



**Universidad Nacional Autónoma de
México**

**Facultad de Estudios Superiores
Cuautitlán**

"DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES *IN VITRO*
DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC Y
NANOPARTÍCULAS DE PLATA COMO AGENTES
"BIOCIDAS" FRENTE A *Escherichia coli*,
Pseudomonas aeruginosa, *Staphylococcus aureus* y
Candida albicans"

T e s i s

Que para obtener el título de:

Química Farmacéutica Bióloga

P r e s e n t a n:

Azeneth Barrera Vargas

Melissa Rosas Ramírez

**Asesores: Dr. Andrés Romero Rojas
QFI. Andrea Becerril Osnaya**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El desarrollo de este proyecto se realizó en el laboratorio de Biología Molecular ubicado en la planta baja de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, bajo la asesoría del Dr. Andrés Romero Rojas y de la M en C Andrea Becerril Osnaya, con apoyo del Dr. David Díaz de la Facultad de Química UNAM.

Agradecemos el apoyo en este proyecto a:

Dr. Andrés Romero Rojas y a **M en C Andrea Becerril Osnaya** por todo su apoyo, consejos y asesoría en este trabajo.

Dr. David Díaz y a su grupo de investigadores por la donación de las Nanopartículas de Óxido de Zinc y las Nanopartículas de Plata utilizadas en esta tesis.

Dr. Eliseo Hernández B. Jefe del laboratorio de Microscopia Electrónica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y especialmente a la **M en C Sofía González** por su apoyo en microscopia electrónica.

Los **sinodales** por su ayuda y consejos, ya que ello nos permitió concluir este trabajo.

Dra. María Rosa Ávila Costa Jefa del laboratorio de Neuromorfología de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala y especialmente al **Técnico Jesús Espinoza Villanueva** por el apoyo en microscopia electrónica.

Q. Alejandra Ávila Miranda Jefa de Planta de BIORAD, **Q. Esteban Salazar Nova** QUINSA, S.A., **Q. Víctor Gil** por la donación de material y reactivos para el desarrollo y termino de este proyecto.

A mi familia:

Por su apoyo, cariño y paciencia enormes, especialmente a mi mamá por todo el amor y comprensión que me has brindado siempre.

Te quiero.

A mis asesores:

Por su paciencia y conocimientos invaluableles que nos condujeron a terminar esta tesis.

Melissa R.R.

A mis padres y hermana:

Porque me enseñaron a luchar por mis sueños a pesar de las adversidades. Sin ustedes esto no sería posible.

Gracias por creer en mí.

A mis asesores:

Por su paciencia y conocimientos invaluableles que nos condujeron a terminar esta tesis.

Azeneth B.V.

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
I. ÍNDICE DE FIGURAS.	3
II. ÍNDICE DE TABLAS.	6
III. LISTA DE ABREVIATURAS.	7
IV. RESUMEN.	9
1.0. INTRODUCCIÓN.	10
1.1. Antimicrobianos.	10
1.1.1. Compuestos de Plata.	12
1.1.2. Compuestos de Zinc.	13
1.1.3. Derivados de biguanidas y amidinas.	14
1.2. Nanotecnología.	16
1.2.1 Nanopartículas de plata.	17
1.2.2 Nanopartículas de Óxido de Zinc.	18
1.3 Microscopia. Microscopio electrónico de transmisión (MET).	20
2.0. GENERALIDADES DE LOS MICROORGANISMOS.	22
2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	22
2.2. <i>Candida albicans</i>	28
2.3. <i>Escherichia coli</i>	33
2.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
3.0. ANTECEDENTES.	39
4.0. JUSTIFICACIÓN.	42
5.0. HIPOTESIS.	43
6.0. OBJETIVOS.	44
6.1. Objetivo general.	44
6.2. Objetivos particulares.	44
7.0. MATERIALES.	45
8.0. METODOS.	48
8.1. Cepas.	48
8.2. Nanopartículas.	48
8.3. Medio de cultivo.	49
8.4. Controles.	49

8.5. Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana.	50
8.5.1. Método Kirby-Bauer-Difusión por disco.	50
8.5.2. Prueba de Dilución en caldo.	51
8.5.3. Método de Recuento en placa.	54
8.6. Microscopia Electrónica.	56
8.6.1. Tinción negativa.	56
9.0. DIAGRAMA DE FLUJO.	57
10.0. RESULTADOS.	58
10.1. Método Kirby-Bauer-Difusión por disco.	59
10.1.1. <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	59
10.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6568	62
10.1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25853	64
10.1.4. <i>Candida albicans</i> ATCC 14083	66
10.2. Prueba de Dilución en caldo.	68
10.3. Método de Recuento en placa.	76
10.4. Microscopia Electrónica.	77
10.4.1. <i>Escherichia coli</i>	77
10.4.2. <i>Candida albicans</i>	81
10.4.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	82
10.4.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	85
11.0. DISCUSIÓN.	87
12.0. CONCLUSIONES.	94
V. BIBLIOGRAFÍA.	95

I. ÍNDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1 Estructura química de Gluconato de Clorhexidina (www.drugs.com/pro/chlorhexidine.html)	14
Figura 2 Micrografía en HR-TEM de Nanopartículas de Citrato de Plata y 2-Etilenhexanoato de Plata en DMSO. (Rodríguez, G.G., et al. 2002)	18
Figura 3 Micrografía de HR-TEM de Nanopartículas de Óxido de Zinc de una estructura cúbica, obtenida por hidrólisis de Ciclohexanobutirato de Zinc. (Rodríguez, G.G., et al. 2003).	18
Figura 4 Figura 4. Diagrama del Microscopio óptico y microscopio electrónico de transmisión (http://www.educa.aragob.es)	20
Figura 5 Microscopio electrónico de transmisión (http://www.cecyt15.ipn.mx)	21
Figura 6 <u><i>Staphylococcus aureus</i></u> (http://es.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus)	22
Figura 7 Tinción de Gram de <u><i>Staphylococcus aureus</i></u> . (http://es.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus)	23
Figura 8 Cultivo en agar de <u><i>Candida albicans</i></u> (http://es.wikipedia.org/wiki/candidiasis)	28
Figura 9 Desarrollo de <u><i>Candida albicans</i></u> , con aspecto blancuzco, sobre lesiones bucales de Sarcoma de Kaposi (http://es.wikipedia.org/wiki/candidiasis)	30
Figura 10 Bacilo de <u><i>Escherichia coli</i></u> por Microscopio electrónico de barrido (http://es.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli .)	33
Figura 11 <u><i>Escherichia coli</i></u> fotografía de microscopio electrónico de transmisión. (http://es.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli)	33
Figura 12 <u><i>Pseudomonas aeruginosa</i></u> al microscopio de barrido (http://es.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas)	36
Figura 13 <u><i>Pseudomonas aeruginosa</i></u> fotografía por microscopía electrónica de transmisión (http://es.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas)	36
Figura 14 Distribución de unidiscos para el método de difusión por disco.	38
Figura 15 Placa de cultivo de 96 pozos con fondo en U donde se indica la distribución y repetición de cada antimicrobiano, para establecer su efecto biocida a diferentes concentraciones sobre los diferentes microorganismos.	39
Figura 16 Preparación de diluciones sucesivas para prueba de recuento en placa.	41
Figura 17 Porcentaje de inhibición de <u><i>Escherichia coli</i></u> en prueba de dilución en caldo.	70

Figura 18	Porcentaje de inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> en prueba de dilución en caldo.	70
Figura 19	Porcentaje de inhibición de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en prueba de dilución en caldo.	71
Figura 20	Porcentaje de inhibición de <i>Candida albicans</i> en prueba de dilución en caldo.	72
Figura 21	Porcentaje de inhibición de los cuatro microorganismos de interés clínico en prueba de dilución en caldo.	72
Figura 22	Porcentaje de inhibición de cada concentración de Nanopartículas para <i>Staphylococcus aureus</i> .	73
Figura 23	Porcentaje de inhibición de cada concentración de Nanopartículas para <i>Escherichia coli</i> .	74
Figura 24	Porcentaje de inhibición de cada concentración de Nanopartículas para <i>Candida albicans</i> .	74
Figura 25	Porcentaje de inhibición de cada concentración de Nanopartículas para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	75
Foto 1	<i>Escherichia coli</i> frente a las Nanopartículas de plata en la prueba de difusión por disco.	60
Foto 2	<i>Escherichia coli</i> frente a las Nanopartículas de Óxido de Zinc en la prueba de difusión por disco.	61
Foto 3	<i>Staphylococcus aureus</i> frente a Nanopartícula de Plata en la prueba de difusión por disco.	62
Foto 4	<i>Staphylococcus aureus</i> frente a Nanopartículas de Óxido de Zinc en la prueba de difusión por disco.	63
Foto 5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente a Nanopartículas de Plata en la prueba de difusión por disco.	64
Foto 6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente a Nanopartículas de Óxido de Zinc en la prueba de difusión por disco.	65
Foto 7	<i>Candida albicans</i> frente a Nanopartículas de Plata en prueba de difusión por disco.	66
Foto 8	<i>Candida albicans</i> frente a Nanopartículas de Óxido de Zinc en la prueba de difusión por disco.	67
Foto 9	Imagen de MET de <i>Escherichia coli</i> frente a NPs de Óxido de Zinc, la cual presenta daño en la pared celular en el ápice de la bacteria.	77
Foto 10	(a) Micrográfica de MET de <i>Escherichia coli</i> frente a NPs de plata, cuya pared celular presenta daño celular caracterizado por la acción de Nanopartículas metálicas, como son la presencia de picos (indicadores de la internalización del nanomaterial) (b) y la aparición de hoyos (c).	78

Foto 11	(a)Micrografía de MET de <i>Escherichia coli</i> frente a Nanopartículas de Óxido de Zinc donde se muestra la formación de uniones entre dos bacilos, propiedad presentada en esta bacteria al exponerla frente a las NPs. (b); (c) y (d) la ampliación del microorganismo permite distinguir las Nanopartículas metálicas pegadas a la superficie, sin embargo no se puede establecer una internalización al no presentar un daño significativo en la pared celular.	79
Foto 12	Imagen de MET de Nanopartículas de Óxido de Zinc sobre una superficie cristalina presente en cultivo de <i>Candida albicans</i> ; (b) y (c) imagen magnificada de la estructura cristalina donde es posible identificar NPs pegadas a lo largo de la superficie.	81
Foto 13	(a)Ampliación de la micrográfica de MET de la pared celular intacta de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente a Nanopartículas de Ag (b) presencia de NPs cercanas a la pared celular de la bacteria.	82
Foto 14	Imagen de MET de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente a Nanopartículas de plata, en la cual no se ve un daño aparente en la pared celular	83
Foto 15	(a)Micrografía de MET de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente a Nanopartículas de Óxido de Zinc después de 24 hr de contacto. (b) Ampliación de la imagen donde se aprecia la presencia de cúmulos de Nanopartículas unidos a la superficie bacteriana. Sin embargo no es posible apreciar un daño en la superficie.	84
Foto 16	(a) Micrográfica de MET de <i>Staphylococcus aureus</i> (racimo) frente a Nanopartículas de Óxido de Zinc; (b) y (c) imágenes magnificadas donde es posible distinguir las estructuras de las Nanopartículas cercanas a la estructura bacterial, la cual no presenta un daño en su morfología.	85
Foto 17	Micrografía de MET de <i>Staphylococcus aureus</i> sin tratamiento.	86

II. ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1	Clasificación científica <i>Staphylococcus aureus</i> 22
Tabla 2	Clasificación científica <i>Candida albicans</i> 28
Tabla 3	Clasificación científica <i>Escherichia coli</i> 33
Tabla 4	Clasificación científica <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 36
Tabla 5	Cepas de estudio frente a los diferentes antimicrobianos 37
Tabla 6	Prueba de difusión en disco, donde se indica los diferentes antimicrobianos y sus concentraciones a probar frente a los diferentes microorganismos. 38
Tabla 7	Pruebas bioquímicas de identificación para cada microorganismo 58
Tabla 8	Inhibición de <i>Escherichia coli</i> frente a diferentes concentraciones de Nanopartículas de Plata en la prueba de difusión en disco 60
Tabla 9	Inhibición de <i>Escherichia coli</i> frente a diferentes concentraciones de Nanopartículas de óxido de zinc en la prueba de difusión por disco. 61
Tabla 10	Inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> frente a diferentes concentraciones de Nanopartículas de Plata en la prueba de difusión en disco. 62
Tabla 11	Inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> frente a diferentes concentraciones de NPs de Óxido de Zinc en la prueba de difusión en disco. 63
Tabla 12	Inhibición de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente a diferentes concentraciones de Nanopartículas de Plata en la prueba de difusión en disco. 64
Tabla 13	Inhibición de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente a diferentes concentraciones de Nanopartículas de Óxido de Zinc en la prueba de difusión en disco. 65
Tabla 14	Inhibición de <i>Candida albicans</i> frente a diferentes concentraciones de Nanopartículas de Plata en placas en la prueba de difusión en disco. 66
Tabla 15	Inhibición de <i>Candida albicans</i> frente a diferentes concentraciones de NPs de Óxido de Zinc en la prueba de difusión en disco. 67
Tabla 16	Porcentajes de inhibición en prueba de dilución en caldo. 68
Tabla 17	Porcentajes de inhibición de cada concentración de Nanopartículas por especie para la prueba de dilución en caldo. 69
Tabla 18	Porcentajes de inhibición en la prueba de recuento en placa. 76

III. LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
μm	Micrómetros
μM	Micromolar
A/E	Attaching and effacing /Adherencia y Destrucción
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Plata
Ag ⁺	Ion Plata
Ag (ethex)	Plata 2-etilhexanoato
AgNO ₃	Nitrato de plata
AgSD	Sulfadiazina de plata
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Types Culture Collection/ Colección Americana de cultivos tipo
BaCl ₂	Cloruro de Bario
BFP	Bundle Forming Pilus
CIM	Concentración mínima inhibitoria
DGE	Dietilenglicol
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
ECEA	<u><i>Escherichia coli</i></u> enteroagregativa
ECEH	<u><i>Escherichia coli</i></u> entero hemorrágica o verotoxigénica
ECEI	<u><i>Escherichia coli</i></u> enteroinvasiva
ECET	<u><i>Escherichia. coli</i></u> enterotoxigénica
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay / Ensayo Inmuno Enzimatico Absorbente
EPEC	<u><i>Escherichia coli</i></u> enteropatógena
EPON	Resina Epoxi de Bisfenol
H ₂ SO ₄	Acido sulfúrico
Hep-2	Heterohaploide-2
HR-TEM	Microscopio electrónico de transmisión de alta resolución
IMVIC	Indol, Rojo de Metilo, Vogues Proskauer y Citratos
LPS	Lipopolisacaridos
MET	Microscopio electrónico de transmisión
MH	Mueller Hinton
ml	Mililitros
M.O	Microorganismo
MR	Rojo de metilo
NaCl	Cloruro de sodio
NCCLS	Nacional Comite for Clinical Laboratory Standards/Comité Nacional de pruebas de laboratorio clínico

-NH ₂	Grupo Nitrilo
nm	Nanómetros
NPs	Nanopartículas
O/F	Oxido / Fermentativo
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PSA	Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana
P/V	Peso/ volumen
rpm	Revoluciones por minuto
S	Desviación estándar
SEM	Scanning Electrón Microscope / Microscopio electrónico de barrido
SD	Sulfadiazina
-SH	Grupo Sulfidrilo
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SSF	Solución salina fisiológica
SST	Síndrome del shock toxico
UFC	Unidades formadoras de colonias
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VP	Vogues Proskauer
Zn	Zinc
ZnO	Oxido de Zinc
ZnSO ₄	Sulfato de Zinc
β	Beta

IV. RESUMEN

Reportamos el estudio preliminar del efecto biocida e internalización de Nanopartículas de Oxido de Zinc y Nanopartículas de Plata en los microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Las PSA se realizaron en medio Mueller Hinton (MH), en placas de agar y sistema líquido, con diferentes concentraciones de las nanopartículas metálicas. Los resultados en PSA por recuento en placa demostraron que los microorganismos presentan una inhibición en su crecimiento, alcanzando porcentajes significativos de inhibición a concentraciones de 1×10^{-6} y 1×10^{-5} M, esto para ambas nanopartículas (NPs). Respectivamente estas nanopartículas presentaron un uso limitado como material biocida en PSA sobre sistemas líquidos, al disminuir la estabilidad coloidal. El análisis por microscopio electrónico de transmisión (MET) fue usado para caracterizar el daño causado por el nanomaterial sobre la pared celular. El análisis demostró cambios morfológicos sobre la pared bacteriana caracterizada por la presencia de picos y hoyos, debido a la acumulación de NPs sobre la superficie bacteriana.

1.0. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTIMICROBIANOS

La resistencia a los antimicrobianos plantea una amenaza grave y cada vez mayor para la salud pública en el mundo, que involucra cada día nuevas especies bacterianas y nuevos mecanismos de resistencia (39).

Algunas de las bacterias con amplia resistencia antimicrobiana son: Enterobacterias (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*), bacilos no fermentadores (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Enterococcus* (16, 21, 31).

Los fenómenos de resistencia antimicrobiana más importantes son:

- Elaboración de enzimas hidrolizantes
- Modificación del sitio de acción o blanco del antibiótico
- Disminución de la permeabilidad de la pared celular al ingreso del antimicrobiano
- Activo flujo del antibiótico hacia el exterior de la célula sin modificaciones.

El problema de resistencia antimicrobiana se hace aún mayor cuando un microorganismo puede presentar más de un mecanismo de resistencia y tienen la facultad de transmitirlo a su descendencia mediante mecanismos de conjugación o transducción (16).

En la actualidad hay una gran variedad de antimicrobianos que actúan como agentes biocidas (agentes químicos de amplio espectro que inactivan a microorganismos); agentes desinfectantes (agentes capaces de matar microorganismos patógenos de un material y pueden presentar efectos tóxicos

sobre tejido vivo) y como agentes antisépticos, (agentes de baja toxicidad hacia tejidos vivos en que se aplican pero matan a los microorganismos presentes) (35).

Las sustancias con actividad antimicrobiana tienen grados variables de actividad sobre los diferentes grupos de microorganismos, clasificándolos en tres categorías según su potencia y efectividad:

- Desinfectantes de bajo nivel

Destruye la mayor parte de las formas vegetativas bacterianas, tanto grampositivas como gramnegativas, algunos virus con envoltura lipídica y hongos levaduriformes, pero no *Mycobacterium spp.*, ni las esporas de bacterias.

- Desinfectantes de nivel intermedio

Inactivar todas las formas bacterianas vegetativas, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*, la mayoría de los virus con o sin envoltura y hongos filamentosos, pero no destruyen necesariamente las esporas bacterianas.

- Desinfectantes de alto nivel

Consiguen destruir todos los microorganismos, excepto algunas esporas bacterianas.

En la actualidad, también se clasifican según el grupo químico al que pertenecen, tal es el caso de los derivados de metales pesados y algunos derivados de biguanidas (35). Entre los metales pesados usados por su actividad antimicrobiana se encuentran principalmente los derivados de sales de mercurio (timerosal y merbromin), las sales de plata (nitrato de plata, sulfadiazina de plata), los compuestos de cobre y los compuestos de zinc (35, 37, 40, 42,44). De los derivados de biguanidas se encuentra principalmente la clorhexidina (2, 49, 50).

1.1.1 Compuestos de plata

Los compuestos de plata tienen acción principalmente sobre bacterias Gram positivas y menor frente a Gram negativas. Son especialmente activos contra *Staphylococcus* y *Pseudomonas*. Además, han mostrado buena actividad antifúngica y antiviral. El mecanismo de acción de la plata está estrechamente relacionado a la interacción de los iones plata con grupos sulfidrilo (-SH), esta actividad antimicrobiana va a depender de la acumulación intracelular de bajas concentraciones de iones plata, que interactúan con las enzimas, proteínas y ácidos nucleicos produciendo cambios estructurales en la pared celular bacteriana, membranas y ácidos nucleicos afectando su viabilidad (35). También se ha comprobado que llegan a unirse a grupos fosfatos, carboxilo y $-NH_2$ (2).

- Nitrato de plata

Las sales de nitrato de plata ($AgNO_3$) son potentes antimicrobianos que destruyen la mayor parte de microorganismos en forma rápida a una concentración del 1%. La Ag^+ del $AgNO_3$ interactúa con los grupos -SH de enzimas y proteínas, precipitando las proteínas del protoplasma bacteriano, produce salida de iones potasio intracelular, inhibe la división celular, causa anomalías en la pared celular bacteriana e interfiere con los ácidos nucleicos. También puede unirse a grupos fosfatos, carboxilo y $-NH_2$.

Por su acción coagulante de las proteínas puede ser irritante, astringente o cáustico, según su concentración. Utilizada tópicamente tiene una acción bactericida. A gran concentración se emplea para la eliminación de verrugas. A concentración de 0.5 % pueden ser utilizados para prevenir infecciones en quemaduras e infecciones oculares. La solución de $AgNO_3$ al 1:1000 de uso oftálmico se utiliza para la prevención de la oftalmia del recién nacido, debida por lo general a *Neisseria gonorrhoeae* adquirida en el paso por el canal del parto. La solución al 2% resulta útil

para tratar eczemas agudos (húmedos). Es frecuente emplearlo, como antiséptico local, en pomada que contiene 15% de plata coloidal. En las presentaciones de coloides orgánicos de plata, los iones Ag^+ se van liberando lentamente. Tienen efectos bacteriostáticos y encuentran su principal aplicación en oftalmología (19, 22, 26, 37).

- Sulfadiazina de plata

La sulfadiazina de plata (AgSD) es esencialmente la combinación de dos agentes antimicrobianos: Ag^+ y sulfadiazina (SD). Se usa como antibiótico para las quemaduras y heridas. El mecanismo de acción de la AgSD no ha sido completamente dilucidado. Inhibe la síntesis de ácido fólico y coenzimas de ácido fólico requeridas para la síntesis de precursores de ADN y ARN (pirimidinas y purinas), destruye a la bacteria por interferencia con la síntesis de la pared celular. Las sulfonamidas bloquean la formación de ácido paraaminobenzoico, los iones Ag^+ interfieren relativamente en forma no específica con un número de enzimas, incluyendo algunas involucradas en la síntesis de la pared celular de la bacteria. La AgSD posee una extensa actividad sobre bacterias Gram positivas (*S. aureus*) y la mayoría de Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*) y posee actividad antifúngica (*C. albicans*). Los estudios *in vitro* han demostrado que la AgSD puede inhibir bacterias resistentes a otros agentes antimicrobianos (2, 35, 37).

1.1.2 Compuestos de zinc

Otro de los metales pesados más utilizados es el Zinc, cuyas sales son agentes astringentes, corrosivos y antisépticos, se pueden usar en polvo, pomadas y lociones. Como Sulfato de Zinc ($ZnSO_4$) generalmente se presenta en polvo o gránulos blancos, inodoros y solubles en agua al 30%. Los fomentos $ZnSO_4$ al 1:1000 se emplean en casos de impétigo contagioso, ectima, furunculosis y dermatitis agudas infectadas secundariamente. El mecanismo de acción de estos compuestos consiste

en precipitar las proteínas e inhibir los grupos sulfidrilos de las células de tejidos y bacterias. La materia orgánica y el suero disminuyen la efectividad de los antisépticos de este grupo (3, 5).

1.1.3 Derivados de biguanidas y amidinas

En este grupo se encuentra básicamente a la clorhexidina (Figura 1), la cual es un antiséptico bisbiguanídico de molécula simétrica compuesta de dos anillos clorofenólicos, y dos grupos de biguanida conectados por un puente central de hexametileno. Este compuesto es una base fuerte y dicatiónica a niveles de pH de más de 3.5, con dos cargas positivas en cada extremo del puente de hexametileno. La naturaleza dicatiónica de la clorhexidina la hace extremadamente interactiva con los aniones, lo cual es relevante para su eficacia, seguridad y efectos secundarios locales.

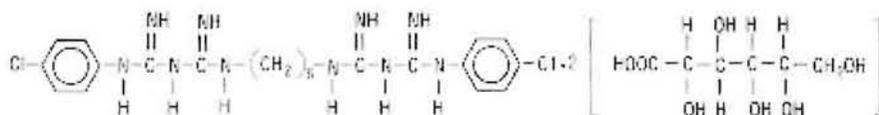


Figura 1. Estructura química de Gluconato de Clorhexidino (www.drugs.com/pro/chlorhexidine.html)

Las características claves en relación con la muerte de bacterias por parte de la acción de la clorhexidina se resumen básicamente en tres mecanismos:

1. Absorción. Es absorbido por el microorganismo debido a la carga negativa de su pared celular. La cantidad absorbida, depende de la concentración utilizada, a mayor concentración mayor será la acción sobre los microorganismos.
2. Daña las barreras de permeabilidad en la pared celular. La absorción conduce a una alteración de la movilidad electroforética de la pared y de su intercambio iónico, originando trastornos metabólicos en las bacterias.

3. Precipitación proteica en el citoplasma bacteriano. La clorhexidina después de actuar sobre los componentes de la membrana bacteriana, ocasiona y facilita una disociación de los componentes intracelulares, logrando una precipitación e inactivación de sus procesos reproductivos y vitales (49, 50).

Se ha demostrado que su absorción por difusión pasiva a través de las membranas, es extraordinariamente rápida tanto en bacterias, como en levaduras, consiguiéndose el efecto máximo en 20 segundos. A bajas concentraciones produce una alteración de la permeabilidad osmótica de la membrana (salida de potasio y fósforo celular) y una inhibición de enzimas del espacio periplásmico. A concentraciones altas origina la precipitación de proteínas, contenido citoplasmático y ácidos nucleicos. Su acción se debe a la molécula catiónica que se adhiere a los complejos microbianos y a las paredes de las bacterias cargadas negativamente alterando de esta manera el equilibrio osmótico de las células. (54, 55).

Posee un amplio espectro de acción. Las bacterias Gram positivas son más sensibles que las Gram negativas, algunas cepas de *Proteus sp* y *Pseudomonas sp* son menos susceptibles (22, 23). No es esporicida, aunque inhibe el crecimiento de las esporas, y su acción sobre *Micobacterias* es bacteriostática, si bien se muestran, en general, altamente resistentes. No actúa sobre los virus sin cubierta, como *Rotavirus* y *Poliovirus*, aunque si inactiva virus con cubiertas lipídicas como el Virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y *Herpes virus*. La formación de la película adquirida sobre la superficie de mucosas evita la adhesión bacteriana.

Otra propiedad importante de la clorhexidina es su elevada substantividad (es la asociación prolongada entre un material y un sustrato) favoreciendo la liberación del agente en forma lenta al medio, prolongando así su efecto hasta por 12 hr (2, 35, 49, 51, 54).

1.2. NANOTECNOLOGÍA

Actualmente el desarrollo, uso y manejo de procedimientos de nuevos materiales posee un alto impacto sobre diversas actividades importantes en las sociedades, como son medicina, protección de medio ambiente, manufactura, energía, transporte y recreación; entre otras muchas. La nueva tecnología basada en el desarrollo de nuevos materiales y nuevas aplicaciones de los materiales tradicionales es de gran éxito en los países avanzados, ya que le ha permitido alcanzar el liderazgo económico mundial (52).

Aunque la nueva tecnología se puede volver obsoleta rápidamente en ciertas áreas frente a las nuevas tecnologías, los procesos bien establecidos de fabricación de materiales se seguirán aplicando y siempre habrá diferencias en la manera como se utilicen.

Un claro ejemplo de esta tecnología es la nanotecnología, que involucra nuevos métodos de síntesis, producción y aplicación sobre procesos bien establecidos de fabricación de materiales tradicionales así como avanzados; además incluye la búsqueda de nuevas aplicaciones de dichos materiales y procesos para su obtención.

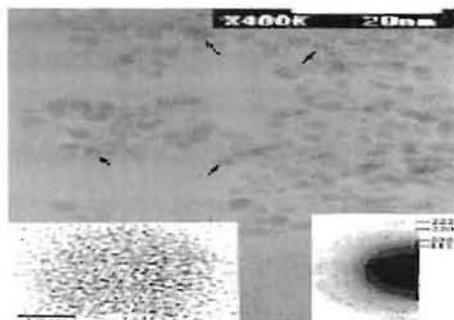
Por tanto la nanotecnología realiza investigaciones para el desarrollo de nuevos materiales y la mejor aplicación de los ya existentes. El programa es un medio que puede asegurar a un país alcanzar los beneficios del avance científico y tecnológico, y estos lleguen a extenderse a toda la sociedad. Este lo ha tomado en cuenta la UNAM, que actualmente se encuentra desarrollando nuevos métodos de síntesis para la obtención de materiales de tamaño nanométrico, logrando un número de materiales metálicos de tamaño nanoscópico en estado coloidal, tales como nanopartículas de plata y zinc, con altas posibilidades de aplicación en la medicina.

De esta forma la nanotecnología nos habré nuevas expectativas sobre la lucha y prevención de enfermedades usando la escala atómica de los materiales, siendo prometedor y efectivo el uso de nanomateriales metálicos con propiedades antimicrobianas. Su alta efectividad se a sus nuevas características: las partículas metálicas de un tamaño nanométrico exhiben propiedades físicas muy diferentes a las que puede presentar un ion, como el aumento en su actividad, dadas por un lado al gran volumen de superficie y otro a sus estructuras cristalográficas; ambas características aumenta la interacción con superficies u organismos y por tanto su actividad sobre estos (40).

1.2.1 Nanopartículas de plata

La nanotecnología promete beneficios de todo tipo, entre ellas las aplicaciones médicas nuevas o más eficientes. En esta área las aplicaciones más usadas comercialmente a escala mundial son las nanopartículas metálicas (fabricadas para cambiar las propiedades que tienen esos elementos a mayor tamaño o combinarlas con otros materiales otorgándole nuevas propiedades) y las nanocápsulas de diferentes materiales; ambas pueden funcionar como pequeños contenedores de sustancias para una liberación controlada.

Entre los materiales metálicos, se encuentra la plata y sus derivados. Dentro de los diferentes métodos para la obtención de dispersiones coloidales esta el método por reducción el cual es uno de los más simples y económicos (32). Este método es empleado en la Facultad de Química de la UNAM para la obtención de nanopartículas de plata.



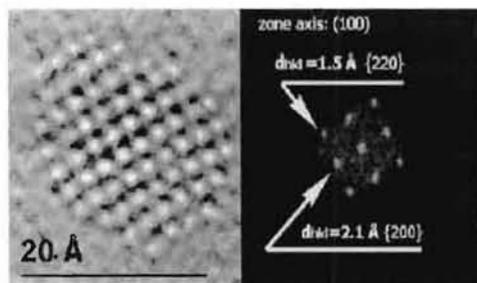
La reducción espontánea de plata 2-etilhexanoato [Ag (ethex)] toma lugar en dimetil sulfoxido (DMSO) en temperatura ambiente. La reacción es lenta y depende, marcadamente, de la temperatura predominante en la formación de nanopartículas de plata (Figura 2) (32).

Figura 2. Micrografía en HR-TEM de Nanopartículas de Citrato de Plata y 2-Etilhexanoato de Plata en DMSO (Rodríguez, G.G., et al. 2002)

Por medio del microscopio electrónico de transmisión (MET) las Nanopartículas de Plata muestran un tamaño de distribución centrado en 4.4 nm de diámetro ($S=1.2$) (Figura 2) (32).

1.2.2 Nanopartículas de Óxido de Zinc

Las Nanopartículas de Oxido de Zinc (ZnO) presentan excelente actividad antibacterial y existen varios métodos que permite su obtención, entre ellas esta la hidrólisis espontánea de Zinc.



Las Nanopartículas de Oxido de Zinc se obtienen por disolución de sal hidratada de carboxilato de zinc (ciclohexanobutilato o acetato) en un solvente aprótico polar básico como dimetilsulfóxido (DMSO) o *N,N*-dimetilformamida (DMF) en temperatura ambiente (33).

Figura 3. Micrografía de HR-TEM de Nanopartículas de Oxido de Zinc de una estructura cúbica, obtenida por hidrólisis de Ciclohexanobutilato de Zinc (Rodríguez, G.G., et al. 2003).

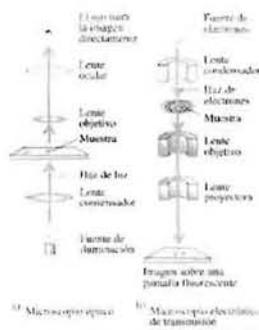
Rodríguez G.G., *et al* (2003) encontraron que por hidrólisis espontánea a una concentración baja de ciclohexanobutirato de Zinc (2×10^{-4} M) y el acetato de zinc se producían nanocristales de un tamaño promedio entre 2.12 nm ($S= 0.76$) y 3.0nm ($S=0.5$), respectivamente (Figura 3) (33).

1.3 MICROSCOPIA. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN (MET)

La observación de objetos pequeños ha sido uno de los desafíos que el hombre a tenido que enfrentarse y, sin lugar a dudas, el Microscopio de Transmisión (MET) ha figurado entre las principales herramientas que le han permitido alcanzar este objetivo, especialmente al realizar estudios de escala manométrica.

El microscopio electrónico de transmisión, a diferencia del microscopio óptico, no se encuentra limitado por la longitud de onda de la luz visible, pues utiliza electrones para iluminar el objeto incrementando su potencia amplificadora.

El MET disponen de un cañón de electrones, el cual emite los electrones que chocan contra el espécimen, creando una imagen aumentada. Se utilizan lentes magnéticas para crear campos que dirigen y enfocan el haz de electrones, ya que las lentes convencionales utilizadas en los microscopios ópticos no funcionan con los electrones. El sistema funciona en un ambiente de vacío, el que constituye una parte relevante del microscopio electrónico, pues los electrones pueden ser desviados por las moléculas del aire. Por último, cuenta con un sistema que registra o muestra la imagen que producen los electrones (Figura 4).



Debido a que el haz de electrones tiene una longitud de onda mucho menor que la de la luz pueden mostrar estructuras muy pequeñas, logrando aumentos de un objeto hasta un millón de veces, escala de nm. Para utilizar un microscopio electrónico de transmisión la muestra debe tener un grosor no mayor a un par de miles de ángstroms.

Figura 4. Diagrama del Microscopio óptico y microscopio electrónico de transmisión (<http://www.educa.aragob.es>)

Las partes principales de un microscopio electrónico son:



Figura 5. Microscopio electrónico de transmisión (<http://www.cecy115.ipn.mx>)

- Cañón de electrones, que emite los electrones que chocan contra el espécimen, creando una imagen aumentada.
- Lentes magnéticas para crear campos que dirigen y enfocan el haz de electrones, ya que las lentes convencionales utilizadas en los microscopios ópticos no funcionan con los electrones.
- Sistema de vacío es una parte muy importante del microscopio electrónico. Debido a que los electrones pueden ser desviados por las moléculas del aire, se debe hacer un vacío casi total en el interior de un microscopio de estas características.
- Placa fotográfica o pantalla fluorescente que se coloca detrás del objeto a visualizar para registrar la imagen aumentada.
- Sistema de registro que muestra la imagen que producen los electrones, que suele ser una computadora (Figura 5) (56).

2.0. GENERALIDADES DE LOS MICROORGANISMOS.

2.1 Staphylococcus aureus.

El Staphylococcus aureus es una bacteria que se encuentra en la piel y fosas nasales de las personas sanas, causa gran variedad de infecciones, desde complicaciones menores de la piel (forúnculos, ampollas, vejigas) y abscesos cutáneos; hasta enfermedades que pueden poner en peligro la vida como neumonía, meningitis, endocarditis, síndrome del shock toxico (SST) y sepsis (16, 23). Su clasificación científica se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación científica Staphylococcus aureus

Reino:	Bacteria
Filo:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	Bacillales
Familia:	Staphylococcaceae
Género:	<u>Staphylococcus</u>
Especie:	<u>Staphylococcus aureus</u>

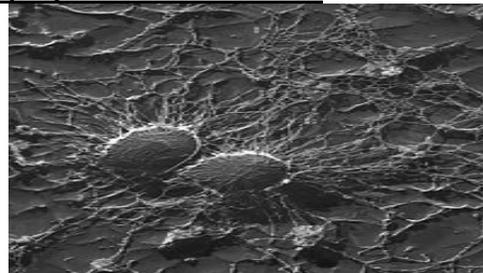


Figura 6. Staphylococcus aureus
(http://es.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus)

La forma de cocos tiende a ser de tamaño mucho mas uniforme que los otros tipos morfológicos de bacterias, tienen un diámetro aproximado de 1 μm , típicamente son casi perfectos en su forma esférica (Figura 6). Su característica morfológica más obvia es la notable tendencia a presentarse como masas de células, aparentando racimos (de ahí su raíz "Staphylo"). Ello es consecuencia de una división celular en tres planos, junto a la tendencia de las células hijas de permanecer en estrecha proximidad para crear el aspecto característico. Estos grumos irregulares son tridimensionales, hecho manifiesto al examinar preparaciones frescas, pero en los frotis teñidos usualmente los grumos están aplanados creando el aspecto de láminas irregulares de células. Los estafilococos son bacterias no motiles, no forman esporas, pilis ni flagelos, no parecen tener cápsulas excepto en el caso de las variedades mucoides pueden sobrevivir tanto en condiciones aeróbicas como anaerobias (48, 53).

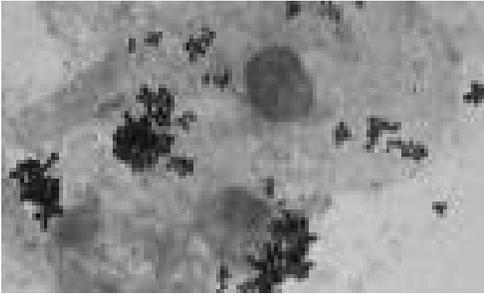


Figura 7. Tinción de Gram de *Staphylococcus aureus*.

(http://es.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus)

Estas bacterias se tiñen fácil e intensamente con los colorantes básicos de la tinción de Gram (cristal violeta) y son fuertemente Gram positivas (Figura 7), aunque en ciertas ocasiones se puede observar alguna Gram negativa.

Los estafilococos son relativamente más resistentes al calor, y hasta cierto grado, a desinfectantes, que las formas vegetativas de la mayor parte de las bacterias.

Mientras casi todas las bacterias mueren entre 30 a 60 minutos, los estafilococos soportan temperaturas mayores de 80° C hasta por una hora. También son resistentes a la desecación, y pueden conservarse infecciosos por periodos prolongados y capaces de crecer en concentraciones relativamente altas de cloruro de sodio.

Como todos los microorganismos fuertemente Gram positivos los estafilococos son sensibles a la actividad bacteriostática del trifenilmetano y otros colorantes, y son característicamente sensibles a los antibióticos eficaces para bacterias Gram positivas incluyendo penicilina, y los de amplio espectro como tetraciclinas. Son especialmente propensos a desarrollar resistencia a medicamentos, algunas de estas generalizaciones no son aplicables a cultivos puros de estafilococos recién aislados.

Son capaces de fermentar lentamente varios tipos de carbohidratos, produciendo ácido láctico pero no gas, también se forman pequeñas cantidades de etanol y bióxido de carbono, aunque como la fermentación de los azúcares usuales y alcoholes polihídricos es irregular. Se considera que la fermentación de manitol tiene significación diferencial porque lo fermentan la mayor parte de las cepas coaguladas positivas (53).

Crece eficazmente bajo condiciones aeróbicas en la mayoría de los medios bacteriológicos usuales de extracto de carne y peptona, pero lo hacen de manera más profusa en agar sangre que se usa por lo común para aislar formas. Estos crecen rápidamente a 37°C pero tienden a formar pigmentos con mayor facilidad a temperatura ambiente (20°C). Las colonias en medio sólido son redondeadas, uniformes, sobresalientes y resplandecientes.

Contienen proteínas y polisacáridos antigénicos lo cual permite a las cepas agruparse limitadamente. Los ácidos teicoicos (polímeros de glicerol o ribitol fosfato) enlazados a los peptidoglucanos de la pared celular pueden ser antígenos. La proteína de superficie puede interferir con la fagocitosis. Muchas de las sustancias extracelulares producidas por el estafilococo actúan de igual manera como antígenos.

Debido a que las pruebas serológicas han brindado resultados poco útiles en la identificación de las cepas, esta puede realizarse por medio de la tipificación de fagos. Este método está basado en la lisis del organismo realizada por una o más series de bacteriófagos específicos. De manera que la susceptibilidad del bacteriófago (tipo de fago) es una característica genética estable, basada en la superficie de los receptores.

Factores de patogenicidad:

- Adhesina: Es una sustancia proteica que favorece al anclaje de las bacterias a la membrana citoplasmática de las células de los tejidos.
- Coagulasa: Esta enzima se correlaciona con el 97% de las cepas de *S.aureus* y se considera la prueba tipo para identificar esta especie, actúa transformando el fibrinógeno en fibrina formando una capa sobre la bacteria que le protege de la fagocitosis.

- Lipasas: Son varias enzimas que actúan sobre diferentes substratos (aceites, grasas, ceras, etc.) que le permiten colonizar áreas de la piel con altas concentraciones de estas enzimas.
- Hialuronidasa: Esta enzima actúa sobre el ácido hialurónico, presente en la unión de las células de los tejidos, favoreciendo así la difusión de la bacteria en los tejidos.
- Estafiloquinasa: Es una fibrinolisisina activa el plasminógeno, lo transforma en plasmina y este actúa sobre la fibrina rompiendo enlaces peptídicos que lisan la fibrina.
- Nucleasa: Enzima que tiene propiedades endonucleotídicas y exonucleotídicas, puede actuar sobre el ADN y el ARN produciendo licuación del material, es un factor de difusión.
- Toxina alfa o hemolisina alfa: Toxina con acción hemolítica sobre eritrocitos de diferentes especies, lesiona las plaquetas y es dermonecrotica.
- Toxina beta o esfingomielinasa: Actúa sobre la esfingomielina de la membrana de los eritrocitos produciendo hemólisis en frío y en calor.
- Toxina delta o hemolisina delta: Es hemolítica lesiona linfocitos, plaquetas y neutrófilos.
- Toxina gamma o hemolisina gamma: Produce lisis de eritrocitos de diferentes especies.
- Leucocidina: Produce lisis de polimorfonucleares y de macrófagos, pero no de otras poblaciones de leucocitos ni eritrocitos.
- Enterotoxinas: Se han identificado a la fecha 7 diferentes toxinas que se denominan, A, B C1, C2, D, E y F, producen intoxicación o envenenamiento por la ingestión de alimentos contaminados por *S. aureus* que la producen (aproximadamente el 30%) El cuadro clínico aparece a las 4 u 8 hrs. de la ingestión y se caracteriza por nauseas, vómitos, diarrea y cólicos
- Exfoliatina: Toxina que actúa específicamente a nivel de la piel produciendo separación del estrato granuloso de la epidermis, desprendiéndose la piel.

- Exotoxinas pirógenas: Se han identificado tres diferentes sustancias pirógenas que se denominan A, B y C las tres producen fiebre de diferentes intensidades.
- Dermonecrotina: Como ya indica el nombre, esta toxina produce necrosis cutánea. Ha sido demostrada experimentalmente en el conejo y se produce en infecciones naturales de dermatitis del perro (45, 46, 47).

Excepto en el caso de neumonías estafilocócicas, estos microorganismos penetran en el cuerpo a través de la piel íntegra o cuando se rompe esta barrera por un traumatismo. Al parecer la vía de infección en la piel íntegra serían los folículos pilosos o conductos de glándulas sudoríparas. Las infecciones estafilocócicas suelen asumir forma localizada, con un foco de infección purulenta parcial o totalmente aislado de los tejidos circundantes. Este puede limitarse o diseminarse por vía sanguínea para causar focos secundarios de infección en cualquier tejido u órgano donde puedan alojarse las bacterias. En ocasiones, la infección puede asumir una forma bacteriémica fulminante.

En el hombre son causantes de:

Infecciones cutáneas

Las infecciones más comunes son las que afectan la piel y las estructuras anexas: furúnculos, ántrax, foliculitis, piodermitis, impetigo ampollar y síndrome de la piel escaldada.

Una toxina que afecta la piel es la exfoliatina. El cuadro que ocasiona recibe el nombre de síndrome de la piel escaldada, de observación frecuente en los niños. Suele comenzar como un eritema alrededor de la boca y la nariz y se extiende hacia el cuello el tronco y extremidades. Pocas horas después la piel aparece denudada, a medida que se desprenden capas de la epidermis como consecuencia de una necrólisis.

Infecciones profundas

Se pueden desarrollar infecciones más extensas y profundas a partir de infecciones cutáneas o de una exposición a fuentes exógenas. El recién nacido hospitalizado puede producir una neumonía o una septicemia fatal.

Los pacientes que han recibido agentes quimioterápicos, especialmente por vía oral, pueden desarrollar una enteritis estafilocócica, ya que eliminan la flora bacteriana intestinal normal proporcionando al estafilococo endógeno la posibilidad de multiplicarse en forma irrestricta.

Intoxicación alimentaria

Los estafilococos también interfieren en el tipo más prevalente de intoxicación alimentaria. En sentido estricto no se trata de una infección. Ciertas cepas de estafilococos liberan una exotoxina termoestable en los alimentos (*enterotoxina*). La ingestión de esta causa entre 2 y 8 hrs. después, un cuadro caracterizado por vómitos, diarrea y postración. Raras veces es fatal (16, 23, 53).

2.2. Candida albicans

Las especies de Candida son hongos unicelulares o levaduras. Aunque su poder patógeno es conocido desde la época de Hipócrates, su interés creciente comienza a partir de 1940 con la introducción de la antibioticoterapia. El principal representante del grupo es la Candida albicans aunque otras muchas especies son fuente bien documentada de infecciones, especialmente en los pacientes inmunodeficientes (16, 23). Su clasificación científica se presenta en la tabla 2:

Tabla 2. Clasificación científica Candida albicans

Reino:	Fungi
Filo:	Ascomycota
Subfilo	Saccharomycotina
Clase:	Saccharomycetes
Orden:	Saccharomycetales
Familia:	Saccharomycetaceae
Género:	<u>Candida</u>
Especie:	<u>Candida albicans</u>



Figura 8. Cultivo en agar de Candida albicans (<http://es.wikipedia.org/wiki/candidiasis>)

Las candidiasis constituyen un grupo de infecciones causada por un hongo oportunista que puede tener expresión cutánea, gastrointestinal, sistema respiratorio y genitales del género Candida, de los cuales Candida albicans es la más frecuente

Estos hongos están siempre presentes en la piel y en la mucosa del tracto digestivo, genitourinario y respiratorio de la mayoría de las personas, pero se encuentran controlados por otros microorganismos no patógenos. Cuando se produce un desequilibrio, el aumento desmedido de la población de hongos produce esta u otras micosis.

Al microscopio se observa como células redondeadas, ovales (3-7 μm de diámetro) o gemantes las cuales quedan unidas para formar pseudomicelios o se alargan para

formar micelio. La especie *Candida albicans*, produce tubos germinativos. En agar Sabouraud crece formando colonias blancas, blandas, cremosas, lisas (Figura 8) (23).

Los tres efectos patogénicos de los hongos que le dan importancia médica son: micotoxicosis, enfermedades de hipersensibilidad y la colonización de los tejidos. Refieren esta última como la forma principal por la cual *Candida albicans* provoca su acción patógena en el hombre y los animales.

La adherencia de *C. albicans* es el primer paso en la colonización e invasión de los tejidos mucocutáneos, la cual es probablemente mediada por la interacción de las glucoproteínas de superficie de la levadura con la célula epitelial del hospedero. Luego se produce la aparición de tubos germinativos, micelio o pseudomicelio los cuales penetran directamente en la célula epitelial. La adherencia continúa con la producción de enzimas hidrofílicas como proteinasas, fosfatasas y fosfolipasas. Una vez dentro de la célula epitelial los hongos proliferan. Generalmente las especies de *Candida* que no se adhieren son no patógenas (45, 46, 47).

La presencia de *Candida albicans* en determinados procesos infecciosos, está dada por la existencia de ciertos factores predisponentes, los cuales se mencionan a continuación:

- Daño en la integridad de la piel por maceración de sus tejidos, heridas, abrasión por quemaduras térmicas o químicas y por presencia de catéteres vasculares.
- Alteración de la barrera mucocutánea por diabetes, uso de agentes antimicrobianos, irritación por incidencia de humo, uso de drogas citotóxicas, corticoides, realización de vagotomía resultando un aumento del pH gástrico, entubaciones nasogástricas o diafragmas.
- Disminución del número de células fagocitarias como resultado de leucemia, granulomatosis, aplicación de radiaciones o quimioterapia contra el cáncer.

- Defectos intrínsecos en las funciones de las células fagocitarias como resultado de enfermedades granulomatosas crónicas y deficiencia de mieloperoxidasa.
- Alteración de la función fagocitaria causada por uremia, enfermedades virales y el uso de corticoides y agentes antimicrobianos como aminoglucósidos y sulfamidas.

Las formas clínicas de la candidiasis son:

Candidiasis genital: El cuadro clínico se caracteriza por una leucorrea blanca, espumosa, grumosa, de aspecto viscoso muy pruriginoso que recubre la pared de la vagina y el endocervix; la mucosa de la zona se encuentra eritematosa. Se halla con frecuencia durante el embarazo y mujeres diabéticas por aumento de la glucosa en los tejidos y en los pacientes con tratamientos prolongados con antibióticos como la tetraciclina y los aminoglucocidos que eliminan las bacterias normales de la vagina. La balanopostitis o balanitis es una lesión en el pene y en el surco balanoprepucial (adherencia interna de la mucosa al prepucio) con eritema y placas blanquecinas.



Candidiasis oral: (*algodoncillo, muget o sapillo*) Se caracteriza por la presencia de placas pseudomembranosas blanquecinas cremosas que pueden recubrir la lengua, mucosa oral y en ocasiones afecta la comisura labial. Se ve con frecuencia en recién nacidos de madres con infecciones vaginales que se infectan al paso por el canal del parto, en pacientes en estadio terminal de enfermedades caquetizantes, tales como los carcinomas y en ancianos que padecen de enfermedades debilitantes (Figura 9).

Figura 9. Desarrollo de *Candida*, con aspecto blancuzco, sobre lesiones bucales de Sarcoma de Kaposi
(<http://eswikipedia.org/wiki/candidiasis>)

La esofagitis por lo general proviene de la candidiasis oral. Se observan lesiones semejantes a las orales.

Intertrigo: Se produce en los pliegues de inflexión de la piel de dos superficies que se rozan donde se acumula la humedad (sudor) y aumenta la maceración. La localización más frecuente son los pliegues axilares, submamarios, inguinales, intergluteos, perianales e interdigitales de las manos y pies. Los pacientes más afectados son obesos y diabéticos. Las lesiones se caracterizan por formar placas erimatoescamosa con bordes bien definidos, son húmedas y en ocasiones aparecen escamas o costras. Los síntomas son prurito y ardor. Las candidiasis por rozadura del pañal son semejantes a las de intertrigo.

Onicomocis por *Candida*: Lesión en la uña y en el reborde de la misma (paroniquia). La uña incrementa de grosor, se opaca y oscurece y a veces aparecen estrías. En el reborde de la uña hay inflamación, edema, dolor y puede producirse expulsión de pus. Aparecen en personas que mantienen con frecuencia sus manos húmedas por largos períodos.

Granulomas: Se presentan en cualquier parte de la piel, dando lugar a lesiones verrucosas, vegetantes que pueden ulcerarse. Es una forma clínica rara. Se ve en niños inmunosuprimidos o en adultos con diabetes descompensada.

Candidiasis mucocutánea crónica: Es casi exclusiva de niños con defectos genéticos o en la función del Timo que los llevan a alteraciones en la inmunidad celular. Las lesiones abarcan todo el cuerpo y las mucosas y en la piel son granulomatosas. Es muy difícil de curar y gran parte de estos pacientes no llegan a edad adulta, ya que se produce invasión a todos los órganos del cuerpo.

Candidiasis urinaria: Observada en pacientes diabéticos, con catéteres y trastornos con los corticoides. Puede afectar el riñón, dando manifestaciones de pielonefritis, o localizarse en la vejiga y en la uretra produciendo Polaquiuria, dolor vesícula y manifestaciones de uretritis.

Candidiasis sistémica profunda: Son poco frecuentes, tiene mala respuesta al tratamiento y se produce por invasión sanguínea. Entre la candidiasis sistémica profunda tenemos a la candidiasis broncopulmonar, la endocarditis y la meningoencefalitis (16, 23).

La septicemia ocurre en pacientes con inmunosupresión severa de la inmunidad humoral y celular. Un ejemplo de lo anterior es el Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida (SIDA), donde se pueden presentarse todas las formas descritas de las candidiasis, aunque las más frecuentes son: la oral esofágica, cutánea y genital.

Pruebas de identificación de especies de Candida:

- o Formación de tubo germinativo en suero, clara de huevo etc.
- o Auxograma o asimilación de carbohidratos.
- o Zimograma o fermentación de carbohidratos.
- o Microcultivos en agar maíz arroz.
- o Producción de velo en medio Sabouraud líquido.
- o Utilización del sistema API 20 C Biomeriux (23).

2.3. Escherichia coli

Se encuentra generalmente en los intestinos animales (incluido el humano) y por ende en las aguas negras. Fue descrita por primera vez en 1885 por *Theodor von Escherich*, bacteriólogo alemán, quién la denominó Bacterium coli. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de Escherichia coli, en honor a su descubridor. Es una bacteria utilizada frecuentemente en experimentos de genética y biotecnología molecular (16, 23). La tabla 3 muestra su clasificación científica:

Tabla 3. Clasificación científica <u>Escherichia coli</u>	
Reino:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gamma Proteobacteria
Orden:	Enterobacteriales
Familia:	Enterobacteriaceae
Género:	<u>Escherichia</u>
Especie:	<u>Escherichia coli</u>

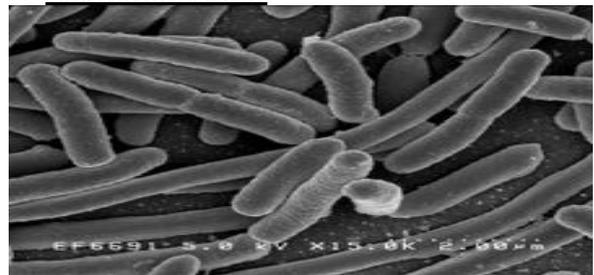


Figura10. Bacilo de Escherichia coli por Microscopio electrónico de barrido (http://eswikipedia.org/wiki/Escherichia_coli.)

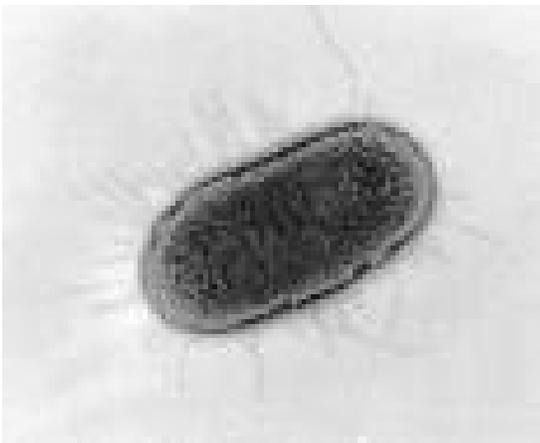


Figura11. Escherichia coli fotografía de microscopio electrónico de transmisión. (http://eswikipedia.org/wiki/Escherichia_coli)

Escherichia coli es un bacilo (Figura 10) que reacciona negativamente a la tinción de Gram, es anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo)(Figura 11), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa, su prueba de IMVIC +++ (Indol, Rojo de Metilo es positivo y Vogues Proskauer y Citrato negativos).

***Escherichia coli* O157:H7**

Escherichia coli O157:H7 es una de cientos de cepas de *E. coli*. Aunque la mayoría de las cepas son inocuas y viven en los intestinos de los seres humanos y animales saludables, esta cepa produce una potente toxina y puede ocasionar una enfermedad grave.

E. coli O157:H7 fue reconocida inicialmente como causa de enfermedad en 1982 durante un brote de diarrea aguda con sangre; el brote determinó que se debía a hamburguesas contaminadas. Desde entonces, la mayoría de las infecciones han provenido de comer carne de vacuno molida insuficientemente cocinada.

Se diferencia de las otras *Escherichia coli* en que no fermenta el sorbitol, no crece a 44 °C y no produce β -glucuronidasa.

La combinación de letras y números en el nombre de la bacteria se refiere a los marcadores específicos que se encuentran en su superficie y la distingue de otros tipos de *E. coli* (23).

Se distinguen seis cepas según su poder patógeno:

- *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) es el agente causal predominante de diarrea en niños que viven en países en vía de desarrollo. ECEP interacciona con las células epiteliales produciendo una lesión histopatológica característica conocida como "adherencia / destrucción" o lesión A/E (*attaching and effacing*). En la producción de la lesión A/E por ECEP, se observan cambios importantes en el citoesqueleto de la célula hospedera, los cuales incluyen la acumulación de actina polimerizada formando una estructura parecida a una copa o pedestal. La adherencia inicial está relacionada a la producción de la fimbria BFP (*Bundle Forming Pilus*), el cual se requiere para la producción de diarrea por ECEP.

- *E. coli* enterotoxigénica (ECET) Su toxina se parece mucho a la de *Vibrio cholerae*, se adhiere a la mucosa del intestino delgado, no la invade, y elabora toxinas que producen diarrea. No hay cambios histológicos en las células de la mucosa y muy poca inflamación. Produce diarrea no sanguinolenta en niños y adultos, sobre todo en países en vías de desarrollo, aunque los desarrollados también se ven afectados.
- *E. coli* enteroinvasiva (ECEI) Es inmóvil, no fermenta la lactosa. Invade el epitelio intestinal causando diarrea sanguinolenta en niños y adultos. Libera el calcio en grandes cantidades impidiendo la solidificación ósea, produciendo artritis y en algunos casos arterioesclerosis.
- *E. coli* entero hemorrágica o verotoxigénica (ECEH) Produce verotoxinas que actúan en el colon. Sus síntomas son: primero colitis hemorrágica, luego síndrome uremico hemolítico (lo anterior más infección del riñón, posible entrada en coma y muerte), y por último, púrpura trombocitopénica trombótica (lo de antes más infección del sistema nervioso central).
- *E. coli* enteroagregativa (ECEA) Los estudios realizados sobre la capacidad adherente de la *E. coli* a células heteroaploides (HEp-2) muestran que, además de la adherencia localizada, existen otros dos mecanismos: uno llamado difuso, que se produce cuando las bacterias se unen al citoplasma celular, y otro agregativo, que se forma cuando las bacterias se acumulan en forma de empalizada tanto en la superficie celular como en el vidrio de la preparación (16, 23, 45, 46, 47).

2.4. *Pseudomonas aeruginosa*.

El género *Pseudomonas* incluye especies que se han transformado extensamente en especies clínicas, debido a su resistencia a muchos antimicrobianos, incluyendo agentes aleatorios. Entre ellas están la *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 12) que normalmente es un patógeno ocasional; pero en la práctica médica, causa considerables problemas infecciosos (53). Su clasificación se presenta en la tabla 4:

Tabla 4. Clasificación científica *Pseudomonas aeruginosa*

Reino:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gamma Proteobacteria
Orden:	Pseudomonadales
Familia:	Pseudomonadaceae
Género:	<u><i>Pseudomonas</i></u>
Especie:	<u><i>Pseudomonas aeruginosa</i></u>

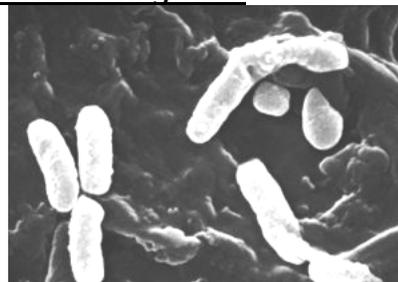


Figura 12. *P. aeruginosa* al microscopio de barrido (<http://eswikipedia.org/wiki/Pseudomonas>)

Pseudomonas aeruginosa es un bastón recto o curvado; mide de 0.5 a 1.0µm por 1.5 a 4.0µm.; posee uno o más flagelos polares (Figura 13); un miembro del grupo es permanentemente inmóvil, otros, producen flagelo lateral en adición al polar, es Gram negativo, no forma endosporas o envoltura y la energía producida durante el metabolismo es respiratoria (16, 21).

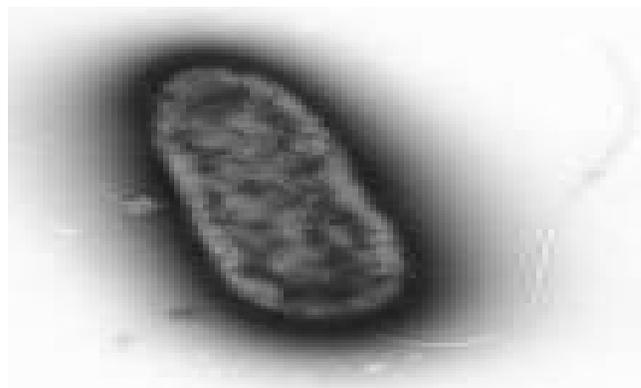


Figura 13. *Pseudomonas aeruginosa* fotografía por microscopía electrónica de transmisión (<http://eswikipedia.org/wiki/Pseudomonas>)

Como otras *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* secreta una variedad de pigmentos, como piocianina (azul verdoso), fluoresceína (amarillo verdoso fluorescente), y piorubina (rojo pardo). *P. aeruginosa* es frecuentemente y preliminarmente identificada por su apariencia perlada y su olor a nueces *in vitro*. La identificación definitiva clínica de *P. aeruginosa* frecuentemente incluye identificar la producción de ambas piocianina y fluoresceína, así como su habilidad de crecer a 42°C. *P. aeruginosa* es capaz de crecer en combustible diesel y kerosene, donde se conoce su utilización de un carbohidrato, causando estragos de corrosión microbiana; y creando una gelatina oscura inapropiadamente llamada "alga" (16, 23).

El término *Pseudomonas* significa 'falsa unidad', procede del griego *Pseudo*, que significa "falso", y *monas*, que significa unidad "simple". El nombre fue usado inicialmente en la historia de la microbiología como sinónimo de gérmenes. *Aeruginosa* es el nombre latino para el cardenillo u 'óxido de cobre'. Esto describe el pigmento azul verdoso bacteriano, visto en los cultivos de laboratorio de *P. aeruginosa*. La biosíntesis de piocianina es regulada por mecanismos homeostáticos, como en un biofilme asociada a la colonización de *P. aeruginosa* en los pulmones de los pacientes con fibrosis quística.

P. aeruginosa es un patógeno oportunista en individuos inmunocomprometidos; infecta el tracto pulmonar, el urinario, tejidos, heridas, y también causa otras infecciones de sangre. *Pseudomonas* puede causar neumonías, necesitando a veces ayuda mecánica para superar dichas neumonías, siendo uno de los más comunes agentes aislados en muchos estudios. La piocianina es un factor de virulencia de la bacteria y se ha conocido que puede hasta causar muerte por estrés

oxidativo. Sin embargo, la investigación indica que el ácido salicílico puede inhibir la producción de piocianina. La fibrosis quística está también predispuesta a la infección con *P. aeruginosa* de los pulmones. Es el causante de dermatitis, causada por disminución del control de la calidad del agua de bebida y el más común causante de altas fiebres en infecciones (16, 23, 57).

P. aeruginosa es frecuentemente aislada de sitios no estériles (boca, esputo, y demás) y en esas circunstancias, frecuentemente representa una colonización, sin infección. Su aislamiento de especímenes no estériles debería interpretarse con cautela y el aviso del microbiólogo o el médico infectólogo deberían corroborarse antes del comienzo del tratamiento. Cuando es aislada de sitios estériles (sangre, hueso, colecciones profundas), debe tomarse con mucha seriedad y en la mayoría de los casos requiere tratamiento rápido.

3.0. ANTECEDENTES

En el mercado ya existen cerca de 475 productos que usan nanotecnología. Sin embargo, el estudio de nanomateriales con propiedades bactericidas surge recientemente debido a la aparición de nuevas cepas resistentes de bacterias a los antibióticos (40).

Avalos, J (2006) estableció el efecto antibacterial de nanocristales de Óxido de Zinc y Silicio luminiscente a través de una curva de crecimiento de *Escherichia coli* y *Corynebacterium xerosis*, señalando la susceptibilidad de los microorganismos a cada uno de los compuestos; encontrando total inactividad celular a las 4 horas de incubación con los bactericidas. *Zhigang, H., et al (2006)* utilizaron una mezcla de Nanopartículas de Óxido de Zinc y Quitosán, en ácido acético diluido, sobre telas de algodón. Mediante técnicas de espectrofotometría de luz visible-ultravioleta y difracción de rayos X demostraron una notable actividad antibacterial contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Sukdeb, P., et al (2007)* establecieron la relación de la actividad antibacterial de Plata con el tamaño de la Nanopartícula, principalmente en bacterias Gram negativas, como fue el caso de *E. coli*, concluyendo que a menor tamaño mayor será su acción biocida. *Brayner, R. et al (2006)*, reportaron el efecto biocida y la internalización de Nanopartículas de ZnO en *E. coli*. Las nanopartículas sintetizadas en medio dietilenglicol (DEG) a partir de sales de Zn^{2+} fueron caracterizadas mediante el uso de MET y Rayos X. *E. coli*, observada por MET después del contacto con las Nanopartículas presentó desorganización en su triple membrana por acumulación de NPs en su superficie provocando así el aumento en la permeabilidad y por ende la lisis de las células. *Kumar, G.S., et al (2006)* establecen que las NPs menores de 20 nm de diámetro son más efectivas para atacar las proteínas de membrana, que

aquellas que poseen un diámetro mayor. Sintetizaron Nanopartículas de Plata a partir de la reducción de Sales de AgNO_3 obteniendo NPs entre 10 y 4 nm de diámetro. Por espectrofotometría fluorescente se establece que a menor tamaño de diámetro mayor será la interacción con la superficie de las bacterias provocando inhibición en el crecimiento (inactivación de síntesis de proteínas y ADN) y muerte celular. Por análisis de MET demostraron la presencia de perforaciones en la pared celular y la formación de "picos"; características que presentan las células al exponerse con NPs de Ag.

Morones, J.R., et al (2006) enfatiza la importancia de la nanotecnología contra la lucha de enfermedades mediante la utilización de materiales metálicos nanométricos 1-100nm contra las bacterias Gram negativas, demostrando el efecto antibacterial mediante microscopia electrónica. También *Morones* en 2005 realiza una revisión de 2001 al 2004 de las propiedades antimicrobianas de los metales principalmente la Plata, las cuales al estar en Nanopartículas aumenta su espectro de actividad; de igual forma apoyándose mediante microscopio electrónico de transmisión indican que es posible establecer la acción biocida de las Nanopartículas sobre las bacterias, manifestando que las células fueron dañadas al formarse "hoyos" en la pared celular por acumulación de las Nanopartículas, aumentando su permeabilidad y con ello la muerte celular. *Sondi, I., et al (2005)* mediante la utilización de microscopio de transmisión establece el efecto de las Nanopartículas de Plata sobre los microorganismos y su mecanismo antimicrobiano, el cual depende de la forma y distribución de las Nanopartículas sobre la membrana celular de especies, ya sean levaduras o bacterias (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*), provocando inhibición del crecimiento para las levaduras y *E. coli* pero no así para *S. aureus*. *Lok, Ch.N., et al (2005)*, mediante un análisis proteómico demostró el mecanismo de acción antimicrobial de NPs de Ag

sobre células de *E. coli*; encontrando que la exposición de Nanopartículas metálicas y su internalización a la célula causa la acumulación de proteínas precursoras de membrana, que lleva a la desestabilización de la estructura e induce un cambio en el potencial de membrana. Además que disminuye el ATP intracelular. Dichos factores son responsables de la muerte de la bacteria. Rodríguez, G.G., et al (2002) se basan en una reacción de reducción espontánea de la Plata (I) en Dimetilsulfóxido (DMSO) para formar Nanopartículas de Plata (32) mientras que para Nanopartículas de Óxido de Zinc son preparadas por hidrólisis del ciclohexanobutirato de Zinc en DMSO-3% en agua (33).

En este trabajo se utilizan dichas Nanopartículas para demostrar si poseen un efecto antimicrobiano que pueda contrarrestar los efectos negativos de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

4.0. JUSTIFICACION

La nanotecnología abre nuevos campos que permiten combatir enfermedades mediante el uso de materiales de escala atómicas. Entre los materiales mas prometedores en el uso clínico están aquellos con propiedades antimicrobianas como son las nanopartículas metálicas que exponen una actividad química aumentada debido a su superficie grande en relación al volumen y la estructura de su superficie cristalográfica. Por tanto el estudio y desarrollo de nanomateriales metálicos como antimicrobiano debe considerarse de particular importancia debido al reciente incremento de microorganismos resistentes a los antibióticos más potentes.

Al manipular la materia a escala nanométrica aparecen propiedades distintas de las habituales en el mundo macro. El óxido de zinc es blanco y opaco, como nanopartícula se vuelve transparente, y al igual que la plata muestra propiedades antibacterianas. Esas nuevas características pueden ser extrapoladas a nuestra realidad cotidiana, porque lo que ocurre en el mundo nanométrico influye en el macro.

Por ello, tomando en cuenta las propiedades ya conocidas de los iones zinc y plata, estableceremos su posible actividad biocida como nanopartículas, las cuales ya se elaboran en la UNAM con el objetivo de encontrar un nuevo tratamiento terapéutico contra microorganismos resistentes a los antibióticos actuales.

5. 0. HIPOTESIS

Si tomamos en cuenta la alta efectividad de los iones de Ag^+ y ZnO como biocidas, entonces esperamos que en su forma nanométrica aumentara significativamente su poder antibacteriano y antimicótico, incluso en microorganismos que desarrollaron resistencia a estos metales.

6.0. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la posible actividad antimicrobiana de dos compuestos experimentales (Nanopartículas de Óxido de Zinc y Plata) frente a cuatro microorganismos de interés clínico (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*) por medio de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y su identificación por microscopia electrónica para poder orientar hacia un mejor esquema terapéutico en las enfermedades que causan dichos microorganismos.

6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana con Nanopartículas de Oxido de Zinc y Plata "in Vitro" sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) de los dos compuestos experimentales frente a cuatro microorganismos de interés clínico, comparando con tres productos de gran uso como antimicrobianos.
- Establecer el daño celular de las bacterias y de la levadura en presencia de Nanopartículas de Zinc y Plata, mediante el uso de microscopio electrónico de transmisión (MET).

7.0. MATERIALES

MATERIAL.

- Asas bacteriológicas
- Cajas de Petri desechables
- Cubreobjetos
- Matraces de MacFarland
- Matraces Erlenmeyer
- Micropipetas de 10, 100 y 1000 microlitros
- Papel filtro
- Papel parafilm
- Perlas de ebullición
- Pinzas
- Pipetas volumetricas (1, 2, 5, 10 mL)
- Placas de 96 pozos con fondo en U
- Portaobjetos
- Puntas blancas amarillas y azules
- Rastrillo estéril
- Rejillas para microscopio electrónico
- Tubo grande de ensayo con rosca
- Tubos de ensayo
- Unidiscos estériles
- Vasos de precipitado 250, 500 y 1000 mL
- Vernier
- Viales de rosca o Eppendorf medianos (2mL)

REACTIVOS

- Acetona (BAKER)
- Acido Fosfotungstico al 1% (ph 7)
- Clorhexidina (GlaxoSmithKline México, S.A. de C.V.)
- Fijador de Karnosky
- Fomvar
- Medios de cultivo para pruebas secundarias (*MacFaddin, F. 1990*)
- NaCl (Productos Químicos Monterrey S.A.)
- Nanopartículas de Óxido de Zinc (Proporcionadas por el Dr. David Díaz de la Facultad de Química, UNAM. Lab. Química inorgánica)
- Nanopartículas de plata (Proporcionadas por el Dr. David Díaz de la Facultad de Química, UNAM. Lab. Química inorgánica)
- Nefelómetro de Mcfarland (1% Cloruro de Bario anhídrido($BaCl_2$), 1% Ácido sulfúrico (H_2SO_4) puro)
- Nitrato de Plata (Química Dinámica S.A. de C.V.)
- Parlodion
- Reactivos para tinción de Gram (Cristal Violeta, Lugol, Alcohol-Acetona y Safranina)
- Solución amortiguadora de fosfatos pH 7
- Sulfato de Zinc (BAKER)

MEDIOS Y SOLUCIONES

- Agar Dextrosa Sabouraud (BAKER)
- Agar Mueller Hinton (BAKER)
- Caldo Mueller Hinton (BAKER)
- Solución salina fisiológica

EQUIPO

- Centrifuga (ROTINA 35R, Hettich)
- Congelador (AMERICAN)
- Espectrofotómetro (GENESYS 20 Thermo Spectronic)
- Incubadora (MAPSA)
- Lector de ELISA (TECAN GENIOS)
- Microscopio Electrónico de Transmisión (MET) (JEOL JEM-100S Electron Microscope)
- Microscopio óptico (LIEDER)
- Refrigerador (AMERICAN & HIETO)

8.0. MÉTODOS

8.1. Cepas

Se utilizaran cepas de referencia *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6568, y *Candida albicans* ATCC 14083.

Para cada cepa se realizo las pruebas de identificación primaria (tinción de Gram, Motilidad, Catalasa y Oxidasa) y las pruebas secundarias correspondientes para cada especie (Prueba Óxido/Fermentativa (O/F), Rojo de Metilo (MR), Vogues-Proskauer (VP), Malonato, Citrato y Coagulasa).

8.2. Nanopartículas

Las Nanopartículas de Oxido de Zinc y Nanopartículas de Plata fueron proporcionadas por el departamento de química inorgánica y nuclear, de la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México por el Dr. David Díaz. La obtención de este nanomaterial fue mediante la aplicación de un nuevo método de síntesis. En el caso de Nanopartículas de ZnO la síntesis implica la disolución de sales dihidratadas de Carboxilato de Zinc en un solvente básico bipolar aprótico como fue el Dimetil Sulfoxido (DMSO) a temperatura ambiente. Siendo necesario controlar el contenido de agua y temperatura para garantizar la reproducibilidad, obteniendo nanocristales de un tamaño promedio entre 2.12 nm ($S= 0.76$) y 3.0nm ($S=0.5$).Las concentraciones de los coloides de ZnO muestran una gran estabilidad por arriba de los 2 meses (32, 33).

Por otro lado, la síntesis de Nanopartículas de Plata implicó la reducción espontánea de 2-ethylhexanoato de Plata en DMSO a temperatura ambiente. La reacción es lenta y depende marcadamente de la temperatura para la formación de nanopartículas. Las Nanopartículas de Plata muestran un tamaño de distribución centrado en 4.4 nm de diámetro ($S=1.2$) (32, 33).

Ambos métodos mencionados permiten la obtención de suspensiones coloidales mediante el uso mínimo de reactivos.

8.3. Medio de cultivo

Se utilizó el medio de Mueller Hinton (MH) en caldo y agar.

8.4. Controles

En la tabla 5 se especifica los antimicrobianos a utilizar frente a cada microorganismo:

Tabla 5. Cepas de estudio frente a los diferentes antimicrobianos

Antimicrobianos \ Cepas	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
Nanopartículas de óxido de zinc	√	√	√	√
Nanopartículas de plata	√	√	√	√
Clorhexidina 1.3×10^{-1} M	√	√	√	√
Nitrato de plata 5.8×10^{-3} M	√	√	√	√
Sulfato de zinc 6.1×10^{-2} M	√	√	√	√

8.5. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA (PSA)

8.5.1. Método Kirby-Bauer – Difusión en disco

Preparación de unidiscos:

Se obtuvo por medio de donación de la empresa *BioRad*, un lote de 1000 unidiscos estériles.

Los discos se impregnaron con los compuestos a probar. Para lo cual se agregaron 5µL en cada disco de cada dilución (tabla 6), utilizando micropipetas semiautomáticas en condiciones estériles. Se almacenaron a 4°C y se utilizaron dentro de los tres días siguientes a su preparación.

Preparación de inóculo

Se preparó una suspensión de cada una de las cepas con solución salina fisiológica estéril ajustada a la turbidez visual comparable al estándar del tubo 0.5 del Nefelómetro de McFarland por espectrofotómetro a una longitud de onda de 625nm, entre 0.08 y 0.1 de absorbancia (equivalente a 1×10^8 UFC/mL) (58, 59).

Preparación de las placas.

Posteriormente se inocularon las placas, sin dejar alguna zona libre. Dejamos secar de 3 a 5 minutos antes de colocar los unidiscos en la placa, deben situarse de tal forma que tengan una distancia homogénea entre cada uno (Figura 14); se incubaron a 37°C de 18-24 horas. Se midieron los halos de inhibición con un vernier.

Tabla 6. Prueba de difusión en disco, donde se indica los diferentes antimicrobianos y sus concentraciones a probar frente a los diferentes microorganismos.

Unidiscos	Contenido
1	DMSO 2%
2	Nanopartículas de ZnO o Ag de $2 \times 10^{-9} \text{M}$
3	Nanopartículas de ZnO o Ag de $2 \times 10^{-8} \text{M}$
4	Nanopartículas de ZnO o Ag de $2 \times 10^{-7} \text{M}$
5	Nanopartículas de ZnO o Ag de $2 \times 10^{-6} \text{M}$
6	Nanopartículas de ZnO o Ag de $2 \times 10^{-5} \text{M}$
7	Clorhexidina $1.3 \times 10^{-1} \text{M}$
8	Control de ZnSO_4 o AgNO_3

Nota: Toda prueba se realizó por triplicado

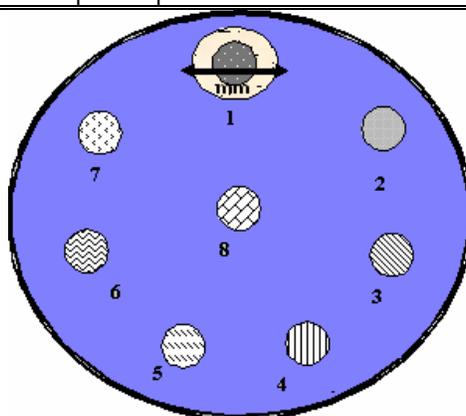


Figura 14. Distribución de unidiscos con diferentes concentraciones de antimicrobiano para la prueba de difusión en disco.

8.5.2. Prueba de Dilución en caldo

Las concentraciones p/v de los controles a utilizar serán:

- Clorhexidina al $1.3 \times 10^{-1} \text{M}$
- Nitrato de Plata al $5.8 \times 10^{-3} \text{M}$
- Sulfato de Zinc al $6.1 \times 10^{-2} \text{M}$

Todos los antimicrobianos fueron diluidos en DMSO (32). Las Nanopartículas se encuentran presentes en DMSO a una concentración de $2 \times 10^{-3} \text{M}$ (stock) y se realizaron diluciones hasta obtener concentraciones entre $2 \times 10^{-5} \text{M}$ a $2 \times 10^{-9} \text{M}$.

Preparación del inóculo

Se preparo una suspensión de cada una de las cepas en solución salina estéril o en caldo Mueller Hinton a una turbidez equivalente a la del estándar 0.5 de McFarland (esta suspensión contiene 1.5×10^8 UFC/mL).

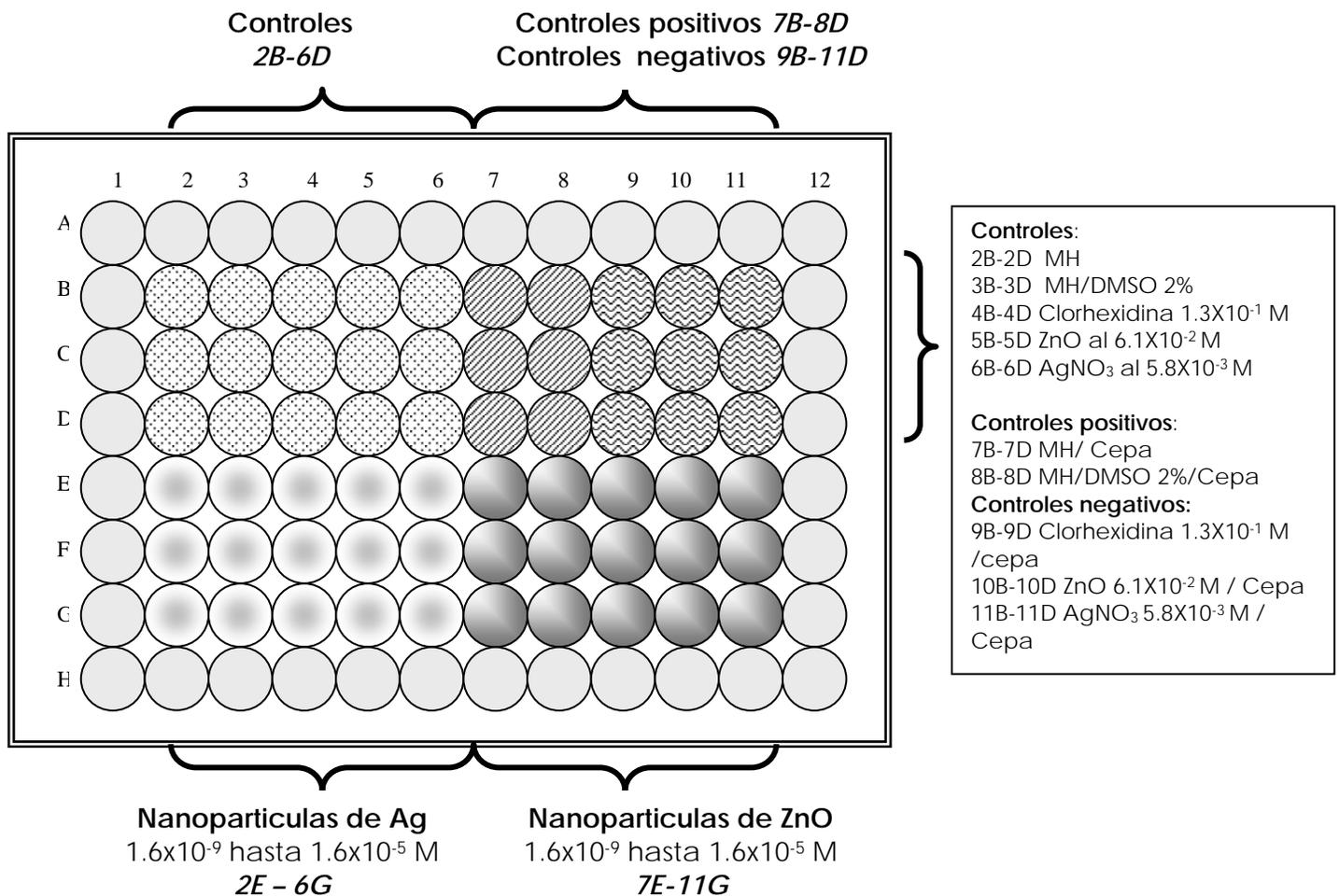


Figura 15. Placa de cultivo de 96 pozos con fondo en U, se indica la distribución y repetición de cada antimicrobiano, para establecer su efecto biocida a diferentes concentraciones sobre los diferentes microorganismo.

Inoculación de microplacas (Figura 15):

1. Caldo Mueller Hinton (control de esterilidad)
2. DMSO al 2% en Caldo Mueller Hinton (control)
3. Clorhexidina al 1.3×10^{-1} M en caldo Mueller Hinton (control)
4. Sulfato de Zinc al 6.1×10^{-2} M en caldo Mueller Hinton (control)
5. Nitrato de Plata al 5.8×10^{-3} M en caldo Mueller Hinton (control)
6. Suspensión de microorganismo con caldo Mueller Hinton (control positivo)
7. Suspensión de microorganismo con caldo Mueller Hinton con DMSO 2%
8. Suspensión de microorganismo con Clorhexidina al 1.3×10^{-1} M (control negativo)
9. Suspensión de microorganismo con Sulfato de Zinc al 6.1×10^{-2} M (control negativo)
10. Suspensión de microorganismo con Nitrato de Plata 5.8×10^{-3} M (control negativo)
11. Suspensión de microorganismo con Nanopartículas de Zinc a concentración 2×10^{-5} M a 2×10^{-9} M (problemas)
12. Suspensión microorganismo con Nanopartículas de Plata a concentración 2×10^{-5} M a 2×10^{-9} M (problemas). Para fines estadísticos se realizo por triplicado.

La placa de cultivo inoculada se incubo a 37°C por 24 horas, pasado este tiempo se tomo la lectura a 625 nm en un lector de ELISA.

8.5.3. Método de recuento en placa

a) Preparación de las placas

Se deposita en una placa de cultivo (por triplicado) un volumen de 1 mL de NPs de Ag, NPs de ZnO y controles, y se llevaron a un aforo de 20 mL con agar, de tal forma que se obtuvieron las diferentes concentraciones propuestas.

b) Preparación de la muestra

1.- Se preparó una suspensión de microorganismos en solución salina estéril a una turbidez equivalente a la del estándar 0.5 de McFarland (esta suspensión contiene 1.5×10^8 UFC/mL) por espectrofotometría a 625 nm.

NOTA: A las placas que no se adiciona las NPs serán los blancos y servirán de comparación para establecer el porcentaje de inhibición.

2.- Se realizaron diluciones decimales sucesivas (relación muestra/volumen de dilución 1 en 10), tomando 1 mL de muestra en 9 mL de diluyente para la primera dilución, es decir, $1/10$ o 10^{-1} (Figura 16) Cada vez que se preparó una dilución fue necesario homogenizar la muestra adecuadamente para lograr una distribución uniforme de los microorganismos en todo el volumen de dilución.

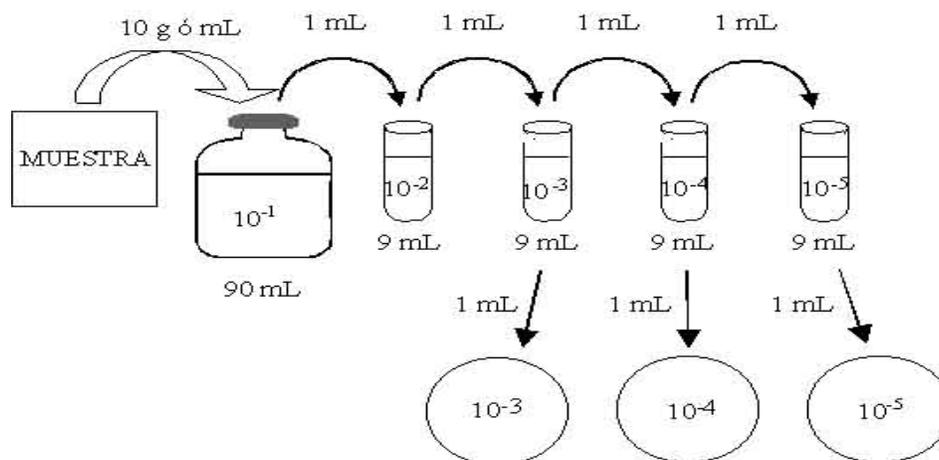


Figura 16. Preparación de diluciones sucesivas en prueba de recuento en placa.

3.- Para la segunda dilución (1/100 o 10^{-2}) se toma 1 mL de la dilución 10^{-1} y se lleva a 10 mL con diluyente (SSF o caldo MH) y así sucesivamente. Se descarta la pipeta luego de cada descarga.

4.- Según la carga esperada, se elige la dilución a sembrar. En este caso se selecciono 100 UFC/mL. Una vez preparada la última dilución, se sembró dentro de los 15 minutos siguientes.

c) Siembra

Se deposita en la superficie de las placas del medio de cultivo ya preparado, 0.1 mL de la dilución seleccionada. Se realiza por duplicado o triplicado. Se procede a extenderla sobre toda la superficie de las placas para que se absorba, usando rastrillo estéril.

d) Incubación

Una vez absorbida la muestra las placas se invierten y se incuban a 37°C durante 18 a 24 hrs.

e) Interpretación

Finalizado el período de incubación se observaron los efectos de los controles y las diferentes concentraciones de NPs sobre las colonias. Se contaron las colonias desarrolladas como individuales, aquellas que se distinguían de las colonias próximas a una distancia al menos igual al diámetro de la colonia más pequeña (58, 59). El promedio de colonias crecidas en cada concentración de NPs se comparara con el promedio de colonias en las placas sin ningún tratamiento, obteniendo así el porcentaje de inhibición.

8.6. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

8.6.1. Tinción negativa

a) Preparación de la muestra

- Pasadas 24 horas de incubación del microorganismo frente a Nanopartículas de Óxido de Zinc y Plata (control positivo + control negativos + problemas; todos por triplicado) se realizarán 3 lavados con PBS, centrifugando 2500 rpm por 10 minutos a 4°C.
- Una vez limpia la muestra se procede a fijar en solución fijador de Karnovsky con rojo de rutenio por 2 horas. La muestra debe tener 10^6 - 10^7 partículas por mililitro.

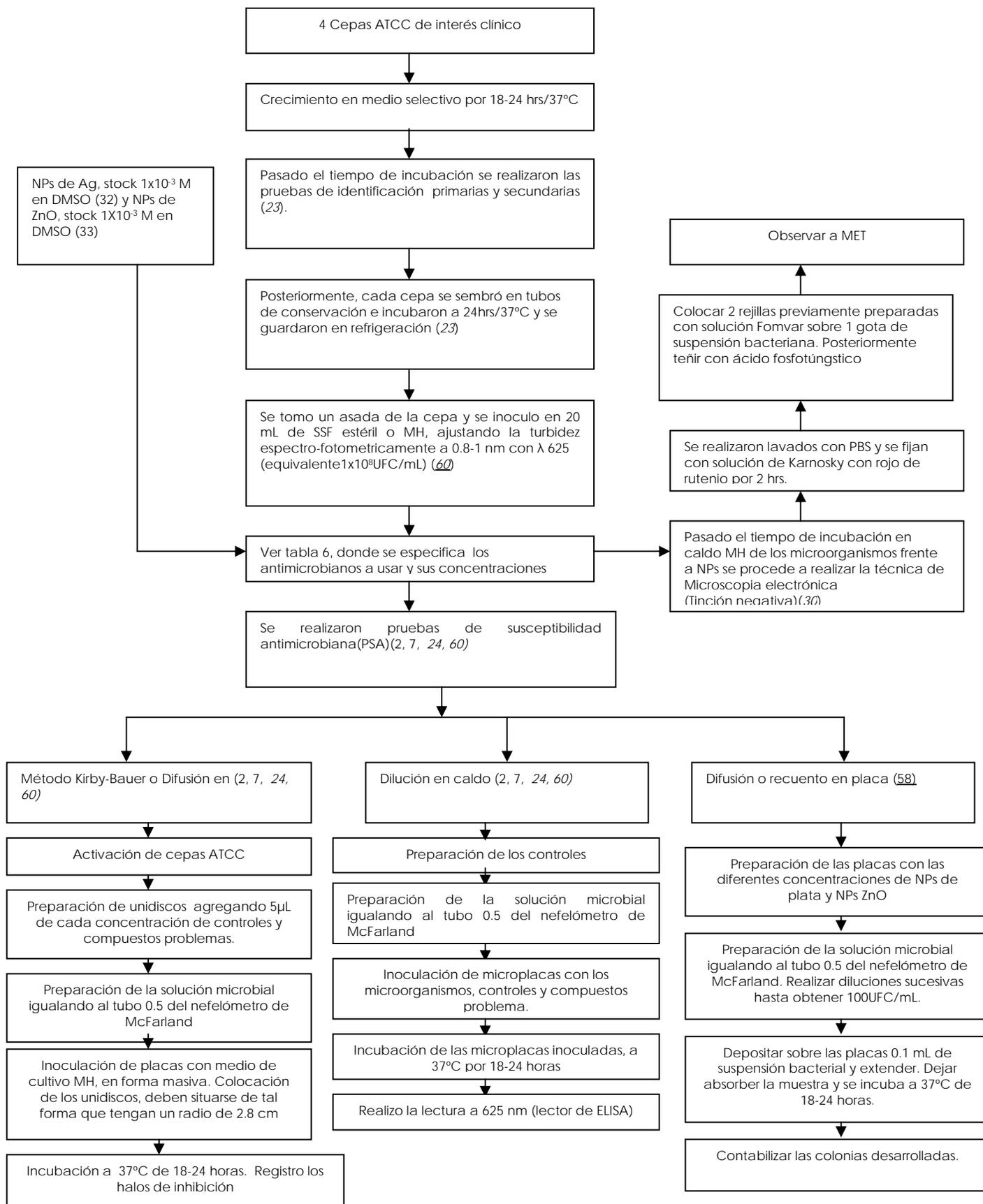
b) Preparación de las rejillas con membrana Fomvar

- Las rejillas se lavan con acetona y se secan.
- Preparar solución de Fomvar al 1% en Parlodion 1%.
- En un vaso de precipitado de 1 litro llenar con agua destilada y calentar.
- Impregnar un portaobjetos con solución de Fomvar y dejar reposar hasta que seque la película. Cortar las orillas y sobre baño maría con agua destilada sumergir poco a poco hasta separar la película plástica.
- Colocar la rejilla sobre la membrana y recoger con papel filtro.

c) Técnica de tinción

- Colocar 1 gota de suspensión bacteriana sobre papel parafilm y colocar 2 rejillas con membrana para que adsorba la muestra durante 15 min.
- Tomar las rejillas y el exceso se retira con papel filtro.
- Teñir durante 1 minuto con solución de Ácido Fosfotúngstico al 1% , pH 7.1
- Recoger las rejillas, eliminando el exceso de colorante, y secar a temperatura ambiente o en estufa a 35°C.
- Observar a MET.

9.0. DIAGRAMA DE FLUJO



10. RESULTADOS

Las pruebas fueron realizadas sobre microorganismos que a menudo están presentes como flora normal de piel, mucosa nasal y tracto genital; sin embargo adquieren relevancia a nivel nosocomial, al surgir como agentes patógenos en infecciones que afectan piel y heridas postoperatorias. Algunos de estos microorganismos son *Escherichia coli* ATCC8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC25853, *Staphylococcus aureus* ATCC6568 y *Candida albicans* ATCC14083.

Se realizaron pruebas bioquímicas para comprobar su identidad. Los resultados se muestran en la tabla 7:

Tabla 7. Pruebas bioquímicas de identificación para cada microorganismo

Cepas Pruebas bioquímicas	<i>Escherichia coli</i> ATCC8739	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC25853	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6568	<i>Candida albicans</i> ATCC14083
Gram	Cocos Gram negativos	Bacilos Gram negativos	Cocos agrupados en racimos Gram positivos	Hifas Gram positivas
Motilidad	(+)Positiva	(+)Positiva	(-)Negativa	(-) Negativa
Catalasa	(+)Positiva	(+)Positiva	(+)Positiva	
Oxidasa	(+)Positiva	(+)Positiva	(-)Negativa	
OF	O/F	O/Fermenta glucosa	Fermenta glucosa	Fermenta glucosa
MR	(+) Positiva			
VP	(-)Negativa	(-)Negativa	(+)Positiva	
Malonato	(-)Negativa			
Citrato	(-)Negativa			

Coagulasa	-----	-----	(+) Positiva	-----

Establecida la identidad de cada cepa se procedió a realizar las Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (PSA).

10.1. MÉTODO KIRBY-BAUER-DIFUSIÓN POR DISCO.

Para los resultados de las PSA en difusión por disco se reporta la resistencia o susceptibilidad de cada cepa frente a las diferentes concentraciones utilizadas de los antimicrobianos, esto mediante los halos de inhibición desarrollados en el medio.

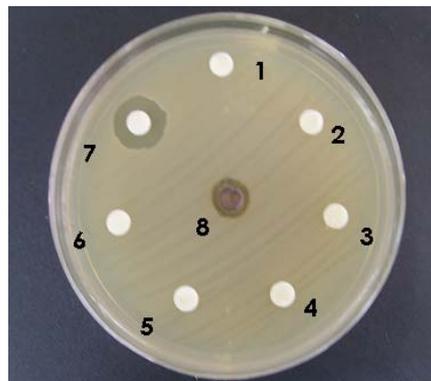
Los resultados para cada microorganismo frente a los controles (DMSO 2%, Clorhexidina $1.3 \times 10^{-1} \text{M}$, Nitrato de Plata $5.8 \times 10^{-3} \text{M}$ y Sulfato de Zinc $6.1 \times 10^{-2} \text{M}$) y los compuestos problema (Nanopartículas de Óxido de Zinc y Nanopartículas de Plata) pueden verse en las tablas 8-15 y en las fotografías 1-8.

10.1.1 Escherichia coli ATCC 8739

En la siguiente tabla se observa y expresan los halos de inhibición que presento Escherichia coli frente a las diferentes concentraciones de Nanopartículas de Plata y los tres controles propuestos.

Prueba de Difusión en disco**Tabla 8.** Inhibición de *Escherichia coli* frente a diferentes concentraciones de Nanopartículas de Plata en la prueba de difusión en disco.

<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739								
Controles	Nanopartículas de Plata					6 DMSO 2%	7 Clorhexidina 1.3 X 10 ⁻¹ M	8 AgNO ₃ 5.8X10 ⁻³ M
	1 2X10 ⁻⁵ M	2 2X10 ⁻⁶ M	3 2X10 ⁻⁷ M	4 2X10 ⁻⁸ M	5 2X10 ⁻⁹ M			
Halos de inhibición [mm]	----	----	----	----	----	0.7	15	11
	----	----	----	----	----	0.7	15	10
	----	----	----	----	----	0.7	15	10

**Foto 1.** *Escherichia coli* frente a las Nanopartículas de Plata en la prueba de difusión en disco.

En la tabla 8 podemos determinar la ausencia de inhibición de *E. coli* frente a las Nanopartículas de Plata, sin embargo con los controles el resultado fue diferente ya que la Clorhexidina tuvo la mejor inhibición, seguida del Nitrato de Plata.

Tabla 9. Inhibición de *Escherichia coli* frente a diferentes concentraciones de Nanopartículas de Oxido de Zinc en la prueba de difusión en disco.

<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739								
Unidiscos	Nanopartículas de Óxido de Zinc					6 DMSO 2%	7 Clorhexidina 1.3 X 10 ⁻¹ M	8 ZnSO ₄ 6.1X10 ⁻² M
	1 2X10 ⁻⁵ M	2 2X10 ⁻⁶ M	3 2X10 ⁻⁷ M	4 2X10 ⁻⁸ M	5 2X10 ⁻⁹ M			
Halos de inhibición [mm]	----	----	----	----	----	0.7	15	11
	----	----	----	----	----	0.7	14	10
	----	----	----	----	----	0.7	14	10

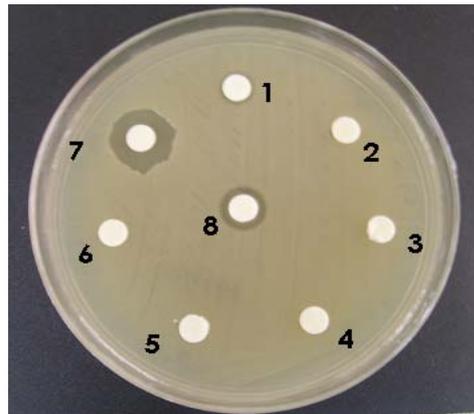


Foto 2. *Escherichia coli* frente a las Nanopartículas de Oxido de Zinc, en la prueba de difusión en disco.

En la tabla 9 también se observa que las Nanopartículas de Oxido de Zinc no tuvieron un efecto sobre *E. coli* y se corrobora en la foto 2. El control con mayor inhibición sobre esta bacteria fue nuevamente Clorhexidina.

10.1.2 *Staphylococcus aureus* ATCC 6568

Prueba de Difusión en disco

Tabla 10. Inhibición de *Staphylococcus aureus* frente a diferentes concentraciones de Nanopartículas de Plata en la prueba de difusión en disco.

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6568								
Unidiscos	Nanopartículas de Plata					6 DMSO 2%	7 Clorhexidina 1.3 X 10 ⁻¹ M	8 AgNO ₃ 5.8X10 ⁻³ M
	1 2X10 ⁻⁵ M	2 2X10 ⁻⁶ M	3 2X10 ⁻⁷ M	4 2X10 ⁻⁸ M	5 2X10 ⁻⁹ M			
Halos de inhibición [mm]	----	----	----	----	----	----	20	10
	----	----	----	----	----	----	20	10
	----	----	----	----	----	----	20	10

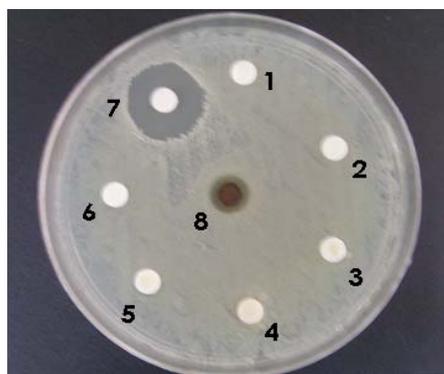


Foto 3. *Staphylococcus aureus* frente a Nanopartículas de Plata en la prueba de difusión en disco.

En la tabla 10 y en la foto 3 se puede observar que la Clorhexidina es quien tuvo mayor zona de inhibición para *S. aureus*, seguido del Nitrato de Plata. Siendo estos dos los únicos con los que se presentaba la inhibición.

Tabla 11. Inhibición de *Staphylococcus aureus* frente a diferentes concentraciones de NPs de Oxido de Zinc en la prueba de difusión en disco.

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6568								
Unidiscos	Nanopartículas de Óxido de Zinc					6 DMSO 2%	7 Clorhexidina 1.3 X 10 ⁻¹ M	8 ZnSO ₄ 6.1X10 ⁻² M
	1 2X10 ⁻⁵ M	2 2X10 ⁻⁶ M	3 2X10 ⁻⁷ M	4 2X10 ⁻⁸ M	5 2X10 ⁻⁹ M			
Halos de inhibición [mm]	----	----	----	----	----	----	18	12
	----	----	----	----	----	----	20	12
	----	----	----	----	----	----	19	12

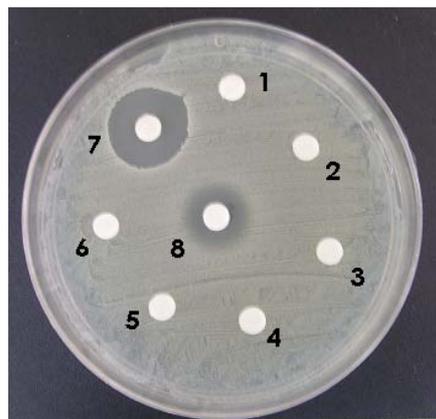


Foto 4. *Staphylococcus aureus* frente a NPs de Oxido de Zinc en la prueba de difusión en disco.

Los resultados de la tabla 11 nos indican que *S. aureus* fue inhibida fuertemente por Clorhexidina y medianamente por el Sulfato de Zinc mientras que las NPs no tuvieron efecto. La Foto 4 da muestra de ello.

10.1.3 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853

Prueba de Difusión en disco

Tabla 12. Inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* frente a diferentes concentraciones de Nanopartículas de Plata en la prueba de difusión en disco.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25853								
Unidiscos	Nanopartículas de Plata					6 DMSO 2%	7 Clorhexidina 1.3×10^{-1} M	8 AgNO ₃ 5.8×10^{-3} M
	1 2×10^{-5} M	2 2×10^{-6} M	3 2×10^{-7} M	4 2×10^{-8} M	5 2×10^{-9} M			
Halos de inhibición [mm]	----	----	----	----	----	0.7	0.8	13
	----	----	----	----	----	0.7	0.7	12
	----	----	----	----	----	0.7	0.7	12

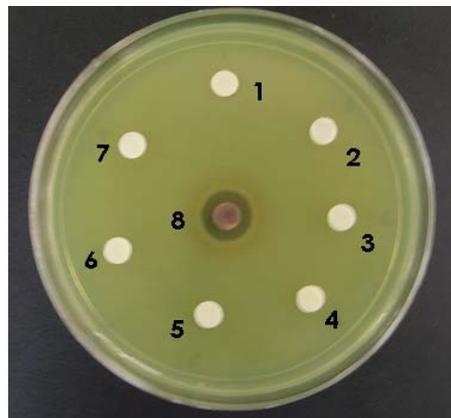


Foto 5. *Pseudomonas aeruginosa* frente a NPs de Óxido de Zinc en la prueba de difusión en disco.

En la tabla 12 se observa que el Nitrato de plata tuvo halo de inhibición y la Clorhexidina junto con el DMSO al 2% mostró una leve inhibición. Las Nanopartículas de Ag no mostraron efecto sobre la bacteria.

Tabla 13. Inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* frente a diferentes concentraciones de Nanopartículas de Óxido de Zinc en la prueba de difusión en disco.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25853								
Unidiscos	Nanopartículas de Óxido de Zinc					6 DMSO 2%	7 Clorhexidina 1.3 X 10 ⁻¹ M	8 ZnSO ₄ 6.1X10 ⁻² M
	1 2X10 ⁻⁵ M	2 2X10 ⁻⁶ M	3 2X10 ⁻⁷ M	4 2X10 ⁻⁸ M	5 2X10 ⁻⁹ M			
Halos de inhibición [mm]	----	----	----	----	----	0.7	0.8	0.9
	----	----	----	----	----	0.7	0.7	0.8
	----	----	----	----	----	0.7	0.7	0.9

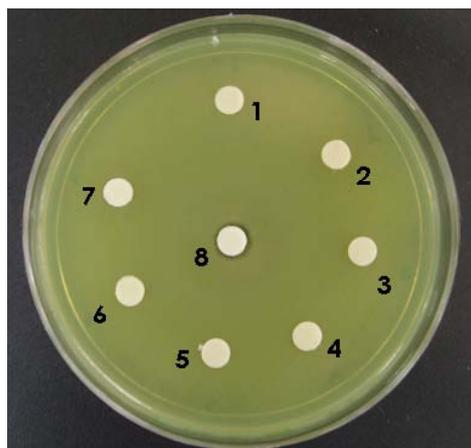


Foto 6. *Pseudomonas aeruginosa* frente a NPs de Óxido de Zinc en la prueba de difusión en disco.

La tabla 13 nos muestra que los tres controles presentan una leve inhibición, siendo negativa para las Nanopartículas de Óxido de Zinc. La Foto 6 también muestra el desarrollo sin problema de *P. aeruginosa*.

En el caso de *Candida albicans* se observan los siguientes resultados:

10.1.4 *Candida albicans* ATCC 14083

Prueba de Difusión en disco

Tabla 14. Inhibición de *Candida albicans* frente a diferentes concentraciones de Nanopartículas de Plata en placas en la prueba de difusión en disco.

<i>Candida albicans</i> ATCC 14083								
Unidiscos	Nanopartículas de Plata					6 DMSO 2%	7 Clorhexidina 1.3 X 10 ⁻¹ M	8 AgNO ₃ 5.8X10 ⁻³ M
	1 2X10 ⁵ M	2 2X10 ⁶ M	3 2X10 ⁷ M	4 2X10 ⁸ M	5 2X10 ⁹ M			
Halos de inhibición [mm]	----	----	----	----	----	----	16	18
	----	----	----	----	----	----	16	18
	----	----	----	----	----	----	16	20

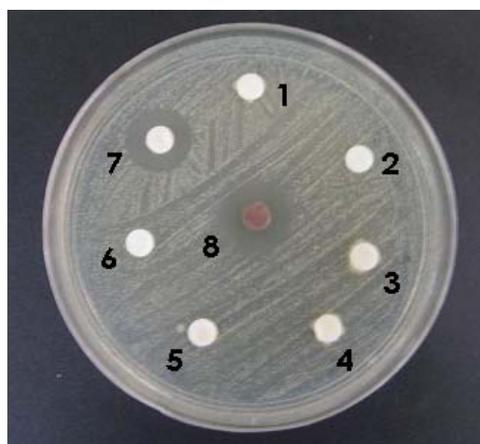


Foto 7. *Candida albicans* frente a Nanopartículas de Plata en la prueba de difusión en disco.

En la tabla 14 observamos una mayor inhibición del Nitrato de plata sobre *C. albicans* mientras que las nanopartículas no tienen efecto. En la foto 7 se puede observar claramente esto.

Tabla 15. Inhibición de *Candida albicans* frente a diferentes concentraciones de Nps de Oxido de Zinc en la prueba de difusión en disco.

<i>Candida albicans</i> ATCC 14083								
Unidiscos	Nanopartículas de Óxido de Zinc					6 DMSO 2%	7 Clorhexidina 1.3 X 10 ⁻¹ M	8 ZnSO ₄ 6.1X10 ⁻² M
	1 2X10 ⁻⁵ M	2 2X10 ⁻⁶ M	3 2X10 ⁻⁷ M	4 2X10 ⁻⁸ M	5 2X10 ⁻⁹ M			
Halos de inhibición [mm]	----	----	----	----	----	----	18	----
	----	----	----	----	----	----	16	----
	----	----	----	----	----	----	16	----

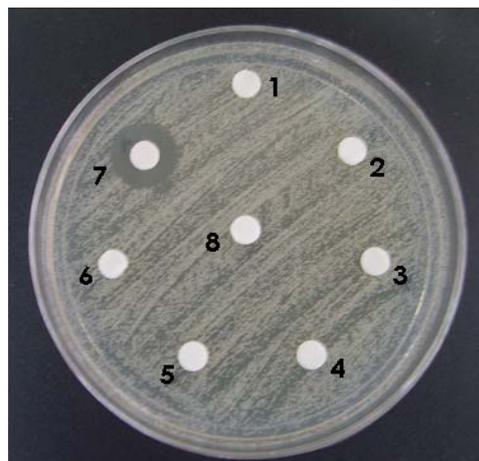


Foto 8. *Candida albicans* frente a Nanopartículas de Oxido de Zinc en la prueba de difusión en disco.

La tabla 15 muestra a la clorhexidina como único control con efecto sobre *Candida albicans* mientras que el compuesto problema no lo tiene. La Foto 8 también lo demuestra.

10.2. PRUEBA DE DILUCIÓN EN CALDO.

En la PSA por dilución en caldo, después de 24 horas a 37°C de incubación para cada cepa, se obtuvo la densidad de crecimiento mediante método espectrofotométrico a 625nm, permitiendo obtener el porcentaje de inhibición que se muestra en el siguiente cuadro. (Para un análisis estadístico todo se realizó por triplicado).

En la tabla 16 se presentan los porcentajes de inhibición para la prueba de dilución en caldo de los cuatro microorganismos, mostrando que el control más efectivo sobre los cuatro géneros de microorganismos fue la Clorhexidina seguida del Sulfato de Zinc. Para el caso de nitrato de plata debido a su carácter fotosensible que provoca su precipitación, no fue posible establecer una medida. Las Nanopartículas de Óxido de Zinc tuvieron mejor efecto en la concentración de 2×10^{-5} M sobre *Staphylococcus aureus* mientras que las nanopartículas de Plata tuvieron inhibición en la concentración de 2×10^{-5} M para el mismo microorganismo. Las demás concentraciones de las nanopartículas tuvieron un efecto poco notorio para las otras cepas. De esta forma podemos establecer que la bacteria que presentó mayor susceptibilidad frente a Nanopartículas tanto de Plata como de Óxido de Zinc fue *S.aureus* y la bacteria con mayor resistencia fue *P. aeruginosa*.

Tabla 16. Porcentajes de inhibición en prueba de dilución en caldo.

	DMSO 2%	ZnSO ₄ 6.1X10 ⁻² M	AgNO ₃ 5.8X10 ⁻³ M	Clorhexidina 1.3X10 ⁻¹ M	Nanopartículas de Óxido de Zinc	Nanopartículas de Plata
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.35	59.35	-----	91.97	53.38 (2X10 ⁻⁵ M)	54.40 (2X10 ⁻⁵ M)
<i>Candida albicans</i>	1.36	39.29	-----	70.45	16.10 (2X10 ⁻⁶ M)	16.98 (2X10 ⁻⁵ M)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.46	52.73	8.85	87.95	-----	1.93 (2X10 ⁻⁵ M)
<i>Escherichia coli</i>	-----	64.66	3.30	81.35	19.57 (2X10 ⁻⁷ M)	-----

La **Tabla 17** muestra los porcentajes de inhibición de cada concentración de nanopartículas por especie, siendo la inhibición más elevada para ambas nanopartículas en la concentración de 2×10^{-5} M sobre *Staphylococcus aureus*. Para *Escherichia coli*, las Nanopartículas de Oxido de Zinc (ZnO) en la concentración de 2×10^{-7} M tuvieron el mayor porcentaje de inhibición, pero sin ningún efecto de inhibición frente a Nanopartículas de Plata. En el caso de *Candida albicans*, las Nanopartículas de ZnO en la concentración de 2×10^{-6} M tuvieron el mayor porcentaje de inhibición, para las Nanopartículas de Ag el mayor porcentaje se obtuvo en la concentración de 2×10^{-5} M. *Pseudomonas aeruginosa* solo tuvo inhibición con las Nanopartículas de Ag en su concentración mayor. Tanto *Escherichia coli* como *Pseudomonas aeruginosa* presentaron mayor resistencia frente a ambas Nanopartículas que el resto de los microorganismos.

Tabla 17. Porcentajes de inhibición de cada concentración de Nanopartículas por especie para la prueba de dilución en caldo.

	Concentraciones [M]	<i>Staphylococcus Aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Ag	2×10^{-9}	42.39	0	5.71	0
	2×10^{-8}	37.04	0	3.94	0
	2×10^{-7}	33.00	0	12.64	0
	2×10^{-6}	38.35	0	16.34	0
	2×10^{-5}	54.40*	0	16.98*	1.93*
Zn	2×10^{-9}	34.42	0	0.56	0
	2×10^{-8}	34.02	0	6.52	0
	2×10^{-7}	44.61	19.57*	8.93	0
	2×10^{-6}	48.20	12.47	16.10*	0
	2×10^{-5}	53.28*	12.92	3.70	0
S		7.9484	7.4818	5.9902	0.6109

*Mayor porcentaje de inhibición. (Desviación estándar=)

Estos resultados se expresan con mayor claridad en los siguientes gráficos:

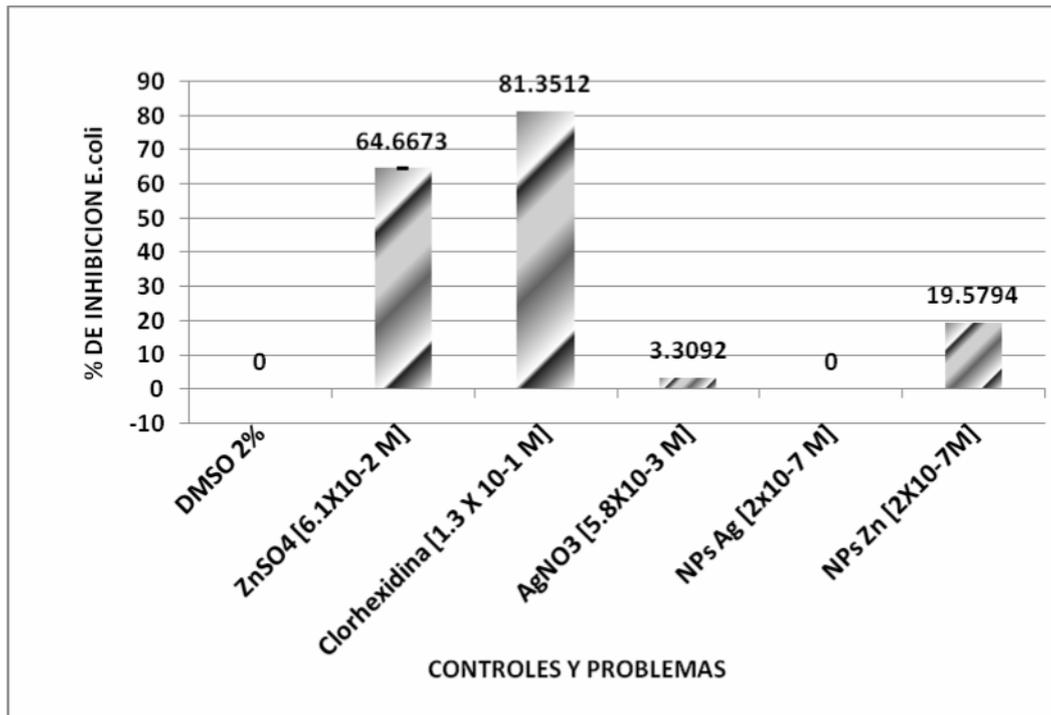


Figura 17. Porcentajes de inhibición de *Escherichia coli* en prueba de dilución en caldo (S=0.0159).

La **Figura 17** muestra que el mayor porcentaje de inhibición para *Escherichia coli* fue en el control de Clorhexidina, mientras que los compuestos problema solo las Nanopartículas de Oxido de Zinc tuvieron efecto.

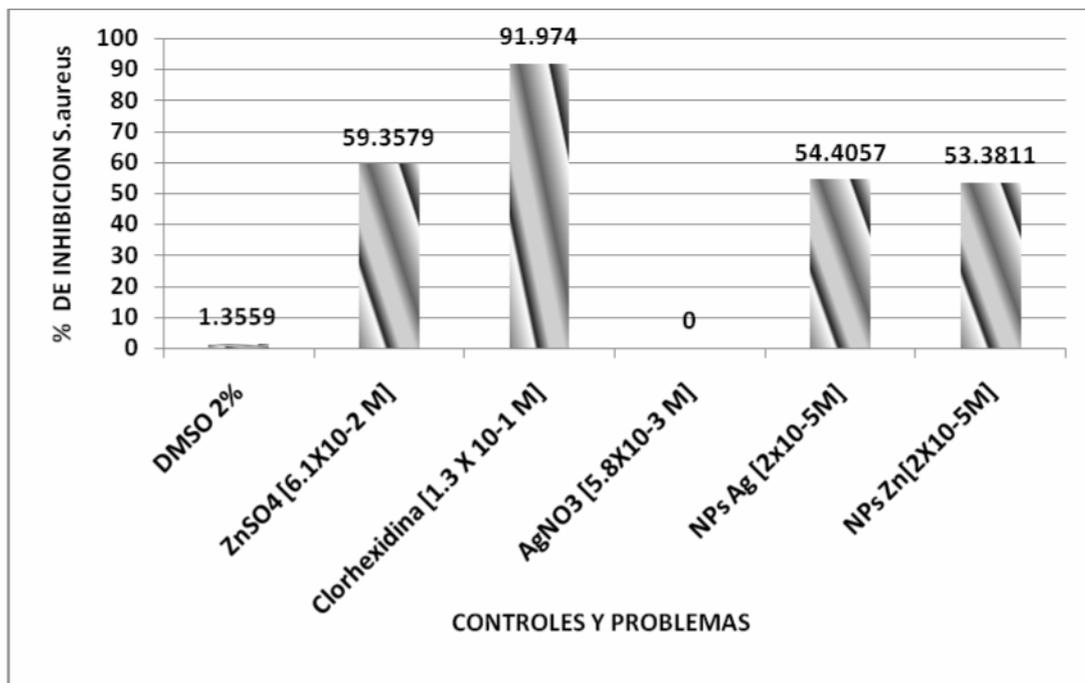


Figura 18 Porcentaje de inhibición de *Staphylococcus aureus* en prueba de dilución en caldo. (S=0.006)

La **Figura 18** muestra que el mayor porcentaje de inhibición para *Staphylococcus aureus* fue en el control de Clorhexidina, mientras que los compuestos problema las Nanopartículas de Oxido de Zinc tuvieron el mayor porcentaje, sin embargo, no muy diferente el porcentaje de las Nanopartículas de Plata.

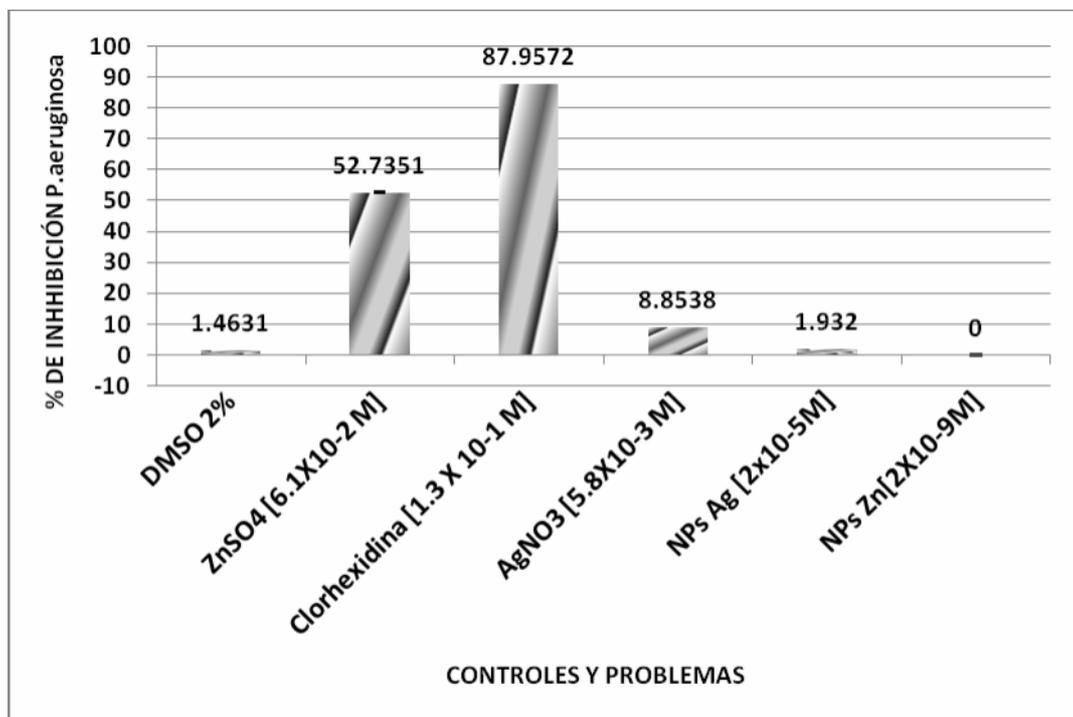


Figura 19 .Porcentajes de inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* en prueba de dilución en caldo (S=0.0129).

La **Figura 19** muestra que el mayor porcentaje de inhibición para *Pseudomonas aeruginosa* fue en el control de Clorhexidina, mientras que para los compuestos problema fue nulo el efecto.

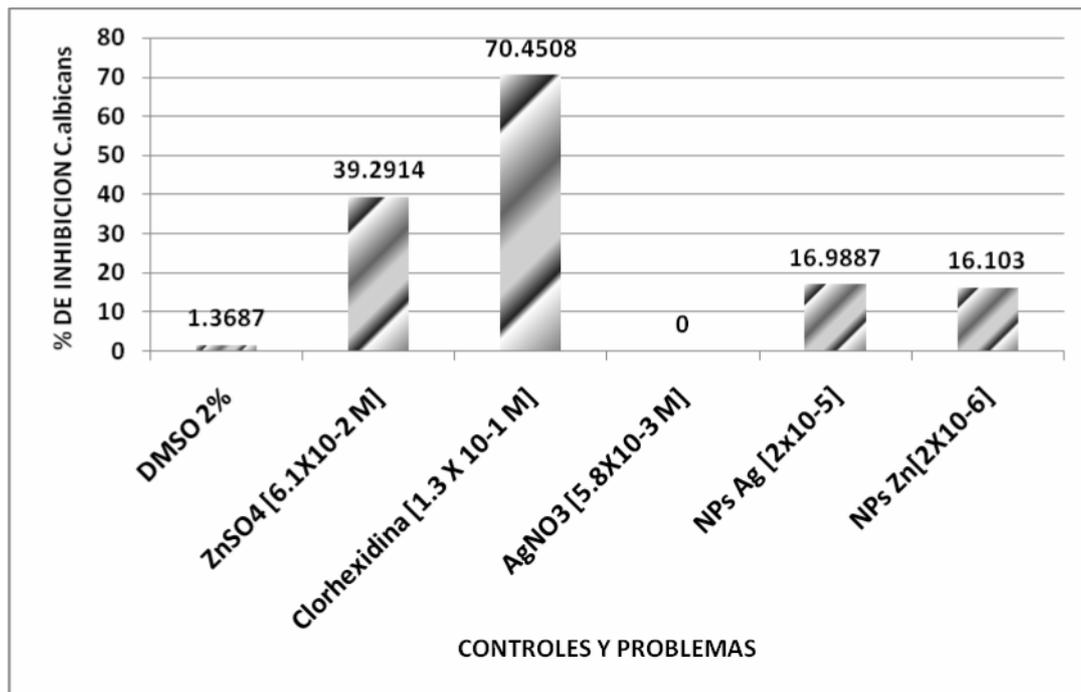


Figura 20. Porcentaje de inhibición de *Candida albicans* en prueba de dilución en caldo (S=0.007).

La Figura 20 muestra que el mayor porcentaje de inhibición para *Candida albicans* fue en el control de Clorhexidina, mientras que las Nanopartículas de Ag y Zn0 presentan un efecto inhibitorio similar.

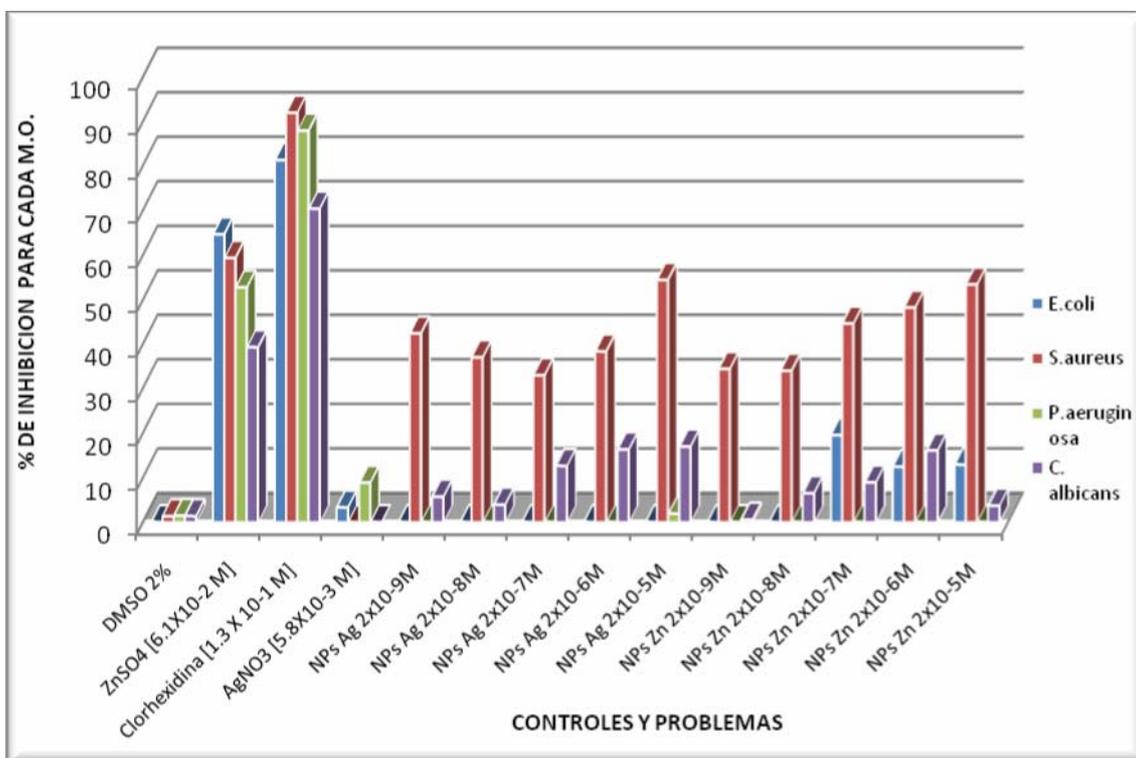


Figura 21. Porcentaje de inhibición de los cuatro microorganismos de interés clínico en prueba de dilución en caldo.

La **Figura 21** muestra los porcentajes de inhibición para los cuatro microorganismos siendo el mayor porcentaje de inhibición para el control de Clorhexidina en las 4 especies; seguidas del Sulfato de Zinc. En los compuestos problema se presentaron porcentajes similares entre Escherichia coli , Pseudomonas aeruginosa y Candida albicans, al ser más resistentes. Ocurriendo lo contrario para Staphylococcus aureus que presento mayor susceptibilidad frente a ambas NPs.

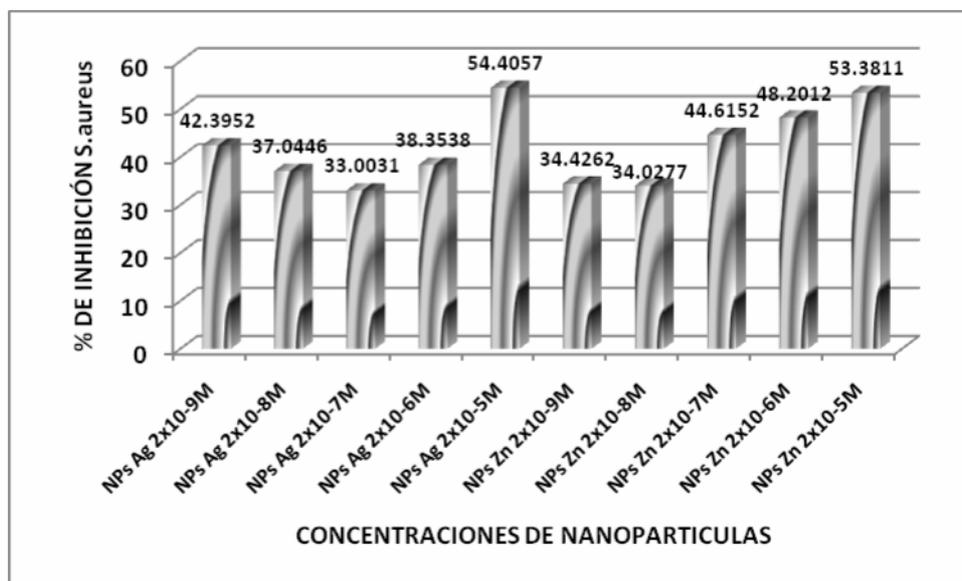


Figura 22. Porcentaje de cada concentración de nanopartículas para Staphylococcus aureus (S=7.9484).

La **Figura 22** muestra los porcentajes de inhibición para S. aureus frente a cada concentración de ambos compuestos problema, teniendo en la concentración de 2X10⁻⁵M la mayor respuesta de inhibición.

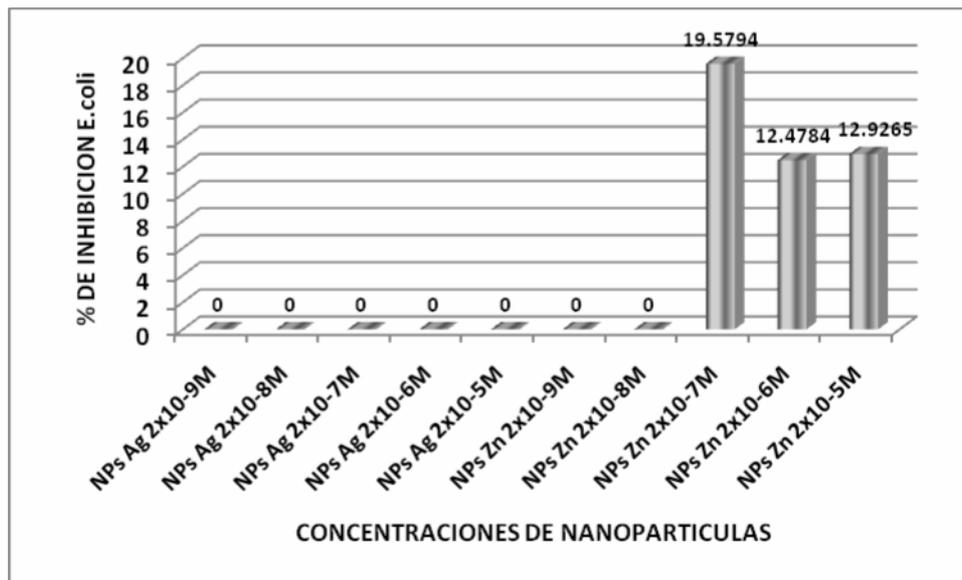


Figura 23. Porcentaje de inhibición de cada concentración de nanopartículas para *Escherichia coli* (S=7.4818).

La Figura 23 muestra los porcentajes de inhibición de cada concentración de ambos compuestos problema, siendo únicamente las Nanopartículas de Oxido de Zinc quien tiene efecto sobre *Escherichia coli*.

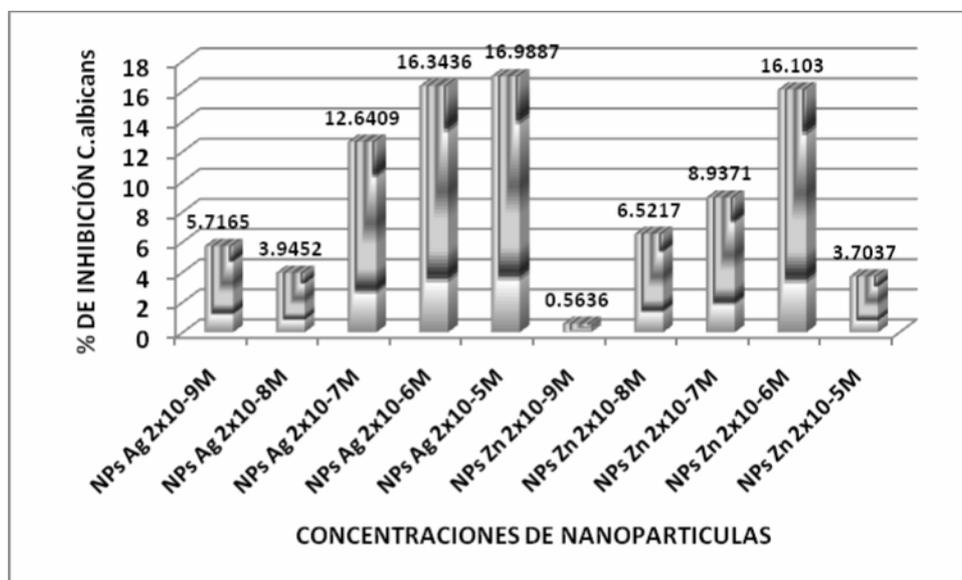


Figura 24. Porcentaje de inhibición de cada concentración de nanopartículas para *Candida albicans* (S=5.9902).

La **Figura 24** muestra los porcentajes de inhibición para cada concentración de ambos compuestos problema, teniendo mayor efecto inhibitorio a la concentración $2 \times 10^{-6} \text{M}$ en ambas NPs sobre *Candida albicans*.

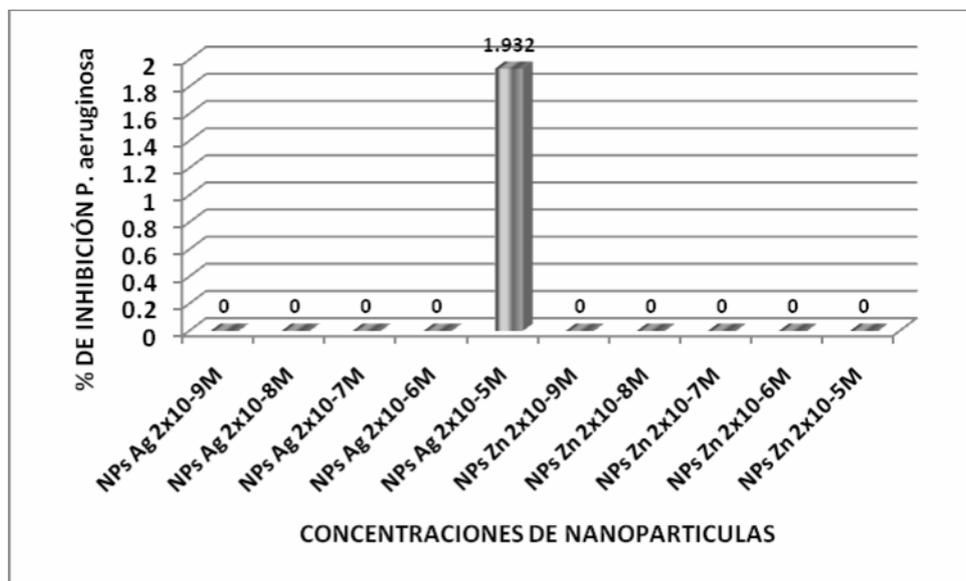


Figura 25. Porcentaje de inhibición de cada concentración de nanopartículas para *Pseudomonas aeruginosa* ($S=0.6109$).

La **Figura 25** muestra los porcentajes de inhibición de cada concentración de ambas nanopartículas, siendo únicamente las de Plata en la concentración de $2 \times 10^{-5} \text{M}$ quienes tuvieron efecto sobre *P. aeruginosa*.

10.3. MÉTODO DE RECuento EN PLACA

Otra PSA es la prueba de Recuento en placa la cual es muy usada en pruebas para establecer el efecto biocida de nuevos compuestos en forma cuantitativa. La cual en el presente experimento presento mejores resultados que los obtenidos en que las pruebas previas. Dichos resultados se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Porcentajes de inhibición en la prueba de recuento en placa.

Cepa Tratamiento	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Nanopartículas de Zinc [M]	%	%	%	%
1x10 ⁻⁵	75.81	70.30	37.32	43.08
1x10 ⁻⁶	69.93	61.21	38.73	42.16
1x10 ⁻⁷	64.70	48.48	20.42	31.14
1x10 ⁻⁸	54.24	10.30	7.04	10.90
Nanopartículas de Plata [M]	%	%	%	%
1x10 ⁻⁵	70.58	75.15	42.25	52.40
1x10 ⁻⁶	53.59	62.42	30.98	45.28
1x10 ⁻⁷	39.86	39.39	28.16	29.15
1x10 ⁻⁸	29.41	0	11.26	0
AgNO₃ 5.8 X 10⁻³ M	80.53	83.67	79.45	85.89
ZnSO₄ 6.1 X 10⁻² M	76.28	85.69	68.25	83.98
Clorhexidina 1.3 X 10⁻¹ M	78.69	85.43	76.09	87.76

La tabla 18 muestra que a diferencia de las pruebas anteriores de difusión en disco y dilución en caldo, demuestra el significativo efecto en la disminución del crecimiento de los cuatro microorganismos, especialmente en el caso *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* que resultaron ser más susceptibles a las diversas concentraciones de Nanopartículas de Plata como de Óxido de Zinc llegando incluso a presentar inhibición por arriba de 70% inhibición a concentraciones de 1x10⁻⁵; por el contrario en el caso de *S. aureus* presento más resistencia en esta prueba, presentando ante las diversas concentraciones de nanopartículas un % por debajo del 50 % en la concentración más alta.

10.4. MICROSCOPIA ELECTRONICA.

El estudio por microscopía electrónica de transmisión (MET) ayuda considerablemente a determinar el daño causado por las nanopartículas sobre los microorganismos, ya que en las fotografías se pueden observar ligeros cambios a nivel de pared celular.

El análisis por MET fue utilizado para evaluar la superficie morfológica de cada uno de los microorganismos posterior al tratamiento con las Nanopartículas de Óxido de Zinc y Nanopartículas de Plata. Este estudio demostró que las células bacterianas bajo el tratamiento presentaron ligeros cambios en su pared celular, caracterizados por la formación de *hoyos* y *de picos* provocando discontinuidad en su pared. Esto es demostrado en las siguientes fotografías donde se observan algunos cambios a lo largo de la pared bacteriana (**Fotografía 9 y 10**).

10.4.1. *Escherichia coli*

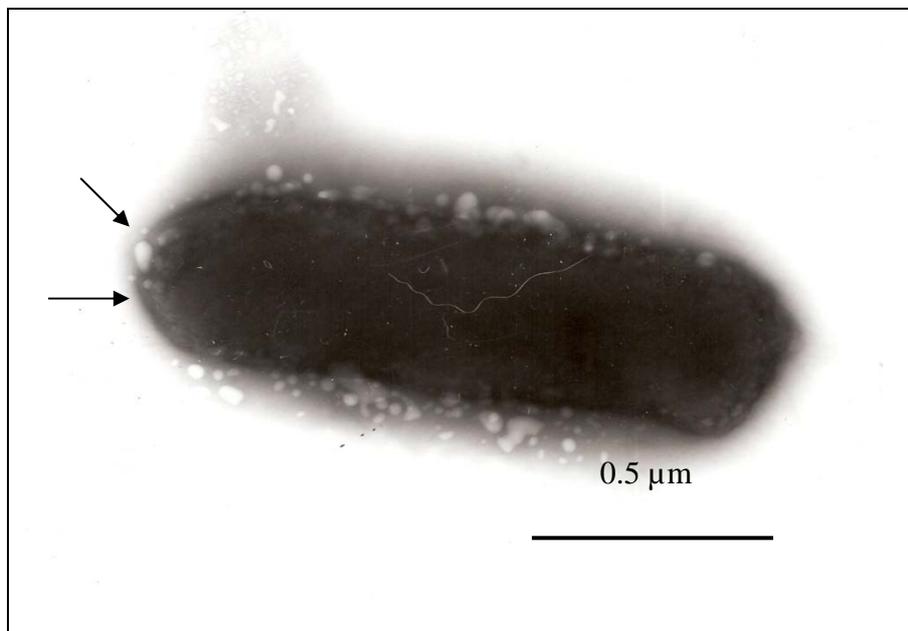


Foto 9. Imagen de MET de *Escherichia coli* frente a NPs de Óxido de Zinc, la cual presenta discontinuidad en su pared celular sobre el apice de la bacteria.

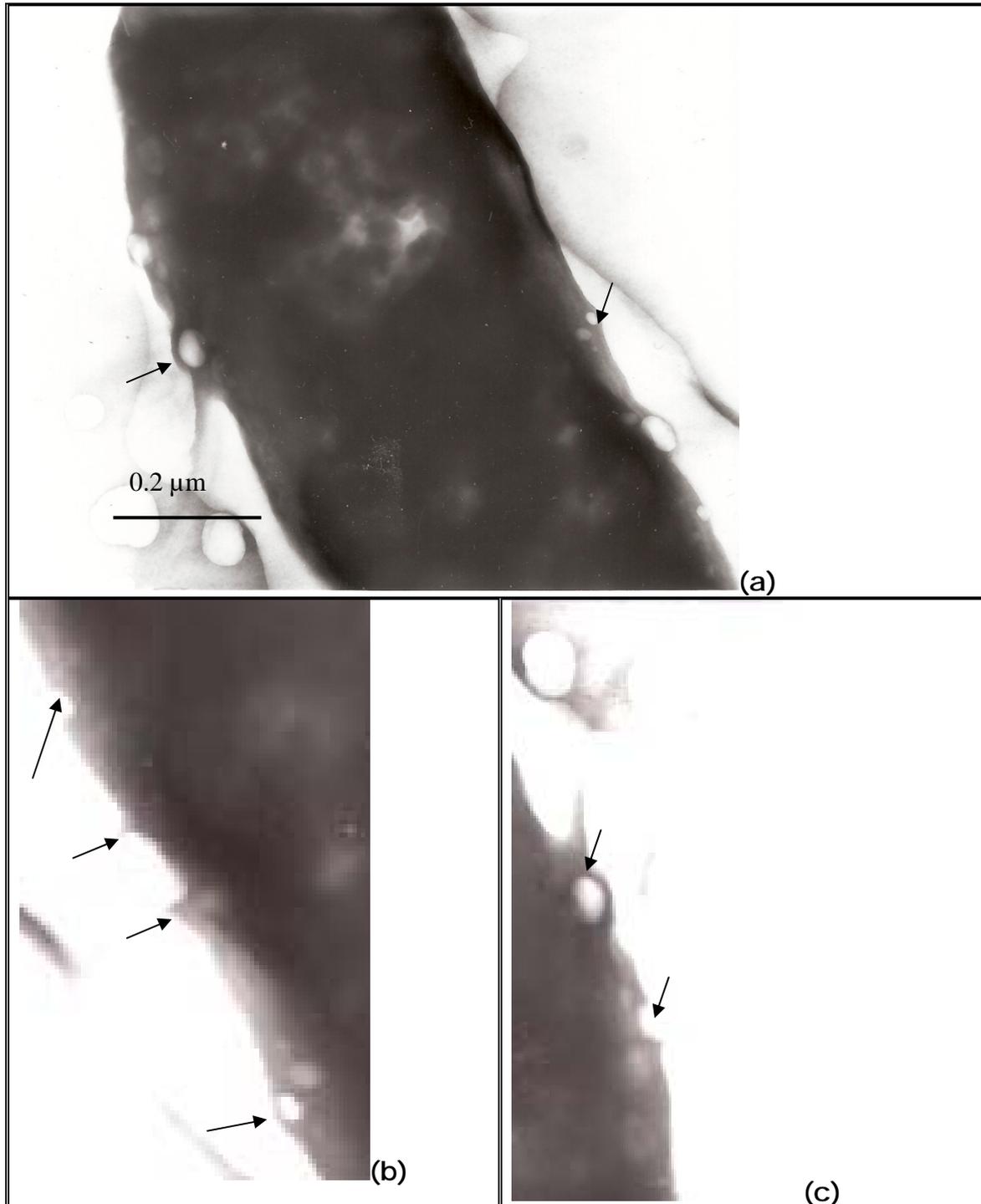


Foto 10. (a) Micrografía de MET de *Escherichia coli* frente a NPs de Plata, cuya pared celular presenta daño al tener contacto con Nanopartículas metálicas, el cual se caracteriza por presencia de picos (indicadores de la internalización del nanomaterial) (b) y la aparición de hoyos (c).

También se observó que los microorganismos frente a las nanopartículas en ocasiones tienden a formar uniones entre varias bacterias; a diferencia de aquellas que no se enfrentaron a un tratamiento donde generalmente cada bacteria se encontró de forma aislada (**Fotografía 11**).

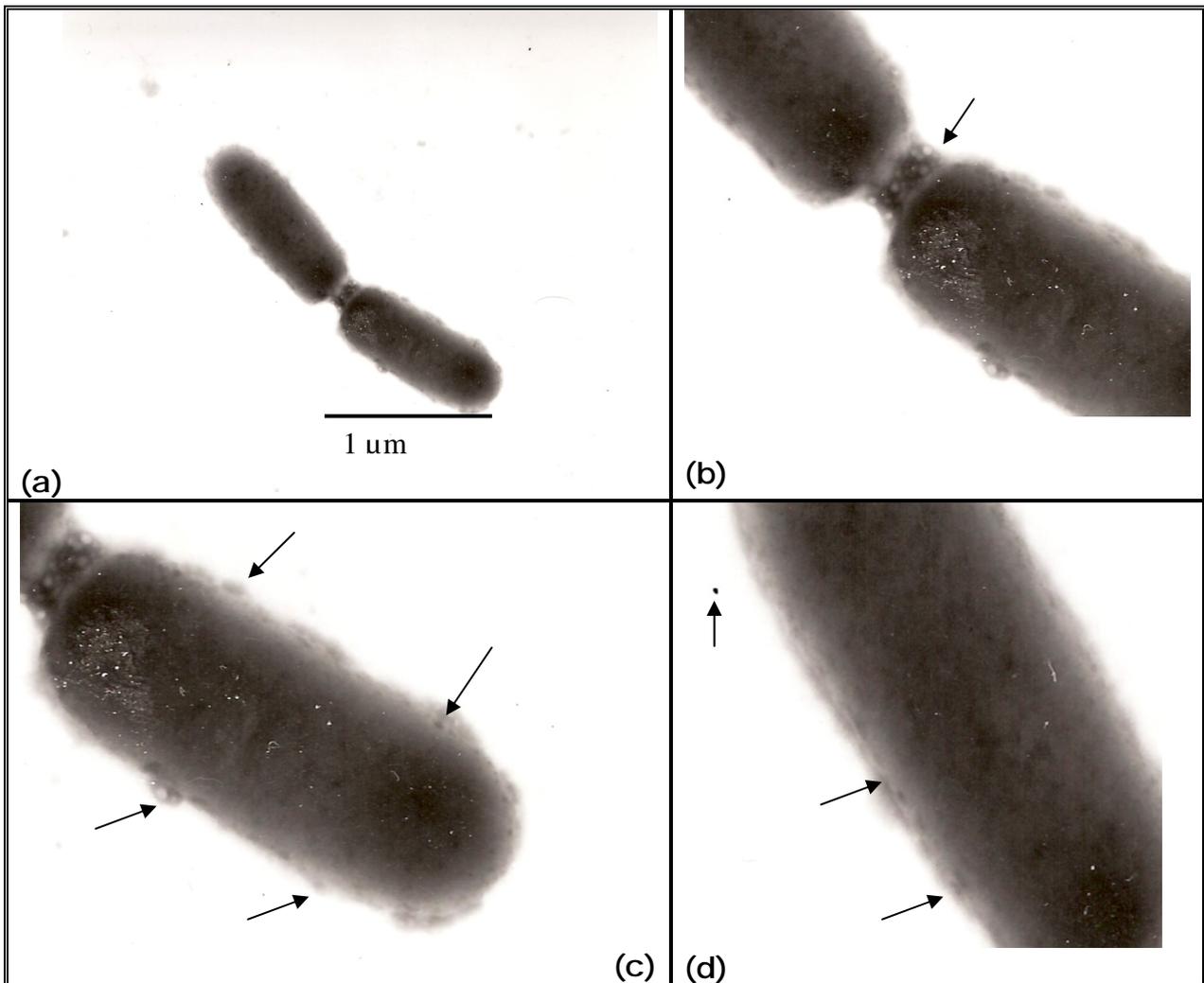


Foto 11. (a) Micrografía de MET de *Escherichia coli* frente a Nanopartículas de Oxido de Zinc donde se muestra la formación de uniones entre dos bacilos, propiedad característica al exponerse frente al nanomaterial (b); (c) y (d) la ampliación del microorganismo permite distinguir las Nanopartículas metálicas pegadas a la superficie, sin embargo no se puede establecer una internalización al no presentar un daño significativo en la pared celular.

En la **fotografía 11**, es posible distinguir algunas Nanopartículas unidas a la pared bacteriana, las cuales se observan como puntos más oscuros con respecto a la tinción de la bacteria. Debido al principio de la tinción negativa solo es posible establecer la presencia de nanopartículas sobre la bacteria, mas no así si estas llegaron a penetrar la membrana, es decir, su internalización.

10.4.2. *Candida albicans*

En el caso de *Candida albicans*, el análisis en MET por la técnica de tinción negativa se obtuvieron fotografías que muestran la presencia de lo que podemos pensar son sustancias producidas por *C. albicans* como parte de su metabolismo, en cuya longitud es distinguible la presencia de nanopartículas unidas (**Fotografía 12**).

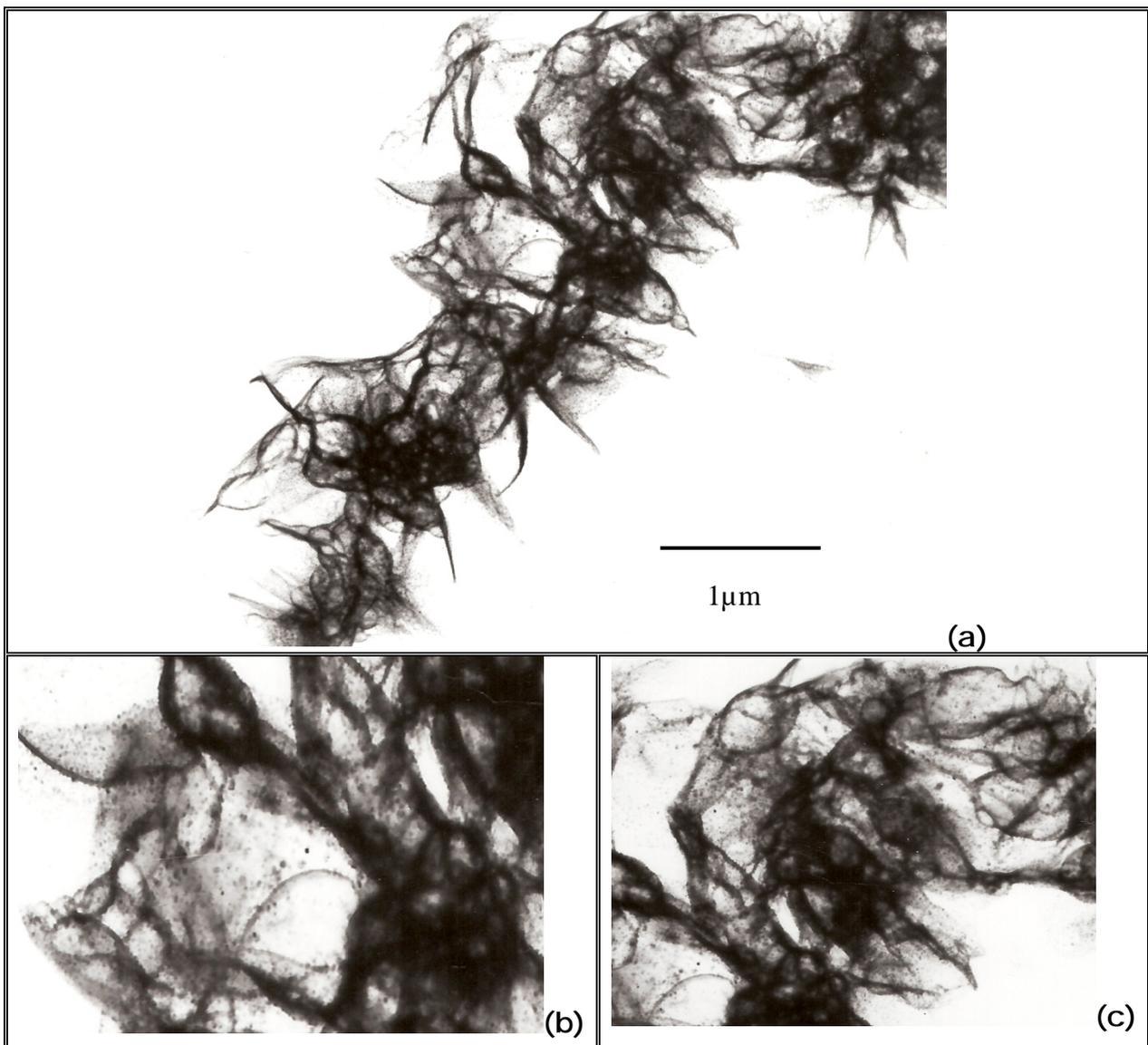


Foto 12. (a) Imagen de MET de Nanopartículas de Oxido de Zinc sobre una superficie cristalina presente en cultivo de *Candida albicans*; (b) y (c) imagen magnificada de la estructura cristalina donde es posible identificar diferentes NPs pegadas a lo largo de la superficie.

10.4.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Para el caso de *Pseudomonas aeruginosa* fue posible establecer la presencia de NPs unidas a su pared celular (**Fotografías 13,14 y 15**) en forma de cúmulos, pero no se establece la presencia de un cambio o daño aparente sobre la bacteria después de estar en contacto con el nanomaterial, tanto de plata como el de Oxido de zinc.

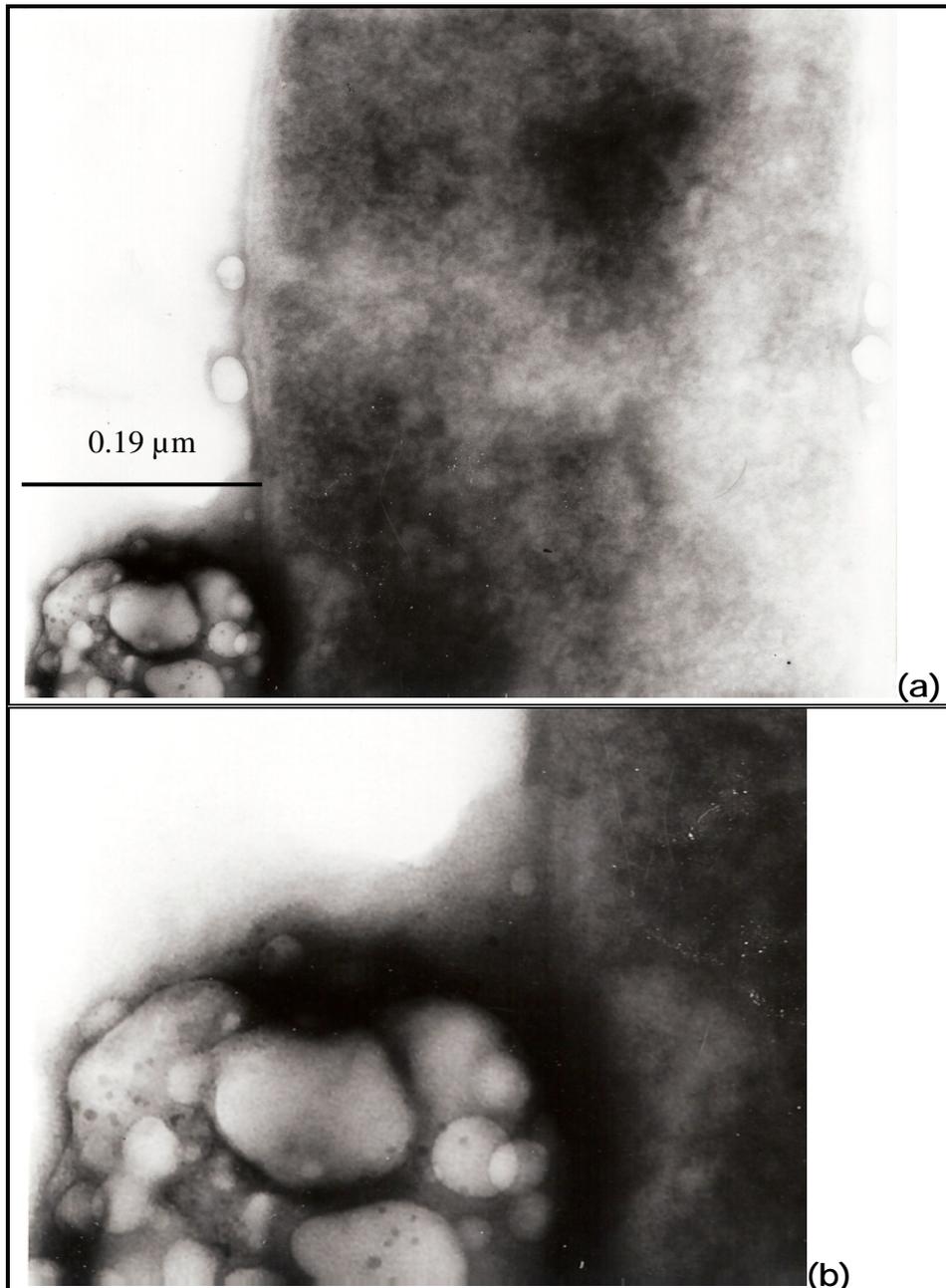


Foto 13. (a)Ampliación de la micrografía de MET de la pared celular intacta de *P. aeruginosa* frente a Nanopartículas de Ag; (b) presencia de NPs cercanas a la pared celular de la bacteria.

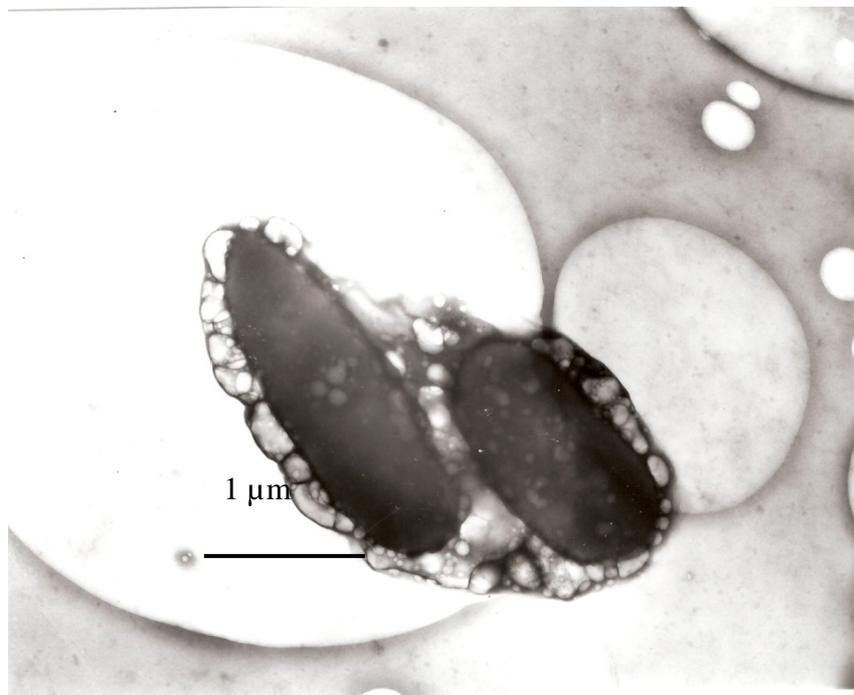


Foto 14. Imagen de MET de *Pseudomonas aeruginosa* frente a Nanopartículas de Plata, en la cual no se ve un daño aparente en la pared celular.

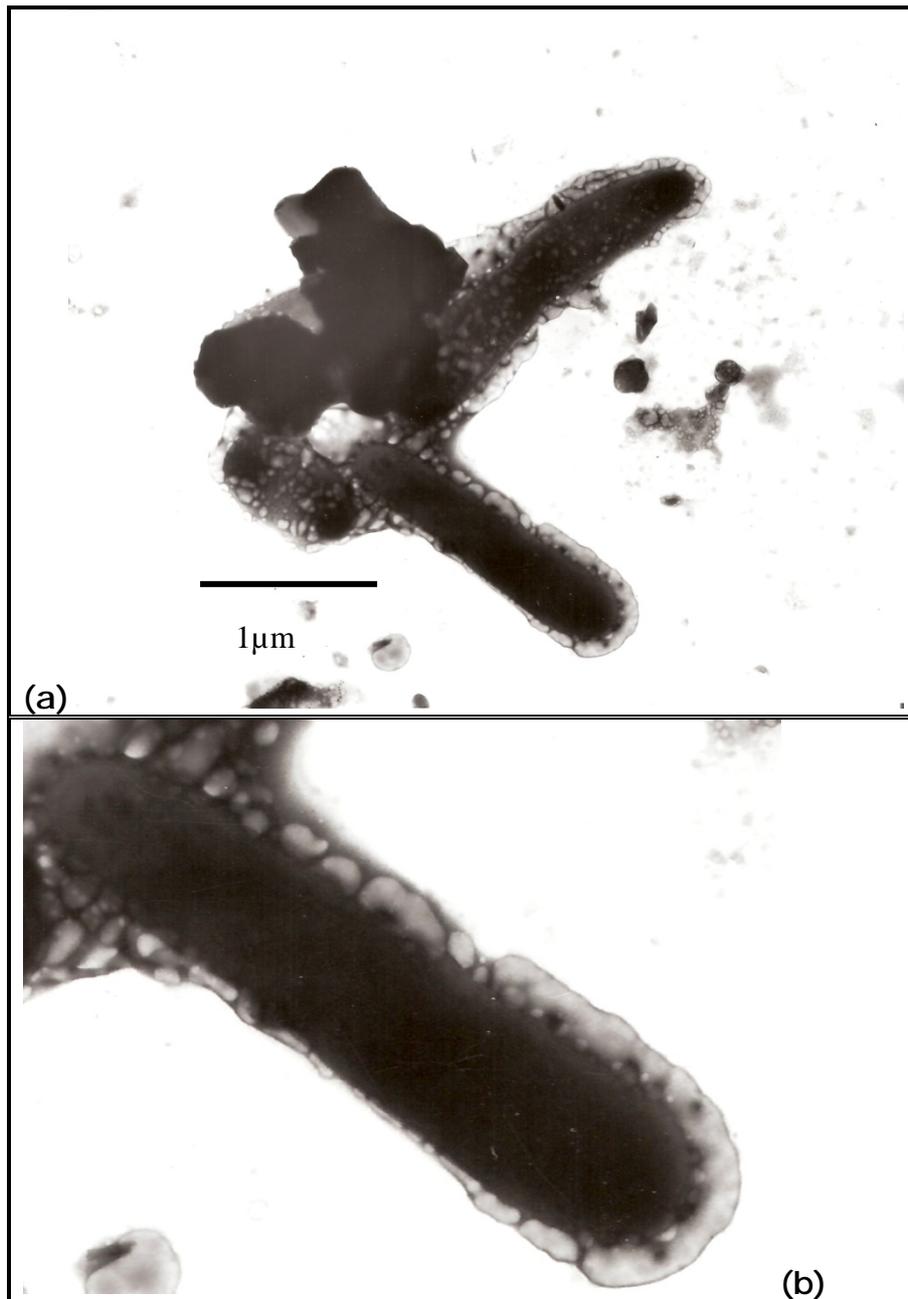


Foto 15. (a) Micrografía de MET de *Pseudomonas aeruginosa* frente a Nanopartículas de Óxido de Zinc después de 24 hr de contacto; (b) ampliación de la imagen donde se aprecia la presencia de cúmulos de Nanopartículas unidos a la superficie bacteriana. Sin embargo no es posible apreciar un daño en la superficie.

10.4.4. Staphylococcus aureus

En el caso de Staphylococcus aureus, se observaron semejanzas a lo encontrado con P. aeruginosa (**Foto 16**) al ver las NPs próximas a su pared celular en forma de cúmulos, sin embargo no se establece algún cambio en su morfología por la interacción del nanomaterial en comparación con la **Foto 17** que es Staphylococcus aureus sin tratamiento de NPs.

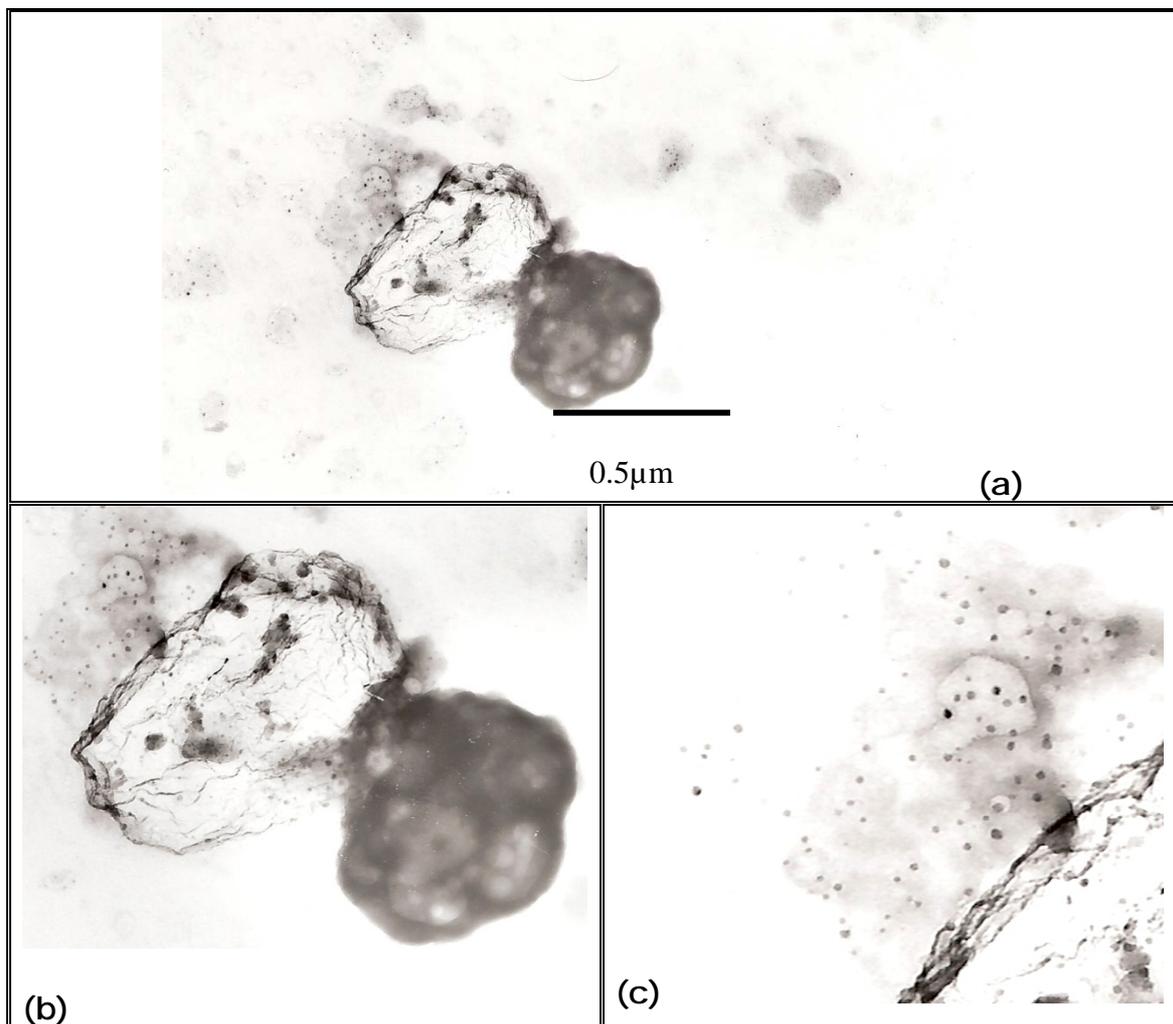


Foto 16. (a) Micrografía de MET de Staphylococcus aureus en racimo frente a Nanopartículas de Zinc; (b) y (c) imágenes magnificadas donde es posible distinguir las estructuras de las Nanopartículas cercanas a la estructura bacteriana, la cual no presenta un daño en su morfología.

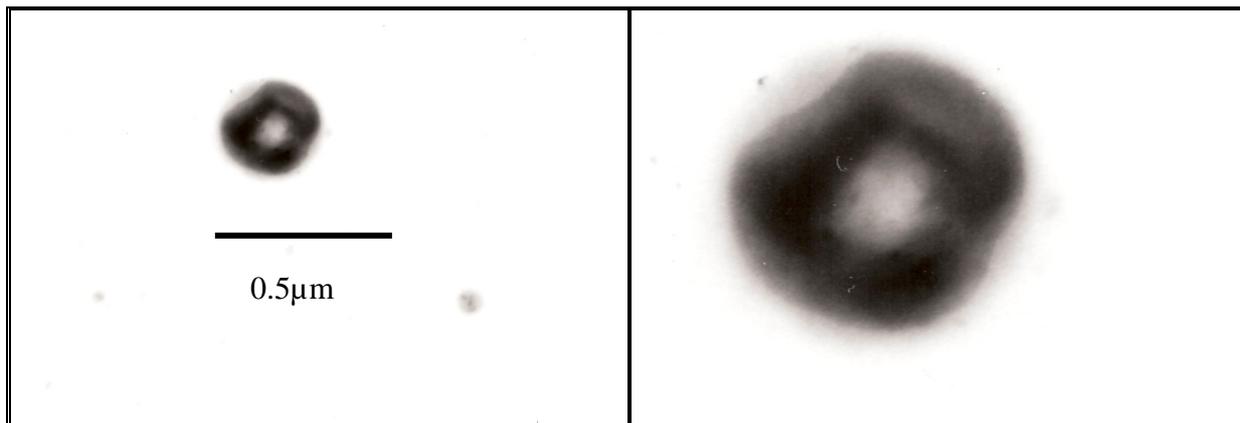


Foto 17. Micrografía de MET de *Staphylococcus aureus* sin tratamiento.

Las fotografías de MET muestran el efecto en la morfología bacteriana y del hongo con ambas Nanopartículas. Mediante la aplicación de técnicas de MET con la utilización de EPON (resina) y marcadores fluorescentes, se han reportado resultados favorables para corroborar la internalización, desestabilidad de la membrana bacteriana y mecanismos bactericidas del uso de nanomateriales (5,22).

11.0. DISCUSIÓN

Las NPs donadas por el laboratorio de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química, fueron sintetizadas mediante el método de reducción espontánea de 2-ethilhexanoato de plata para obtener NPs de Ag⁺ y el método de hidrólisis espontánea de sales dihidratadas de carboxilato de zinc para la obtención de NPs de ZnO. Las concentraciones de ambas sales en la solución Stock es de 1×10^{-3} M produciendo NPs estables en DMSO equivalentes a 8×10^{11} partículas/ml (cúmulos) de nanopartícula. Las NPs son menores a 10 nm de diámetro, en nuestro caso fueron de 4.4nm (S =1.2) para las NPs de Ag y 3nm (S =0.5) para NPs de ZnO. Este menor tamaño aumenta su volumen de superficie por cúmulo y así se obtiene mayor posibilidad de contacto con la superficie bacteriana; resultando en el incrementa de su actividad bactericida en las diferentes pruebas realizadas.

El principal efecto bactericida de las NPs metálicas esta relacionada al tamaño y forma de estos. Brayne, *et al* (2006) y Pal, S. *et al* (2007) encontraron que el grado de interacción con la pared celular del organismo Gram negativo con las NPs de ZnO y Ag depende grandemente de la relación forma-tamaño del nanomaterial, el cual influye directamente en la acción biocidal. De forma general, las NPs de Ag y ZnO típicamente menores a 20 nm de diámetro atacaran las proteínas de las membranas celulares bacteriales provocando una gran desorganización y permeabilidad de la membrana, resultando con ello la muerte de la bacteria.

La acción bactericida fue probada mediante las tres PSA en nuestro estudio, presentando diferencias con los resultados reportados por los autores antes mencionados, quienes obtienen porcentajes de inhibición cercanos al 100%. En nuestro caso solo resulta evidente el poder de

inhibición sobre el crecimiento microbiano en la prueba de recuento en placa (cuadro 18), en comparación a los porcentajes bajos de inhibición obtenidos con las pruebas de difusión en disco y la prueba de dilución en caldo.

En la prueba de difusión por disco se esperaba encontrar inhibición en el crecimiento microbiano frente a NPs, tanto de Ag como de ZnO, principalmente en las concentraciones más altas (2×10^{-5} M), concentración que se ha reportado altamente efectiva en la inhibición del crecimiento bacteriano, principalmente en NPs de Ag sobre enterobacterias y *S. aureus*. Sin embargo, como lo demostraron los resultados los dos tipos de NPs no provocaron algún efecto considerable de inhibición sobre el crecimiento bacteriano o el hongo frente a las diferentes concentraciones propuestas. Es probable que dentro de las causas influyentes, de más importancia, esta la poca difusión de las NPs en el medio, junto con la disminución progresiva de la concentración de estas conforme van difundiendo en el agar; con ello la poca difusión de las NPs presentes provocara poco contacto con los microorganismos y por tanto no habrá acción antimicrobiana. Por ello podemos considerar que el contacto de las NPs con los microorganismos fue de forma limitada para este tipo de prueba. Pal, S. *et al* (2007), reportan resultados semejantes en el cual el poco o limitado contacto de las NPs en el agar presentan menor actividad biocida sobre los microorganismos, en comparación con las pruebas realizadas en caldo.

Los resultados de la prueba de dilución en caldo (Cuadro 17) establecen la especial susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* frente a ambas NPs presentando una inhibición en su crecimiento por arriba del 50% a concentraciones de 2×10^{-5} M, en contraste los demás microorganismos presentaron una alta resistencia obteniendo un efecto de inhibición por debajo del 20% o ninguna reacción.

A pesar de que Kumar, et al (2006) y Lee, et al (2005) reportan una inhibición en *E.coli* por arriba del 50% en caldo frente a NPs de Ag; Sondi, et al (2004) encontraron que en medio líquido a altas concentraciones de NPs de Ag ($100\mu\text{g}/\text{cm}^{-3} = 9 \times 10^{-4}\text{M}$) causan solo el retardo en el crecimiento de *E.coli*. Con la creciente disminución de la concentración de NPs ($10\text{-}15\mu\text{g}/\text{cm}^{-3} = 9 \times 10^{-5}$ y $5 \times 10^{-4}\text{M}$) se permitió el crecimiento de las células bacterianas. Mediante SEM (Microscopio electrónico de barrido) demostró la presencia de agregados microscópicos de los compuestos NPs de Ag en las células muertas; agregados que indican una desestabilidad coloidal.

Pal, S. et al (2007) confirmaron que existe una disminución en la estabilidad coloidal de las NPs en caldo, resultado en un decremento en la efectividad de las concentraciones de NPs de Ag en caldo. Sin embargo encontraron un efecto sinérgico con la adición de surfactantes cationicos, alcanzando finalmente la muerte total de la bacteria.

Por tanto podemos establecer que las NPs tanto de ZnO como las de Ag tienen un uso limitado como material biocida en el sistema debido a la disminución en la estabilidad coloidal, reflejado en la disminución del % de inhibición después de 24hr de exposición frente al nanomaterial en medio líquido.

Los resultados de dilución en caldo presentaron mejores efectos de inhibición sobre el crecimiento de los microorganismos probados en comparación a los resultados de difusión en disco, ya que las nanopartículas en el caso del caldo tenían mayor contacto con los microorganismos pues se encontraban en el mismo medio y no disminuía la concentración en los pozos como ocurre en el caso de los

unidiscos mientras se va difundiendo la concentración de las nanopartículas durante su expansión.

Otra PSA realizada en este trabajo fue la prueba de recuento en placa la cual presento mejores resultados (Tabla 18) que los obtenidos en que las pruebas previas. Se mostró a diferencia de las pruebas de difusión en disco y dilución en caldo, que en esta existió mayor contacto del microorganismos a las diferentes concentraciones de nanopartículas, demostrado por el significativo efecto en la disminución del crecimiento de los cuatro microorganismos, especialmente en el caso *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* que resultaron ser mas susceptibles a las diversas concentraciones de nanopartículas de plata como de zinc llegando incluso a presentar inhibición por arriba de 70% a concentraciones de 1×10^{-5} M; por el contrario *Staphylococcus aureus* presento mayor resistencia en esta prueba mostrando ante las diversas concentraciones de nanopartículas un % por debajo del 50 % en la concentración más alta.

Mediante el análisis por MET hemos establecido la existencia elemental de NPs sobre la membrana de las bacterias y el hongo, mas no hemos podido establecer alguna internalización de estas. Esta observación es de importancia para tratar de explicar la acción antibacteriana de estas NPs de Ag. Es claro que estos microorganismos muestran cambios y daños en la membrana con el tratamiento, reconocidos por la formación de hoyos en la superficie (Ver fotografías 9 y 10). Efecto descrito previamente por Soudy, I. et al, (2004) al tratar a *E.coli* frente a NPs de plata. La morfología de los microorganismos exhibió un incremento significativo en la permeabilidad, incapacitando a las células bacterianas de una adecuada regularización de transporte de la membrana plasmática y finalmente causando la muerte de la célula.

Pal, S. et al, (2007) de igual forma menciona que la depleción o vaciamiento de NPs de plata puede causar la formación de formas irregulares de picos en la membrana externa, causando cambios en la permeabilidad de la membrana y con ello la progresiva pérdida o daño total de las moléculas de lipopolisacáridos (LPS) y proteínas de membrana. Nosotros creemos que un mecanismo similar de degradación de la estructura de la membrana de los microorganismos utilizados se presenta durante el tratamiento con NPs de Ag.

Mecanismos de acción.

El mecanismo de acción de inhibición de la plata sobre los microorganismos es parcialmente conocido, donde las proteínas celulares pierden su habilidad de replicación por la inactivación de la plata. En adición se ha demostrado que las uniones de plata con grupos funcionales de proteínas, provocan la desnaturalización de estas. En la literatura se han reportado y demostrado una atracción electrostática entre cargas negativas de las células bacteriales y las cargas positivas de las NPs, la cual es crucial para la actividad de las NPs como materiales bactericidas. Sin embargo las NPs de plata utilizadas en este estudio son cargadas negativamente. A pesar del rechazo de cargas entre las NPs de plata cargadas negativamente con la superficie cargada del microorganismo, si hay un efecto bactericida, dado probablemente a la interacción de las NPs con otros elementos estructurales; interacción suficiente para provocar cambios en la estructura, degradación de la membrana y finalmente la muerte del microorganismo. Desafortunadamente resulta difícil aun discernir el mecanismo de acción de las NPs y los constituyentes de la membrana externa de los microorganismos que interactúan.

El modo de acción antibacterial de los iones de Ag es conocido en algunos detalles. A concentraciones μM los iones Ag reporta que en la vía respiratoria ataca el transporte de electrones en la trifosforilación oxidativa, inhibe enzimas en vía respiratoria, e interfiere con la permeabilidad de protones y fosfato. En adición a altas concentraciones del ion Ag ha demostrado interactuar con componentes de citoplasma y ácidos nucleicos. *Chum-Nam, L. et al*, (2004) mediante estudios de microscopía electrónica revelaron en su estudio que la mayoría de nanopartículas de Ag se localizaban en la membrana de la bacteria (*E.coli*) mientras que algunas llegaban a penetrar la célula. Observaron acumulación de pro-precursores de proteínas de envoltura en células con tratamiento de Ag dando una idea del posible modo de acción de NPs de Ag. Previamente establecieron que la translocación de proteínas precursoras hacia el interior requiere de una membrana plasmática funcional que tenga un potencial electroquímico o potencial de membrana. Agentes que desaparecen el potencial de membrana son conocidos por inducir una acumulación de precursores de proteínas de envoltura en el citoplasma. En adición la translocación de precursores de proteínas de membrana también requieren de ATP. Establecieron que la acumulación de proteínas precursoras en células bajo tratamiento es debido a la desestabilización de membrana y des-energización de esta, por propiedades de NPs Ag.

El efecto de NPs de Ag respectivamente en el CMI sobre el potencial de la membrana citoplasmática en células de *E.coli* fueron examinados por técnica de fluorescencia que les indicó una desaparición en el potencial de membrana. El potencial de membrana es mantenido por la alta cantidad intracelular de iones K que después de cinco minutos de tratamiento se detectó una disminución de K intracelular. Los niveles de ATP de la *E.coli* después del tratamiento también se veían afectados al disminuir. La membrana externa de las bacterias es una barrera de

sustancias hidrofobicas y macromoleculas donde las NPs afectaran su integridad, desestabilizandola y con ello incrementando su susceptibilidad

Por otro lado la acción de Nps de ZnO sobre los microorganismos, a pesar de poseer carga positiva, no fue tan eficiente como las NPs de Ag. El zinc al ser un micro nutriente esencial para el crecimiento máximo de microorganismo y otras células; al ser un componente activador de algunas enzimas (alcohol deshidrogenasa, aldolasa, DNA polimeriza dependiente de RNA, etc), incluso ser parte de membrana biológicas y pared celular de bacterias negativas como el caso de *E. coli.*, provoca un efecto contrario a la inhibición en los microorganismos. Lo cual es demostrado en cada uno de los resultados obtenidos, donde a pesar de presentar una concentración alta de NPs en la placa de agar o en medio liquido no hay una disminución significativa en el crecimiento del microorganismo, ya que el Zinc es utilizado como un nutriente más en su metabolismo en lugar de funcionar como un antibacteriano o antimicótico. Tal es el caso de la tolerancia de *P. aeruginosa* a las altas concentraciones al Zinc debido a su requerimiento como nutriente al ser usado para el almacenamiento e integridad de la pared celular de la bacteria (Brayner, R. et al 2006). Probablemente en concentraciones superiores a las utilizadas (arriba de 2×10^{-5} M) se logre obtener resultados favorables como antibactericidas. Por el contrario las concentraciones bajas de NPs de Zinc son aparentemente requeridas por todas las bacterias, incluyendo hongos. Sin embargo el mecanismo responsable de la toxicidad a concentraciones elevadas de NPs de Zn son aun desconocidas, pero se ha sugerido que el exceso de zinc puede interferir en el metabolismo de Mg^{+2} .

12.0. CONCLUSIONES

- El presente trabajo es un estudio preliminar de la acción antimicrobiana de las NPs de ZnO y NPs de Ag sintetizados por métodos hidrólisis y reducción espontánea.
- Los datos demuestran que a concentraciones bajas utilizadas de Nps ($\geq 2 \times 10^{-6}$) no se presenta un daño mayor al 50%. Sin embargo las bacterias y el hongo después del contacto de NPs de ZnO y NPs de Ag a una concentración de 2×10^{-5} en el método de dilución en placa fue posible encontrar un daño significativo.
- Las NPs tienen un uso limitado como nanomaterial biocida en la prueba de dilución en caldo al disminuir su estabilidad coloidal.
- No se establece la acción bactericida o bacterioestática de ambas NPS probadas, solo se establece un efecto de inhibición en el crecimiento bacterial y de la levadura.
- La unión de Nps a la membrana de los microorganismos se estableció a través del estudio de MET por técnica de tinción negativa, la cual demostró daño en la pared celular mediante la aparición de hoyos y picos, mas no se establece la internalización de las NPs.
- Este estudio puede complementarse mediante la utilización de monitoreo de crecimiento de los microorganismos frente a ambas NPs a diferentes concentraciones por arriba de 2×10^{-5} M, estudios de MET por método de corte y utilización de métodos de fluorescencia.

V. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, K.L., *et al*, 2006. **Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions.** *Rev. Water Research*; 40: 3527-3532.
2. Arevalo, M., *et al*, 1996. **Guía de utilización de antisepticos.** *Sociedad española de medicina preventiva salud publica e higiene.* (SEPSPH). (URL: www.mpsp.org/mpsp/Documentos/Desinfec/antisept.htm)
3. Avalos, J. 2006. **Effect of zinc oxide nanocrystales in media containing E.coli and C. xerosis bacteria.**
4. Babich, H. and G. Stotzky. 1978. **Toxicity of zinc to fungi, bacteria, and coliphages: Influence of Chloride ions.** *Applied and Environmental microbiology.* Dec; 36(6): 906-914.
5. Brayner, R., *et al*, 2006. **Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloid medium.** *Nano. Lett- Apr*; 6(4): 866-70.
6. Cooney, J.J. and Pettibone, G.W. 2000. **Metals and microbes in toxicity testing.** *Bulleting of Enviromental contamination and toxicology.* May; 64(5): 726-734.
7. Díaz, M.G. y Ferran, C.J. 2004. **Fundamentos y técnicas de análisis microbiológico. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.** *Lab. De Diagnostico clínico.* España. pp
8. Famiglietti, A., *et al*, 2004. **Actualización del consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en cocos gram-positivos.** *Coordinación de Subcomisión de antimicrobianos, SADEBAC:AAM.* Buenos Aires. Argentina.

9. Feng, Q.L., *et al*, 2000. **A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.** *J. Biomed Mater. Res. Dec* 15;52(4):662-8.
10. García, F.M.M. 1985. **Identificación bioquímica y pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos por el método de dilución seriada en placa en bacilos gram negativos no fermentadores de glucosa.** *TESIS de Licenciatura (Químico farmacéutico biólogo)-UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. México.*
11. Ghule, K., *et al*, 2006. **Preparation and characterization of ZnO nanoparticles coated paper and its antibacterial activity study.** *Green Chem.* 8: 1034-1041.
12. Guerrero, O.J. 2003. **Determinación de la concentración mínima inhibitoria de nuevos derivados de ácido carbámico contra *Helicobacter pylori*.** *TESIS de Licenciatura (Químico farmacéutico biólogo)-UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. México.*
13. Horna, Q.G., *et al*, 2005. **Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas.** *Rev.Med.Hered.* 16: 39-45
14. Ip, M., *et al*, 2005. **Antibacterial activities of silver dressings: an *in vitro* comparison.** *Journal of Medical Microbiology.* 55: 59-63.
15. Jain, P. and T. Pradeep. 2004. **Potencial of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter.** *Wiley Periodicals, Inc.:* 59-63.

16. Jawetz, E., *et al*, 1997. **Manual de microbiología medica**. El manual moderno. México.Pp
17. Jordan, L. 2007. **Nanotechnology helps battle the bugs**. *BUILD*. February/march.: 45-46.
18. Jurado, S.B y Petrucelli, M.A. 2005. **Aplicaciones de la microscopia electrónica en el diagnostico microbiológico**. *Analista veterinaria*. 25(1):18-24. URL: www.fcv.unip.edu.ar/analecta/vol25n1/097juradoME.pdf
19. Kim, J.S., *et al*, 2007. **Antimicrobial effects of silver nanoparticles**. *Nanomedicine*. Mar; 3(1):95-101.
20. Kumar, G.S., *et al*, 2006. **Green fluorescent protein-expressing *Escherichia coli* as a model system for investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles**. *Langmuir*. 22: 9322-9328.
21. Lee, D., *et al*, 2005. **Antibacterial properties of Ag Nanoparticles loaded multilayers and formation of magnetically directed antibacterial microparticles**. *Langmuir*. 21:9651-9659.
22. Lok, C.N., *et al*, 2006. **Proteomic analysis of the mode of antimicrobial action of silver nanoparticles**. *J. proteom Res*. Apr:5(4): 916-24.
23. MacFaddin, F. 1990. **Pruebas bioquímicas para a identificación de bacterias d importancia clínica**. Editorial Médica Panamericana. México. Pp.
24. **Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana** (URL: www.cdc.gov/old/ohs/biosfty.htm.)

25. Mendoza, T.C., et al, 2003. **Susceptibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* sensible, con sensibilidad "BORDERLINE" y resistentes a la meticilina.** *Rev. Med. Herd.* 14(4): 181-184
26. Morones, J.R., et al. 2005. **The bactericidal effect of silver nanoparticles.** *Nanotechnology* ;16(10): 2346-53.
27. Ortega, A.D.G. 2005. **Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los derivados de ácido carbámico en *C. albicans* y *C. neoformans*.** *TESIS de Licenciatura (Químico farmacéutico biólogo)-UNAM.* Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. México.
28. Pal, S., et al, 2007. **Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticles? A study of the gram-negative bacterium *Escherichium coli*.** *Applied and Environmental microbiology.* Mar.; 73(6): 1712-1720.
29. Payne, S.M. and Finkelstein, R.A. 1978. **The critical role of iron in host bacterial interactions.** *J.clin Invest.,Jun ; 61(6): 1428-40*
30. Postek, M.T., et al, 1980. **Scanning electron microscopy. A studentes Handbook.** Lab. Research Industries Inc. USA. Pp. 278.
31. Rivas, R.X. 2005. **Evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria contra *Helicobacter pylori* de nuevos derivados del ácido carbámico y en combinación con nitazoxamida, amoxicilina y metronidazol.** *TESIS de Licenciatura (Químico farmacéutico biólogo)-UNAM.* Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. México.

32. Rodríguez, G.G., et al, 2002. **Metallic nanoparticles from spontaneous reduction of silver (I) in DMSO. Interaction between Nitric Oxide and Silver nanoparticles.** *J.Phys. Chem. B. 106* : 2482- 2487.
33. Rodríguez, G.G., et al, 2003. **Novel síntesis pathway of ZnO nanoparticles from the spontaneous hydrolysis of zinc carboxylate salts.** *J.Phys. Chem. B. 107*: 12597-12604.
34. Rodríguez, S.R., et al, 2000. **Características de la resistencia antimicrobiana de la colección clínica de *Streptococcus pyogenes*.** *Salud pública México. 42*: 226-229.
35. Sanchez, S.L y Saenz, A.E. 2005. **Antisépticos y desinfectantes.** *Dermatol. Perú. 52* (2)
36. Shuting, Z., et al, 2004. **Preparation and characterization of antibacterial silver-dispersed activated carbon aerogels.** *Carbon 42*: 3209-3216.
37. SIR. 2001. **Sistema Informativo de Resistencia. Análisis de los dos cortes de prevalencia del año 2001.** Argentina. (URL: www.aam.org.ar/Informe%20SIR%202001.php)
38. Sondi, I. and Salopeck-Sondi, B. 2004. **Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E.coli* as a model form gram-negative bacteria.** *J.Colloid Interface Sci. Jul;275(1)*: 177-82.
39. Sukdeb, P., et al, 2007. **Does the antimicrobial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticles? A study o the gram-negative bacterium *Escherichia coli*.** *Research Institute of Pharmaceutical Scienses and Colege of Pharmacy, Seoul National University.*

40. Williams, D.N., *et al*, 2006. **Evaluation of the microbial growth response to inorganic nanoparticles.** *J Nanobiotechnology*. Feb 28;4: 3.
41. Yacoby, I., *et al*, 2007. **Targeted drug-carrying bacteriophages as antibacterial nanomedicines.** *Antibacterial agents and Chemotherapy*, June; 51(6): 2156-2163.
42. Yamamoto, O., *et al*, 2004. **Effect of lattice constant of zinc oxide on antibacterial characteristic.** *J Mater. Sci. Mater. Med.* Aug; 15(8): 847-51.
43. Yamanaka, M., *et al*, 2005. **Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis.** *Applied and Environmental microbiology*. Nov; 71(11): 7589-7593.
44. Zhingan, H., *et al*, 2006. **Suspension of silver oxide nanoparticles in chitosan solution and its antibacterial activity in cotton fabrics** (URL: www.cdc.gov/old/ohs/biosfty.htm)
45. URL: germanluis_2003@ yahoo.com.ar
46. URL: germanpuigdomenech@ hotmail.com
47. URL: <http://www.monografias.com/trabajos14/patogenos/patogenos.shtml>
48. URL: http://es.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli.
49. URL: <http://www.sdpt.net/controlquimicoplacabacteriana.htm>

50. URL: <http://www.puc.cl/manejoheridas/html/antiseptico.html>
51. URL: http://www.javeriana.edu.co/academiapgendodoncia/i_a_revision31.htm
52. URL: <http://investigacion.uson.mx/posgrados/doc-materiales.htm>
53. URL: http://es.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus
54. URL: <http://coli.usal.es/Web/educativo/micro2/tema02.html#anchor>
55. URL: <http://www.educa.aragob.es>
56. URL: <http://es.wikipedia.org/wiki/Candidiasis>
57. URL: <http://es.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas>
58. URL: mail.fq.edu.uy/~microbio/MGral/practico/segundociclo.doc
59. URL: <http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/509/analisis2.pdf>
60. URL: <http://www.seimc.org/document/protocolos/microbiologia/cap11.http>
61. URL: <http://www.drugs.com/pro/chlorhexidine.html>
62. URL: http://www.ust.cl/html/cree/asignaturas/material_profesor/material_biologen/laboratorio/microscopio.pdf

