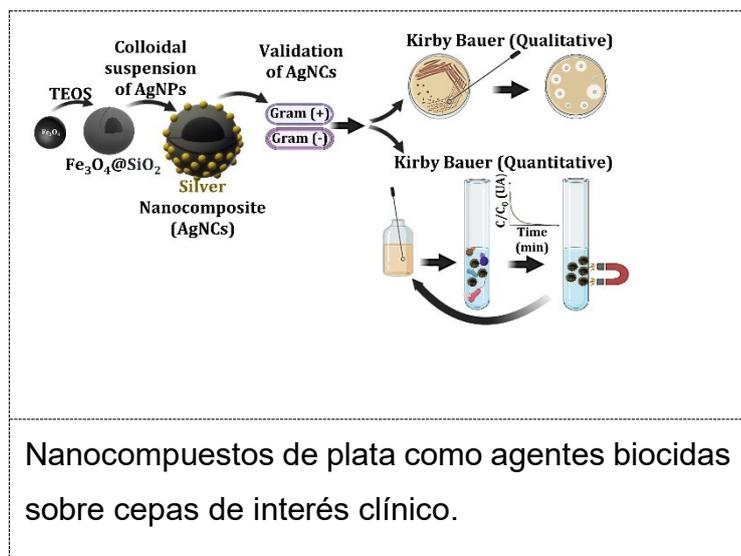


**Síntesis y actividad antibacteriana de un nanocompuesto NPIO@SiO₂/Ag,
evaluando su citotoxicidad en células eucariotas.**

***Synthesis and antibacterial activity of a NPIO@SiO₂/Ag nanocomposite,
assessment its cytotoxicity in eukaryotic cells.***

Graphical Abstract (GA)



**Síntesis y actividad antibacterial de un nanocompuesto NPIO@SiO₂/Ag,
evaluando su citotoxicidad en células eucariotas.**

***Synthesis and antibacterial activity of a NPIO@SiO₂/Ag nanocomposite,
assessment its cytotoxicity in eukaryotic cells.***

Camila A. Lota*

** Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.*

*Dirigido por: Bact. Gladys A. Murillo
y Dr. Javier Rincón*

Resumen

Las nanopartículas de plata se han ido constituyendo como un tratamiento novedoso contra infecciones bacterianas que presentan resistencia contra los agentes antibióticos tradicionales generando como consecuencia enfermedades infecciosas de evolución compleja. Sin embargo, este tipo de nanopartículas exhiben citotoxicidad sobre células eucariotas, así como generan contaminación en el agua donde han sido empleadas, por falta de un mecanismo para su remoción del medio. Como una alternativa de solución a estas problemáticas, se propone el desarrollo de un nanocompuesto constituido por un núcleo magnético de óxido de hierro, recubierto con sílica y decorado con nanopartículas de plata. La capacidad del compuesto nanoestructurado producido como agente bactericida, fue evaluado sobre cepas Gram positivas y Gram Negativas. La caracterización se realizó a través de microscopia electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión de barrido para determinar su morfología, su composición química fue determinada de forma semicuantitativa por espectroscopía de rayos X de energía dispersa y las propiedades magnéticas por magnetometría de muestra vibrante. El estudio evidenció

que los nanocompuestos desarrollados pueden aplicarse como agentes bactericidas y/o bacteriostáticos, siendo una alternativa en los procesos de desinfección para el control microbiano. Finalmente, por su propiedad magnética facilitarían su remoción del medio en el que han sido aplicadas, permitiendo así realizar un proceso de desinfección sin adicionar agentes contaminantes adicionales al medio, previniendo la acumulación de estos en el ambiente.

Abstract

Silver nanoparticles are a novel treatment against bacterial infections that exhibit resistance against traditional antibiotic agents resulting in infectious diseases of complex evolution. However, this type of nanoparticles exhibit cytotoxicity on eukaryotic cells, as well as are a substance that generates contamination in the water where it has been used, due to lack of a mechanism for its removal from the environment. As a solution alternative to these problems, it is proposed to develop a nanocomposite consisting of a magnetic core of iron oxide, coated with silica, and decorated with silver nanoparticles. The capacity of the nanostructured compound produced as a bactericidal agent, was evaluated on Gram positive strains and Gram Negatives. The characterization was carried out through by scanning electron microscopy and scanning transmission electron microscopy to determine its morphology, its chemical composition was determined semi-qualitatively by dispersed energy X-ray spectroscopy and its magnetic properties by vibrant sample magnetometry. The study showed that developed nanocomposites can be applied as bactericidal and/or bacteriostatic agents, being an alternative in disinfection processes for microbial control. Finally, by their magnetic property they would facilitate their removal from the environment in which they have been applied, thus allowing to perform a disinfection process without adding additional contaminants to the environment, preventing the accumulation of these in the environment.

Palabras clave: nanocompuesto magnético de plata, biocida, bacteriostático, bacterias multirresistentes, antibióticos.

Keywords: magnetic silver nanocomposite, biocide, bacteriostatic, multi-resistant bacteria, antibiotics.

Introducción

En 2015, la organización mundial de la salud (OMS) puso en marcha el Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos, denominado GLASS. En enero del 2018 se publicaron los primeros resultados, indicando la presencia generalizada de resistencia a los antibióticos para diversas bacterias generando infecciones en una población de 500.000 personas en 22 diferentes países (Lindmeier, 2018). En noviembre del 2018 se presentaron elevadas tasas de mortalidad por esa causa en particular en algunos países como Italia (18,17/100.000 habitantes al año), Grecia (14,79/100.000 habitantes al año), Portugal (11,34/100.000 habitantes al año), Francia (8,61/100.000 habitantes al año) y Estados Unidos (8,98/100.000 habitantes al año) (Herrera, 2018).

En Colombia se ha identificado la relevancia de la resistencia a los agentes antimicrobianos, como en el frecuente hallazgo de infecciones intrahospitalarias a causa de cepas bacterianas *Klebsiella pneumoniae* (Echeverri-Toro et al., 2012), *Pseudomona aeruginosa* (Valderrama et al., 2016) y *Escherichia coli* (Álvarez et al., 2020) cuya resistencia a los antimicrobianos (como carbapenémicos y betalactámicos) es de gran preocupación terapéutica, lo cual ha aumentado en los últimos años alcanzado un 90% del total de las infecciones. Así mismo, con el *Enterococcus faecium* la tasa de resistencia que exhibe frente a la vancomicina en Bogotá es menor al 20% (Gaviria et al., 2018). De igual manera el *Staphylococcus aureus*, es considerado un microorganismo altamente patógeno con gran capacidad de generar un amplia gama de enfermedades (Alejo Riveros et al., 2011);

generado una potente resistencia a la meticilina gracias a las toxinas y serotipos que desencadena (Sánchez Lerma et al., 2016). Este hecho resulta preocupante por las implicaciones en la mortalidad, al igual que aumenta los costos en los servicios de salud (Barros et al., 2020).

Desafortunadamente, las bacterias evolucionan rápidamente, y sus mecanismos de resistencia también, llevando estos mecanismos a extenderse frente a cada antibiótico después de su introducción en los esquemas terapéuticos (Rajeev, 2018), debido a que la mayoría de estos provienen de un pequeño conjunto de andamios moleculares (OMS, 2017). Las bacterias multirresistentes al generar enfermedades que no pueden ser controladas con agentes antibióticos ponen en peligro la eficacia de estos (Rajeev, 2018), como la penicilina, aislada de *Penicillium chrysogenum* que han transformado la medicina y salvado millones de vidas (Miranda & Costa Almeida, 2020).

Los microorganismos patógenos que desarrollan resistencia a los antibióticos son una amenaza para la salud pública, debido a que algunas bacterias con importancia clínica no solo exhiben resistencia a un solo fármaco, si no que presentan una multirresistencia (Daşbaşı, 2017). La crisis generada por la resistencia a los antibióticos se ha atribuido a varios factores entre ellos al empleo indiscriminado de esta tipo de sustancias farmacológicas (Ventola, 2015), por la eliminación de metabolitos del antibiótico que no son absorbidas por el cuerpo y terminan siendo excretados y desechados a través de la tuberías que recolectan las aguas sucias, acumulándose estos, llevando a que estos residuos se vuelvan a consumir a través de estas aguas (Ben et al., 2019).

El frecuente aumento de los genotipos de resistencia a los antimicrobianos, se debe principalmente a genes adaptativos que pueden ser "movilizados" (Zhao et al., 2017) dentro y entre especies microbianas (Juhás, 2019), a mutaciones a través de genes específicos

por plásmidos que modifican las proteínas de unión al antibiótico (Botelho et al., 2019), residuos de antibióticos descartados y acumulados en el medio ambiente que alteran el microbioma (Ventola, 2015) y promueven la resistencia de las bacterias que habitan el cuerpo humano (Ben et al., 2019). Actualmente la mayoría de los fármacos que se están desarrollando de última generación como las cefalosporinas, carbapenémicos, fluoroquinolonas, linezolid y daptomicina (Calderón & Aguilar, 2016), con el propósito de combatir infecciones bacterianas son modificaciones de antibióticos ya existentes que ofrecen soluciones a corto plazo, cuyas vidas funcionales se han extendido por generaciones de sastrería sintética (Michael & Christopher, 2009).

A nivel nanotecnológico, el desarrollo de nanomateriales (material en la escala nanométrica) ha permitido realizar la síntesis de variados materiales que exhiben propiedades únicas, capaces de aportar a la solución de diversos problemas que han ido surgiendo, como la resistencia bacteriana (Huang et al., 2018). Las características que presenta cada nanomaterial dependen en gran parte del tamaño (entre 1 y 100nm) y de la forma que se presentan (nanotubos, esféricas, grafenos, fullerenos, entre otros) (Kulkarni, 2015), estos se clasifican según sus dimensiones exteriores a nano-escala: nanocapas (una), nanotubos (dos) y nanopartículas (tres) (Pósniak, 2020).

Las propiedades de las nanopartículas se derivan principalmente de la relación entre su área superficial y el volumen del material que ha sido empleado para su síntesis (propiedades extensivas) (Llamosa, 2018), como ejemplo las nanopartículas a partir de óxido de titanio exhiben propiedades fotocatalíticas (Singh & Mehata, 2019), las de hierro exhiben características magnéticas (Escobar et al., 2018) y las de oro presentan propiedades ópticas (Kolavekar et al., 2018). Adicionalmente, se ha identificado el empleo de nanopartículas como catalizadores, en procesos de separación (Kharisov et al., 2019), remediación (Ruiz et al., 2019), biosensores y nanomedicina (Vallabani & Singh, 2018). Los

avances recientes en antibióticos basados en el empleo de la nanotecnología han generado nuevos horizontes para combatir la resistencia que algunos microorganismos han desarrollado frente a múltiples antibióticos (Ssekatawa et al., 2020).

Se ha reconocido la actividad antibacteriana de diferentes nanopartículas de metales como el Zn (Happy Agarwal et al., 2018), Cu (Nabila & Kannabiran, 2018), el Au (Díaz et al., 2018) y la Ag (Changanaqui Barrientos et al., 2019). En especial se ha identificado el empleo de las nanopartículas de plata (AgNPs) como un potente agente antibacteriano, generando alta expectativa por la importancia a nivel clínico que representa (Travieso et al., 2018). Las AgNPs exhiben su potencial antimicrobiano a través de diferentes mecanismos como: formación de especies de oxígeno reactivo (ROS) (Dakal et al., 2016; Zhang et al., 2018), producción de radicales libres, y por último la modulación de las vías de transducción de señales (Dakal et al., 2016), llevados a cabo a través de la adhesión de las AgNP a las membranas de las células microbianas y con el ingreso al citoplasma (Ben et al., 2019) (Ilustración 1).

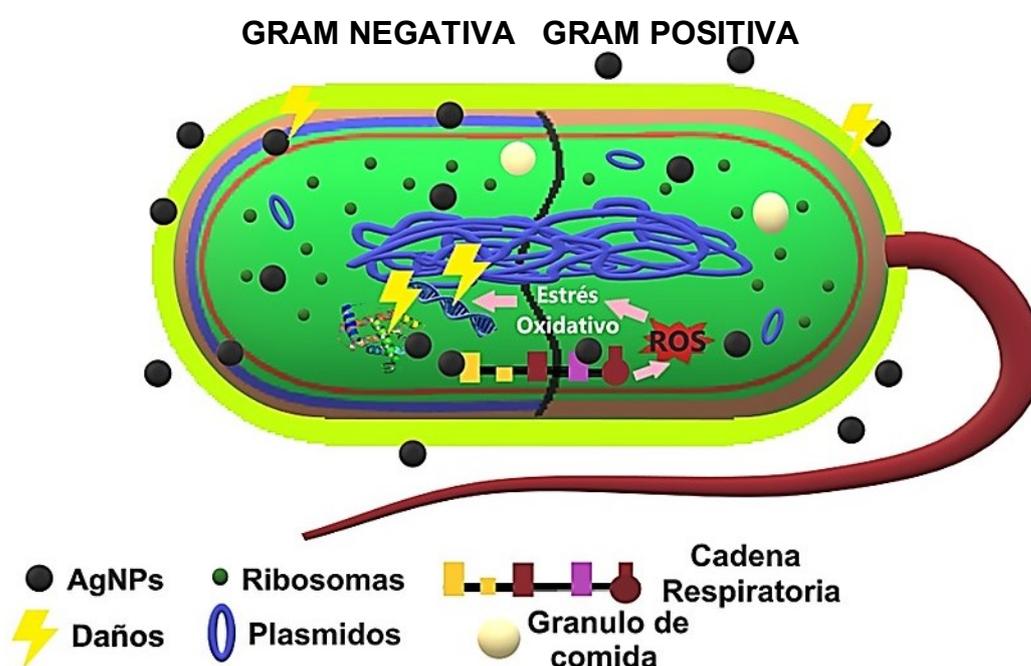


Ilustración 1. Mecanismos que llevan a cabo las AgNPs en el proceso biocida.

Las nanopartículas de plata (AgNPs) pueden generar consecuencias negativas por su toxicidad para el organismo por la generación de radicales libres afectando las células eucariotas (mutagenicidad) (Vera Nuñez & Tamo Cornejo, 2018), generando consecuencias inflamatorias, oxidativas y genotóxicas (Yan Li et al., 2017), dentro de estas consecuencias se encuentra la pérdida de su morfología típica de la célula, propiedad de adhesión e integridad de la membrana, de igual manera se ha identificado que las AgNPs inducen una peroxidación de lípidos (Chen et al., 2015) con la degradación de ácidos grasos insaturados y una reducción de lípidos polares en las células, provocando alteraciones en la morfología celular de los linfocitos humanos (Dey Bhowmik et al., 2019). De igual manera las AgNPs se han constituido como un contaminante para el medio debido a que permanecen activas en este (Changanaqui Barrientos et al., 2019), por falta de un mecanismo para su remoción, teniendo un punto de investigación importante en la nanotecnología para solucionar este tipo de problemáticas.

Los nanocompuestos son materiales que presentan más de un componente, dentro de los cuales al menos uno de sus dominios presenta una dimensión en el orden de los nanómetros (Lizarazo Salcedo et al., 2018), con base en lo mencionado anteriormente en este estudio planteamos como solución a la problemática que generan las AgNPs, formar un nanocompuesto con un núcleo magnético, que permitiría mejorar los procesos de separación y reutilización de las nanopartículas de plata en el medio (Fang et al., 2019; Yanlin Li et al., 2019). A nivel nanotecnológico las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (NPIO) desempeñan un papel importante en el área ambiental (Yano et al., 2017) presentando una utilidad como absorbentes de contaminantes orgánicos para el tratamiento de aguas residuales (Gupta et al., 2018; Peralta et al., 2020), como la remoción del arsénico (Kane et al., 2017) y el linuron, un pesticida que contamina el medio ambiente (Belaroui et al., 2018).

La combinación de las propiedades mencionadas anteriormente con relación a las nanopartículas de hierro y plata, da como producto los nanocompuestos de plata (AgNCs), (Changanaqui Barrientos et al., 2019), dando como resultado nanocompuestos con propiedades antibacteriales (Padilla Cruz, 2018) y magnéticas (Dadfar et al., 2019) dotando a las AgNPs de un mecanismo que facilitaría su remoción del medio en que se hayan aplicado. Por lo anterior, el objetivo de nuestro trabajo es determinar la dosis mínima biocida de un nanocompuesto de plata (AgNCs) sintetizado sobre cepas bacterianas resistentes a antibióticos (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*) y como último paso realizaremos una revisión teórica de la toxicidad que genera en células eucariotas, contribuyendo a la búsqueda de nuevos tratamientos efectivos y específicos contra la resistencia bacteriana a los antibióticos.

1. Materiales y Métodos

FeCl₂·4H₂O Merck No. CAS 13478-10-9, FeCl₃·6H₂O Merck No. CAS 10025-77-1, alcohol isopropílico Merck No. CAS 67-63-0, etanol (C₂H₅OH) Merck No. CAS 64-17-5, tetraetilortosilicato (TEOS) Merck No. CAS 78-10-4, metiltrietoxisilano (MTES) Merck No. CAS 2031-67-6, ácido cético (CH₃COOH) Merck No. CAS 200-580-7, AgNO₃ de Merck No. CAS 7761-88-8.

Métodos: Síntesis asistida por ultrasonidos empleando dos sistemas de ultrasonidos directo con un sonicador UP400St de la marca Hielscher Ultrasonics y ultrasonidos indirecto con un baño de ultrasonidos Elmasonic S 30 H de la marca Elma ultrasonic, por último para el análisis a nivel microbiológico se empleó un espectrofotómetro UV-VIS equipo SQ4802.

a) Síntesis de AgNCs

Síntesis del núcleo Fe₃O₄

Para la síntesis de los AgNCs se realizó como primer paso la síntesis del núcleo compuesto por hierro (NPIO), en donde se empleó como precursores el $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en una relación de 1:2 respectivamente, el proceso fue llevado a cabo a través de ultrasonido directo (US). Los ultrasonidos en líquidos producen el fenómeno de la cavitación acústica, que intensifica y acelera las reacciones químicas como la síntesis y la catálisis, por la formación, el crecimiento y el colapso implosivo de las burbujas en un líquido. El colapso de la cavitación produce un intenso calentamiento local ($\sim 5000 \text{ K}$), altas presiones ($\sim 1000 \text{ atm}$) y enormes tasas de calentamiento y enfriamiento ($>10^9 \text{ K / s}$) y chorros de líquido ($\sim 400 \text{ km / h}$) (Suslick et al., 1999).

Para la síntesis se disolvió cada cloruro en 75 mL de agua milli-Q. Las disoluciones se mezclaron en US durante los 30 seg en modo de pulso 90% y amplitud 60%, posteriormente se adiciono NH_4OH (25%) en dos tiempos llevando a un pH $\pm 10,33$, finalmente se dispersó por 7:21 min con una energía total transferida de 6,510 kW/h y un pH final de $\pm 8,8$.

Todas las NPIOs obtenidas se lavaron 3 veces con acetona. Se realizó un proceso de centrifugación a 4000 rpm por 10 min, retirando el sobrenadante y almacenándolas al vacío en un desecador.

Síntesis de NPIO@SiO₂

Para la funcionalización de las NPIOs se empleó una capa de sílice (por medio del método Stöber, obteniendo NPIO@SiO₂) (Hsieh et al., 2015) dispensando gota a gota por ultrasonidos la sílice (37 Hz) durante 15 min, en alcohol isopropílico en relación 1:1 con 0,64 mg de NPIOs. Como último paso se realizó

un tratamiento térmico a 55°C durante 1 hora a presión reducida, eliminando de esta manera la mayor parte del disolvente.

Síntesis de AgNCs

Al obtener las NPIOs funcionalizadas con SiO₂ (NPIO@SiO₂) se generó un cambio de medio de etanol por NH₄OH (100 mL) y citrato de sodio (324 mg), en un tratamiento por ultrasonido a 37 Hz preparando de esta manera la superficie. Se elaboró una suspensión de plata coloidal a partir 10 mL de citrato de sodio (Na₃C₆H₅O₇) y 10 mL de ácido ascórbico (C₆H₈O₆), de esta manera, se llevó la solución a un pH 11 con la adición de hidróxido de sodio (NaOH). Por último, gota a gota se adicionó 2,5 mL de nitrato de plata (AgNO₃), obteniendo una solución con una concentración de 10 mM. Posteriormente, se adicionó la suspensión coloidal de nanopartículas de Ag en porcentajes de 2%, 4% y 6% del total de las NPIO@SiO₂ (0,63 g), aplicando ultrasonidos (30 min a 37 Hz), obteniendo concentraciones de 0,126 mg/mL, 0,252 mg/mL y 0,378 mg/mL respectivamente. Como último paso se llevó a cabo un tratamiento térmico a 55°C durante 1 hora a presión reducida, obteniendo como resultado final nanocompuestos magnéticos de plata (AgNCs). A continuación, se realizó 3 lavados con alcohol isopropílico (IPA) y se dejaron en caldo nutritivo.

Tabla 1. Codificación de las diferentes muestras de NPs sintetizadas.

NOMENCLATURA DE LA NPs	COMPOSICIÓN	CONCENTRACIONES
NPIO@SiO ₂ Control	NPIO recubiertas con una capa porosa de Si.	0,0063 mg/mL
AgNCs _{II}	NPIO recubiertas con una capa porosa de Si y Ag en la superficie de esta.	2% de Ag. 0,126 mg/mL
AgNCs _{IV}	NPIO recubiertas con una capa porosa de Si y Ag en la superficie de esta.	4% de Ag. 0,252 mg/mL

AgNCs_{VI}	NPIO recubiertas con una capa porosa de Si en la superficie de esta.	6% de Ag. 0,378 mg/mL
---------------------------	----------------------------------------------------------------------	--------------------------

a) Caracterización química y morfológica de las AgNPs

Las fases cristalinas de los AgNCs se determinaron a través de difracción de Rayos X (DRX), se empleó el equipo de la marca Bruker modelo D2 PHASER dotado de una fuente de Rayos X con ánodo de cobre de alta estabilidad. Para este análisis se empleó una muestra en polvo de 30 mg de NPIO@SiO₂ formando una superficie uniforme sobre el portamuestras de DRX, obtenido diagramas de difracción en polvo de 10.002 a 80.002 °2θ, con tamaño de paso de 0,05 °2θ y tiempo de medida de 4 segundos por paso. El tiempo total de medida fue de 1 hora y 33 minutos.

La distribución de tamaño de las nanopartículas (análisis morfológico) fue determinado por microscopía electrónica de barrido (SEM) mediante un equipo Tescan Lyra 3 de cátodo de emisión de campo tipo Schottky, con un detector de microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM) empleado para determinar el tamaño y la morfología interna de las nanopartículas. Este equipo presenta una resolución de 1,2 nm en el modo alto vacío a 30 kV. Para el análisis se utilizó una pequeña cantidad de la muestra de NPIO@SiO₂ (30 mg en una disolución 1:100 en agua milli-Q) depositada sobre rejillas convencionales para TEM. Las imágenes obtenidas fueron analizadas empleando el programa de procesamiento de imagen ImageJ. Se utilizó el programa Origin para obtener histogramas de distribución de tamaño ajustados a funciones LogNormal y determinar los diámetros medios de las nanopartículas.

Para el análisis morfológico y caracterización química semicuantitativa se empleó un microscopio electrónico de barrido (SEM) de la marca Teascan modelo Lyra 3 con una resolución de 1,2 nm a 30 keV, equipado con un espectrómetro de energía dispersiva (EDS), empleando como sustrato cinta de carbono adherida a los porta muestras de aluminio.

Para la caracterización magnética de las nanopartículas se empleó un magnetómetro de muestra vibrante (VSM) de la marca Quantum Design modelo VersaLab que permite realizar medidas de magnetización en función de la temperatura en un rango entre 50 K a 350 K, y medidas a temperatura constante variando el campo aplicado entre -3 T a 3 T. En las curvas de histéresis magnética en función del campo magnético aplicado se empleó un campo máximo de 3,0 T a una temperatura de 300 K. Se empleo 30 mg de NPIO@SiO₂ polvo.

b) Determinación de la dosis mínima inhibitoria (DMI) de los AgNCs

Se seleccionaron como cepas bacterianas modelo cepas de referencia (ATCC) de las bacterias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922; Gram positiva) y *Escherichia coli* (ATCC 25923; Gram negativa) adquiridas de colecciones reconocidas, con su correspondiente certificado de origen.

Para el recuento de unidades formadoras de colonia se preparó un inóculo de cada bacteria con una turbidez de 0,5 con respecto a la escala McFarland, preparando una dilución en 100 mL de caldo nutritivo (10⁰), llevando a cabo el método de recuento en placa (Sánchez et al., 2017). Se realizó un pase de cada tubo (100 µL) a cajas de Petri con agar nutritivo (se empleó un agar sin ningún cultivo bacteriano como control) y por último se colocarán en la incubadora a

37°C por 24 - 48 horas, pasado este tiempo se contarán las colonias mediante conteo manual.

Para las curvas de crecimiento microbiano de cada una de las cepas, se incubó cada especie bacteriana en caldo nutritivo (0,5 en la escala McFarland) y se realizaron lecturas cada hora por espectrofotometría UV-VIS a 560 nm durante 24 horas (caldo nutritivo como blanco y cada una de las mediciones se realizó por triplicado).

Por último, se determinó la dosis mínima inhibidora (DMI) (concentración más baja (mg/ml) de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento bacteriano de una determinada cepa (IDDEX, 2018)), de los AgNCs en las dos cepas bacterianas, por medio de la técnica Kirby Bauer, mediante un cultivo en caldo nutritivo con diluciones para determinar el crecimiento poblacional bacteriano equivalente a 0,5 en la escala de McFarland. Posteriormente, se tomó el inóculo y se sembró sobre la superficie de Agar Müeller Hinton con un asa de Drigalsky, haciendo una siembra masiva. Por último, se colocaron sensidiscos previamente impregnados con los nanocompuestos NPIO@SiO₂, AgNCs_{II}, AgNCs_{IV} y AgNCs_{VI} sobre las siembras, para finalmente llevarlos a incubar a 36°C por 24 horas. Se realizó el análisis cuantitativo de DMI por el método de Kirby Bauer en disolución en caldo Müeller Hinton, utilizando una serie de 5 disoluciones de igual concentración bacteriana a las cuales se les agregó los nanocompuestos preparados previamente (0,126 mg/mL, 0,252 mg/mL y 0,378 mg/mL), realizando 4 mediciones en períodos de 30 min cada una, durante 120 min en un espectrofotómetro convencional con un filtro 540 nm, con base en la siguiente referencia (Sobhani-Nasab et al., 2017).

Los datos obtenidos se presentaron en forma descriptiva a través de un tratamiento estadístico en Excel y el programa GraphPad Prism determinando el promedio y la desviación estándar para representar los resultados en forma de diferentes gráficas y tablas.

c) Citotoxicidad

La evaluación de la toxicidad generada por los AgNCs se llevó a través de una investigación teórico-descriptiva de los estudios más actuales en un periodo comprendido desde el 2015 hasta el 2020 relacionados con la citotoxicidad generada por nanocompuestos de plata.

Se realizó la búsqueda de los documentos en bases de datos como Scopus, ScienceDirect y SpringerLink, donde se seleccionaron los artículos con los siguientes criterios de inclusión y exclusión (incluyeran palabras como citotoxicidad, nanocompuestos de plata, células mamíferas no cancerosas y cancerosas, así como artículos que presentaban ensayos experimentales de la toxicidad de nanocompuestos de plata en células eucariotas de los últimos 5 años,). No se tomaron en consideración para el análisis aquellos artículos que no hacían alusión a los núcleos temáticos.

2. Resultados y Discusión

Caracterización de los nanocompuestos de plata

El patrón de DRX a temperatura ambiente de las nanopartículas de hierro recubiertas con sílice (NPIO@SiO₂), se muestra en la **Figura 1**. Para este estudio se empleó la técnica de refinamiento Rietveld utilizando el software Powdercell 2.4 y de esta manera poder confirmar las fases cristalinas presentes. Se identificaron dos picos amplios asignados en los planos de difracción (110) y (200) que pertenecen a $2\theta \approx$

44,7° y 65,0° siendo planos de difracción que corresponden al Fe (JCPDS tarjeta N° 65-4899). Los parámetros seleccionados en el DRX, tamaño de paso alto y el tiempo de paso bajo, ocasionaron una relación ruido/intensidad baja, como se observa en la **Figura 1**. Sin embargo por el refinamiento de Rietveld se muestran los picos en 18.15° (111), 35.17° (311), 56.50° (511), 62.03 (440) correspondientes al Fe₃O₄ (JCPDS tarjeta no 19-0629), que se encuentran opacados por el ruido generado en DRX debido al recubrimiento con SiO₂ amorfa.

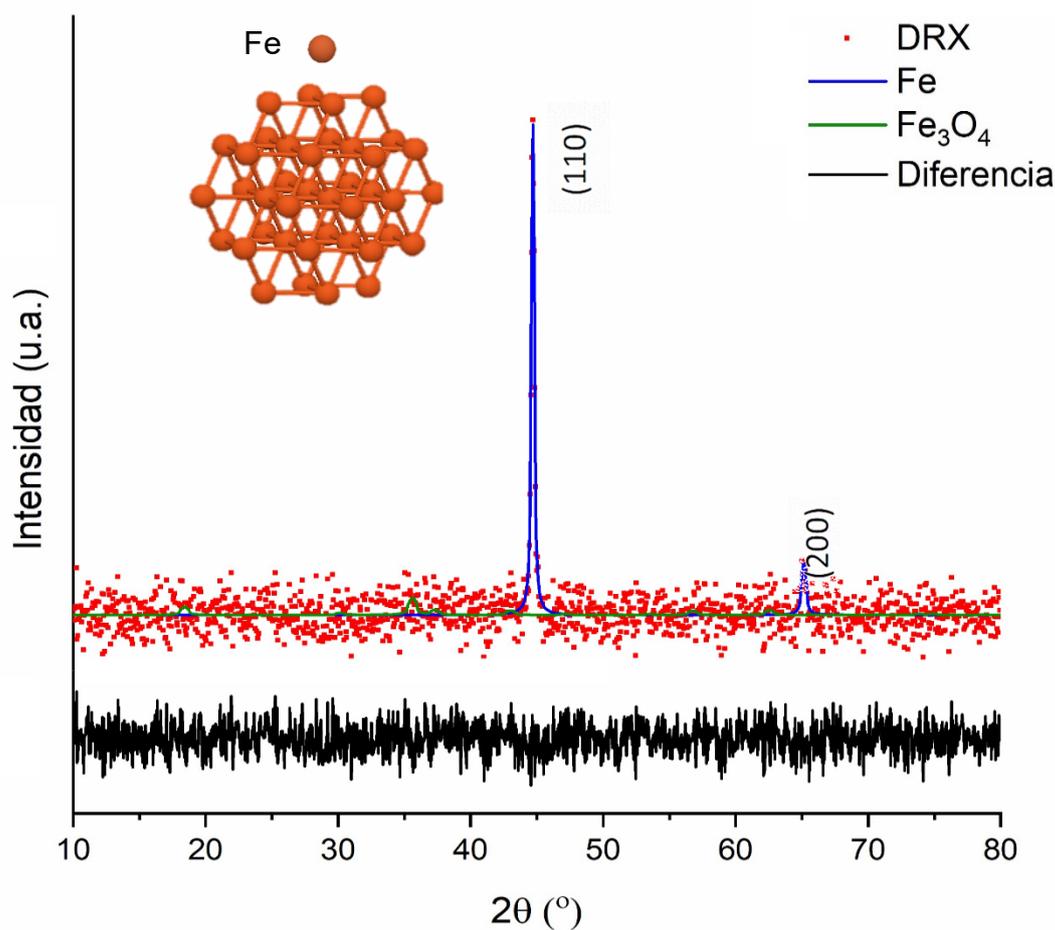


Figura 1. Patrón de difracción y refinamiento Rietveld de NPs de NPIO@SiO₂.

Del refinamiento se determinó que el 98% W% corresponde a la fase de hierro puro (ferrita) y el 2% W% a la fase de Fe₃O₄ (magnetita). Así mismo, el resultado demuestra que la estructura cristalográfica del núcleo de hierro es cúbica centrada

en el cuerpo que se mantiene posterior a su recubrimiento con SiO₂ amorfa lo cual concuerda con los estudios llevados a cabo por Silva et al y Lee y colaboradores con el recubrimiento con sílice amorfa (Lee et al., 2018; Silva Calpa et al., 2020), indicando de esta manera que el recubrimiento de sílice no afecta la estructura cristalina.

La ecuación de Scherrer $L = K\lambda/\beta \cos \theta$; donde λ es la longitud de onda del haz incidente, β el ancho de altura promedio, θ el ángulo de reflexión de la señal más intensa y $K = 0,9$ es un coeficiente, se adoptó para determinar el tamaño del cristalito. Reemplazando el valor de la señal más intensa que corresponde a $2\theta \approx 44,7^\circ$ con dirección (110) en la ecuación y usando el valor del ancho de altura promedio se obtuvo un tamaño de grano cristalino de 35,87 nm. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. *Parámetros estructurales y tamaño de grano de los cristalitos de nanopartículas NPIO@SiO₂.*

Muestra NPIO@SiO ₂	Porcentaje de la fase W (%)	Grupo Espacial	Parámetro de red (Å) a=b=c	Volumen de celda V (Å ³)	Tamaño del cristalito (nm)
Fe	98 %	Im-3m (229)	2,805 (3)	22,070 (5)	35,87
Fe₃O₄	2 %	Fd-3m (227)	8,463(1)	589,32 (4)	NA

En la **Figura 2A** se observa la dispersión de las nanopartículas NPIO por STEM. La morfología exhibida fue de forma esférica con aglomerados. El análisis de la imagen fue llevado a cabo por el software ImageJ, el ajuste de las distribuciones de tamaños es realizado asumiendo una distribución del tipo lognormal como se observa en la **Figura 2B**, a partir de la cual se calculó el tamaño promedio obteniendo $10,74 \pm 2,25$

nm de diámetro, al comparar los resultados con el tamaño de grano cristalito se observa que este es mayor, generado por la exposición a una temperatura de 55°C durante un tiempo prologado (1 hora), así como el ruido y los picos empleados en la ecuación Scherrer para determinar el tamaño, afectan considerablemente el dato determinado (Goyeneche, 2018; Neciosup Zavaleta & Ulloa Zavaleta, 2019).

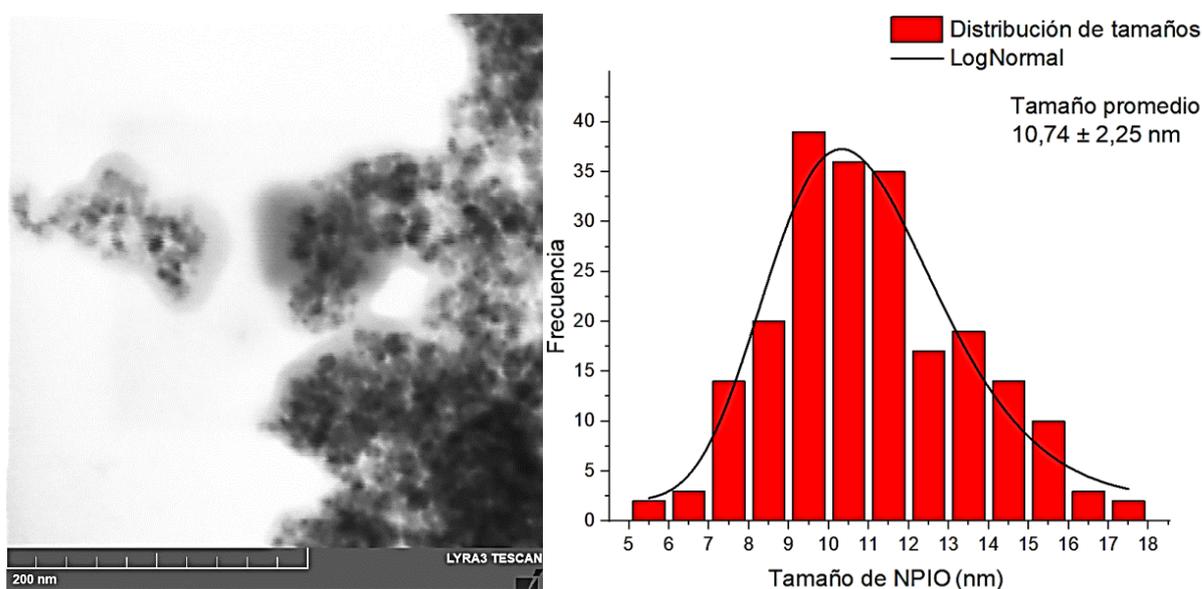


Figura 2. A) Imagen de STEM de nanopartículas NPIOs **B)** distribución de tamaño de las nanopartículas NPIO.

La micrografía de STEM para las NPIO@SiO₂ se muestra en la **Figura 3A**. Al comparar estos con resultados de las NPIO (**Figura 2B**) se corrobora la morfología esférica y se evidencia el crecimiento del tamaño en las nanopartículas NPIO@SiO₂ después del recubrimiento con SiO₂ como se evidencia en la **Figura 3B** donde se observa que las NPIO@SiO₂ se encuentran embebidas dentro de una matriz de silicio remanente, por la alta cantidad de SiO₂ que se adicionó para el recubrimiento (20 mL) así como la síntesis del mismo por un método que no fue in-situ con la síntesis de las NPIO, de igual manera se identificó aglomeraciones en algunas

nanopartículas de NPIO@SiO₂, lo cual se encuentra relacionado con lo publicado por Fuentes García y colaboradores (Fuentes García et al., 2018).

Contrastando esto con la distribución de tamaño obtenida por el análisis de imagen (ImageJ y Origin) asumiendo una distribución del tipo lognormal se identifica que el tamaño promedio de las NPIO@SiO₂ es de $76,38 \pm 9,98$ nm de diámetro.

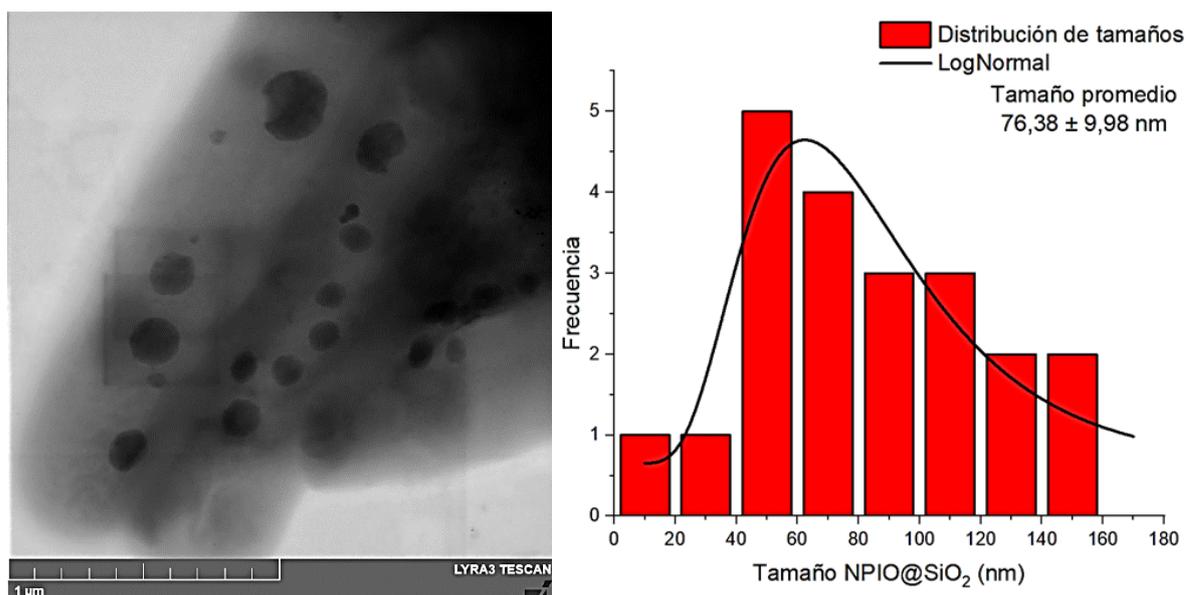


Figura 3. A) Imagen de STEM de nanopartículas NPIO@SiO₂ **B)** Distribución de tamaño de las nanopartículas NPIO@SiO₂.

La **Figura 4A** muestra la micrografía de SEM para las nanopartículas NPIO@SiO₂. El análisis de la imagen se realizó por medio del software ImageJ. En la **Figura 4B** se muestra el análisis químico semicuantitativo por EDS. En el recuadro se muestra la micrografía de SEM analizada de forma puntual (punto rojo) y la composición semicuantitativa de una partícula. El alto contenido de carbono se correlaciona a la cinta de carbono que se empleó para adherir la muestra al portamuestras, la presencia de Fe y Si comprueba la composición de nanopartícula NPIO@SiO₂.

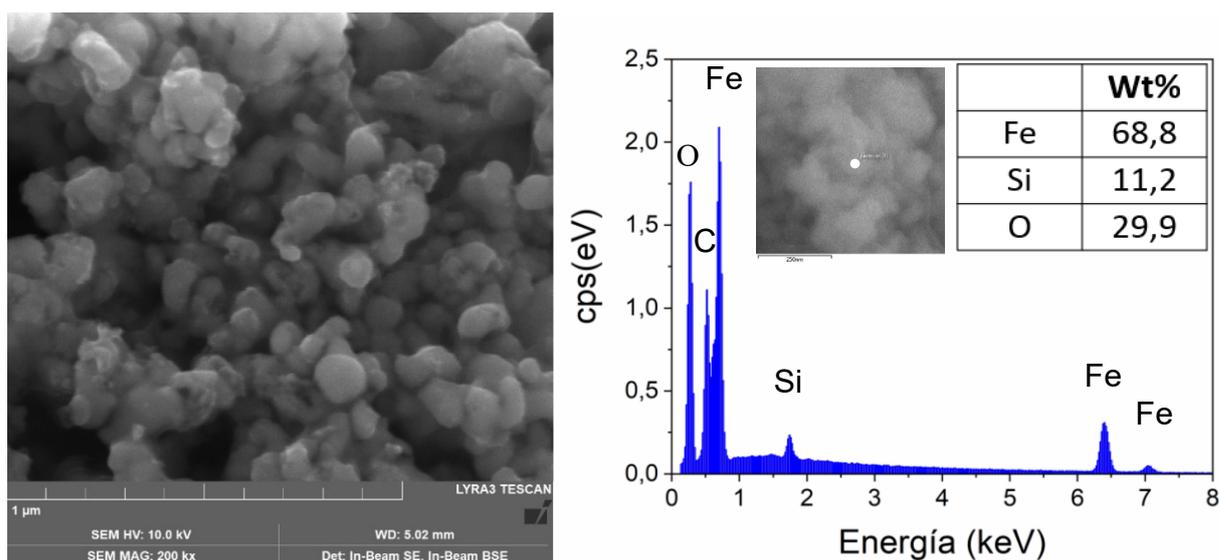


Figura 4. A) Imagen de SEM de nanopartículas NPIO@SiO₂ **B)** Espectro EDS y datos semicuantitativos elementales representativos de NPs de NPIO@SiO₂.

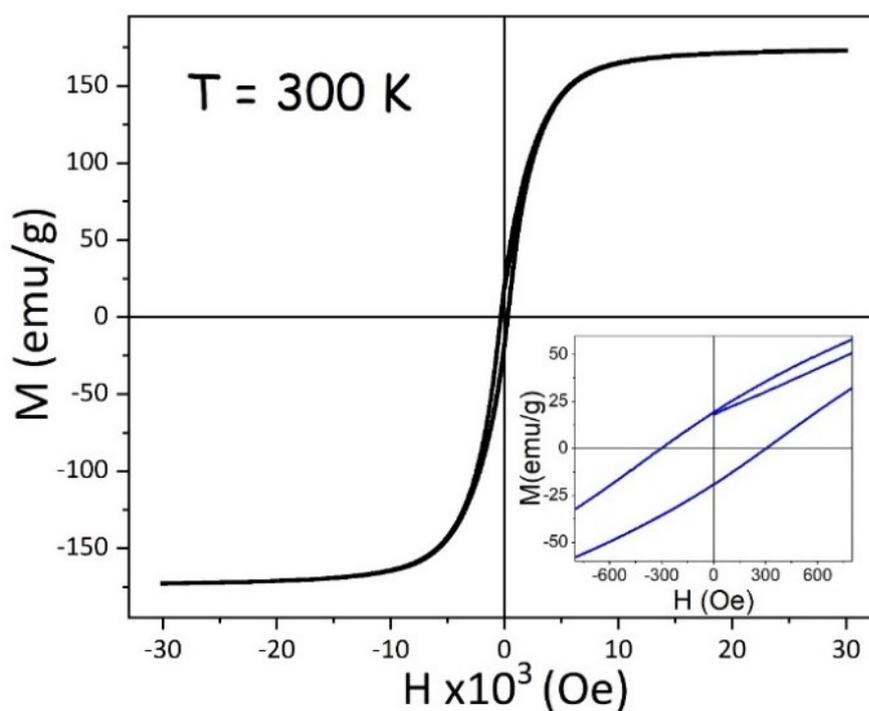


Figura 5. Ciclo de histéresis magnética a temperatura ambiente de NPIO@SiO₂. Recuadro ciclo de histéresis magnética aumentado.

En la **Figura 5** se muestra el bucle de histéresis magnética a temperatura ambiente de nanopartículas NPIO@SiO₂, variando el campo aplicado (H) de -30 kOe a 30 kOe.

La histéresis exhibe pequeños valores de campo de coercitividad mostrados en el recuadro de la **Figura 5**. Esto confirma que la mayoría de las partículas NPIO@SiO₂ exhiben propiedades súperparamagnéticas y solo unas pocas presentan un comportamiento ferromagnético a temperatura ambiente. Las nanopartículas NPIO@SiO₂ presentan saturación total en un campo magnético de 20 kOe. Además, a medida que aumenta el campo magnético externo la magnetización primero aumenta rápidamente y luego alcanza la saturación.

Las magnetizaciones de saturación (Ms), de remanencia (Mr) y campos coercitivos (Hc) se muestran en la **Tabla 2**. Estos resultados demuestran que a pesar de que la sílice podría llegar a apantallar las propiedades magnéticas de núcleo de hierro, este sistema es susceptible a ser manipulado al interactuar con un campo magnético externo. Adicionalmente, se identifica que el comportamiento presentado en el bucle de histéresis (superparamagnético) proviene tanto del óxido de hierro como del Fe puro que está presente en nuestras nanopartículas evidenciado con el valor de la magnetización de saturación (173,134 emu/g con un campo magnético 20 kOe).

Tabla 3. *Parámetros magnéticos de nanopartículas NPIO@SiO₂*

Muestra	Ms (emu/g)	Mr (emu/g)	Hc (Oe)
NPIO@SiO ₂	173,134	19,232	302,564

Dosis mínima inhibitoria (DMI) exhibida por los nanocompuestos

En la Técnica de Kirby Bauer a nivel cualitativo (**Figura 6**) y a nivel cuantitativo (**Gráfico 1 y 2**) se empleó una suspensión bacteriana de la cepa modelo *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* obtenida previamente a través de las curvas de crecimiento de cada cepa con mediciones durante 24 horas en una longitud de onda a 540nm, punto en donde se identificó que para esta absorbancia

la bacteria se encontraba en una fase estacionaria (momento en el cual el crecimiento bacteriano se mantiene de forma constante), la cual para *Staphylococcus aureus* fue de 0,721 y 0,91 para *Escherichia coli*.

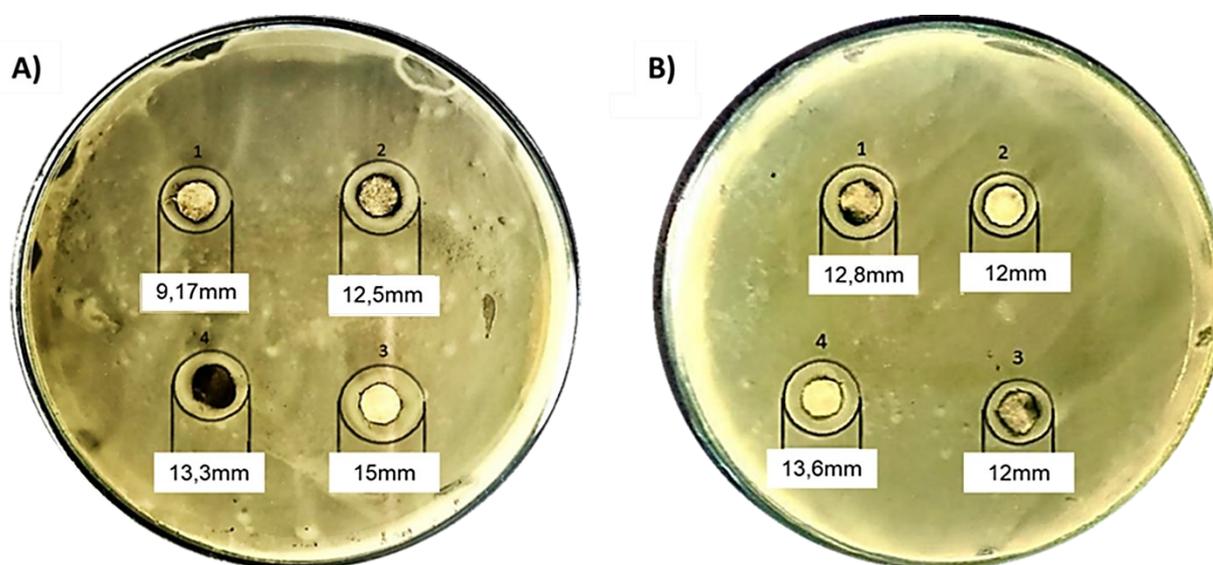


Figura 6. Técnica Kirby Bauer a nivel cualitativo para *Staphylococcus aureus* (A) y *Escherichia coli* (B). Tratamiento con NPIO@SiO₂ (sensidisco 1), AgNCs_{II} (sensidisco 2), AgNCs_{IV} (sensidisco 3) y AgNCs_{VI} (sensidisco 4).

La susceptibilidad de las cepas modelo *S. aureus* y *E. coli* después de 48 horas con cada tratamiento se observa en la **Figura 6A** y **Figura 6B**, el halo de inhibición que exhibieron los diferentes nanocompuestos sobre las bacterias Gram positiva y Gram negativa no es de forma apreciable a través de la placa con una matriz de agar Mueller Hinton, siendo generado por diferentes aspectos dentro de los que se encuentra la gravedad específica que presentan los AgNCs (Khan, 2018) generando un bajo índice de fluidez (Ziabka et al., 2020), por lo cual al actuar sobre un medio con alta densidad (agar), no logran difundirse correctamente. Por otro lado, el recubrimiento que presentan los AgNCs con SiO₂ genera que este tipo de

nanocompuesto no pueda difundirse fácilmente a temperaturas bajas (menos de 36°C temperatura en la cual se encuentra almacenado previo al ensayo Kirby bauer), ya que es en este punto el SiO₂ que hace parte de estos se encuentra estabilizado formando un grupo Si-O-Si (Siloxano) (Veprek & Veprek-Heijman, 2012). Por último, los AgNCs presentan una carga neta positiva (Guadarrama-Reyes, 2013) que al encontrarse sobre un sólido sin carga como es el agar la relación de estas cargas impide la difusión de los AgNCs del sensidisco a través del agar, ya que nuestros nanocompuestos de plata al ser positivos producen que las cargas de la matriz de agar (neutro) se redistribuyan generando que ambos se atraigan.

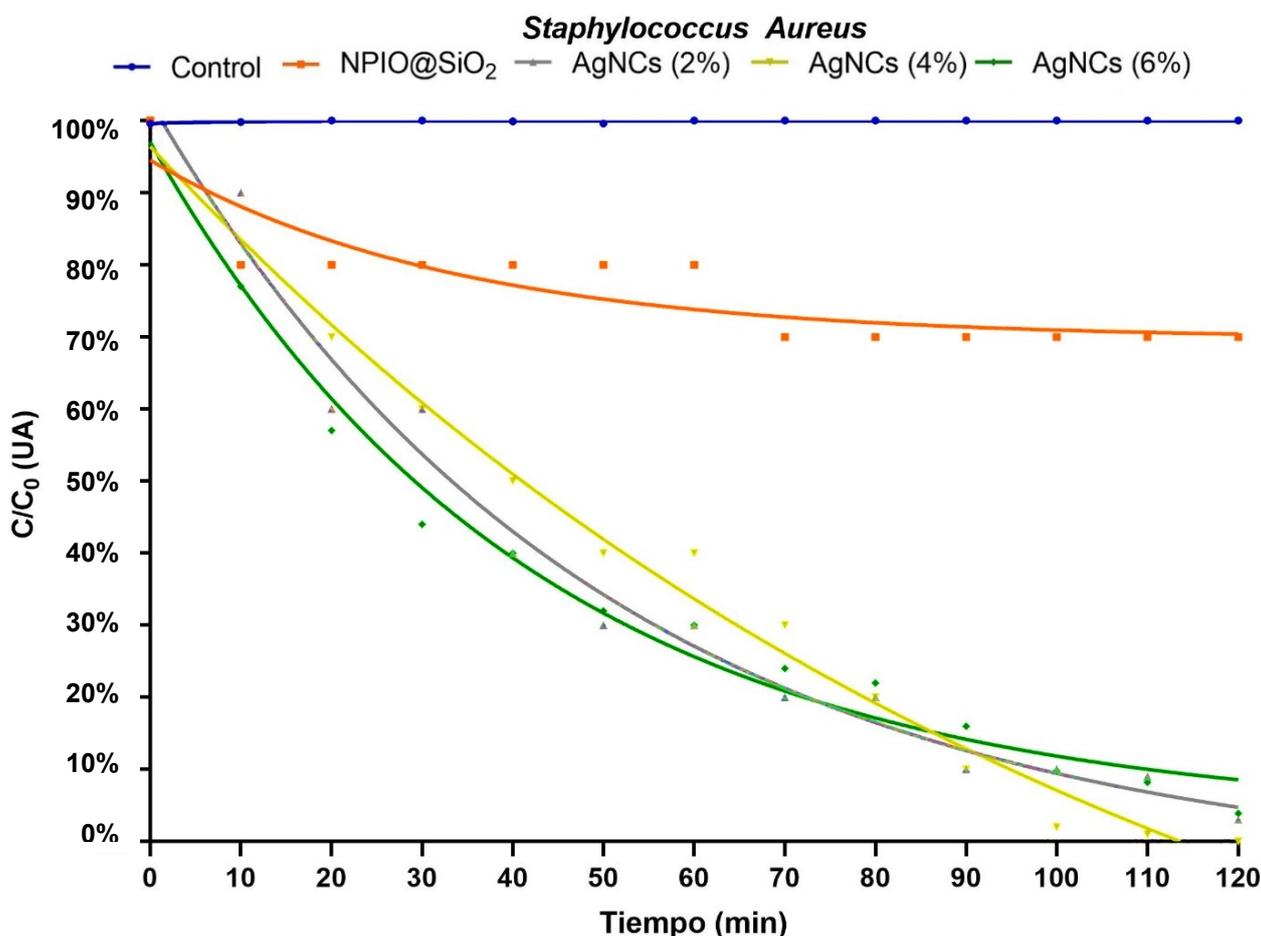
En la **Figura 6A** en los cuatro tratamientos empleados no hay una tendencia en el grado de susceptibilidad de la bacteria *S. aureus*, con respecto al aumento de la concentración de plata, obteniendo que el halo de inhibición más grande (15 mm) se encuentra relacionado con los AgNCs_{IV} (0,252 mg/mL) donde se logra apreciar el efecto biocida generado por los AgNCs en comparación con los demás (después de retirar el sensidisco con halos de inhibición de 9,17 mm para las NPIO; 12,5 mm para AgNCs_{II} y 13,3 mm para los AgNCs_{VI}). En esta técnica el nanocompuesto presentó una interacción limitada con la superficie bacteriana por la dificultad de difusión mencionada anteriormente generando que no se transporte de forma facilitada a través de la membrana de este tipo de bacteria Gram positiva (Cardoso, 2016).

En la **Figura 6B**, se precisa como a medida que aumentó la concentración de plata en los AgNCs empleados la susceptibilidad de la cepa *E. coli* aumentó obteniendo un halo de 13,6 mm de diámetro generado por el AgNCs_{VI} (0,0378 mg/mL).

La susceptibilidad generada por el *S. aureus* a través de la técnica Kirby Bauer en dilución en caldo se logra apreciar en el **Grafico 1**. En primer lugar, las

nanopartículas NPIO@SiO₂, desempeñan un papel menor en la actividad bactericida (Tung et al., 2016), generando un efecto inhibitorio leve en el crecimiento en comparación con los AgNCs, debido a que destruyen las bacterias presentes en el periodo inicial de aplicación ($\pm 25\%$) y finalmente terminan deteniendo la proliferación o crecimiento bacteriano, de tal manera que no produce una muerte celular bacteriana total (tendencia constante).

Gráfico 1. Susceptibilidad del *Staphylococcus aureus* con diferentes concentraciones de AgNCs por el método Kirby Bauer en dilución. Tratamiento con NPIO@SiO₂ (línea naranja), AgNCs_{II} (línea gris), AgNCs_{IV} (línea verde claro) y AgNCs_{VI} (línea verde oscuro).



Los AgNCs con 2%, 4% y 6% de Ag (0,126 mg/mL, 0,252 mg/mL y 0,378 mg/mL respectivamente), manifestaron un comportamiento bactericida frente a la cepa modelo *S. aureus*, ya que lograron inhibir el crecimiento bacteriano de forma irreversible. En el **Grafico 1** (línea gris) se identificó que al emplear los AgNCs con 2% de plata no generaban una muerte celular total (0%), de igual manera sucedió con los AgNCs al 6% (**Grafica 1** (verde oscuro)), por la agregación de los nanocompuestos por la alta concentración empleada, por lo cual no son concentraciones óptimas en el comportamiento inhibitorio que se esperaba obtener a los 120 min de exposición para el *S. aureus*. Finalmente, se determinó que la dosis mínima inhibitoria (DMI) para la cepa modelo *S. aureus*, que genere una lisis celular en su totalidad, es el AgNCs al 4% como se observa en la **Grafica 1** (verde claro), eliminando completamente las bacterias de manera que, en 120 min redujo a un 0% la concentración de bacterias presentes en el caldo. La tendencia que presenta línea correspondiente a este nanocompuesto carece de fluctuaciones significativas por lo que es posible determinar que las bacterias no presentan periodos de adaptación, ya que actúan al momento de ser aplicados (Dai et al., 2018).

El efecto antimicrobiano de los nanocompuestos de plata también ha sido validado en otros tipos de cepas modelo Gram positivas de importancia clínica, como fue publicado por Hinojos, López, Espinosa, Donohue, & Reyes (Lopez-Esparza et al., 2016) en 2016, donde determinaron que con concentraciones de 1 – 100 mM de los nanocompuestos de plata se obtenían de 6 – 8 mm en la zona de inhibición sobre el *Streptococcus pyogenes*. Este tipo de ensayo también se ha llevado a cabo por Ghiut y colaboradores en 2018 (Ghiuță et al., 2018), identificando que para una cepa Gram positiva como el *Streptococcus pyogenes*, se producían halos de inhibición por la técnica Kirby Bauer a nivel cualitativo superior a los 30 mm con nanocompuestos

de plata de tamaño entre los 10 - 20 nm, así como en el 2019 Masri, Anwar, Khan, Shahbaz, Khan, Shahabuddin & Siddiqui (Masri et al., 2019) reconocieron que los nanocompuestos de plata con una concentración de 5 μ M y tamaño de 100 nm reducían hasta un 4% la viabilidad celular bacteriana del *S. pyogenes*.

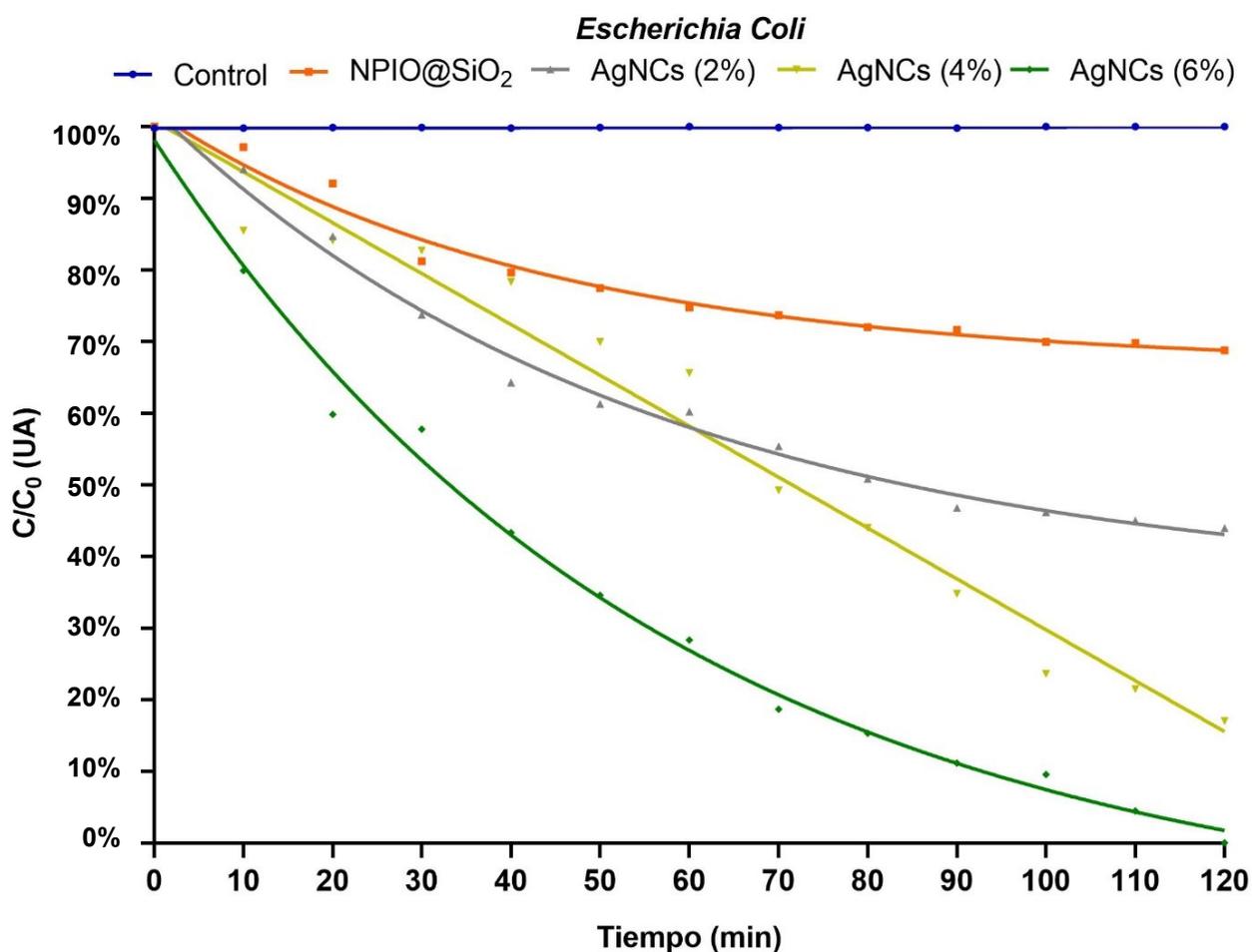
Por otro lado, Dhafer, Dhahri, Mezni & Smiri en 2018 (Dhafer et al., 2018) observaron que los nanocompuestos de plata presentaban un efecto bactericida sobre cepas Gram positivas como el *Enterococcus faecium* y el *Staphylococcus aureus*. De la misma manera López, y colaboradores en el 2020 (López-Carrizales et al., 2020) identificaron que con un tamaño de los nanocompuestos de plata de 10 - 12 nm se erradicaba en su totalidad la cepa *Enterococcus faecium* del medio en el cual se realizó la evaluación. Por último, en el 2020 Piras, Mahon & Smith (Piras et al., 2020) obtuvieron zonas de inhibición con ± 10 mm con respecto a cepas bacterianas de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina.

En el **Gráfico 2** se confirma que las nanopartículas NPIO@SiO₂ presentan un efecto antibacteriano leve (30%) con la capacidad de controlar el crecimiento bacteriano, tanto para cepas Gram positivas (**Gráfico 2**) como Gram negativas (**Gráfico 1**), debido a que el hierro de la nanopartículas NPIO@SiO₂ funciona como un nutriente para estas, por lo cual no lleva a muerte celular bacteriana (Puntes, 2015).

Los AgNCs con una concentración del 2% de Ag (0,126 mg/mL) reducen la concentración de bacterias presentes en el medio en aproximadamente el 50% (**Grafica 2** (gris)). Sin embargo, en el periodo evaluado (120 min) no se considera como un efecto inhibitorio significativo, ya que no lleva a la eliminación total de las células bacterianas lo cual permite determinar que la cepa modelo de *E. coli* logra sobrevivir bajo esta concentración de plata, por lo que la misma es insuficiente para

hablar de un comportamiento bactericida. Por otro lado, los AgNCs con una concentración del 4% (0,252 mg/mL) de plata, logran una actividad biocida con una disminución bacteriana hasta menos de un 20% en 120 min como se observa en la **Grafica 2** (verde claro).

Gráfico 2. Susceptibilidad del *Escherichia coli* con diferentes concentraciones de AgNCs por el método Kirby Bauer en dilución. Tratamiento con NPIO@SiO₂ (línea naranja), AgNCsII (línea gris), AgNCsIV (línea verde claro) y AgNCsVI (línea verde oscuro).



Finalmente, para los AgNCs con 6% de Ag (0,378 mg/mL), se evidencio el comportamiento biocida que se presentaron frente a la cepa bacteriana *E. coli*, lo

que determina que a esta concentración de plata los nanocompuestos son capaces de generar una lisis celular total después de un periodo de 120 min de aplicación (**Grafica 2** (verde oscuro)), presentando la mayor susceptibilidad bacteriana con respecto a los nanocompuestos evaluados, razón por la cual, se considera a los AgNCs con 6% (0,378 mg/mL) de plata es la dosis mínima inhibitoria (DMI) para *E. coli*.

Por consiguiente, se evidencio que se requiere un mayor porcentaje de plata sobre los AgNCs (6%, 0,378 mg/mL) para poder generar una inhibición total de la cepa *E. coli* siendo una bacteria Gram negativa en comparación con el *S. aureus*, en donde con 4% (0,252 mg/mL) de plata se llevó a cabo un efecto inhibitorio total, este fenómeno se presenta gracias a las diferencias en la estructura de estas dos cepas bacterianas en cuanto a su fisiología, estructura celular o el grado de contacto de los nanocompuestos con los microorganismos (Reyes, 2012). La *E. coli*, al ser un microorganismo Gram negativo, posee en principio una membrana plasmática, seguido por una pared celular que consta de un espacio periplásmico constituido por bajos niveles de péptido-glucano y una membrana externa constituida por lipopolisacáridos, fosfolípidos y proteínas (Arzate, 2016). Por lo cual, se genera una menor interacción de los AgNCs con la *E. coli* debido a la morfología que presentan, razón por la cual la dosis mínima biocida para este tipo de bacterias requiere una mayor concentración de plata para llevar a cabo un efecto biocida en un 100% de la concentración de bacterias en el medio. Siendo insuficiente los AgNCs con concentraciones relativamente bajas (0,126 – 0,252 mg/mL) para lograr irrumpir y permear las tres zonas de la estructura de estas bacterias descritas anteriormente.

De la misma manera este tipo de ensayo ha sido llevado a cabo sobre cepas Gram negativas como la *Pseudomonas aeruginosa* y el *Acinetobacter baumannii*, como fue reportado por Silva, Mendonça, Pereira, Santos, Prior & Ferreira en 2016 (Silva Santos et al., 2016) quienes comprobaron el efecto antimicrobiano de los nanocompuestos de plata a nivel cualitativo con una concentración de 500 mg/mL sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* resistentes a múltiples fármacos, obteniendo halos de inhibición mayores a 10 mm, así como Freire y colaboradores en 2016 (Freire et al., 2016) quienes determinaron que la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los nanocompuestos de plata para la *P. Aeruginosa*, se encontraba en un rango de 30 – 50 µm/mL generando una lisis total. Chang, Chen, Cheng, Chin, Chen, Chen, Sun, Joven & Chiueh en 2017 (Chang et al., 2017) identificaron que para *Pseudomonas aeruginosa* y el *Acinetobacter baumannii* se presentaba una inhibición total con una concentración de 3,06 µg/mL de los nanocompuestos de plata, siendo esta la dosis mínima biocida. Finalmente, Shah, Buabeid, Arafa, Hussain, Li, Murtaza en 2019 (Shah et al., 2019) comprobaron que con nanocompuestos de plata con tamaños entre 500 – 600 nm generaban zonas de inhibición entre 16 - 40 mm con respecto al *Acinetobacter baumannii*.

La diferencia encontrada entre los diferentes estudios se basa principalmente en la relación tamaño/concentración, por lo cual se encuentran diferentes concentraciones de los nanocompuestos que generan la dosis mínima inhibitoria (MIC) en las diferentes cepas bacterianas analizadas dependiendo del tamaño empleado, ya que pueden generar una perturbación en el entorno de las bacterias (González Flores, 2017; Ouahid Hessissen, 2016).

Citotoxicidad

Con respecto a las nanopartículas de plata se ha venido investigando las aplicaciones que pueden tener por sus propiedades, específicamente en el campo de la biomédicina en el cual se ha identificado su empleo como vectores de suministro, inhibidores de angiogénesis e inhibidores del crecimiento tumoral determinado a través del estudio llevado a cabo por Ong, Lim, Ng, Li, Yung & Bay, en 2013 (Ong et al., 2013), de igual manera se ha evaluado la citotoxicidad que pueden presentar como fue reportado por Porenczuk y colaboradores en 2019 (Porenczuk et al., 2019) determinando que además de contar con la actividad antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* y *Lactobacillus acidophilus* eran incompatibles hacía células madre de la pulpa dental (DPSC) (por ensayos de MTT (sal de tetrazolio)), esto se encuentra relacionado con lo publicado por Vellore & Nadu en 2016 (Vellore & Nadu, 2016), donde se logró identificar que el nivel toxico que presentan este tipo de nanopartículas depende en gran parte de su concentración, observando que a concentraciones de 100 µg/mL, las nanopartículas de plata exhibían efectos citotóxicos significativos, pero que por el contrario dentro del rango de concentraciones de 5 – 50 µg/ml, con tamaños entre 5 - 40 nm, no presentaban efectos citotóxicos para líneas celulares de osteoblastos, este tipo de análisis también fue llevado a cabo por Nayak, Ashe, Rauta, Kumari & Nayak en 2016 (Nayak et al., 2016) donde se sintetizaron nanopartículas que mostraron actividad antimicrobiana prometedora contra las bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*) y Gram-positivas (*Bacillus subtilis*), como actividad antiproliferativa contra la línea celular de osteosarcoma MG-63 de una manera dependiente de la dosis.

Wang, Ji, Li, Guan, Zhang & Feng en 2017 (Wang et al., 2017) verificaron el efecto bactericida de nanocompuestos de carbono y plata contra bacterias Gram-negativas

y Gram-positivas, así como la toxicidad celular de los mismos evidenciando una buena biocompatibilidad, y poca toxicidad en las células de ovario de hámster, este estudio se encuentra relacionado con lo obtenido por Reddy, Saha, Shimoga, Kronekova, Sláviková & Saha en 2017 (Palem et al., 2017) quienes determinaron que los nanocompuestos de quitosano-plata no presentaban un efecto tóxico contra una línea celular de fibroblastos 3T3 normal con una viabilidad celular de más del 70%. De igual manera se encuentra de acuerdo con lo publicado por Ivashchenko, Woźniak, Coy, Peplinska, Gapinski & Jurga en 2017 (Ivashchenko et al., 2017) identificando que la citotoxicidad de los nanocompuestos de magnetita/Ag/Rifampicina dependía de la concentración empleada, en donde 0,5 mg/mL generaba una viabilidad celular de más del 90% mientras que con 1,5 mg/mL y 2,5 mg/mL se obtiene una viabilidad de 70% y 50% respectivamente en células de riñón embrionario humano 293 (HEK293T) en un tiempo de 72h.

En los últimos años este tipo de ensayo citotóxico de antimicrobianos se ha adelantado en diferentes líneas celulares evaluando su citotoxicidad sobre líneas celulares cancerosas como se realizó en 2017 por Moghayedi y colaboradores (Moghayedi et al., 2017), evaluando la actividad antibacteriana en *Escherichia coli* y la citotoxicidad contra las células cancerosas de glioblastoma, se identificó que las propiedades antibacterianas del nanocompuesto como la reducción de viabilidad de glioblastoma dependían del tiempo y la concentración, de igual manera este tipo de estudio fue llevado a cabo por Choi, Gurunathan & Kim (Choi et al., 2018) donde en 2018 se logró determinar que los nanocompuestos de Ag-óxido de grafeno eran eficaces contra células de cáncer de ovario humano generando especies reactivas de oxígeno, potencial de membrana mitocondrial reducido y expresión mejorada de genes apoptóticos, que muy posiblemente desencadenaría en apoptosis, lo cual

también fue determinado por Yuan & Gurunathan en 2017 (Yuan & Gurunathan, 2017) en células de cáncer de cuello uterino humano (HeLa). Liu y colaboradores en 2018 (Liu et al., 2018) emplearon nanocompuestos de Ag-Fe₃O₄ modificados con Tat (peptido) en la evaluación antitumoral, evidenciando efectos inhibidores más significativos en tumores MCF-7, reduciendo la tasa de crecimiento en un 29,6%, con un rendimiento superior en la administración del fármaco al tumor en comparación con los nano-vehículos de control.

La citotoxicidad de nanocompuestos de Fe₃O₄@Ag fue determinada a través de un estudio llevado a cabo por Pieretti, Rolim, Ferreira, Lombello, Nascimento & Seabra (Pieretti et al., 2020) quienes en el 2020 lograron identificar que este tipo de nanocompuestos presentaban una mayor toxicidad en las células tumorales SW-1353 disminuyendo su viabilidad celular en menos del 30% con respecto a las células no tumorales (Vero) presentando una viabilidad celular superior al 60% en todas las concentraciones empleadas (1 – 150 µg/mL).

Según los estudios analizados a través de la revisión bibliográfica el nanocompuesto modelo para disminuir los efectos citotóxicos que generan estos nanocompuestos en células eucariotas de mamíferos sería con una concentración menor a 3 mg/mL y con tamaños de ±40 nm.

3. Conclusiones

Los AgNCs sintetizados en este estudio demostraron ser eficaces contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* las cuales fueron susceptibles a estos, con concentraciones de 4% y 6% de plata respectivamente, obtenido a través de la técnica Kirby Bauer a nivel cualitativo y cuantitativo. Determinando que con una exposición de 80 min es suficiente para inhibir más de un 80% las cepas modelo

ensayadas.

Las nanopartículas NPIO@SiO₂ presentan una morfología esférica de 40 - 60 nm de diámetro con un núcleo de hierro de $10,74 \pm 2,25$ nm de diámetro (NPIO) y que dota al agente antimicrobiano de propiedades superparamagnéticas, las cuales no interfieren con la acción como agente antibiótico que generan los nanocompuesto de plata tanto en cepas Gram positivas y Gram negativas, susceptible de ser una alternativa como tratamientos en procesos de desinfección con características antimicrobianas, siendo efectivos contra microorganismos multirresistentes.

Las propiedades exhibidas por estos nanocompuestos de plata los convierten en posibles tratamientos para ser empleados en procesos de desinfección con la posibilidad de evitar contaminación del medio en el que sean empleadas. Susceptibles de una amplia gama de aplicaciones, como por ejemplo en biomedicina, donde pueden usarse para un transporte dirigido hacia un agente antimicrobiano y su posterior recuperación por un campo magnético externo.

En estudios futuros se aconseja llevar a cabo el proceso de recubrimiento de las NPIO con SiO₂, a través de la síntesis del sol-gel (SiO₂) con las nanopartículas NPIOs ya presentes en la síntesis y no adicionado el sol-gel previamente preparado sobre las NPIO. Adicionalmente, se sugiere en trabajos futuros el empleo de los AgNCs sobre cepas de importancia clínica como el Streptococcus Pyogenes, Enterococos faecium (Gram positivos), Acinetobacter Baumannii y Pseudomona Aeruginosa (Gram negativo). Por último, se recomienda realizar una investigación que se enfoque en un método de recuperación de los AgNCs con el fin de verificar su capacidad de ser reutilizables y llevar a cabo los ensayos que permitan identificar la toxicidad generada por lo nanocompuestos sobre líneas celulares cancerosas y

normales, que permitan establecer la posibilidad del empleo de este tipo de nanocompuestos como una terapia alternativa contra el cáncer.

Limitaciones y fortalezas

Las limitaciones durante el desarrollo del presente estudio fue el tiempo limitado por la crisis de la pandemia generada por el SARS-CoV2 restringiendo de esta manera los ensayos relacionados con la validación de los AgNCs sobre cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas. De la misma manera el tiempo necesario para realizar los ensayos acerca de la citotoxicidad exhibida de los AgNCs en líneas celulares tanto cancerosas como normales.

Las fortalezas de este proyecto incluyen la participación de otros miembros del semillero de Nanomateriales de la Universidad Antonio Nariño que permitieron llevar a buen término algunos de los ensayos propuestos, así como las intervenciones de los profesores relacionados con este proyecto. Pese a todos los inconvenientes enfrentados este proyecto aporta nuevos materiales que permitirían combatir infecciones bacterianas generadas por microorganismos de importancia clínica, así como la posibilidad de emplear los nanocompuestos desarrollados como tratamientos anticancerígenos.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a los directores del proyecto Gladys Angélica Murillo y Javier Rincón, quienes con sus conocimientos me guiaron a través de cada una de las etapas de este proyecto para alcanzar los resultados que buscaba.

En segundo lugar, el desarrollo del trabajo ha sido soportado por el programa de financiación interno de la Universidad Antonio Nariño (UAN), convocatoria interna 2019 (proyecto 2019204). Al igual que al programa de iniciación científica de la cual fue

beneficiaria la estudiante Camila Lota Mendoza en las convocatorias realizadas en 2019-2 y 2018-2 en la modalidad tipo 1 y 2.

Por último, quiero agradecer a todos mis compañeros del semillero de Nanomateriales y al profesor Daniel Llamosa por su asesoría durante el proyecto en el área nanotecnológico. A mi familia, por apoyarme en toda la trayectoria para el desarrollo de este proyecto. En especial, quiero hacer mención a mis padres, que siempre estuvieron ahí para darme palabras de apoyo.

Muchas gracias a todos.

Referencias

- Alejo Riveros, J. C., Cortes Muños, M. S., Correa Lizarazo, D. X., Klotz Ceberio, B., Herrera Arias, F. C., Martínez Galán, J. P., Rey Rodríguez, J. F., & Vanegas López, M. C. (2011). *Evaluación de riesgos de Staphylococcus aureus enterotoxigénico en alimentos reparados no industriales en Colombia* (Issue November). <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Er-staphylococcus.pdf>
- Álvarez, D., Negrón, S., Barrionuevo, J., & Romero, P. (2020). Infecciones Urinarias en pacientes geriátricos por presencia de *Escherichia coli* y *Klebsiella spp* productoras de betalactamasas de espectro extendido Urinary Infections in geriatric patients by presence of *Escherichia coli* y *Klebsiella spp* producers of ex. *FACSalud*, 4, 14–22.
- Arzate, C. (2016). *Efectos de citotoxicidad en microorganismos patógenos expuestos a nanopartículas de plata y óxido de zinc*. 48.
- Barros, G., Melo, C., Oliveira, M., Silva, J., Santos, R., & Oliveira, S. (2020). Impacto financiero de la terapia con antibióticos en la resistencia a múltiples fármacos

- bacterianos en un hospital de emergencia en Pernambuco, Brasil. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 61(2), 121–126. <https://doi.org/10.30827/ars.v61i2.115337>
- Belaroui, L. S., Ouali, A., Bengueddach, A., Lopez Galindo, A., & Peña, A. (2018). Adsorption of linuron by an Algerian palygorskite modified with magnetic iron. *Applied Clay Science*, 164(March), 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2018.03.021>
 - Ben, Y., Fu, C., Hu, M., Liu, L., Wong, M. H., & Zheng, C. (2019). Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. *Environmental Research*, 169(November 2018), 483–493. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.11.040>
 - Botelho, J., Grosso, F., & Peixe, L. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resistance Updates*, 44(April), 100640. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2019.07.002>
 - Calderón, G., & Aguilar, L. (2016). Infectología Resistencia Antimicrobiana: Microorganismos Más Resistentes Y Antibióticos. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXXIII*, 621, 757–763.
 - Cardoso, P. (2016). Nanopartículas de plata: obtención, utilización como antimicrobiano e impacto en el área de la salud. *Rev. Hosp. Niños (B. Aires)*, 58(260), 19–28. <http://revistapediatria.com.ar/wp-content/uploads/2016/04/260-Nanopartículas-de-plata.pdf>
 - Chang, T. Y., Chen, C. C., Cheng, K. M., Chin, C. Y., Chen, Y. H., Chen, X. A., Sun, J. R., Young, J. J., & Chiueh, T. S. (2017). Trimethyl chitosan-capped silver nanoparticles with positive surface charge: Their catalytic activity and antibacterial spectrum including multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. In *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (Vol. 155). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.03.054>

- Changanahui Barrientos, K., Alvarado Iparraguirre, D. E., & Alarcón Cavero, H. A. (2019). Síntesis y caracterización de nanocompuestos Fe₃O₄/Ag: su efecto contra *Enterobacter aerogenes* y *Enterococcus faecalis*. *Revista Colombiana de Química*, 48(2), 33–39. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v48n2.73724>
- 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. <https://doi.org/10.1021/tx500479m>
- Choi, Y. J., Gurunathan, S., & Kim, J. H. (2018). Graphene oxide-silver nanocomposite enhances cytotoxic and apoptotic potential of salinomycin in human ovarian cancer stem cells (OvCSCs): A novel approach for cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3). <https://doi.org/10.3390/ijms19030710>
- Dadfar, S. M., Roemhild, K., Drude, N. I., von Stillfried, S., Knüchel, R., Kiessling, F., & Lammers, T. (2019). Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 138, 302–325. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.01.005>
- Dai, X., Zhao, Y., Li, J., Li, S., Lei, R., Chen, X., Zhang, X., & Li, C. (2018). Thiazolium-derivative functionalized silver nanocomposites for suppressing bacterial resistance and eradicating biofilms. *New Journal of Chemistry*, 42(2), 1316–1325. <https://doi.org/10.1039/c7nj03251j>
- Dakal, T. C., Kumar, A., Majumdar, R. S., & Yadav, V. (2016). *Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles*. 7(November), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01831>
- Daşbaşı, B. (2017). The Fractional-Order mathematical modeling of bacterial

- resistance against multiple antibiotics in case of local bacterial infection. *SAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 21(3), 1–1. <https://doi.org/10.16984/saufenbilder.298934>
- Dey Bhowmik, A., Bandyopadhyay, A., & Chattopadhyay, A. (2019). Cytotoxic and mutagenic effects of green silver nanoparticles in cancer and normal cells: a brief review. *Nucleus (India)*, 62(3), 277–285. <https://doi.org/10.1007/s13237-019-00293-0>
 - Dhafer, C. E. B., Dhahri, M., Mezni, A., & Smiri, L. S. (2018). Surface-enhanced Raman scattering study of PP /Ag nanocomposite developed to prevent postsurgery infection. *Raman Spectrosc*, 7.
 - Díaz, S., Martínez, J., & Colino, C. (2018). *Incorporación de agentes anti-infecciosos en nanopartículas metálicas de oro y quitosan | DÍAZ SÁNCHEZ | FarmaJournal*. <http://revistas.usal.es/index.php/2445-1355/article/view/18645>
 - Echeverri-Toro, L. M., Rueda, Z. V., Maya, W., Agudelo, Y., & Ospina, S. (2012). *Klebsiella pneumoniae* multi-resistente, factores predisponentes y mortalidad asociada en un hospital universitario en Colombia. *Revista Chilena de Infectología*, 29(2), 175–182. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182012000200009>
 - Escobar, A. M., Pizzio, L. R., & P. Romanelli, G. (2018). Catalizadores Magnéticos Basados En Óxidos De Hierro: Síntesis, Propiedades Y Aplicaciones. *Ciencia En Desarrollo*, 10(1). <https://doi.org/10.19053/01217488.v10.n1.2019.8811>
 - Fang, W., Zheng, Q., Fang, Y., & Huang, H. (2019). Facile synthesis of silver-decorated magnetic nanospheres used as effective and recyclable antibacterial agents. *Current Applied Physics*, 19(2), 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.cap.2018.11.008>
 - Freire, P. L. L., Albuquerque, A. J. R., Farias, I. A. P., da Silva, T., Santos Aguiar, J., Galembeck, A., Flores, M. A. P., Sampaio, F. C., Stamford, T. C. M., & Rosenblatt,

- A. (2016). Antimicrobial and cytotoxicity evaluation of colloidal chitosan – silver nanoparticles – fluoride nanocomposites. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 896–903. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.052>
- Fuentes García, J. A., Diaz Cano, A. I., Guillen Cervantes, A., & Santoyo Salazar, J. (2018). Magnetic domain interactions of Fe₃O₄ nanoparticles embedded in a SiO₂ matrix. *Scientific Reports*, 8(1), 2–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23460-w>
 - Gaviria, A., Correa Luis, Davila, C., Burgos, G., & Gomez Carolina. (2018). *Plan nacional de respuesta a la resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/MET/plan-respuesta-resistencia-antimicrobianos.pdf>
 - Ghiuță, I., Cristea, D., Croitoru, C., Kost, J., Wenkert, R., Vyrides, I., Anayiotos, A., & Munteanu, D. (2018). Characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles, biosynthesized using Bacillus species. *Applied Surface Science*, 438, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.09.163>
 - Gonzáles Flores, M. (2017). *Efecto bactericida de nanopartículas de plata y desinfectantes sobre bacterias multirresistentes*. Universidad Autonoma de México.
 - Goyeneche, L. M. (2018). *Determinación del tamaño de rayos X (Determination of particle size by X-Ray diffraction)*. Universidad de Cantabria.
 - Guadarrama-Reyes, S. C. (2013). *Efecto antibacteriano de las nanopartículas de plata versus clorhexidina sobre Streptococcus mutans y Lactobacillus casei*. 151.
 - Gupta, N., Pant, P., Gupta, C., Goel, P., Jain, A., Anand, S., & Pundir, A. (2018). Engineered magnetic nanoparticles as efficient sorbents for wastewater treatment: a review. *Materials Research Innovations*, 22(7), 434–450. <https://doi.org/10.1080/14328917.2017.1334846>
 - Happy Agarwal, Menon, S., Venkat Kumar, S., & Rajeshkumar, S. (2018).

- Mechanistic study on antibacterial action of zinc oxide nanoparticles synthesized using green route. *Chemico-Biological Interactions*, 286(March), 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.03.008>
- Herrera, M. (2018). *Aumentó cifra de bacterias resistentes a los antibióticos en Colombia | La FM*. <https://www.lafm.com.co/salud/en-colombia-se-desperdician-9-millones-de-toneladas-de-alimentos-fao>
 - Hsieh, P. W., Tseng, C. L., & Kuo, D. H. (2015). Preparation of SiO₂-protecting metallic Fe nanoparticle/SiO₂ composite spheres for biomedical application. *Materials*, 8(11), 7691–7701. <https://doi.org/10.3390/ma8115416>
 - Huang, D., Yan, X., Yan, M., Zeng, G., Zhou, C., Wan, J., Cheng, M., & Xue, W. (2018). Graphitic Carbon Nitride-Based Heterojunction Photoactive Nanocomposites: Applications and Mechanism Insight [Review-article]. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(25), 21035–21055. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b03620>
 - IDDEX. (2018). *Guía microbiológica para interpretar la concentración mínima inhibitoria (CMI)*. *Cmi*, 3. <https://www.idexx.es/files/mic-guía-microbiológica-es.pdf>
 - Ivashchenko, O., Woźniak, A., Coy, E., Peplinska, B., Gapinski, J., & Jurga, S. (2017). Release and cytotoxicity studies of magnetite/Ag/antibiotic nanoparticles: An interdependent relationship. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 152, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.01.009>
 - Juhas, M. (2019). Genomic Islands and the Evolution of Multidrug-Resistant Bacteria. *Horizontal Gene Transfer*, 143–153. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21862-1_4
 - Kane, S. N., Mishra, A., & Dutta, A. K. (2017). Magentite nanoparticle for arsenic remotion. *Journal of Physics: Conference Series*, 755(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/755/1/011001>
 - Khan, M. (Ed.). (2018). *Silver Nanoparticles: Fabrication, Characterization and*

Applications (Vol. 1). Croatia.

https://books.google.com.co/books?hl=es&lr=&id=iHuQDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA71&dq=gravity+of+silver+nanocomposites&ots=RxqturpW6N&sig=wZ2_WWCgICxew43mbLy2dRIn9AM&redir_esc=y#v=onepage&q=gravity of silver nanocomposites&f=false

- Kharisov, B. I., Dias, H. V. R., & Kharissova, O. V. (2019). Mini-review : Ferrite nanoparticles in the catalysis. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 1234–1246. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.10.049>
- Kolavekar, S. B., Ayachit, N. H., Jagannath, G., NagaKrishnakanth, K., & Venugopal Rao, S. (2018). Optical, structural and Near-IR NLO properties of gold nanoparticles doped sodium zinc borate glasses. *Optical Materials*, 83(May), 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2018.05.083>
- Kulkarni, S. K. (2015). *Nanotechnology: Principles and Practices* (3rd Editio). Springer International Publishing.
- Lee, D. W., Fatima, H., & Kim, K. S. (2018). Preparation of silica coated magnetic nanoparticles for bioseparation. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 18(2), 1414–1418. <https://doi.org/10.1166/jnn.2018.14888>
- Li, Yan, Qin, T., Ingle, T., Yan, J., He, W., Yin, J. J., & Chen, T. (2017). Differential genotoxicity mechanisms of silver nanoparticles and silver ions. *Archives of Toxicology*, 91(1), 509–519. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1730-y>
- Li, Yanlin, Duan, W., Lu, X., Yang, S., & Wen, X. (2019). Synthesis of strawberry-like Fe₃O₄@SiO₂@Ag composite colloidal particles for constructing responsive photonic crystals. *Optical Materials*, 94(May), 423–429. <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2019.06.002>
- Lindmeier, C. (2018). OMS | Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia

- a los antibióticos en todo el mundo. WHO.
<https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/es/>
- Liu, E., Zhang, M., Cui, H., Gong, J., Huang, Y., Wang, J., Cui, Y., Dong, W., Sun, L., He, H., & Yang, V. C. (2018). Tat-functionalized Ag-Fe₃O₄ nano-composites as tissue-penetrating vehicles for tumor magnetic targeting and drug delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(6), 956–968. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.07.012>
 - Lizarazo Salcedo, C. G., González Jiménez, E. E., Arias Portela, C. Y., & Guarguati Ariza, J. (2018). Nanomateriales: un acercamiento a lo básico Nanomaterials: Being Closer to Basics. In *Nanomateriales: Artículo especial Med Segur Trab (Internet)* (Vol. 64, Issue 251).
 - LLamosa, D. (2018). *Nanomundo* (1st ed.). Universidad Antonio Nariño.
 - Lopez-Carrizales, M., Mendoza-Mendoza, E., Peralta-Rodriguez, R. D., Pérez-Díaz, M. A., Portales-Pérez, D., Magaña-Aquino, M., Aragón-Piña, A., Infante-Martínez, R., Barriga-Castro, E. D., Sánchez-Sánchez, R., Martínez-Castañón, G. A., & Martínez-Gutierrez, F. (2020). Characterization, antibiofilm and biocompatibility properties of chitosan hydrogels loaded with silver nanoparticles and ampicillin: an alternative protection to central venous catheters. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 196. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111292>
 - Lopez-Esparza, J., Francisco Espinosa-Cristobal, L., Donohue-Cornejo, A., & Reyes-Lopez, S. Y. (2016). Antimicrobial activity of silver nanoparticles in polycaprolactone nanofibers against gram-positive and gram-negative bacteria. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 55(49), 12532–12538. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b02300>
 - Masri, A., Anwar, A., Khan, N. A., Shahbaz, M. S., Khan, K. M., Shahabuddin, S., & Siddiqui, R. (2019). Antibacterial Effects of Quinazolin-4(3H)-One Functionalized-

Conjugated Silver Nanoparticles. *Antibiotics*, 4, 19.

- Michael, F., & Christopher, W. (2009). Antibiotics for Emerging Pathogens. *Science*, 325(5944), 1089–1093. <https://doi.org/10.1126/science.1159961>
- Miranda, C. V., & Costa Almeida, R. (2020). A importância do farmacêutico na dispensação e controle de medicamentos classificados como antimicrobianos. *Saúde Multidisciplinar*, 1–12.
- Moghayedi, M., Goharshadi, E. K., Ghazvini, K., Ahmadzadeh, H., Ranjbaran, L., Masoudi, R., & Ludwig, R. (2017). Kinetics and mechanism of antibacterial activity and cytotoxicity of Ag-RGO nanocomposite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 159, 366–374. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.08.001>
- Nabila, M. I., & Kannabiran, K. (2018). Biosynthesis, characterization and antibacterial activity of copper oxide nanoparticles (CuO NPs) from actinomycetes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 15, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.05.011>
- Nayak, D., Ashe, S., Rauta, P. R., Kumari, M., & Nayak, B. (2016). Bark extract mediated green synthesis of silver nanoparticles : Evaluation of antimicrobial activity and antiproliferative response against osteosarcoma. *Materials Science & Engineering C*, 58, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.022>
- Neciosup Zavaleta, C. P., & Ulloa Zavaleta, J. L. (2019). Efecto del porcentaje molar de Ag y temperatura de recocido sobre el tamaño de grno y conductividad eléctrica en películas semiconductoras de ZnO por el método Sol-Gel. In *Lexus* (Vol. 4, Issue None). Universidad Nacional de Trujillo.
- OMS. (2017, September 20). *Un informe de la OMS confirma que el mundo se está quedando sin antibióticos*. 2. <http://www.calvo.qb.fcen.uba.ar/proteinas.htm>
- Ong, C., Lim, J. Z. Z., Ng, C., Li, J. J., Yung, L. L., & Bay, B. (2013). *Silver*

Nanoparticles in Cancer : Therapeutic Efficacy and Toxicity. 772–781.

- Ouahid Hessissen, A. (2016). *Nanotecnología y sus potenciales aplicaciones en microbiología.* Universidad de Sevilla.
- Padilla Cruz, A. L. (2018). *Biosíntesis de nanopartículas bimetálicas (Ag-Fe), caracterización y evaluación de sus propiedades bactericidas.*
- Palem, R. R., Saha, N., Shimoga, G. D., Kronekova, Z., Sláviková, M., & Saha, P. (2017). Chitosan–silver nanocomposites: New functional biomaterial for health-care applications. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 67(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/00914037.2017.1291516>
- Peralta, M. E., Ocampo, S., Funes, I. G., Medina, F. O., Parolo, M. E., & Carlos, L. (2020). Nanomaterials with tailored magnetic properties as adsorbents of organic pollutants from wastewaters. *Inorganics*, 8(4), 1–27. <https://doi.org/10.3390/inorganics8040024>
- Pieretti, J. C., Rolim, W. R., Ferreira, F. F., Lombello, C. B., Nascimento, M. H. M., & Seabra, A. B. (2020). Synthesis, Characterization, and Cytotoxicity of Fe₃O₄@Ag Hybrid Nanoparticles: Promising Applications in Cancer Treatment. *Journal of Cluster Science*, 31(2), 535–547. <https://doi.org/10.1007/s10876-019-01670-0>
- Piras, C. C., Mahon, C. S., & Smith, D. K. (2020). Self-Assembled Supramolecular Hybrid Hydrogel Beads Loaded with Silver Nanoparticles for Antimicrobial Applications. In *Chemistry - A European Journal* (Vol. 26, Issue 38, pp. 8452–8457). <https://doi.org/10.1002/chem.202001349>
- Porenczuk, A., Grzeczkwicz, A., Maciejewska, I., Gołaś, M., Piskorska, K., Kolenda, A., Gozdowski, D., Kopeć-swoboda, E., Granicka, L., & Olczak-kowalczyk, D. (2019). *An initial evaluation of cytotoxicity , genotoxicity and antibacterial effectiveness of a disinfection liquid containing silver nanoparticles alone and combined with a glass-*

- ionomer cement and dentin bonding systems*. <https://doi.org/10.17219/acem/76160>
- Póśniak, M. (2020). *Emerging Chemical Risks in the Work Environment* (TAY, Vol. 1). Taylor & Francis Group. [https://books.google.com.co/books?id=sZ7qDwAAQBAJ&pg=PA9&dq=nanolayers+\(with+one+outer+nano-scale+dimension\),+nanotubes+\(two+outer+nano-scale+dimensions\)+and+nanoparticles+\(three+outer+nano-scale+dimensions\)&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjLvfkub_rAhUsw1kKHYNzAks](https://books.google.com.co/books?id=sZ7qDwAAQBAJ&pg=PA9&dq=nanolayers+(with+one+outer+nano-scale+dimension),+nanotubes+(two+outer+nano-scale+dimensions)+and+nanoparticles+(three+outer+nano-scale+dimensions)&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjLvfkub_rAhUsw1kKHYNzAks)
 - Puentes, V. (2015). Uso de nanopartículas de hierro en la digestión anaeróbica, una revolución que multiplica exponencialmente la producción de biogás . [https://www.Retema.Es/](https://www.retema.es/).
 - Rajeev, L. (2018). Antibiotic Discovery. *Materials and Methods*, 8. <https://doi.org/10.13070/mm.en.8.2671>
 - Reyes, P. (2012). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de cobre y óxido de cobre y su incorporación en una matriz polimérica y el estudio de sus propiedades anti bacterianas* [Centro de investigación en química aplicada]. [https://ciqa.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1025/166/1/Pamela Yajaira Reyes Rodriguez maestria.pdf](https://ciqa.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1025/166/1/Pamela_Yajaira_Reyes_Rodriguez_maestria.pdf)
 - Ruiz, M., Cermeño, C., & Benites, E. (2019). Magnetite nanoparticles for reduction of hexavalent chrome in soil of an industrial park, Cerro Colorado - Arequipa. *Journal of Nanotechnology*, 3(1), 12–17.
 - Sánchez, E. P., Núñez, D., Cruz, R. O., Torres, M. A., & Herrera, E. V. (2017). Simulación y Conteo de Unidades Formadoras de Colonias. *ReCIBE*, 6(1), 97–111. <http://recibe.cucei.udg.mx/revista/es/vol6-no1/pdf/computacion06.pdf>
 - Sánchez Lerma, L., Pavas Escobar, N. C., Rojas Guloso, A., & Pérez Gutiérrez, N. (2016). Infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina adquirido en

la comunidad en pacientes de Villavicencio, Colombia. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 68(1), 0–0.

- Shah, A., Ali Buabeid, M., Arafa, E. S. A., Hussain, I., Li, L., & Murtaza, G. (2019). The wound healing and antibacterial potential of triple-component nanocomposite (chitosan-silver-sericin) films loaded with moxifloxacin. *International Journal of Pharmaceutics*, 564(April), 22–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.04.046>
- Silva Calpa, L. de R., Correia, T. O. F., Netto Ferreira, J. C., Kuriyama, S. N., Letichevsky, S., & de Avillez, R. R. (2020). Stable and highly active zero-valent iron-nickel nanofilaments/silica for the hexavalent chromium reduction. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 14, 100332. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100332>
- Silva Santos, K., Barbosa, A. M., Da Costa, L. P., Pinheiro, M. S., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira Padilha, F. (2016). Silver nanocomposite biosynthesis: Antibacterial activity against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Molecules*, 21(9), 1–7. <https://doi.org/10.3390/molecules21091255>
- Singh, M. K., & Mehata, M. S. (2019). Phase-dependent optical and photocatalytic performance of synthesized titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. *Optik*, 193(June), 163011. <https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2019.163011>
- Sobhani-Nasab, A., Zahraei, Z., Akbari, M., Maddahfar, M., & Hosseinpour-Mashkani, S. M. (2017). Synthesis, characterization, and antibacterial activities of ZnLaFe₂O₄/NiTiO₃ nanocomposite. *Journal of Molecular Structure*, 1139, 430–435. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.03.069>
- Ssekatawa, K., Byarugaba, D. K., Kato, C. D., Ejubi, F., Tweyongyere, R., Lubwama, M., Kirabira, J. B., & Wampande, E. M. (2020). Nanotechnological solutions for

- controlling transmission and emergence of antimicrobial-resistant bacteria, future prospects, and challenges: a systematic review. *Journal of Nanoparticle Research*, 22(5). <https://doi.org/10.1007/s11051-020-04817-7>
- Suslick, K. S., Didenko, Y., Fang, M. M., Hyeon, T., Kolbeck, K. J., McNamara, W. B., Mdeleleni, M. M., & Wong, M. (1999). Acoustic cavitation and its chemical consequences. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 357(1751), 335–353. <https://doi.org/10.1098/rsta.1999.0330>
 - Travieso, M., Rubio, A., Corzo, M., & Pino, O. (2018). *Nanopartículas de plata obtenidas a partir del extracto residual de la hidrodestilación de Thymus vulgaris L. y su efecto sobre Xanthomonas phaseoli pv. phaseoli*. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522018000300007
 - Tung, L. M., Cong, N. X., Huy, L. T., Lan, N. T., Phan, V. N., Hoa, N. Q., Vinh, L. K., Thinh, N. V., Tai, L. T., Ngo, D. T., Mølhav, K., Huy, T. Q., & Le, A. T. (2016). Synthesis, characterizations of superparamagnetic Fe₃O₄-Ag hybrid nanoparticles and their application for highly effective bacteria inactivation. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(6), 5902–5912. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.11029>
 - Valderrama, S., González, P., Caro, M., Ardila, N., Ariza, B., Gil, F., & Álvarez, C. (2016). Factores de riesgo para bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos adquirida en un hospital colombiano. *Biomédica: Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 36.
 - Vallabani, N. V. S., & Singh, S. (2018). Recent advances and future prospects of iron oxide nanoparticles in biomedicine and diagnostics. *3 Biotech*, 8(6), 1–23. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1286-z>
 - Vellore, T., & Nadu, T. (2016). *Cytotoxic Effect on Cancerous Cell Lines by*

Biologically Synthesized Silver Nanoparticles. 59(December), 1–8.

- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 40(4), 277–283. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25859123>
- Veprek, S., & Veprek-Heijman, M. G. J. (2012). Limits to the preparation of superhard nanocomposites: Impurities, deposition and annealing temperature. *Thin Solid Films*, 522, 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2012.08.048>
- Vera Nuñez, L. del C., & Tamo Cornejo, J. O. (2018). *Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de plata (AgNPs) CON *Thelypteris glandulosolanosa* (RAQUI-RAQUI) y evaluación de su efecto anticancerígeno en línea celular de cáncer de mama MCF-7*.
- Wang, K., Ji, Q., Li, H., Guan, F., Zhang, D., Feng, H., & Fan, H. (2017). Synthesis and antibacterial activity of silver@carbon nanocomposites. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 166, 64–67. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.11.002>
- Yano, T., Tsuchimoto, Y., Zaccaria, R. P., Toma, A., Portela, A., & Hara, M. (2017). Enhanced optical magnetism for reversed optical binding forces between silicon nanoparticles in the visible region. *Optics Express*, 25(1), 431. <https://doi.org/10.1364/oe.25.000431>
- Yuan, Y. G., & Gurunathan, S. (2017). Combination of graphene oxide-silver nanoparticle nanocomposites and cisplatin enhances apoptosis and autophagy in human cervical cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 6537–6558. <https://doi.org/10.2147/IJN.S125281>
- Zhang, L., Wu, L., Si, Y., & Shu, K. (2018). Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles to *Azotobacter vinelandii*: Growth inhibition, cell injury, oxidative stress and internalization. *PLoS ONE*, 13(12), 1–18.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209020>

- Zhao, L., Li, H., Zhu, Z., Wakefield, M. R., Fang, Y., & Ye, Y. (2017). Genomic sequencing of a strain of *Acinetobacter baumannii* and potential mechanisms to antibiotics resistance. *Infection, Genetics and Evolution*, 50, 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.02.001>
- Ziabka, M., Dziadek, M., & Pielichowska, K. (2020). Surface and structural properties of medical acrylonitrile butadiene styrene modified with silver nanoparticles. *Polymers*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/polym12010197>