecto al control sin NPs que se mantiene en el tiempo.

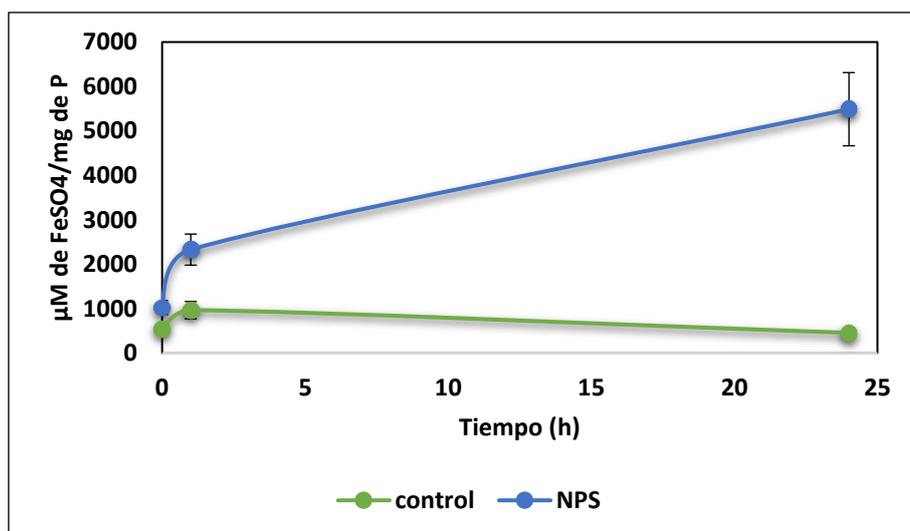


Fig. 54. Capacidad antioxidante total en *S. aureus*. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPsAg 15 pM durante 24 h presentaron un incremento significativo a las 24 h de contacto con respecto al control sin NPs.

La capacidad de defensa bacteriana contra el estrés oxidativo se vio afectada ante la presencia de NPsAg en las tres cepas estudiadas. En los tiempos de máxima generación de ERO, la mayor activación de las defensas antioxidantes, tanto enzimáticas como no enzimáticas, fue para *P. aeruginosa* de la enzima SOD extracelular, en *E. coli* GSH y en *S. aureus* CAT, siendo estos estímulos dependientes del tiempo de exposición a NPsAg.

3.6 Efecto de nanopartículas de plata sobre células eucariotas

El principal objetivo de estos ensayos es ahondar en la citotoxicidad de NPsAg abriendo una puerta al estudio de los efectos en células del huésped.

3.6.1 Determinación de la viabilidad de leucocitos mediante técnicas espectrofotométricas.

La viabilidad celular fue determinada por dos técnicas espectrofotométricas, la prueba de Resazurina y XTT, las cuales permiten evaluar la actividad metabólica de las células estudiadas. Los resultados obtenidos arrojaron que la viabilidad de los leucocitos PMN se mantiene hasta las 4 h de contacto con NPsAg en un 67 % con respecto al control sin NPsAg (Fig. 55).

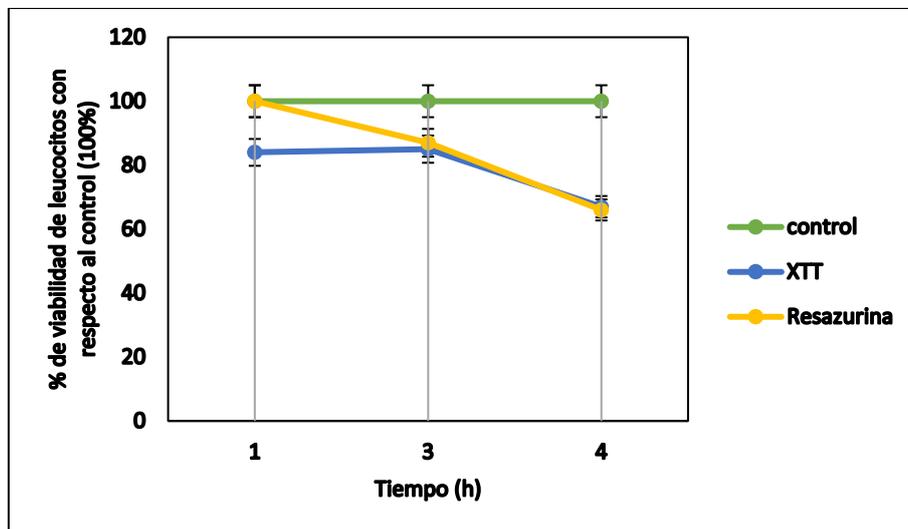


Fig. 55. Determinación de la viabilidad de leucocitos PMN. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPs 0,015 pM permanecen viables en un 67 % a las 4 h de contacto con NPsAg respecto del control sin NPs.

3.6.1.2. Determinación de especies reactivas del oxígeno

Como pudimos observar en resultados previos, dado que las NPsAg producen un aumento de las ERO en bacterias, fue necesario analizar estos efectos sobre células del huésped.

Se observó que la presencia de NPsAg produjo un aumento de los niveles de ERO en leucocitos, siendo este dependiente del tiempo de incubación. A las 4 h de contacto el aumento fue del 37 % con respecto al control sin NPs (Fig. 56).

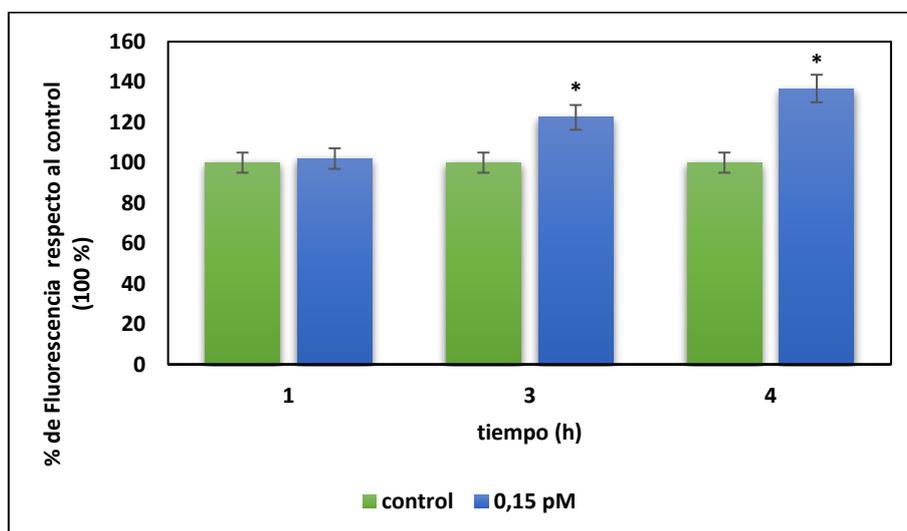


Fig. 56. Estímulo de ERO en leucocitos PMN incubados con NPsAg a diferentes tiempos. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Se puede observar que a partir de la tercera hora de incubación hay un incremento significativo en la producción de ERO ($p < 0,005$).

3.6.1.3. Microscopia electrónica de transmisión

Se tomó una muestra de los leucocitos a las 4 h de contacto con NPsAg y se analizaron las imágenes obtenidas por TEM.

Se pudo observar que las mismas se encontraban fagocitando a las NPsAg extendiendo sus pseudópodos para la incorporación en el citoplasma de las mismas (ver flechas Fig. 57).

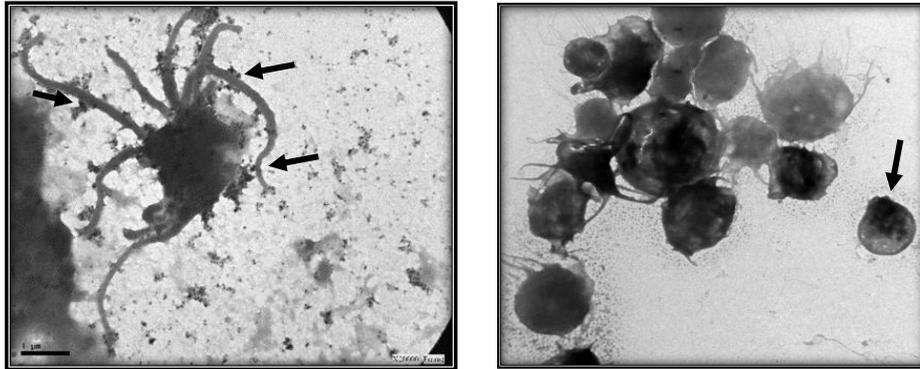


Fig. 57. Imágenes TEM de leucocitos PMN incubados con NPs durante 4 h.

En conclusión, se pudo determinar que en presencia de NPs, los leucocitos respondieron produciendo un aumento de las ERO en un 37 % al tiempo de 4 h de contacto, mientras que su viabilidad se redujo en un 33 %. El aumento de las ERO en presencia de NPs podría ser la causa o podría estar asociado a la disminución de la viabilidad de leucocitos a ese tiempo de análisis.

3.6.2.1 Actividad hemolítica de Nanopartículas de plata

Se analizó el efecto de NPsAg sobre eritrocitos a las 4 h de contacto (Fig. 58). Una concentración de 0,15 pM de NPsAg produjo un 12 % de hemólisis en el tiempo analizado. Al comparar la concentración inicial de AgNO₃ 10 mM (de la cual se parte para la biosíntesis) se observó que la hemólisis fue del 120 %, por lo que el efecto hemolítico se incrementa considerablemente, incluso por encima del control positivo (Fig. 59).

Se ha establecido que menos del 10 % de hemólisis representa un efecto no tóxico, de acuerdo a los valores obtenidos se debería asumir que, la concentración de NPs evaluada en el tiempo de estudio elegido, estaría produciendo el efecto hemolítico no deseado. Sin embargo, se debe realizar un análisis más profundo acerca de la toxicidad de NPsAg en células sanguíneas.

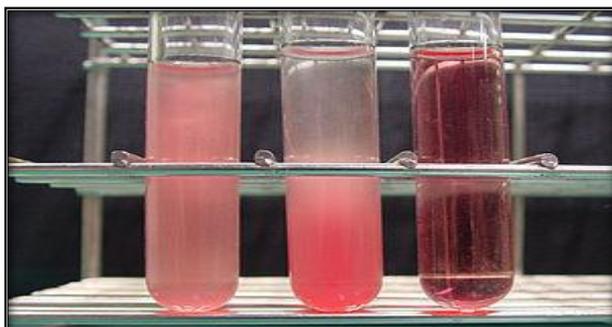


Fig. 58. Imagen de hemólisis producida por NPsAg. De derecha a izquierda: eritrocitos en buffer, eritrocitos incubados con NPs 0,015 pM y eritrocitos incubados con agua durante 4 h.

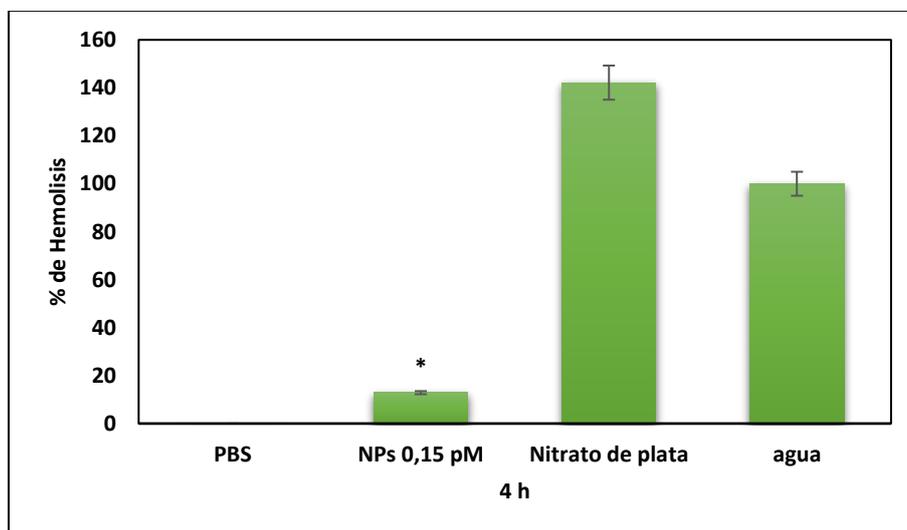


Fig. 59. Porcentaje de hemólisis. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las células incubadas con NPsAg 0,015 pM presentaron un porcentaje de hemólisis del 12 % a las 4 h de contacto con NPsAg respecto del control positivo (* $p < 0,05$).

Resulta sumamente importante tener en cuenta estos resultados preliminares para considerar los ensayos de toxicidad de NPsAg, las posibles vías de administración y dosis a utilizar para los potenciales tratamientos.



CAPÍTULO 4

Discusión



4. DISCUSIÓN

El desafío más importante en los procesos de síntesis es obtener NPs estables, controlando su tamaño y forma. La síntesis química de NPs se produce generalmente bajo condiciones extremas (por ejemplo, pH, temperatura) y los productos químicos usados pueden tener impacto en la salud y en el ambiente⁹⁶. El uso de microorganismos en la síntesis de nanopartículas es un área de investigación relativamente nueva, prometedora, con un considerable potencial de expansión. En primer lugar, mediante una adaptación del método descrito por Ahmad y col.⁵⁷, se logró biosintetizar NPs_{Ag} de tamaño y forma homogéneas, consiguiendo optimizar los parámetros de síntesis hasta concluir que las NPs biosintetizadas a 50 °C durante 1 h de incubación en oscuridad y agitación, son estables y de forma pseudoesferoideal. La biosíntesis presenta como principal ventaja menor uso de energía y un menor impacto ambiental, con respecto a los métodos convencionales de síntesis química o física¹⁰⁻⁹⁷⁻⁹⁸. Además de ser una técnica viable, posee otros beneficios como ser económica, de gran eficiencia y principalmente el hecho de que no produce residuos tóxicos ni utiliza solventes orgánicos¹⁹. Por otro lado, las biomoléculas implicadas en el proceso de biosíntesis le otorgan a las NPs_{Ag} una estabilidad diferencial debido a la función de *capping* que cumplen al interactuar con las NPs¹⁹. Otros autores demostraron que la síntesis de NPs a partir de hongos da lugar a NPs_{Ag} con una excelente actividad antibacteriana, sin embargo, la principal desventaja que posee es que la metodología involucra numerosos pasos y tiempos extensos donde, en algunos casos, la obtención de NPs puede llevar hasta 5 días de incubación⁹⁹⁻¹⁰³ por lo que el uso de bacterias (y en este caso el sobrenadante de *P. aeruginosa*) como vía de producción de NPs_{Ag} resulta más ventajoso que

el de otros microorganismos¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Para la obtención de un cultivo bacteriano se necesita generalmente de 24 h de incubación, mientras que para hongos entre 48 y 72 h. La obtención del sobrenadante bacteriano implica centrifugación y filtrado y luego el contacto con la sal de plata, mientras que en hongos se necesita de lavados continuos del micelio, una nueva incubación del micelio con agua durante 24 a 48 h. Posteriormente se separa el micelio por filtración y se agrega la sal de plata al sobrenadante acuoso. Por lo que el tiempo de obtención del sobrenadante y de síntesis sería el factor clave de la diferencia en la preparación de NPsAg entre hongos y bacterias¹⁰⁴⁻¹⁰⁷.

El mecanismo preciso de la síntesis de NPs que emplean agentes biológicos continúa en su proceso de estudio. Esto se debe a que cada tipo de agente reacciona de manera diferente con los metales que conducen a la formación de NPs¹⁰⁷. El mecanismo que mejor explica la biosíntesis de NPsAg es que la enzima nitrato reductasa dependiente de NADH, que es una enzima secretada por *P. aeruginosa*, sería la responsable de la reducción de Ag^+ a Ag^0 con la posterior formación de NPsAg. La biorreducción de iones se iniciaría por la transferencia de electrones desde el NADH por la enzima reductasa dependiente de NADH como portadora de electrones^{12,103}. En el análisis del *capping* asociado a las NPsAg biosintetizadas se encontraron diferentes proteínas, de las cuales una de ellas posee función reductasa (alkil hidropoxidasa reductasa), quien podría ser la encargada de la reducción de los iones Ag^+ a NPsAg. Las demás proteínas de menor peso molecular que fueron encontradas (que cumplen funciones variadas dentro de la especie *Pseudomonas aeruginosa*, la mayoría de origen extracelular) serían las potenciales responsables de la estabilidad y/o biocompatibilidad hallada en las

NPsAg biosintetizadas. En un trabajo publicado por Jain y col.¹⁰⁸, se analizan NPsAg biosintetizadas por hongos mediante electroforesis. Ellos observaron 2 bandas correspondientes a dos proteínas que cumplirían la función de agente reductor y del *capping*, sin embargo los resultados se limitan a lo obtenido por electroforesis y no se realiza la identificación de las proteínas encontradas. Los resultados obtenidos en esta tesis con respecto a la identificación de las proteínas que recubren a las NPsAg son pioneros en el área ya que completan la información obtenida de la corrida electroforética con los datos adquiridos del análisis de las bandas por nanoHPLC y el software indicado.

Las NPsAg biosintetizadas por el sobrenadante de *P. aeruginosa* se caracterizaron por diferentes técnicas que permitieron evaluar su estabilidad y sus propiedades fisicoquímicas tales como área superficial, forma, distribución de tamaños, carga y estado de agregación. Se pudieron biosintetizar NPsAg de un tamaño de alrededor de 30 nm y de forma pseudoesferoidal, con un potencial Z de -18 mV, por lo que serían estables en la solución donde se encontraban. El control de estos parámetros es sumamente importante debido a que una modificación en los mismos puede afectar significativamente las interacciones entre los nanomateriales y el objetivo planteado^{108,109}. Las técnicas analíticas que se utilizaron, como espectroscopia UV-vis, TEM, DLS, potencial zeta, XRD y espectroscopia IR, se corresponden con las técnicas que se han encontrado en otros estudios y que se utilizan actualmente para la caracterización de las mismas^{59,109-111}.

El siguiente objetivo propuesto fue determinar la actividad antimicrobiana de NPsAg biosintetizadas. Se encontró que las NPsAg fueron eficaces contra todas las especies bacterianas y hongos estudiados. Las CIM

determinadas se encontraron en concentraciones pM, tanto en hongos como en bacterias, siendo mucho más efectivas las NPsAg en hongos filamentosos que en las cepas bacterianas. Otro resultado a destacar es que las CIM de NPsAg obtenidas de bacterias se encontraban por debajo de las concentraciones utilizadas para un antibiótico de uso convencional en la clínica como CIP o de la sal de plata utilizada para la síntesis (mM para CIP, μM para AgNO_3 y pM para NPsAg). Las diferencias encontradas entre las CIM de AgNO_3 y NPsAg afirman la teoría que las NPsAg *per se* serían las responsables de la actividad antimicrobiana observada y no los iones Ag^+ , pudiéndose considerar a las NPsAg como nuevos posibles agentes antimicrobianos frente a diferentes microorganismos. Estos resultados coinciden con otros estudios hallados en bibliografía donde se encontró que el ión Ag^+ sólo (como AgNO_3) tenía menor actividad antibacteriana que la concentración equivalente de NPsAg evaluada^{112,113}. Otro estudio publicado por Siritongsuk y col., informó que durante el efecto de muerte producido por NPsAg, la cantidad del ión Ag^+ liberado desde las NPsAg fue sólo de un 3,9 % de la concentración de NPsAg inicial observada¹¹⁴.

Por otro lado, existen gran cantidad de estudios que avalan que las NPs biogénicas poseen una mejor actividad antimicrobiana comparada a las de origen químico. Sintubin y col. obtuvieron que las NPs biosintetizadas poseían una actividad 20 veces mayor que las sintetizadas químicamente¹¹⁵. Botes y Cloete proponen que esto se debe a que las moléculas biológicas, no solo le otorgan estabilidad a las NPs sino que, también, incrementan notablemente la interacción con los microorganismos, aumentando su actividad antimicrobiana¹¹⁶.

El mecanismo bactericida mediado por NPsAg es tema actual de investigación. Varios autores proponen que las NPsAg se adhieren a la pared celular afectando la integridad de la membrana, perturbando así las funciones de permeabilidad y respiración de la célula¹⁰³. Estos resultados coinciden con los obtenidos en esta tesis donde se observó, a partir de imágenes TEM, como las NPsAg biosintetizadas se encontraban en contacto con la membrana de *S. aureus* para, posteriormente, producir la destrucción de la misma con la consecuente liberación del contenido celular.

Se conoce que la actividad antibacteriana de NPsAg es dependiente del tamaño y cuantas más pequeñas son, más grande es la superficie disponible para la interacción¹¹⁷. Entonces, es posible que las NPs no sólo puedan interactuar con la membrana de la célula sino que también puedan penetrar dentro de la misma. Sin embargo McQuillan y col. proponen que las NPsAg primero interaccionan con la membrana celular de *E. coli* K21 y luego son los iones Ag^+ los responsables de la actividad antibacteriana¹¹⁸. El mecanismo propuesto por McQuillan difiere de la hipótesis que plantea esta tesis, donde se explica que las NPsAg biosintetizadas interactuarían con la membrana de la bacteria, interfiriendo en la cadena respiratoria, generando una inestabilidad en el equilibrio redox, aumentando los niveles de ERO y produciendo en la célula un estado de estrés oxidativo que la conduciría a la muerte.

Mediante diferentes técnicas, como espectrofotometría, espectrofluorometría y microscopía de fluorescencia, se corroboró que las NPsAg biosintetizadas produjeron un aumento de ERO en las tres especies bacterianas ensayadas (*P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus*) respecto al control sin NPs.

Estos resultados coinciden con otros estudios publicados donde se observa el mismo efecto de NPs de diferente origen sobre células bacterianas^{119,120}. Por ejemplo, Kim y col. informaron que el efecto antibacteriano de NPsAg de origen químico fue diferencial entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, sin embargo en ambas cepas observaron un aumento de ERO¹²¹. Otro resultado obtenido fue la reducción en los niveles de ERN para las tres especies bacterianas estudiadas en los máximos encontrados para ERO, este efecto es similar al producido por diferentes antibióticos que generan estrés oxidativo en bacterias^{122,123}.

Por otro lado, se ha reconocido que ciertos antibióticos actúan por mecanismos oxidativos y que conducen al daño en diferentes macromoléculas como lípidos, ADN y proteínas y, consecuentemente, a la muerte bacteriana¹²⁴. En este caso se observó que el tiempo de máximo generación de ERO producido por NPsAg en *P. aeruginosa* coincidió con el tiempo en el cual se obtuvo la mayor oxidación de lípidos y proteínas, asociándose este daño principalmente a la acción de la especie $O_2^{\cdot-}$. En congruencia con lo analizado, se observó que a este tiempo las enzimas SOD, tanto intra como extracelular, se encontraban activadas en un 50 y 70 %, respectivamente. Cabe destacar que el agregado de GSH como secuestrante de ERO no redujo su producción con respecto a las muestras sin GSH luego de las 4 h de contacto. Esto puede relacionarse con el hecho de que luego de la máxima generación de ERO, la capacidad secuestrante de GSH estaba saturada por lo que no pudo disminuir la cantidad de ERO producidas y por consiguiente la cantidad de lípidos y proteínas oxidadas. Se obtuvo que la capacidad antioxidante total inicial de *P. aeruginosa* en presencia de NPs supero en un 200 % al control sin NPs y disminuyó en forma constante

hacia las 24 h, consumiéndose toda la maquinaria responsable de las defensas contra las ERO.

En el caso de *E. coli* el daño a proteínas se observó a tiempos cortos, donde se obtuvo una baja activación de las enzimas antioxidantes CAT y SOD, por lo que el agregado de CAT como secuestraste de ERO redujo la oxidación de las mismas en un 30 %. Debido a estos resultados, se asume que las especies H_2O_2 y/o $HO\cdot$ son las responsables del daño producido en proteínas. En oposición a SOD y CAT, GSH se encuentra altamente estimulado en el máximo de ERO, evitando la peroxidación lipídica, ya que se observa que la oxidación de lípidos se produce más lentamente. Posteriormente al consumirse este tiol, la cuantificación del MDA aumentó y se mantuvo elevada hacia las 24 h. Este resultado se corresponde con un estudio reciente que demostró que, al igual que otros genes antioxidantes de *E. coli*, el gen *btuE* que codifica para GPx independiente de selenio, se induce en condiciones de estrés oxidativo y puede catalizar la descomposición de una variedad de peróxidos, principalmente peróxidos lipídicos¹²⁵. Se podría inferir que en la capacidad antioxidante total de *E. coli*, GSH estaría cumpliendo un papel significativo al inicio del contacto con NPsAg, respondiendo rápidamente al estrés oxidativo producido y, a continuación, CAT y SOD serían las responsables de las defensas contra la acción de las ERO.

Con respecto a la capacidad antioxidante total de *S. aureus* en presencia de NPsAg la misma aumenta progresivamente, siendo las enzimas CAT y SOD las que responden inicialmente en el tiempo de máxima generación de ERO. Por otro lado, se observó que la oxidación proteica en presencia de la más alta concentración de NPsAg es superior al control sin NPs y se mantiene en el

tiempo, por lo que evidentemente las proteínas serían un blanco importante de las ERO generadas. La disminución de los AOPP se produce solo ante el agregado de CAT, por lo que coincide con *E. coli*, que las especies responsables de la oxidación en proteínas serían H_2O_2 y el $HO\cdot$. La peroxidación lipídica en esta cepa se produce gradualmente y disminuye solo ante el agregado de GSH, coincidiendo con la evidencia científica que avala que las bacterias Gram-positivas poseen la capacidad de captación de GSH exógeno para reducir la peroxidación lipídica¹²⁶.

Este es el primer estudio que incluye un análisis integral que involucra la generación de ERO con el daño en macromoléculas y, además, donde se especifica cuál es la principal especie derivada de la reducción incompleta del oxígeno que produce el daño en lípidos y proteínas.

Respecto al análisis de la variación del potencial de membrana utilizando la sonda fluorescente ANS, se conoce que el número de sitios de unión a proteínas de la sonda ANS en membranas biológicas es menor que el número de sitios de unión a lípidos (debido a la proporción lípidos/proteínas), por lo tanto cuando se agrega esta sonda en concentraciones altas, la mayoría de los sitios de unión de proteínas ya están ocupadas por la misma y gradualmente predomina la fluorescencia de ANS unida a lípidos en la fluorescencia total¹²⁷. En esta tesis se obtuvo que la presencia de NPsAg produjo modificaciones en la fluorescencia de la sonda ANS, por lo que se podría deducir que se produjeron alteraciones en la composición de la membrana lipídica y, por ende, en el potencial de membrana. Debido a lo anteriormente expuesto, se asociaron las alteraciones observadas en la oxidación de lípidos y proteínas con las modificaciones observadas en la fluorescencia de la sonda.

En *P. aeruginosa* la fluorescencia de ANS en presencia de NPsAg es inicialmente superior al control. Este resultado coincide con lo obtenido a tiempo 0 donde la oxidación de proteínas es mayor que la de lípidos, por lo tanto el medio en el cual se encuentra la sonda es más lipofílico. La fluorescencia sigue aumentando gradualmente hacia las 24 h, coincidiendo con lo observado donde la recuperación de la célula en la oxidación de los lípidos es mayor que la de proteínas.

Los resultados obtenidos en *E. coli* coinciden con *P. aeruginosa*, donde se observa que la fluorescencia inicial de la sonda ANS es mayor que el control, concordando con una mayor oxidación de proteínas que de lípidos. Sin embargo, se observa un patrón diferente hacia el máximo de ERO, donde la fluorescencia disminuye. Este efecto puede relacionarse con el aumento en la oxidación de lípidos y la disminución en los AOPP cuantificados. Posteriormente, la oxidación de proteínas vuelve a aumentar hacia las 24 h de contacto, coincidiendo con el aumento de la fluorescencia de la sonda.

En la cepa Gram-positiva la fluorescencia de la sonda aumenta considerablemente a la hora de máxima generación de ERO. Este resultado se asocia a la alta proporción de proteínas oxidadas en relación a la cantidad de lípidos oxidados. Posteriormente, el decaimiento en la fluorescencia coincide con la oxidación de los lípidos hacia las 24 h y, por lo tanto, podría asociarse a la generación de un ambiente más hidrofílico. Las modificaciones en el potencial de membrana pueden estar asociadas a varios factores, pero evidentemente el daño oxidativo que se produce tanto en lípidos como en proteínas por la acción de las NPsAg juega un papel fundamental para el análisis del mismo. Otros parámetros a considerar, son los publicados por Páez y col. donde informaron

como diferentes antibióticos generadores de estrés oxidativo como parte de su mecanismo de acción, produjeron una modificación en el potencial de membrana de la cepa sensible de *S. aureus* mientras que en la cepa *S. aureus* resistente a CIP no se observaron cambios significativos⁷³. Por otra parte, los resultados publicados por Lee y col. muestran como células de *E. coli* tratadas con NPsAg exhibieron una dramática despolarización de la membrana plasmática relacionada a modificaciones en los niveles de calcio¹²⁸.

El daño que producen las NPsAg en el ADN se está estudiando para comprender no sólo su toxicidad en células procariotas, sino también para analizar sus efectos sobre las células eucariotas¹²⁹. En la presente tesis, se estudió el efecto de NPsAg sobre el ADN de diferentes especies bacterianas y se observó no solo oxidación de la bases del ADN sino también fragmentación y destrucción del mismo. Se ha descrito que los radicales libres pueden causar modificaciones oxidativas en el ADN, incluyendo rotura de la cadena y oxidación de sus bases¹³⁰. Entre los productos oxidados de daño al ADN, la 8-OHdG es probablemente la más estudiada debido a su relativa facilidad de cuantificación¹³⁰. Se encontró que las NPsAg produjeron un aumento del 60 % de la base oxidada con respecto al control sin NPsAg en *E. coli*, sin embargo, en *P. aeruginosa* y *S. aureus* no se logró cuantificar la base oxidada y no oxidada luego de la incubación con NPs. La ausencia de señal de las bases del ADN podría implicar la destrucción parcial o total al ADN analizado en estas cepas. Para determinar la fragmentación del ADN se utilizó espectroscopia de absorción ya que es una técnica útil en el análisis de unión al ADN con moléculas pequeñas¹³¹. Ya se conocen los sitios de enlaje en la que diferentes moléculas pueden unirse al ADN: (i) entre dos pares de bases (intercalación completa), (ii)

en la ranura menor, (iii) la ranura principal, (iv) en el exterior de la hélice y (v) por unión electrostática¹³². Los resultados obtenidos indicaron que la adición de pequeñas cantidades de NPsAg produjo el aumento de la intensidad de absorción de la muestra de ADN a 260 nm. Sin embargo, con los siguientes agregados de NPsAg se observó disminución de la absorbancia a 260 nm con la aparición de dos picos, uno a longitudes de onda más corta y otro a 290 nm, hasta la desaparición total del pico a 250 nm. Estos resultados son comparables con los obtenidos por Roy y col. quienes encontraron que ante el agregado de NPsAg, sintetizadas a partir de hongos, la intensidad de absorción del ADN de timo de ternera a 260 nm aumentó y este cambio se produjo por la formación directa de un complejo de NPsAg con la doble hélice del ADN de células eucariotas¹³³. Por otro lado se conoce que el espectro UV-vis del nucleótido guanosa puede medirse a longitudes de onda cercanas a 250 nm por lo que es probable que el pico que se observa en el espectro de análisis del ADN, corresponda a la fragmentación del ADN por acción de las NPsAg. Otro estudio comparó la capacidad de ruptura de la cadena de ADN de *E. coli* de NPs de sílice y de nanoplatos de plata (de origen químico) mediante electroforesis en gel de agarosa. Ellos demostraron que tanto los nanoplatos como las NPs de sílice produjeron la ruptura de la cadena en el ADN, concluyendo que la sílice causa mayor efecto y es capaz de romper más hebras de ADN¹³⁴. Otro estudio mostró que la rotura de la cadena de ADN de células eucariotas era fuertemente dependiente del tamaño de NPsAg de origen químico, NPs más pequeñas inducían más daño que las partículas más grandes. Además, encontraron que AgNO_3 indujo más daño al ADN que NPsAg a las mismas concentraciones¹³⁵. Estudios de interacciones directas entre Pb^{2+} y el ADN de timo de ternera

revelaron que el Pb^{2+} puede unirse al esqueleto de fosfato del ADN a través de fuerzas electrostáticas y entrar en pequeños surcos de ADN por combinaciones con purinas y pirimidinas¹³⁶. Todos los avances obtenidos de los diferentes estudios contribuyen a dilucidar el daño de NPsAg sobre el ADN, no solo para sumarlo al mecanismo de acción bactericida sino también como posible efecto tóxico sobre las células del huésped.

Se profundizó en la toxicidad de NPsAg sobre células eucariotas y se encontró que ante la presencia de concentraciones cercanas a la CIM los leucocitos PMN respondieron en primer lugar fagocitándolas, lo cual concuerda con los resultados descritos por Poirier y col. donde se observó la internalización de NPsAg de 20 nm de diámetro en neutrófilos humanos¹³⁷. Además en esta tesis se cuantificó un aumento del 37 % en los niveles de ERO en leucocitos PMN a las 4 h de contacto con NPsAg con respecto al control sin NPs.

Por otro lado, se obtuvo que la viabilidad de leucocitos se mantuvo en un 67 % hasta las 4 h de contacto con NPsAg, siendo un resultado promisorio para seguir estudiando la citotoxicidad de NPsAg biosintetizadas en líneas celulares. Un resultado interesante fue el obtenido por Soares y col. donde informaron que la activación y toxicidad inducida por NPsAg recubiertas con polivinilpirrolidona (PVP) en neutrófilos humanos fue tamaño y tiempo dependiente, siendo las NPsAg de 10 nm más tóxicas que NPsAg de 50 nm¹³⁸. También observaron que se activó el estallido respiratorio de los neutrófilos causando daño a la membrana¹³⁸. Estos datos sugieren que la toxicidad de NPsAg dependen de la concentración, el tiempo, el tamaño y el tipo de NPsAg analizada.

Los resultados publicados con respecto a la citotoxicidad de NPsAg son variados. En algunos casos se informa que las NPsAg no son tóxicas para células eucariotas^{137,139}, mientras que en otros se asume lo contrario¹⁴⁰. Evidentemente, en modelos *in vitro*, el uso de diferentes tipos de células, cada una con una función única, produce desviaciones en los diferentes estudios y se muestran diferentes sensibilidades a las NPsAg ensayadas. Las diferencias en la sensibilidad de los tipos de células a las NPsAg pueden deberse, no solo a las variaciones entre las diferentes NPsAg estudiadas (origen, tipo, forma, tamaño), sino también a las diferentes técnicas que se utilizan para analizar la citotoxicidad de las NPs, por lo que resulta inminente unificar criterios y establecer metodologías específicas que permitan integrar los resultados que se obtienen de los diferentes ensayos. Para este caso se obtuvo que NPsAg biosintetizadas a concentraciones cercanas a la CIM de las especies bacterianas ensayadas presentaron una actividad hemolítica de un 12 % a las 4 h de contacto. Otras investigaciones han demostrado que NPsAg más pequeñas tienen una actividad hemolítica mayor comparada con las partículas grandes ampliando la información aportada en esta tesis¹⁴¹. En otros casos se encontró que NPsAg sintetizadas utilizando un heteropolisacárido aislado de *Lentinus squarrosulus* con actividad antimicrobiana eran compatibles con hematíes humanos en su dosis de LD50¹⁴². Sin embargo, ampliando la búsqueda hacia otras NPs la diversidad de resultados mostró que la actividad hemolítica de NPs de sílice ahumada, sílice mesoporosa y NPs de sílice amorfa coloidal aumentaba con el aumento del tamaño de partícula¹⁴³. Estos resultados difieren de otros estudios sobre NPs de otros metales como el oro, el dióxido de titanio y las NPs de hidroxiapatita que afirman que estas NPs no poseen actividad hemolítica¹⁴⁴⁻¹⁴⁶.

La evaluación de los efectos de la presencia de NPsAg en el torrente sanguíneo se considera de suma importancia no solo porque es imprescindible considerar la compatibilidad de las NPs con los componentes sanguíneos, sino también, porque del resultado de este análisis dependerán las posibles aplicaciones biomédicas, formas de administración y posibles tratamientos a los que estaría dirigido el uso de NPsAg biosintetizadas.



CAPÍTULO 5

Conclusión



5. Conclusión

Las hipótesis planteadas pudieron ser comprobadas gracias al análisis integrado de los resultados obtenidos hasta el momento. Se obtuvo un producto biosintético con las ventajas que esto representa, utilizando el sobrenadante de cultivo de una cepa de referencia de *P. aeruginosa* y sin el agregado de agentes reductores tóxicos. Las NPsAg pudieron ser caracterizadas por diferentes técnicas que confirmaron la forma pseudoesferoideal y con una distribución uniforme de las mismas. Se destaca que las NpsAg biosintetizadas ejercieron una actividad bactericida significativa contra diferentes especies bacterianas a niveles de concentración picomolar, muy debajo de las CIM halladas para la sal de plata estudiada o para un antibiótico como lo es CIP. Esto es notable ya que las NPsAg han demostrado ser agentes antibacterianos eficaces, independientemente de los mecanismos de resistencia a los fármacos que existen en los diferentes microorganismos estudiados. Profundizando en su mecanismo de acción, se observó que en las tres cepas de gran relevancia clínica como lo son, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus* la presencia de las NPsAg generó un aumento de los niveles de ERO y un desbalance en los sistemas antioxidantes propios de cada especie bacteriana. También, se observó un aumento en la cantidad de lípidos oxidados y en los niveles de AOPP, llevando a modificaciones en el potencial de membrana de las células estudiadas. El daño al ADN bacteriano pudo corroborarse, observándose no solo oxidación sino también fragmentación de la hebra. Basándonos en estos resultados, el daño celular por la generación de estrés oxidativo con la consecuente oxidación de macromoléculas debe considerarse como el principal mecanismo de

acción por el cual las NPsAg ejercen su acción como antimicrobiano. Los resultados sobre citotoxicidad en células eucariotas dejan un camino abierto de gran proyección sobre el estudio del efecto en la célula del huésped. En conclusión, las NPsAg biosintetizadas están marcando una nueva dirección en el estudio de nuevas aplicaciones biomédicas como nanoantibióticos específicos.



CAPÍTULO 6

Bibliografía



6. Bibliografía

1. Labarca, J. A., Salles, M. J. C., Seas, C., & Guzmán-Blanco, M. (2016). Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Critical reviews in microbiology*, 42(2), 276-292.
2. Potron, A., Poirel, L., & Nordmann, P. (2015). Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *International journal of antimicrobial agents*, 45(6), 568-585.
3. Ah, Y. M., Kim, A. J., & Lee, J. Y. (2014). Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *International journal of antimicrobial agents*, 44(1), 8-15.
4. Rodríguez-Noriega, E., Seas, C., Guzmán-Blanco, M., Mejía, C., Alvarez, C., Bavestrello, L. & Gotuzzo, E. (2010). Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(7), e560-e566.
5. Takeuchi, N. (2012). Nanociencia y nanotecnología: La construcción de un nuevo mundo átomo por átomo. Fondo de Cultura Económica.
6. Royal Society and Royal Academy of Engineering. (2004). Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties.
7. Shahverdi, A. R., Fakhimi, A., Shahverdi, H. R., & Minaian, S. (2007). Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(2), 168-171.
8. Huh, A. J., & Kwon, Y. J. (2011). "Nanoantibiotics": a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*, 156(2), 128-145.

9. Dibrov, P., Dzioba, J., Gosink, K. K., & Häse, C. C. (2002). Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag⁺ in *Vibrio cholerae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(8), 2668-2670.
10. Zanella, R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología*, 5(1).
11. Schmid, G. (Ed.). (2011). *Nanoparticles: from theory to application*. John Wiley & Sons.
12. Thakkar, K. N., Mhatre, S. S., & Parikh, R. Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(2), 257-262.
13. Bansal M., Bansal A., Sharma M., & Kanwar P. (2015). Green synthesis of gold and silver nanoparticles. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6(3), 1710–1716.
14. Deepak, V., Umamaheshwaran, P. S., Guhan, K., Nanthini, R. A., Krithiga, B., Jaithoon, N. M. H., & Gurunathan, S. (2011). Synthesis of gold and silver nanoparticles using purified URAK. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86(2), 353-358.
15. Li, X., Xu, H., Chen, Z. S., & Chen, G. (2011). Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. *Journal of Nanomaterials*, 2011.
16. Hulkoti, N. I., & Taranath, T. C. (2014). Biosynthesis of nanoparticles using microbes—a review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121, 474-483.
17. Duhamel, B. G. (1912). Electric metallic colloids and their therapeutical applications. *The Lancet*, 179(4611), 89-90.
18. Sintubin, L., Verstraete, W., & Boon, N. (2012). Biologically produced nanosilver: current state and future perspectives. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(10), 2422-2436.

19. Hussain, I., Singh, N. B., Singh, A., Singh, H., & Singh, S. C. (2016). Green synthesis of nanoparticles and its potential application. *Biotechnology letters*, 38(4), 545-560.
20. Li, W. R., Xie, X. B., Shi, Q. S., Zeng, H. Y., You-Sheng, O. Y., & Chen, Y. B. (2010). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(4), 1115-1122.
21. Keenan, C. R., & Sedlak, D. L. (2008). Factors affecting the yield of oxidants from the reaction of nanoparticulate zero-valent iron and oxygen. *Environmental science & technology*, 42(4), 1262-1267.
22. Lushchak, V. I. (2001). Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. *Biochemistry (Moscow)*, 66(5), 476-489.
23. Albesa, I., Becerra, M. C., Battán, P. C., & Páez, P. L. (2004). Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. *Biochemical and biophysical research communications*, 317(2), 605-609.
24. Davies, K. J. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB life*, 50(4-5), 279-289.
25. Poljsak, B., Šuput, D., & Milisav, I. (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013.
26. Wesley, M. S., Allen, C. M., & Van Lier, J. E. (2000). Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods Enzymol*, 319, 342-58.
27. Cabiscol Català, E., Tamarit Sumalla, J., & Ros Salvador, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology*, 2000, vol. 3, núm. 1, p. 3-8.
28. Sies, H. (Ed.). (2013). *Oxidative stress*. Elsevier.
29. Cárdenas-Rodríguez, N., & Pedraza-Chaverri, J. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educacion química*, 17(2), 164-173.

30. Foote, C. S. (1991). Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochemistry and photobiology*, 54(5), 659-659.1991.
31. Fridovich, I. (1975). Oxygen radicals, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity. *Free radicals in biology*, 239-277.
32. Pastor, N., Weinstein, H., Jamison, E., & Brenowitz, M. (2000). A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *Journal of molecular biology*, 304(1), 55-68.
33. Fenton, H. J. H. (1894). Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 65, 899-910.
34. Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1999). Oxidative stress and antioxidant protection: some special cases. *Free radicals in biology and medicine*, 485-543.
35. Burcham, P. C. (1998). Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis* 13, 287-305
36. Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1-40.
37. Chiueh, C. C. (1999). Neuroprotective properties of nitric oxide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 890(1), 301-311.
38. Carr, A. C., McCall, M. R., & Frei, B. (2000). Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 20(7), 1716-1723.
39. Romero, D., Calvo, M., Villalba, M. P., Amiguet, J. A., & Bueno, J. (1987). Radicales libres y especies activadas del oxígeno. *Química, biología e implicaciones en patología médica I. An Med Intern*, 4, 673-9.

40. Ševců, A., El-Temsah, Y. S., Joner, E. J., & Černík, M. (2011). Oxidative stress induced in microorganisms by zero-valent iron nanoparticles. *Microbes and environments*, 26(4), 271-281.
41. Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A. T., Zingraff, J., ... & Descamps-Latscha, B. (1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney international*, 49(5), 1304-1313.
42. Páez, P. L., Becerra, M. C., & Albesa, I. (2010). Antioxidative mechanisms protect resistant strains of *Staphylococcus aureus* against ciprofloxacin oxidative damage. *Fundamental & clinical pharmacology*, 24(6), 771-776.
43. Morzel, M., Gatellier, P., Sayd, T., Renerre, M., & Laville, E. (2006). Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *Meat Science*, 73(3), 536-543.
44. Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., & Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement 1, 2. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(11), 1102-1115.
45. Collins, A. (2000). Comparison of different methods of measuring 8-oxoguanine as a marker of oxidative DNA damage. *Free radical research*, 32(4), 333-341.
46. Mates, J. M., Pérez-Gómez, C., & De Castro, I. N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*, 32(8), 595-603.
47. McCall, M. R., & Frei, B. (1999). Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans?. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(7), 1034-1053.
48. Cannio, R., Fiorentino, G., Morana, A., Rossi, M., & Bartolucci, S. (2000). Oxygen: friend or foe? Archaeal superoxide dismutases in the protection of intra-and extracellular oxidative stress. *Front Biosci*, 5, D768-D779.

49. Nakamura, M., Ando, Y., Sasada, K., Haraoka, K., Ueda, M., Okabe, H., & Motomiya, Y. (2005). Role of extracellular superoxide dismutase in patients under maintenance hemodialysis. *Nephron Clinical Practice*, 101(3), c109-c115.
50. Matsui, M., Taniguchi, Y., Hirota, K., Taketo, M., & Yodoi, J. (1995). Structure of the mouse thioredoxin-encoding gene and its processed pseudogene. *Gene*, 152(2), 165-171.
51. Mora García, S. (1998). Estructura y función en las tiorredoxinas factores que determinan su especificidad por enzimas del ciclo de fijación de CO sub 2 (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires).
52. Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., & Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of nutritional biochemistry*, 16(10), 577-586.
53. Smirnova, G. V., & Oktyabrsky, O. N. (2005). Glutathione in bacteria. *Biochemistry (Moscow)*, 70(11), 1199-1211.
54. Taiwo, F. A. (2008). Mechanism of tiron as scavenger of superoxide ions and free electrons. *Journal of Spectroscopy*, 22(6), 491-498.
55. Vergauwen, B., Pauwels, F., Vanechoutte, M., & Van Beeumen, J. J. (2003). Exogenous glutathione completes the defense against oxidative stress in *Haemophilus influenzae*. *Journal of bacteriology*, 185(5), 1572-1581.
56. De Alencar, T. A. M., Wilmart-Goncalves, T. C., Vidal, L. S., Fortunato, R. S., Leitao, A. C., & Lage, C. (2014). Bipyridine (2, 2'-dipyridyl) potentiates *Escherichia coli* lethality induced by nitrogen mustard mechlorethamine. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 765, 40-47.
57. Ahmad, A., Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Khan, M. I., Kumar, R., & Sastry, M. (2003). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 28(4), 313-318.

58. Raza, M. A., Kanwal, Z., Rauf, A., Sabri, A. N., Riaz, S., & Naseem, S. (2016). Size- and shape-dependent antibacterial studies of silver nanoparticles synthesized by wet chemical routes. *Nanomaterials*, 6(4), 74.
59. Mock, J. J., Barbic, M., Smith, D. R., Schultz, D. A., & Schultz, S. (2002). Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *The Journal of Chemical Physics*, 116(15), 6755-6759.
60. Kaszuba, M., McKnight, D., Connah, M. T., McNeil-Watson, F. K., & Nobbmann, U. (2008). Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(5), 823-829.
61. Winey, M., Meehl, J. B., O'Toole, E. T., & Giddings, T. H. (2014). Conventional transmission electron microscopy. *Molecular biology of the cell*, 25(3), 319-323.
62. Bindhu, M. R., & Umadevi, M. (2014). Silver and gold nanoparticles for sensor and antibacterial applications. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 128, 37-45.
63. Quinteros, M. A., Aiassa Martínez, I. M., Dalmaso, P. R., & Páez, P. L. (2016). Silver nanoparticles: biosynthesis using an ATCC reference strain of *Pseudomonas aeruginosa* and activity as broad spectrum clinical antibacterial agents. *International journal of biomaterials*, 2016.
64. CLSI, W. (2006). Clinical and laboratory standards institute methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobicall. Approve Standard M7-A7, CLSI, seventh ed., PA, USA.
65. Fothergill, A. W. (2012). Antifungal susceptibility testing: clinical laboratory and standards institute (CLSI) methods. In *Interactions of Yeasts, Moulds, and Antifungal Agents* (pp. 65-74). Humana Press.

66. Arce Miranda, J. E., Sotomayor, C. E., Albesa, I., & Paraje, M. G. (2011). Oxidative and nitrosative stress in *Staphylococcus aureus* biofilm. *FEMS microbiology letters*, 315(1), 23-29.
67. Hirose, K., Hockenbery, D. M., & Rubel, E. W. (1997). Reactive oxygen species in chick hair cells after gentamicin exposure in vitro. *Hearing research*, 104(1), 1-14.
68. Bustos, P. S., Deza-Ponzio, R., Páez, P. L., Albesa, I., Cabrera, J. L., Virgolini, M. B., & Ortega, M. G. (2016). Protective effect of quercetin in gentamicin-induced oxidative stress in vitro and in vivo in blood cells. Effect on gentamicin antimicrobial activity. *Environmental toxicology and pharmacology*, 48, 253-264.
69. Peralta, M. A., da Silva, M. A., Ortega, M. G., Cabrera, J. L., & Paraje, M. G. (2015). Antifungal activity of a prenylated flavonoid from *Dalea elegans* against *Candida albicans* biofilms. *Phytomedicine*, 22(11), 975-980.
70. Becerra, M. C., Páez, P. L., Laróvere, L. E., & Albesa, I. (2006). Lipids and DNA oxidation in *Staphylococcus aureus* as a consequence of oxidative stress generated by ciprofloxacin. *Molecular and cellular biochemistry*, 285(1), 29-34.
71. Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358.
72. Páez, P. L., Becerra, M. C., & Albesa, I. (2011). Comparison of macromolecular oxidation by reactive oxygen species in three bacterial genera exposed to different antibiotics. *Cell biochemistry and biophysics*, 61(3), 467-472.
73. Páez, P. L., Becerra, M. C., & Albesa, I. (2013). Impact of ciprofloxacin and chloramphenicol on the lipid bilayer of *Staphylococcus aureus*: changes in membrane potential. *BioMed research international*, 2013.
74. Wan, R., Mo, Y., Feng, L., Chien, S., Tollerud, D. J., & Zhang, Q. (2012). DNA damage caused by metal nanoparticles: involvement of oxidative stress and activation of ATM. *Chemical research in toxicology*, 25(7), 1402-1411.

75. Helbock, H. J., Beckman, K. B., & Ames, B. N. (1999). 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods in enzymology*, 300, 156-166.
76. Sinha, A. K. (1972). Colorimetric assay of catalase. *Analytical biochemistry*, 47(2), 389-394.
77. Ellerby, L. M., & Bredesen, D. E. (1999). Measurement of cellular oxidation, reactive oxygen species, and antioxidant enzymes during apoptosis. *Methods in Enzymology*, 322, 413-421.
78. Misra, H. P., & Fridovich, I. (1977). Superoxide dismutase: a photochemical augmentation assay. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 181(1), 308-312.
79. Akerboom, T. P., & Sies, H. (1981). [48] Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods in enzymology*, 77, 373-382.
80. Henderson, T., Nigam, P. S., & Owusu-Apenten, R. K. (2015). A universally calibrated microplate ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for foods and applications to Manuka honey. *Food chemistry*, 174, 119-123.
81. Albesa, I., Barnes, A. I., & Paraje, M. G. (2000). Induction of oxidative stress in leukocytes by an *Enterobacter cloacae* toxin able to form oligomers and binding to proteins. *Biochemical and biophysical research communications*, 274(3), 649-654.
82. Xiao, J., Zhang, Y., Wang, J., Yu, W., Wang, W., & Ma, X. (2010). Monitoring of cell viability and proliferation in hydrogel-encapsulated system by resazurin assay. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162(7), 1996-2007.
83. Salamanca Capusiri, E., Ruiz Pinell, G., Ticona Huallpara, J. C., & Giménez Turba, A. (2008). Colorimetric method-XTT: as a tool for high performance evaluation of substances with leishmanicidal activity. *Biofarbo*, 16, 21.

84. Siritongsuk, P., Hongsing, N., Thammawithan, S., Daduang, S., Klaynongsruang, S., Tuanyok, A., & Patramanon, R. (2016). Two-Phase Bactericidal Mechanism of Silver Nanoparticles against *Burkholderia pseudomallei*. *PloS one*, 11(12), e0168098.
85. Quester, K., Avalos-Borja, M., & Castro-Longoria, E. (2013). Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron*, 54, 1-27.
86. Ahmad, A., Senapati, S., Khan, M. I., Kumar, R., & Sastry, M. (2003). Extracellular biosynthesis of monodisperse gold nanoparticles by a novel extremophilic actinomycete, *Thermomonospora sp.* *Langmuir*, 19(8), 3550-3553.
87. Mulvaney, P. (1996). Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. *Langmuir*, 12(3), 788-800.
88. Gómez, R., & Murillo, R. (2006). Espectroscopía infrarroja. Universidad Nacional Autónoma de Mexico.
89. Mock, J. J., Barbic, M., Smith, D. R., Schultz, D. A., & Schultz, S. (2002). Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *The Journal of Chemical Physics*, 116(15), 6755-6759.
90. Lok, C. N., Ho, C. M., Chen, R., He, Q. Y., Yu, W. Y., Sun, H., ... & Che, C. M. (2007). Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12(4), 527-534.
91. Suresh, A. K., Pelletier, D. A., & Doktycz, M. J. (2013). Relating nanomaterial properties and microbial toxicity. *Nanoscale*, 5(2), 463-474.
92. Treuel, L., Eslahian, K. A., Docter, D., Lang, T., Zellner, R., Nienhaus, K., ... & Maskos, M. (2014). Physicochemical characterization of nanoparticles and their behavior in the biological environment. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(29), 15053-15067.
93. Castellano, J. J., Shafii, S. M., Ko, F., Donate, G., Wright, T. E., Mannari, R. J., ... & Robson, M. C. (2007). Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. *International wound journal*, 4(2), 114-122.

94. Turina, M., Christ-Crain, M., & Polk Jr, H. C. (2006). Diabetes and hyperglycemia: strict glyceemic control. *Critical care medicine*, 34(9), S291-S300.
95. Páez, P. L., Becerra, M. C., & Albesa, I. (2010). Effect of the association of reduced glutathione and ciprofloxacin on the antimicrobial activity in *Staphylococcus aureus*. *FEMS microbiology letters*, 303(1), 101-105.
96. Pereira, L., Mehboob, F., Stams, A. J., Mota, M. M., Rijnaarts, H. H., & Alves, M. M. (2015). Metallic nanoparticles: microbial synthesis and unique properties for biotechnological applications, bioavailability and biotransformation. *Critical reviews in biotechnology*, 35(1), 114-128.
97. Elsupikhe, R. F., Shameli, K., Ahmad, M. B., Ibrahim, N. A., & Zainudin, N. (2015). Green sonochemical synthesis of silver nanoparticles at varying concentrations of κ-carrageenan. *Nanoscale research letters*, 10(1), 302.
98. Shameli, K., Ahmad, M. B., Yunus, W. M. Z. W., Ibrahim, N. A., Gharayebi, Y., & Sedaghat, S. (2010). Synthesis of silver/montmorillonite nanocomposites using γ-irradiation. *International journal of nanomedicine*, 5, 1067.
99. Singh, A. K., Rathod, V., Singh, D., Ninganagouda, S., Kulkarni, P., Mathew, J., & Haq, M. U. (2015). Bioactive silver nanoparticles from endophytic fungus *Fusarium sp.* isolated from an ethanomedicinal plant *Withania somnifera* (Ashwagandha) and its antibacterial activity. *International Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 5(1), 15-19.
100. Shafiq, S. A., Al-Shammari, R. H., & Majeed, H. Z. (2016). Study of Biosynthesis silver nanoparticles by *Fusarium graminearum* and test their antimicrobial activity. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 15(1), 43.
101. Mohamed, G., Medhat, A., & Wafaa, E. A. (2015). Biogenic synthesis of silver nanoparticles using culture supernatant from the fungus *Cunninghamella phaeospora* optimization and antibacterial efficiency. *Asian Academic Research Journal of Multidisciplinary*, 1(33), 196–213.

102. Abd El-Aziz, A. R. M., AL-othman, M. R., Mahmoud, M. A., & Metwaly, H. A. (2015). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Fusarium solani* and its impact on grain borne fungi. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 10(2), 655–662
103. Eckhardt, S., Brunetto, P. S., Gagnon, J., Priebe, M., Giese, B., & Fromm, K. M. (2013). Nanobio silver: its interactions with peptides and bacteria, and its uses in medicine. *Chemical reviews*, 113(7), 4708-4754.
104. Sharma, V. K., Yngard, R. A., & Lin, Y. (2009). Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in colloid and interface science*, 145(1), 83-96.
105. Pereira, L., Mehboob, F., Stams, A. J., Mota, M. M., Rijnaarts, H. H., & Alves, M. M. (2015). Metallic nanoparticles: microbial synthesis and unique properties for biotechnological applications, bioavailability and biotransformation. *Critical reviews in biotechnology*, 35(1), 114-128.
106. Crespo, K. A., Baronetti, J. L., Quinteros, M. A., Páez, P. L., & Paraje, M. G. (2017). Intra-and Extracellular Biosynthesis and Characterization of Iron Nanoparticles from Prokaryotic Microorganisms with Anticoagulant Activity. *Pharmaceutical research*, 34(3), 591-598.
107. Basavaraja, S., Balaji, S. D., Lagashetty, A., Rajasab, A. H., & Venkataraman, A. (2008). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*. *Materials Research Bulletin*, 43(5), 1164-1170.
108. Jain, N., Bhargava, A., Majumdar, S., Tarafdar, J. C., & Panwar, J. (2011). Extracellular biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Aspergillus flavus* NJP08: a mechanism perspective. *Nanoscale*, 3(2), 635-641.
109. Fayaz, A. M., Balaji, K., Girilal, M., Yadav, R., Kalaichelvan, P. T., & Venketesan, R. (2010). Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(1), 103-109.

110. Singh, R., Shedbalkar, U. U., Wadhvani, S. A., & Chopade, B. A. (2015). Bacteriogenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(11), 4579-4593.
111. Anjum, S., & Abbasi, B. H. (2016). Biomimetic synthesis of antimicrobial silver nanoparticles using in vitro-propagated plantlets of a medicinally important endangered species: *Phlomis bracteosa*. *International journal of nanomedicine*, 11, 1663.
112. Thomas, R., Janardhanan, A., Varghese, R. T., Soniya, E. V., Mathew, J., & Radhakrishnan, E. K. (2014). Antibacterial properties of silver nanoparticles synthesized by marine *Ochrobactrum sp.* *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(4), 1221-1227.
113. Siritongsuk, P., Hongsing, N., Thammawithan, S., Daduang, S., Klaynongsruang, S., Tuanyok, A., & Patramanon, R. (2016). Two-Phase Bactericidal Mechanism of Silver Nanoparticles against *Burkholderia pseudomallei*. *PloS one*, 11(12), e0168098.
114. Sintubin, L., De Gusseme, B., Van der Meeren, P., Pycke, B. F., Verstraete, W., & Boon, N. (2011). The antibacterial activity of biogenic silver and its mode of action. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(1), 153-162.
115. Botes, M., & Eugene Cloete, T. (2010). The potential of nanofibers and nanobiocides in water purification. *Critical reviews in microbiology*, 36(1), 68-81.
116. Lu, Z., Rong, K., Li, J., Yang, H., & Chen, R. (2013). Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(6), 1465-1471.
117. McQuillan, J. S., Groenaga Infante, H., Stokes, E., & Shaw, A. M. (2012). Silver nanoparticle enhanced silver ion stress response in *Escherichia coli* K12. *Nanotoxicology*, 6(8), 857-866.
118. Chaloupka, K., Malam, Y., & Seifalian, A. M. (2010). Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in biotechnology*, 28(11), 580-588.

119. Gopinath, K., Karthika, V., Gowri, S., Senthilkumar, V., Kumaresan, S., & Arumugam, A. (2014). Antibacterial activity of ruthenium nanoparticles synthesized using *Gloriosa superba* L. leaf extract. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 4(1), 83.
120. Kim, S. H., Lee, H. S., Ryu, D. S., Choi, S. J., & Lee, D. S. (2011). Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol*, 39(1), 77-85.
121. Villegas, N. A., Baronetti, J., Albesa, I., Etcheverría, A., Becerra, M. C., Padola, N. L., & Paraje, M. G. (2015). Effect of antibiotics on cellular stress generated in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 and non-O157 biofilms. *Toxicology in Vitro*, 29(7), 1692-1700.
122. Galera, I. L. D., Paraje, M. G., & Paez, P. L. (2016). Relationship between oxidative and nitrosative stress induced by gentamicin and ciprofloxacin in bacteria.
123. Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A., & Collins, J. J. (2007). A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 130(5), 797-810.
124. Arenas, F. A., Covarrubias, P. C., Sandoval, J. M., Perez-Donoso, J. M., Imlay, J. A., & Vasquez, C. C. (2011). The *Escherichia coli* BtuE protein functions as a resistance determinant against reactive oxygen species. *PLoS One*, 6(1), e15979.
125. Sherrill, C., & Fahey, R. C. (1998). Import and Metabolism of Glutathione by *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology*, 180(6), 1454-1459.
126. Slavík, J. (1982). Anilinonaphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 694(1), 1-25.
127. Lee, W., Kim, K. J., & Lee, D. G. (2014). A novel mechanism for the antibacterial effect of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Biometals*, 27(6), 1191-1201.

128. Khanna, P., Ong, C., Bay, B. H., & Baeg, G. H. (2015). Nanotoxicity: an interplay of oxidative stress, inflammation and cell death. *Nanomaterials*, 5(3), 1163-1180.
129. Risom, L., Møller, P., & Loft, S. (2005). Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 592(1), 119-137.
130. Son, G. S., Yeo, J. A., Kim, M. S., Kim, S. K., Holmén, A., Åkerman, B., & Nordén, B. (1998). Binding mode of norfloxacin to calf thymus DNA. *Journal of the American Chemical Society*, 120(26), 6451-6457.
131. Ni, Y., Lin, D., & Kokot, S. (2006). Synchronous fluorescence, UV–visible spectrophotometric, and voltammetric studies of the competitive interaction of bis (1, 10-phenanthroline) copper (II) complex and neutral red with DNA. *Analytical Biochemistry*, 352(2), 231-242.
132. Roy, S., Sadhukhan, R., Ghosh, U., & Das, T. K. (2015). Interaction studies between biosynthesized silver nanoparticle with calf thymus DNA and cytotoxicity of silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 141, 176-184.
133. Vahdati, A. R., & Sadeghi, B. (2013). A study on the assessment of DNA strand-breaking activity by silver and silica nanoparticles. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 3(1), 7.
134. Butler, K. S., Peeler, D. J., Casey, B. J., Dair, B. J., & Elespuru, R. K. (2015). Silver nanoparticles: correlating nanoparticle size and cellular uptake with genotoxicity. *Mutagenesis*, 30(4), 577-591.
135. Zhang, H., Wei, K., Zhang, M., Liu, R., & Chen, Y. (2014). Assessing the mechanism of DNA damage induced by lead through direct and indirect interactions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 136, 46-53.

136. Poirier, M., Simard, J. C., Antoine, F., & Girard, D. (2014). Interaction between silver nanoparticles of 20 nm (AgNP20) and human neutrophils: induction of apoptosis and inhibition of de novo protein synthesis by AgNP20 aggregates. *Journal of Applied Toxicology*, 34(4), 404-412.
137. Soares, T., Ribeiro, D., Proença, C., Chisté, R. C., Fernandes, E., & Freitas, M. (2016). Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human neutrophils assessed by multiple analytical approaches. *Life sciences*, 145, 247-254.
138. Ghosh, M., Manivannan, J., Sinha, S., Chakraborty, A., Mallick, S. K., Bandyopadhyay, M., & Mukherjee, A. (2012). In vitro and in vivo genotoxicity of silver nanoparticles. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 749(1), 60-69.
139. Nymark, P., Catalán, J., Suhonen, S., Järventaus, H., Birkedal, R., Clausen, P. A., ... & Norppa, H. (2013). Genotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells. *Toxicology*, 313(1), 38-48.
140. Chen, L. Q., Fang, L., Ling, J., Ding, C. Z., Kang, B., & Huang, C. Z. (2015). Nanotoxicity of silver nanoparticles to red blood cells: size dependent adsorption, uptake, and hemolytic activity. *Chemical research in toxicology*, 28(3), 501-509.
141. Manna, D. K., Mandal, A. K., Sen, I. K., Maji, P. K., Chakraborti, S., Chakraborty, R., & Islam, S. S. (2015). Antibacterial and DNA degradation potential of silver nanoparticles synthesized via green route. *International journal of biological macromolecules*, 80, 455-459.
142. Yu, T., Malugin, A., & Ghandehari, H. (2011). Impact of silica nanoparticle design on cellular toxicity and hemolytic activity. *ACS nano*, 5(7), 5717-5728.
143. Li, S. Q., Zhu, R. R., Zhu, H., Xue, M., Sun, X. Y., Yao, S. D., & Wang, S. L. (2008). Nanotoxicity of TiO₂ nanoparticles to erythrocyte in vitro. *Food and chemical toxicology*, 46(12), 3626-3631.

144. Han, Y., Wang, X., Dai, H., & Li, S. (2012). Nanosize and surface charge effects of hydroxyapatite nanoparticles on red blood cell suspensions. *ACS applied materials & interfaces*, 4(9), 4616-4622.
145. Verma, A., Uzun, O., Hu, Y., Hu, Y., Han, H. S., Watson, N., & Stellacci, F. (2008). Surface structure-regulated cell membrane penetration by monolayer protected nanoparticles. *Nature materials*, 7(7), 588.



PROYECCIONES



Proyecciones

Los resultados de esta tesis han dado lugar a las siguientes proyecciones:

- Estudio de nuevas fuentes “green” para la obtención de NPsAg, extractos de plantas.
- Estudio e identificación de las biomoléculas que conforman el “capping” de las NPsAg biosintetizadas y que le otorgan estabilidad, para el desarrollo de nuevas estrategias para la síntesis green.
- Estudio de la citotoxicidad *in vitro* de NPsAg biosintetizadas sobre diferentes líneas celulares, empleando técnicas específicas de biología molecular.
- Estudio de la actividad antimicrobiana de NPsAg biosintetizadas sobre microorganismos que se encuentran en comunidades formando biofilms y su relación con la generación de estrés oxidativo.
- Estudio de la actividad antimicrobiana de nuevos compuestos de tamaño nanométrico provenientes de síntesis “green” sobre células persistentes.



APÉNDICES

SOLUCIONES *BUFFER* Y MEDIOS DE CULTIVO***Buffer* salino de fosfatos (PBS)**

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
pH: 7,0 ± 0,2	

Agar Müeller Hinton (MH)-Britania

Infusión de carne	300,0 g
Peptona ácida de caseína	17,5 g
Almidón	1,5 g
NaCl	5,5 g
Agar	15,0 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
pH: 7,3 ± 0,1	

Preparación: Suspender 37 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar embeber de 10 a 15 minutos. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Caldo Müeller Hinton (MH)-Britania

Infusión de carne	300,0 g
Peptona ácida de caseína	17,5 g
Almidón	1,5 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
pH: 7,3 ± 0,2	

Preparación: Suspender 22 g del medio en un litro de agua destilada y dejar embeber 10 minutos, agitando periódicamente. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto. Distribuir en tubos, esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

Agar Tripteína Soya (ATS)-Britania

Tripteína	15,0 g
Peptona de soya	5,0 g
Glucosa	1,0 g
NaCl	5,5 g
Agar-agar (ausente en el caldo)	2,5 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

pH: 7,3 ± 0,2

Preparación: Disolver 40 g de polvo deshidratado en un litro de agua destilada. Mezclar y dejar reposar 5 minutos. Calentar suavemente agitando y hervir durante 1 o 2 minutos hasta su disolución. Distribuir y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

Caldo Tripteína Soya (CTS)-Britania

Tripteína	17,0 g
Peptona de soya	3,0 g
NaCl	5,0 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
Glucosa	2,5 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

pH: 7,3 ± 0,2

Preparación: Suspender 30 g del polvo en un litro de agua destilada. Mezclar y calentar hasta disolver. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Caldo Luria Bertani (LB)

Triptona	10,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
NaCl	5,0 g

pH: 7,2

Disolver 20 g en un litro de agua destilada y ajustar el pH a 7,2 esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Solución salina balanceada de Hanks**Composición g/L**

NaCl	8,0
KCl	0,4
Na ₂ HPO ₄	0,15
KH ₂ PO ₄	0,06
MgSO ₄	0,1
CaCl ₂	0,14
MgSO ₂	0,1
Dextrosa	1,0
NaHCO ₃	0,35
H ₂ O dest.	c.s.p
pH 7,0 ± 0,2	
Conservar a 4° C	

Solución de Dextrán**Composición g/L**

Dextrán	6,0
Buffer Hanks	c.s.p
pH 7,0 ± 0,2	
Conservar a 4° C	

Electroforesis: Tinción con Plata**Solución de fijación****Composición v/v**

Ácido acético	10%
Etanol	40%

Solución de sensibilización
Composición

Etanol	50 mL.
Tiosulfato de sodio	333 mg.
Acetato de sodio	11,33 g.

Solución de plata
Composición

Nitrato de plata	125mg.
Etanol	45mL

Solución de revelado
Composición p/v

Carbonato de sodio	2,5%
--------------------	------

Al momento de utilizar, se agregaron 40 μ L de formaldehído cada 100ml de solución.

Solución de frenado
Composición p/v

EDTA	1,86%
------	-------



APÉNDICE II



Publicaciones Científicas

- I. Quinteros MA, Aiassa Martínez IM, Paraje, MG, Dalmaso PR, Páez PL. Silver nanoparticles: biosynthesis using an ATCC reference strain of *Pseudomonas aeruginosa* and activity as broad spectrum clinical antibacterial agents. *International Journal of Biomaterials*. 2016;2016:5971047. doi: 10.1155/2016/5971047.
- II. Quinteros MA, Cano Aristizábal V, Dalmaso PR, Paraje MG, Páez PL. Oxidative stress generation of silver nanoparticles in three bacterial genera and its relationship with the antimicrobial activity. *Toxicology In Vitro* 2016. 36:216- 223.
- III. Crespo KA., Baronetti JL., Quinteros MA, Páez PL., Paraje MG. Intra- and Extracellular Biosynthesis and Characterization of Iron Nanoparticles from Prokaryotic Microorganisms with Anticoagulant Activity. *Pharm Res* 2016. DOI 10.1007/s11095-016-2084-0.
- IV. Quinteros MA, Cano Aristizabal V, Paraje MG, Páez PL. Biosynthesized silver nanoparticles: decoding their mechanism of action in *S. aureus* and *E. coli*. *Journal of Clinical Toxicology*.2017. <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0495-C1-024>.

Presentaciones a Congresos

Nacionales

- A. Quinteros, MA; Páez, PL; Aiassa Martínez, IM; Dalmaso, PR; Albesa, I. Biosíntesis de nanopartículas de plata con extracto de *Pseudomonas aeruginosa* y su actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente. II Nanocórdoba 2012, Córdoba, Argentina. Octubre 2012. Presentación: Póster.
- B. Páez PL, Quinteros MA, Aiassa Martínez IM, Dalmaso PR, Albesa I. Nanopartículas de Plata como agentes antibacterianos de amplio espectro. Reunión de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE), Mendoza 2012. Seleccionado para presentación oral.
- C. Quinteros, MA; Páez, PL; Aiassa Martínez, IM; Dalmaso, PR; Albesa, I. "Biosíntesis de nanopartículas de plata con extracto de *Pseudomonas aeruginosa* y su actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente". II Jornadas de Estudiantes Investigadores de la UNC. Construcción y difusión de conocimientos desde la universidad pública. Octubre 2012. Presentación oral.
- D. Páez PL, Funes CM, Aiassa Martínez IM, Quinteros MA, Dalmaso PR, Albesa I. Efecto de nanopartículas de Plata sobre la actividad antibacteriana de diferentes antibióticos. XIII

Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires. Septiembre 2013. Presentación: Póster.

E. Aiassa Martínez IM, Quinteros MA, Dalmaso PR, Albesa I and Páez PL. Efecto de Nanopartículas de Plata sobre leucocitos humanos. 45° Reunión de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE), Mar del Plata, Argentina. Noviembre 2013. Presentación: Póster.

G. Quinteros MA, Dalmaso PR, Aiassa V, Zoppi A, Longhi MR, Albesa I, Páez PL. Influence of the addition of maltodextrin and b-cyclodextrin during the Biosynthesis of silver nanoparticles and its antibacterial activity. XI Congreso Argentino de Microbiología General (SAMIGE). Agosto 2015. Córdoba, Argentina. Presentación: Póster.

H. Crespo Andrada K, Baronetti J, Quinteros MA, da Silva MA, Páez PL, Paraje MG. Biosynthesis optimización of transition metal nanoparticles. XI Congreso Argentino de Microbiología General (SAMIGE). Agosto 2015. Córdoba, Argentina. Presentación: Póster.

I. Quinteros MA, Aiassa Martínez I., Dalmaso P, Albesa I y Páez PL. Biosíntesis de nanopartículas de plata y su aplicación como agente antibacteriano de amplio espectro. VII Jornadas de Posgrado y I Jornada de Ciencia y Tecnología de la Facultad de Ciencias Químicas. Abril 2016. Córdoba, Argentina. Presentación: Oral.

J. Quinteros MA y Páez PL. Biosíntesis de Nanopartículas metálicas. Estudio de la actividad antimicrobiana y su relación con la generación de estrés oxidativo en bacterias. 4° Jornadas de Integración del IMBIV. Junio 2016. Córdoba, Argentina. Presentación: Oral.

K. Quinteros MA, Cano Aristizábal V, Dalmaso P, Paraje MG, y Páez PL. Nanopartículas de plata biosintetizadas: análisis del daño oxidativo en macromoléculas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Nanocórdoba 2017. Córdoba, Argentina. Presentación: Póster.

Internacionales

A. Aiassa Martínez IM, Páez PL, Quinteros MA, Dalmaso PR, Pino GA, Berdakin M and Albesa. Silver Nanoparticles Biosynthesis: Characterization and Antibacterial Activity. II Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas, Noviembre 2012. Presentación: Póster

B. Páez PL, Quinteros MA, Aiassa Martínez IM, Funes CM, Dalmaso PR, Albesa I. Biosynthesis of metallic nanoparticles and oxidative stress induced in bacteria". VIII Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine- South American Group (VIII SFRBM-SAG). Buenos Aires, Argentina. Octubre 2013. Presentación: Póster.

-
- C. Quinteros MA, Aiassa Martínez I., Dalmaso P, Albesa I y Páez PL. Optimization and characterization of the silver nanoparticles biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. III Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas, Septiembre 2014. Presentación: Póster.
- D. Quinteros MA, Aiassa Martínez I., Dalmaso P, Albesa I y Páez PL. Biosíntesis de nanopartículas de plata y su aplicación como agente antibacteriano de amplio espectro. XXIII Jornadas de Jóvenes Investigadores Asociación De Universidades Grupo Montevideo (AUGM), Agosto 2015. Presentación: Comunicación oral y Póster.
- E. Estévez B; Quinteros MA, Sanguineto P, Páez PL.; Alborés S. Potencial antifúngico de nanopartículas de plata sintetizadas por microorganismos. II Encuentro Nacional de Jóvenes Microbiólogos. 2 y 3 de Junio de 2016. Auditorio Idea Vilariño, Torre de Telecomunicaciones, ANTEL. Uruguay. Presentación: Comunicación oral.
- F. Quinteros MA, Crespo K, Páez PL, Paraje MG, Baronetti JL. Actividad anticoagulante de nanopartículas metálicas obtenidas por biosíntesis procariota. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología. 26 al 30 de Septiembre. Rosario, Santa Fe, Argentina. Presentación: Póster.
- G. Quinteros MA, Cano Aristizábal V, Dalmaso P, Paraje MG, y Páez PL. Estrés oxidativo en bacterias: Posible mecanismo de acción de nanopartículas de plata biosintetizadas. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología. 26 al 30 de Septiembre. Rosario, Santa Fe, Argentina. Presentación: Póster.
- H. Cano Aristizábal V, Quinteros MA, Paraje MG, Páez PL. Variación de la generación de estrés oxidativo mediado por ciprofloxacina en *Escherichia coli* en atmósferas controladas de CO₂. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología. 26 al 30 de Septiembre. Rosario, Santa Fe, Argentina. Presentación: Póster.
- I. Quinteros MA, Cano Aristizábal V, Paraje MG, y Páez PL. Biosynthesized silver nanoparticles: decoding their mechanism of action in *S. aureus* and *E. coli*. 9th Euro-Global Summit on Toxicology and Applied Pharmacology. 22 al 24 de Junio 2017. Paris, Francia. Presentación: Oral.