

Metodologías analíticas para el estudio de efectos sinérgicos bactericidas entre nanomateriales base plata y antibióticos

Trabajo Fin de Máster

Máster en Nanotecnología Medioambiental

Ana Cristina Giménez Ingalaturre

Director: Juan Ramón Castillo Suarez

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Analítica

Curso 2016/2017



Departamento de
Química Analítica
Universidad Zaragoza



Instituto Universitario de Investigación
en Ciencias Ambientales
de Aragón
Universidad Zaragoza

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Juan Ramón Castillo, director de este trabajo, y al Dr. Francisco Laborda por su apoyo y dedicación durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Pilar Goñi, por todo lo que me ha enseñado en el campo de la microbiología, y por su apoyo y ayuda en el desarrollo experimental del trabajo.

A todos los miembros del grupo GEAS (Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores) por su ayuda durante este tiempo, y al IUCA (Instituto Universitario de Investigación de Ciencias Ambientales de Aragón).

Y por último, a Laboratorios Enosan S.L. por proporcionarnos las muestras de antibióticos que se utilizan en este trabajo.

RESUMEN

La resistencia bacteriana a los antibióticos constituye un problema mundial de salud pública ya que supone una amenaza para la continuidad de la eficacia de muchos antibióticos utilizados actualmente, lo que conlleva a su vez a un incremento en la tasa de morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas. Una estrategia prometedora para combatir esta resistencia es la combinación de un antibiótico tradicional con nanopartículas de plata, las cuales muestran un amplio espectro de propiedades antibacterianas.

En este trabajo se ha llevado a cabo un estudio de detección, caracterización y cuantificación de nanopartículas de plata en distintas muestras de antibióticos y del efecto antibacteriano y la existencia de posibles efectos sinérgicos como consecuencia de la combinación de los antibióticos y las nanopartículas. Para el estudio fisicoquímico de las muestras se han aplicado distintas metodologías analíticas como digestión ácida, lixiviación de las muestras no solubles, ultrafiltración o extracción en punto de nube; y las técnicas de microscopía electrónica, reflectancia y espectrometría de absorción molecular y atómica. Para el estudio de la sensibilidad bacteriana y la determinación de efectos sinérgicos se ha realizado un método de difusión y uno de dilución.

Los resultados obtenidos confirman la presencia de nanopartículas de plata en las muestras de antibióticos y permiten obtener información sobre el tamaño y el estado de agregación de las mismas y cuantificar la plata total, la plata (I) y las nanopartículas de plata presentes en las muestras. Los resultados microbiológicos demuestran la susceptibilidad de algunas de las muestras frente a distintas bacterias y los efectos sinérgicos que se producen al combinar antibióticos con nanopartículas de plata.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Los antibióticos	7
1.2. Estrategias terapéuticas contra la resistencia bacteriana.....	9
1.3. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de los antibióticos modificados con nanopartículas de plata	11
1.3.1. Caracterización fisicoquímica	12
1.3.2. Caracterización microbiológica	13
2. OBJETIVOS.....	14
3. INSTRUMENTACIÓN Y MATERIALES	14
3.1. Detección, caracterización y cuantificación de las nanopartículas de plata en los antibióticos	14
3.1.1.Muestras de antibióticos.....	14
3.1.2.Materiales y reactivos.....	15
3.1.3.Instrumentación y aparatos.....	16
3.2. Determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos.....	16
3.2.1.Cepas bacterianas	16
3.2.2.Medios de cultivo	17
3.2.4.Instrumentación y aparatos.....	18
4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	18
4.1. Detección, caracterización y cuantificación de las nanopartículas de plata en los antibióticos	18
4.1.1.Tratamientos previos	18
4.1.1.1. Digestión ácida	18
4.1.1.2. Disolución en agua.....	19
4.1.1.3. Lixiviación	19

4.1.1.4.	Ultrafiltración.....	19
4.1.1.5.	Extracción en punto de nube (CPE).....	20
4.1.2.	Reflectancia	20
4.1.3.	Espectroscopía de absorción molecular UV-Visible (MAS UV-vis).....	21
4.1.4.	Espectroscopía de absorción atómica con atomización en llama (F-AAS).....	21
4.1.5.	Microscopía electrónica de barrido de campo extendido (FESEM)	22
4.2.	Determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos.....	22
4.2.1.	Método de difusión: antibiogramas	22
4.2.2.	Método de dilución: determinación de CIM y CBM	24
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
5.1.	Detección, caracterización y cuantificación de las nanopartículas de plata en los antibióticos	25
5.1.1.	Detección de las nanopartículas mediante reflectancia y MAS UV-vis.....	25
5.1.2.	Cuantificación de la plata total mediante digestión ácida	29
5.1.3.	Estudio de liberación de plata mediante disolución en agua ultrapura.....	30
5.1.4.	Determinación de la fracción de Ag(I) liberada mediante ultrafiltración....	32
5.1.5.	Determinación de la fracción de nanopartículas de plata mediante CPE	34
5.1.6.	Caracterización de nanopartículas de plata mediante FESEM	36
5.2.	Determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos.....	38
5.2.1.	Método de difusión: antibiogramas	38
5.2.2.	Método de dilución: determinación de CIM y CBM	42
6.	CONCLUSIONES	46
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS	48
8.	BIBLIOGRAFÍA	49

ANEXOS

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas siguen siendo durante el siglo XXI una de las causas más importantes de muerte en la humanidad, aunque su contribución relativa ha ido disminuyendo desde el siglo XIX. La introducción de los antibióticos en la práctica clínica en la década de los cuarenta del siglo pasado supuso un gran control de las enfermedades y aumentó en varios años la esperanza de vida de la población.

Los antibióticos han salvado millones de vida y han supuesto una revolución en la medicina; sin embargo, desde hace años una amenaza creciente deteriora la eficacia de estos fármacos: la resistencia bacteriana. La resistencia bacteriana a los antibióticos se define como la capacidad de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de antibiótico que inhiben o matan a otras de la misma especie.¹ Este fenómeno constituye un problema mundial de salud pública y determina un incremento en la tasa de morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas tanto en los países subdesarrollados como en los más avanzados.

La investigación bacteriológica a lo largo de los años demuestra la rápida progresión de la resistencia bacteriana a los antibióticos. Cada vez que se ha empleado un nuevo antibiótico las bacterias se han adaptado a él con mayor rapidez, necesitando en general sólo de dos a cuatro años para desarrollar nuevos mecanismos de defensa.² Al poco tiempo de introducirse la penicilina en la práctica clínica la gran mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* eran sensibles, mientras que actualmente lo son menos del 5-10%. Lo mismo ocurre con las cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*; a principios de la década de los ochenta eran sensibles a la cefotaxima y actualmente son resistentes el 13 y 16%, respectivamente, de los aislamientos de hemocultivos en España.¹

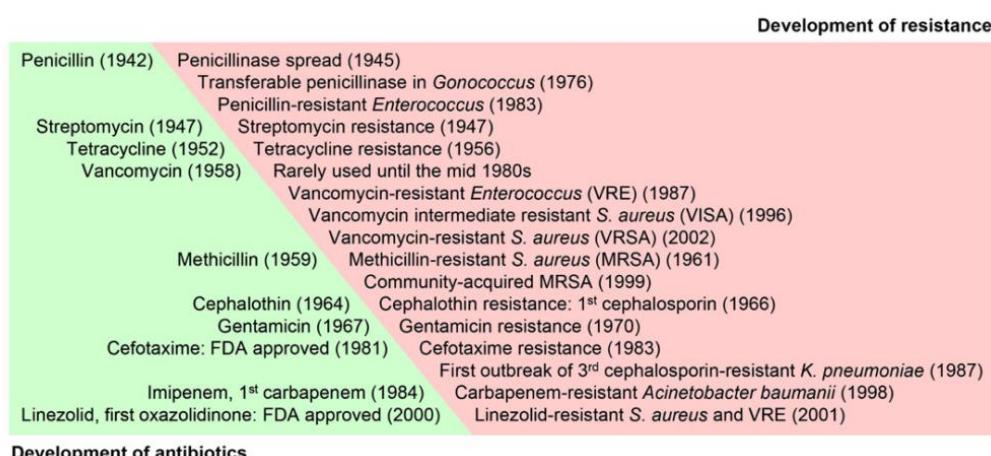


Fig. 1: Historia del desarrollo de los antibióticos vs. descubrimiento de la resistencia bacteriana³

La resistencia de las bacterias a los antibióticos puede ser natural, provenir de mutaciones o bien originarse por transferencia de genes. Cuando todas las cepas pertenecientes a la misma especie son resistentes a un antibiótico, se habla de resistencia intrínseca. Ésta puede producirse por particularidades de la pared bacteriana que impiden acceder el antibiótico a su diana, como en el caso de *Pseudomonas* que son resistentes a muchos antibióticos por impermeabilidad de la membrana. Cuando la resistencia bacteriana sólo aparece en algunas cepas de una especie normalmente sensible se habla de resistencia adquirida, que es la forma más habitual de su presentación y puede ser por mutación, mediante transmisión vertical, o por la adquisición de nuevos genes, mediante difusión horizontal.²

Los mecanismos por los que las bacterias se vuelven resistentes son: alteración o inactivación del antibiótico por la producción de enzimas que hidrolizan o modifican la molécula, alteración de la permeabilidad de la membrana, expulsión de fármacos por bombas de eflujo y alteración de las proteínas diana.^{2,4}

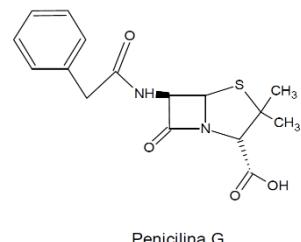
Los mecanismos por los que las bacterias pueden intercambiar material genético y así adquirir los distintos genes de resistencia pueden ser: transformación (adquisición e incorporación de DNA exógeno desnudo), transducción (el vector es un virus bacteriano) y conjugación (el DNA se transfiere de una bacteria donante a una bacteria receptora a través de contacto celular). La conjugación está mediada por plásmidos, que son fragmentos circulares de DNA bicatenario que contienen genes de resistencia y poseen la capacidad de replicarse independientemente del sistema de duplicación del material genético de la bacteria. Un mismo plásmido puede contener varios genes de resistencia, lo que permite que la bacteria se vuelva multirresistente en una sola etapa de replicación.²

1.1. Los antibióticos

Los antibióticos son sustancias químicas naturales o semisintéticas producidas por varias especies de microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos) que suprime el crecimiento de otros microorganismos originando su destrucción. Los antibióticos presentan diferencias pronunciadas en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, espectros antibacterianos y mecanismos de acción.^{5,6}

A continuación, se van a describir las características generales de los antibióticos utilizados en este trabajo:

- Penicilina: constituye uno de los grupos de antibióticos de mayor importancia en el mundo actual. Su estructura básica está formada por un sistema cíclico β -lactámico unido a un anillo tiazolidínico que origina el ácido 6-aminopenicilánico. Este núcleo es el elemento estructural fundamental para su actividad biológica. La transformación metabólica o alteración química de esta parte de la molécula produce la pérdida de toda actividad bacteriana.⁸



Penicilina G

Fig. 2: Estructura química de la penicilina G⁸

Las penicilinas son agentes bactericidas que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana e inducen un efecto autolítico que destruye el peptidoglucano. La destrucción de la pared celular bacteriana se produce como consecuencia de la inhibición de la última etapa de la síntesis del peptidoglucano por la similitud estructural de la penicilina.⁹

El espectro antimicrobiano de las penicilinas incluye bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y espiroquetas. La penicilina G es muy activa contra bacterias Gram-positivas, pero su actividad contra algunas bacterias Gram-negativas como *Klebsiella sp.* y *Pseudomonas aeruginosa* no es suficiente.

- Eritromicina: es un antibiótico con un anillo de 14 carbonos que pertenece al grupo de los macrólidos. Se utiliza en pocas aplicaciones clínicas.

La eritromicina se une a la subunidad 50S del RNA ribosómico inhibiendo la síntesis de proteínas. Es efectiva frente a un amplio espectro de microorganismos. Entre los microorganismos Gram-positivos susceptibles a la eritromicina se incluyen *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus* y *Corynebacterium spp.* Otros microorganismos susceptibles son *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia trachomatis* o *Mycoplasma pneumoniae*.¹⁰

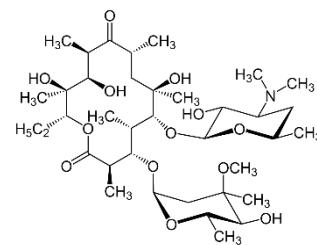


Fig. 3: Estructura química de la eritromicina¹⁰

En este trabajo también se ha utilizado un antifúngico llamado pimaricina o natamicina. Esta sustancia previene la aparición de levaduras y mohos en los alimentos mediante un mecanismo que dirige el ergosterol hacia la pared celular. Se utiliza en superficies de quesos curados o madurados y en embutidos, y en pequeñas cantidades es extremadamente eficaz.¹¹

1.2. Estrategias terapéuticas contra la resistencia bacteriana

Con el fin de superar este problema de resistencia bacteriana es importante desarrollar estrategias terapéuticas alternativas. Una opción es la combinación de antibióticos de penicilina seleccionados (ampicilina, amoxicilina o piperacilina) con inhibidores de las β -lactamasas de las bacterias (ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam), aunque numerosas especies bacterianas exhiben mayor resistencia contra tales combinaciones que bloquean el mecanismo de resistencia bacteriana.¹²

Otro enfoque prometedor para tratar la resistencia bacteriana es la combinación de un antibiótico tradicional con nanopartículas de plata. Estas nanopartículas muestran un amplio espectro de actividades antibacterianas, antimicóticas, antiinflamatorias y antiangiogénicas.

Las propiedades bactericidas de las nanopartículas de plata están fuertemente influenciadas por su forma, tamaño, concentración, estado de agregación y recubrimiento. En algunos estudios se ha demostrado que nanopartículas de plata con la misma área superficial y distinta forma muestran distinta actividad bactericida, lo que puede ser atribuido a variaciones en el área superficial efectiva de las nanopartículas.¹³

En general, las nanopartículas de plata de menor tamaño son más efectivas ya que conducen a una mayor permeabilidad de la membrana de la bacteria, daño y muerte celular, y por tanto, un mayor efecto antibacteriano. Se ha demostrado que el efecto antimicrobiano mejorado de las AgNPs se debe a su alta relación superficie-volumen que permite que las nanopartículas interaccionen con la membrana bacteriana.

Las propiedades antibacterianas de las AgNPs están influenciadas por el espesor y composición de la pared celular de las bacterias. Las bacterias Gram-negativas son más susceptibles a las AgNPs que las Gram-positivas. Esto se debe a que las Gram-positivas tienen una pared celular compuesta por una capa de peptidoglucano más gruesa (30 nm de espesor) y mayor cantidad de peptidoglucano que las Gram-negativas (3-4 nm de espesor). Por tanto, en las Gram-positivas esta capa más gruesa impide la acción de las nanopartículas en la pared celular y las hace más resistentes al efecto antibacteriano de las AgNPs. Además, las bacterias Gram-negativas contienen lipopolisacáridos (LPS) en la membrana celular que contribuyen a la integridad estructural de la membrana. Sin embargo, la carga negativa de los LPS promueve la adhesión de las AgNPs y hace que las bacterias sean más susceptibles.¹³

El efecto antibacteriano de las nanopartículas de plata está ligado a cuatro mecanismos:^{13, 14, 15}

- 1) Adhesión de las AgNPs a la superficie de la pared celular y membrana: la carga superficial positiva de las AgNPs interacciona con la carga negativa de la membrana celular a través de interacciones electrostáticas y facilita la adhesión. Esto produce cambios morfológicos, la contracción del citoplasma y el desprendimiento de la membrana que conlleva a la ruptura de la pared celular. Además, la interacción de las AgNPs con los grupos azufre y tiol de las proteínas presentes en la pared celular produce cambios irreversibles en la estructura celular y su ruptura.
- 2) Penetración de las NPs dentro de la células y daño de estructuras intracelulares (mitocondrias, vacuolas, ribosomas) y biomoléculas (proteínas, DNA, lípidos): tras la adhesión de las AgNPs a la membrana celular, éstas pueden penetrar en las células e interaccionar con estructuras celulares y biomoléculas y afectar al funcionamiento celular vital, que pueden conducir a la muerte de la bacteria. Los iones Ag⁺ liberados de las AgNPs también pueden interaccionar con los enlaces disulfuros y grupos tiol de las proteínas y el DNA y provocar daños celulares.
- 3) Toxicidad celular inducida y estrés oxidativo causado por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS): la generación de ROS y radicales libres (H₂O₂, O₂⁻, OH y HClO) produce un incremento en los niveles de estrés oxidativo que a su vez, causa daño en la membrana mitocondrial y conduce a la necrosis y muerte celular. Los iones Ag⁺ liberados de las NPs generan ROS e inhiben las enzimas de la cadena respiratoria.
- 4) Modulación de las vías de transducción de señales: el ciclo de fosforilación y desfosforilación en cascada es el mecanismo de retransmisión de señales en microorganismos para el crecimiento microbiano y la actividad celular. Las AgNPs inhiben la fosforilación de las proteínas y con ello, el crecimiento bacteriano.

En la Fig. 4 se observa un esquema de los mecanismos de acción bactericida de las AgNPs:

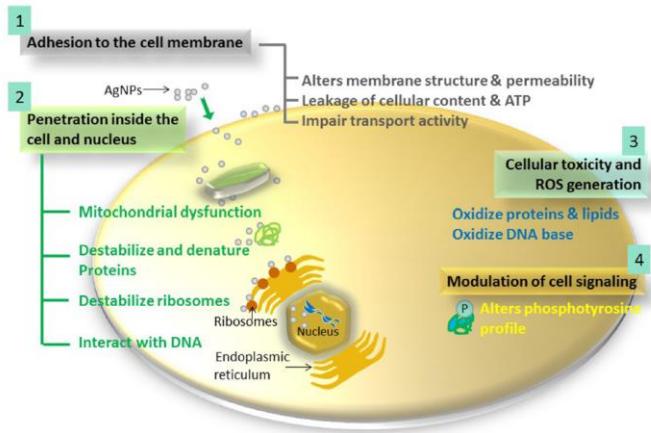


Fig. 4: Esquema de los mecanismos de acción antibacteriana de las AgNPs¹³

Existen numerosos estudios que demuestran efectos sinérgicos entre distintos antibióticos y AgNPs. Baker et al. observaron un aumento del incremento de las zonas de inhibición como consecuencia del aumento del efecto bactericida frente a *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* y *Vibrio vulnificus* al combinar AgNPs con amoxicilina, eritromicina, kanamicina y tetraciclinas. Como se observa en la Fig. 5 demostraron que en bacterias resistentes a la bacitracina la actividad del antibiótico aumentaba e inhibía el crecimiento bacteriano.¹⁶

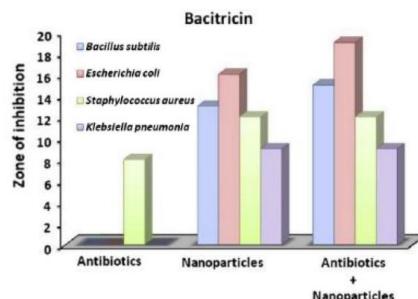


Fig. 5: Efectos sinérgicos entre AgNPs y bacitracina¹⁶

1.3. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de los antibióticos modificados con nanopartículas de plata

Existe una gran variedad de técnicas analíticas para estudiar nanomateriales,¹⁷ pero aparecen limitaciones cuando se aplica al análisis de nanomateriales en muestras complejas. Debido a esto es necesario acoplar técnicas de separación y de caracterización y cuantificación entre sí, como en el estudio de la liberación de plata en distintos nanomateriales en el que se acopla la técnica de espectrometría de masas (ICP-MS) con el fraccionamiento en flujo (AF4). La labor de investigación desarrollada en este Trabajo Fin de Máster se enmarca en la línea de investigación de nanometrología analítica del grupo GEAS (Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores). Recientemente, ha dado lugar a estudios sobre liberación de plata desde nanomateriales.¹⁸ Igualmente, se han establecido las prestaciones diferenciales en cuanto a utilizar Dwell Times en el rango de microsegundos o milisegundos;¹⁹ se han desarrollado aplicaciones para la caracterización

de nanopartículas de CeO₂^{20, 21} y diversos estudios relativos a nanotoxicología relacionada con la utilización de nanomateriales base plata.^{22, 23, 24}

A continuación, se van a describir brevemente las técnicas analíticas utilizadas en este trabajo para la detección, caracterización y cuantificación de las AgNPs en los antibióticos, y los métodos microbiológicos para determinar la capacidad antimicrobiana.

1.3.1. Caracterización fisicoquímica

1) Reflectancia: es una técnica que permite la detección de nanopartículas de plata en muestras sólidas. Los espectrofotómetros de reflectancia miden la cantidad de luz reflejada por una superficie en función de la longitud de onda para obtener un espectro de reflectancia. La luz que se refleja a 90° de la superficie de medida se llama reflectancia especular. La luz que es dispersada en el resto de direcciones se denomina reflectancia difusa y la suma de ambas reflectancias se llama reflectancia total. Para medir el color de un espécimen del mismo modo que se ve, la reflectancia especular deberá excluirse y sólo deberá medirse la reflectancia difusa. El color de un objeto puede parecer diferente debido a las diferencias en el nivel de la reflectancia especular.²⁵

En el espectro de reflectancia característico de las AgNPs aparece un máximo en torno a 400 nm correspondiente con la banda de resonancia de plasmón superficial.

2) Espectroscopía de absorción molecular UV-Vis (MAS UV-vis): esta técnica permite detectar y caracterizar nanopartículas de plata en suspensiones acuosas. La longitud de onda del máximo de absorción se asocia con el tamaño promedio de la partícula. Las AgNPs presentan una banda de absorción correspondiente a la resonancia de plasmón superficial localizado en el visible, en torno a 400 nm. El desplazamiento de la banda depende del tamaño de la NP y del entorno químico. Un desplazamiento a longitudes de onda mayores es indicativo de la aglomeración de las NPs.²⁶

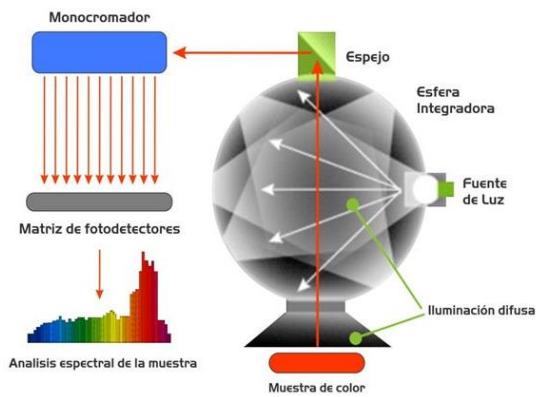


Fig. 6: Esquema del funcionamiento de un espectrofotómetro de reflectancia²⁵

3) Microscopía electrónica: es una técnica basada en la aplicación de un haz de electrones y presenta una alta resolución. Una de las técnicas más destacadas es la microscopía electrónica de barrido, en la que el haz de electrones interacciona con la superficie de la muestra y se detectan los electrones secundarios. Se considera una de las técnicas más potentes para la identificación y caracterización de nanopartículas y permite obtener información sobre el tamaño, forma y estado de agregación de las mismas.

4) Espectroscopía de absorción atómica con atomización en llama (F-AAS): es una técnica para la determinación analítica de elementos. Está basada en la atomización del analito mediante una llama y la posterior medida de la absorbancia a su longitud de onda característica. Se puede determinar la concentración total de plata en las muestras (Ag(I) + AgNPs) o realizar una separación previa de las NPs y de la plata disuelta para cuantificarlas por separado.

1.3.2. Caracterización microbiológica

Para determinar la eficacia de los antibióticos se requieren métodos en los que se estudia la sensibilidad bacteriana a los mismos.

1) Método de difusión: es un método cualitativo que permite clasificar a un microorganismo como sensible o resistente. Se basa en la medición de un halo que aparece alrededor de la muestra como consecuencia de la inhibición del crecimiento del microorganismo debido a la presencia del antibiótico. Un mayor halo de inhibición indica una mayor susceptibilidad de las bacterias ante el antibiótico estudiado. La ventaja de este método es la posibilidad de evaluar múltiples antibióticos y concentraciones a la vez frente a uno o varios microorganismos. Sin embargo, la utilización de la técnica dependerá siempre de la difusión del agente en el medio.^{27, 28, 29}

2) Método de dilución: es un método cualitativo que permite determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM). Se basa en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones decrecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar). La CIM se define como la menor concentración de antimicrobiano que a simple vista inhibe completamente el crecimiento del microorganismo y corresponde con la ausencia de turbidez en los pocillos.³⁰ La CBM se define como la concentración del agente bactericida necesaria para matar el 99,9% de la población microbiana y corresponde con la ausencia de crecimiento bacteriano en la placa.^{29, 31}

2. OBJETIVOS

El proyecto desarrollado en este Trabajo Fin de Máster forma parte de una de las líneas de la investigación del grupo GEAS (Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores), que se encuentra integrado en el IUCA (Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón). La caracterización microbiológica se realizó conjuntamente con el Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Zaragoza.

Los objetivos de este trabajo son:

- Detectar, caracterizar y cuantificar las nanopartículas de plata presentes en las muestras de antibióticos aplicando distintas metodologías y técnicas analíticas, como espectroscopía de absorción molecular UV-vis, espectroscopía de absorción atómica, reflectancia y microscopía electrónica.
- Estudiar el efecto antibacteriano de las muestras de antibióticos convencionales modificados con nanopartículas de plata.
- Determinar la existencia de efectos sinérgicos como consecuencia de la combinación de AgNPs y los antibióticos convencionales.

3. INSTRUMENTACIÓN Y MATERIALES

3.1. Detección, caracterización y cuantificación de las nanopartículas de plata en los antibióticos

3.1.1. Muestras de antibióticos

Las muestras de antibióticos y el antifúngico han sido proporcionados por Laboratorios Enosan S.L., donde han sido sintetizado a partir de distintos precursores y métodos de síntesis. Debido a la distinta solubilidad en agua de los antibióticos se va a distinguir entre antibióticos solubles y no solubles.

Antibióticos solubles

- Penicilina G (PG)
- Penicilina + AgNPs 1 (4A)
- Penicilina + AgNPs 2 (4B)
- Penicilina + AgNPs 3 (4C)

Antibióticos no solubles

- Eritromicina (E)
- Eritromicina + AgNPs 1 (E1)
- Eritromicina + AgNPs 2 (E2)
- Eritromicina + AgNPs 3 (E3)
- Eritromicina + AgNPs 4 (E4)
- Pimaricina
- Pimaricina + AgNPs

3.1.2. Materiales y reactivos

- Cubetas de cuarzo
- Cuentagotas de plástico
- Espátulas de laboratorio
- Ultrafiltros Nanosep con membrana de poliéster sulfona de 3 kDa (Pall)
 - Tubos tipo Falcon de polipropileno de 15 mL y 50 mL. Los tubos se dejaron en un baño de HNO₃ al 10% (v/v) durante al menos 24 horas. Posteriormente, se lavaron con agua ultrapura y se secaron en la estufa a una temperatura de 60°C antes de su uso.
- Tubos Eppendorf
- Vasos de precipitados
- Ácido nítrico HNO₃ 69% (m/m) (Panreac)
- Agua ultrapura (MilliQ Advantage)
- Amoníaco NH₃ 25% (Panreac)
- Disolución patrón Ag(I) 1000 mg/L (Fluka)
- Dodecilsulfato de sodio (SDS) (Bio-Rad)
- Glicerol anhidro (Scharlau)
- Lámina de PET (Mylar)
- Na₂S₂O₃ x 5 H₂O (Panreac)
- Papel de Aluminio

- Peróxido de hidrógeno H₂O₂ 30% (Scharlau)
- Suspensión de nanopartículas de plata de 100 mg/L recubiertas con citrato y de 10 nm de diámetro (PlasmaChem)
- Triton X-114 (Sigma Aldrich)

Todas las disoluciones de estándares y de las muestras se realizaron por pesada. Las muestras se sonicaron durante 1 minuto justo antes de cada medida.

3.1.3. Instrumentación y aparatos

- Agitador magnético con placa calefactora (IKA)
- Agitador orbital analógico Reax 2 (Heidolph)
- Balanza analítica GH-200 con precisión de ±0,1 mg (A&D)
- Baño de Ultrasonidos Ultrasons-P (J.P. Selecta)
- Centrífuga de sobremesa Heraeus Multifugue X1R (Thermo Scientific)
- Espectrofotómetro de absorción atómica en llama (FAAS) AAnalyst 200 (Perkin Elmer) con una lámpara de cátodo hueco con una longitud de onda de excitación de 328,07 nm y una intensidad de corriente de 15 mA.
- Espectrofotómetro de reflectancia CM-2600d (Konica Minolta)
- Espectrofotómetro Molecular UV-vis Diode Array V-730 (Jasco)
- Cámara incubadora (Ovan)
- Micropipetas (Biohit)
- Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Merlin (Carl Zeiss)

3.2. Determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos

3.2.1. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas que se utilizaron son cepas de referencia de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC).

- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212: bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa y que no posee movilidad. Puede presentarse individualmente, en parejas o en pequeñas cadenas.²⁹

- *Escherichia coli* ATCC 25922: bacilo Gram-negativo, con una sola cadena espiral de DNA, móvil, aerobio y aerobio facultativo y con flagelos.²⁹
- *Haemophilus influenzae (Hi)* ATCC 49247: cocobacilo Gram-negativo y no posee movilidad. Puede ser aerobio y anaerobio facultativo. Requiere un medio complejo y factores de crecimiento y crece en medios de agar-chocolate.²⁹
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853: bacterias Gram-negativas con forma de bacilos rectos o curvados. Tienen un metabolismo aerobio en el que el O₂ es el acceptor de electrones en la cadena respiratoria y son móviles ya que poseen uno o dos flagelos.²⁹
- *Salmonella enterica* CECT 4300: bacilo Gram-negativo, móvil, no encapsulado y con flagelos. Puede ser aerobio o anaerobio facultativo y forma colonias.²⁹
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213: bacteria Gram-positiva con forma de coco que se presenta como diplococo, racimos o cadenas de cocos. Son aerobios facultativos y no poseen movilidad.²⁹
- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619: bacteria Gram-positiva con forma de coco, anaerobia facultativa, de forma redondeada y con tendencia a formar cadenas. Crece en medios enriquecidos con sangre y necesita CO₂ para crecer.²⁹

3.2.2. Medios de cultivo

- Agar-Chocolate (Maim)
- Agar Mueller-Hinton (Difco)
- Agar-sangre: 5% s. carnero (Maim)
- Brain Heart Infusion (B.H.I.) (Difco)
- Suero fisiológico estéril: NaCl 0,9% (SFE)

3.2.3. Materiales y reactivos

- Agua destilada
- Asa de platino
- Discos de eritromicina 15 µg (Bio-Rad)
- Discos de penicilina 6 µg/10 U (Bio-Rad)
- Escala de turbidez 0,5 McFarland
- Gradillas

- Hisopos esterilizados
- Nitrato de plata AgNO₃ (Sigma Aldrich)
- Micropipetas (Pipet4u)
- Placas de 96 pocillos
- Placas de Petri
- Puntas estériles de pipeta Pasteur
- Suspensión de nanopartículas de plata de 100 mg/L recubiertas con citrato y de 10 nm de diámetro (PlasmaChem)

3.2.4. Instrumentación y aparatos

Todo el material utilizado en el análisis bacteriológico se esterilizó con el fin de evitar la posible contaminación por otros organismos o forma esporulada de resistencia. La esterilización se realizó en autoclave a 121°C y 1 bar de presión durante 15 min.

- Agitador magnético con placa calefactora (J. P. Selecta)
- Agitador Vortez ZX3 (Velp Scientifica)
- Autoclave 437-P (J. P. Selecta)
- Balanza analítica (Ohaus Corporation)
- Campana extractora Bio-II A/G (Telstar)
- Estufa de cultivo (Memmert)
- Jarra de anaerobiosis AG25 (Oxoid)
- Mechero bunsen

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1. Detección, caracterización y cuantificación de las nanopartículas de plata en los antibióticos

4.1.1. Tratamientos previos

4.1.1.1. Digestión ácida

Se llevó a cabo una digestión ácida para la determinación del contenido total de plata presente en las distintas muestras de antibióticos.

Se pesaron 20 mg de muestra en un vaso de precipitados y se añadieron 2 mL de HNO₃ concentrado. Se calentó hasta ebullición y se añadieron unas gotas de H₂O₂. Se dejó hervir sin llegar a sequedad.

Posteriormente, a las muestras de penicilina y pimarcina se les añadió agua ultrapura hasta un volumen final de 50 mL. A las muestras de eritromicina se les añadió NH₃ 1% hasta un volumen de 40 mL.

Para la cuantificación de plata total mediante F-AAS se hizo una dilución previa a la medida en HNO₃ 1% para las muestras de penicilina y pimarcina; y en NH₃ 1% para las de eritromicina.

4.1.1.2. Disolución en agua

Los antibióticos solubles se disolvieron en agua ultrapura para determinar si era necesario realizar una digestión ácida para cuantificar el contenido de la plata total en dichos antibióticos. Se pesaron 30 mg de muestra y se añadió agua ultrapura hasta un volumen final de 5 mL. Para la medida en F-AAS y MAS UV-vis se hizo una dilución previa.

4.1.1.3. Lixiviación

Se llevó a cabo una lixiviación de los antibióticos no solubles para determinar la cantidad de plata liberada respecto a la plata total presente en las muestras.

Para ello, se pesaron 20 mg de muestra y se añadieron 30 mL de agua ultrapura. Se dejó agitar en un sistema de agitación rotatorio a una velocidad de 40 rpm a temperatura ambiente y en ausencia de luz durante 1 hora. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugó a 5000 rpm y 20°C durante 30 minutos.

Se realizó una dilución del sobrenadante con agua ultrapura y posteriormente se cuantificó la plata liberada mediante F-AAS. Para detectar la presencia de nanopartículas mediante MAS UV-vis también se diluyó previamente con agua ultrapura.

4.1.1.4. Ultrafiltración

Se llevó a cabo la ultrafiltración para la determinación directa del contenido de Ag(I) liberada de las muestras de antibióticos. Por diferencia con la concentración de plata total obtenida mediante digestión ácida en los antibióticos solubles, y de la concentración de plata liberada en los antibióticos no solubles se obtuvo la concentración de nanopartículas de plata de las muestras. Se utilizaron ultrafiltros de 3 kDa que corresponden a un tamaño

de poro inferior a los 5 nm (el fabricante establece una equivalencia de 5 nm de tamaño de poro para los ultrafiltros de 50 kDa).

Para humedecer los ultrafiltros, se lavaron dos veces con agua ultrapura. Para ello, se añadieron 500 µL de agua y se centrifugó a 9000 rpm y 20°C durante 10 minutos.

Posteriormente, se cogieron 500 µL del sobrenadante de las disoluciones lixiviadas en el caso de los antibióticos no solubles y se añadieron al ultrafiltro. En los antibióticos solubles se añadieron 500 µL de la disolución en agua ultrapura.

Se centrifugó a 9000 rpm y 20°C durante 30 minutos. El ultrafiltrado se diluyó con agua ultrapura previamente a la cuantificación de la Ag(I) liberada mediante F-AAS.

4.1.1.5. Extracción en punto de nube (CPE)

Se realizó la CPE para la determinación directa de las nanopartículas de plata de las muestras. Es un método que preserva el tamaño y la morfología de las NPs en la muestra y proporciona una separación selectiva de las especies disueltas. Se basa en la extracción de las AgNPs tras la adición de un surfactante no iónico (Triton X-114) con el que forman micelas. Por tanto, las AgNPs se quedan concentradas en la fase rica en Triton, mientras que la plata disuelta es acompañada por el Na₂S₂O₃ y permanece en la fase acuosa.³²

Para ello, se añadieron 9,5 mL del sobrenadante de las disoluciones lixiviadas en el caso de las muestras no solubles, y de la disolución en agua de los antibióticos solubles. Se ajustó el pH a 3,5 ± 0,5. Posteriormente, se añadieron 0,1 mL de Na₂S₂O₃ · 5H₂O y 0,2 mL Triton X-114 5% y se agitó para que se mezclaran. Se calentó en un incubador a 40 ± 2°C durante 30 minutos. Una vez incubado, se centrifugó a 2000 rpm y 20°C durante 5 minutos para que se separaran las dos fases. Se introdujo en un congelador a -18°C durante 10 min y se decantó el sobrenadante. A la fase de tensoactivo, que queda en el tubo, se le añadieron 9,5 mL glicerol 1% y se midió mediante F-AAS.

4.1.2. Reflectancia

Se llevó a cabo la medida de la reflectancia para detectar la presencia de nanopartículas en los antibióticos.

Se realizó la calibración del espectrofotómetro de reflectancia. El cero se realizó dirigiendo al aire el puerto de medida de muestras. Como 100% de reflectancia se fijó la obtenida para una muestra de referencia que no absorbiera luz en el rango de longitudes de onda utilizado (BaSO₄). Posteriormente, se cogió una pequeña cantidad del antibiótico

sólido y se depositó en un trozo de papel de aluminio. Se puso una lámina de PET sobre la muestra y se midió con el espectrofotómetro.

La fuente de iluminación utilizada fue una lámpara de xenón y se midió la radiación reflejada a 8°.

Para extraer los datos de reflectancia obtenidos se utilizó el software SpectraMagic NX (Konica Minolta). En el tratamiento de los datos se trabajó con la componente especular excluida (SCE) ya que la componente especular estaba formada principalmente por la luz que reflejaba la lámina de PET, y esto variaba la reflectancia obtenida. Por tanto, sólo se midió la reflectancia difusa.

4.1.3. Espectroscopía de absorción molecular UV-Visible (MAS UV-vis)

Para identificar las nanopartículas en la muestra se realizó un barrido de longitudes de onda en el espectrofotómetro UV-vis.

Para ello, en una cubeta de cuarzo se añadieron 2 mL del sobrenadante de las disoluciones lixiviadas en el caso de los antibióticos no solubles, y de la disolución en agua de los antibióticos solubles y se realizó la medida. El máximo del pico de resonancia del plasmón superficial característico de las nanopartículas de plata se obtiene en torno a 400 nm.

El barrido de longitudes de onda fue de 200 a 700 nm, la respuesta del instrumento fueron 0,015 segundos y la velocidad de barrido fueron 200 nm/min.

4.1.4. Espectroscopía de absorción atómica con atomización en llama (F-AAS)

Tras preparar las muestras, se midió la absorbancia en el espectrofotómetro. Se programó el equipo para que realizará diez medidas de cada muestra, de las cuales se obtuvo la media y la desviación estándar. Para realizar el cálculo de las concentraciones se interpoló a una recta de calibrado que se obtuvo a partir de una disolución patrón de Ag(I). La recta de calibrado tuvo concentraciones de 0,5, 1, 2, 5 y 10 mg/L Ag y se realizó en agua ultrapura, HNO₃ 1% o NH₃ 1%, según el medio de las muestras.

La plata se midió con una longitud de onda de excitación de 328,07 nm. El ancho de banda espectral era de 2,7 nm y la intensidad de corriente de la lámpara de cátodo hueco fueron 15 mA.

4.1.5. Microscopía electrónica de barrido de campo extendido (FESEM)

La caracterización de las nanopartículas de plata en las muestras de antibióticos se realizó mediante FESEM.

La preparación de las muestras consistió en suspender en agua ultrapura las muestras, sonicarlas, depositarlas en un portaobjetos que contenía una rejilla de cobre recubierta con carbono y dejarlas evaporar.

Debido a que en las muestras de antibióticos solubles interfirió la matriz orgánica se llevó a cabo una ultrafiltración. Para ello se añadieron 500 µL en el ultrafiltro y se centrifugó a 9000 rpm y 20°C durante 15 minutos. La suspensión de nanopartículas que se quedó en la parte superior del ultrafiltro se transfirió a un Eppendorf. Se depositó la muestra en una rejilla de cobre recubierta con carbono y se evaporó. Una vez preparadas las muestras se observaron en el microscopio electrónico.

4.2. Determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos

Las cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* se encontraban sembradas en un medio de cultivo de agar Mueller-Hinton. Las cepas de *Hi* estaban sembradas en placas de agar-chocolate y las de *Streptococcus pneumoniae* en placas de agar-sangre.

4.2.1. Método de difusión: antibiogramas

1) Preparación del medio de cultivo de agar Mueller-Hinton:

Se pesaron 38 g de la mezcla comercial de agar y se disolvieron en un litro de agua destilada. Se calentó en una placa calefactora hasta llegar a ebullición y se mantuvo hirviendo durante un minuto. Se esterilizó en el autoclave durante 15 minutos a 121°C. Por último, se depositó el agar en las placas de Petri a una altura de 4 mm y se dejó secar en la campana extractora.

2) Preparación de la suspensión de bacterias y estandarización del inóculo:

La turbidez de la suspensión se preparó con el estándar 0,5 de McFarland, un estándar turbidimétrico que indica la cantidad de bacterias, y que en este caso corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Se cogieron varias colonias con un asa de platino, previamente flameado, y se disolvieron en un tubo que contenía 4 mL de SFE.

3) Inoculación de la placa y carga de las muestras:

Se sumergió un hisopo de algodón estéril en la suspensión de bacterias y se inoculó la placa de Petri frotando con el hisopo. Se dejó secar durante 3-5 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se cargaron las distintas muestras de antibióticos en las placas de Petri inoculadas. Además, se realizó un control con un disco del antibiótico comercial, con nanopartículas de plata de 10 nm y con AgNO₃ a dos concentraciones distintas (50 y 500 µg/mL). Se cargaron 5 µL tanto de las muestras como de los controles. Las muestras del antibiótico sin nanopartículas y de las nanopartículas de plata se cargaron a 20 mm de distancia para observar si existían efectos sinérgicos, aditivos o antagónicos. En la Fig. 7 se muestra el esquema correspondiente con la distribución de las muestras en las placas de Petri.

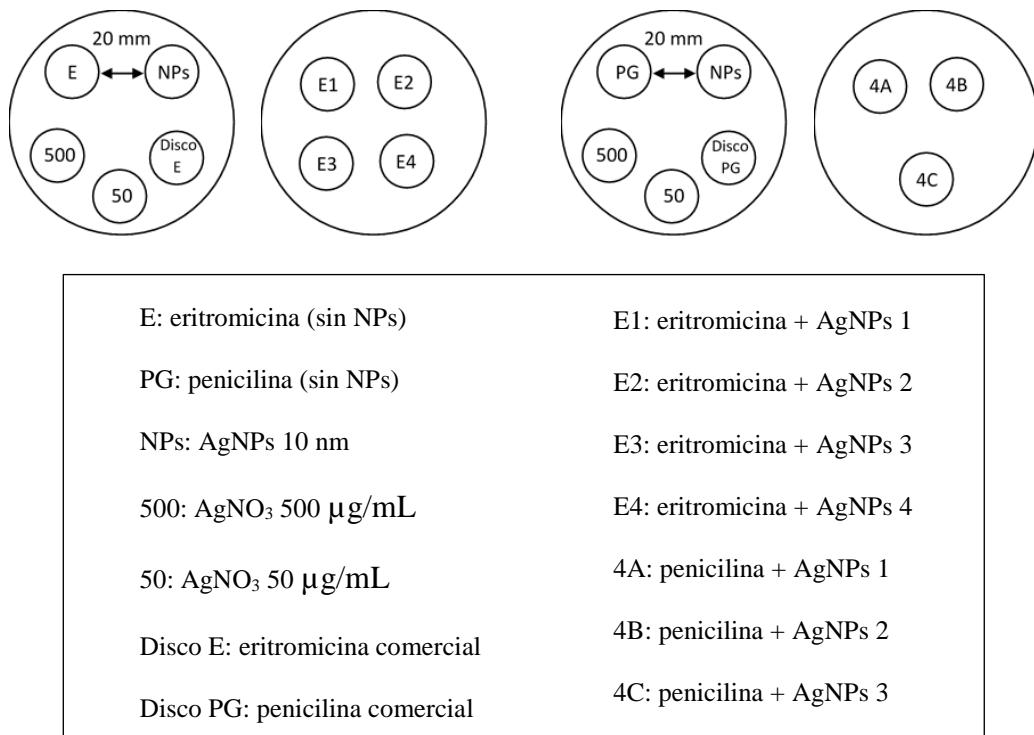


Fig. 7: Esquema de la distribución de muestras en las placas de Petri

4) Incubación de las placas: se incubaron las placas invertidas en una estufa durante 24 horas a 37°C.

5) Lectura de los resultados:

Tras sacar la placa de la estufa, se examinó el crecimiento uniforme y confluente de las bacterias y las zonas de crecimiento bacteriano. Sobre una superficie negra que no

reflejaba la luz, se midieron los halos de inhibición de cada una de las muestras. El diámetro del halo para considerar a una bacteria sensible a un antibiótico varía en función de la difusión de dicho antibiótico en el agar y de su carga.

Este procedimiento se realizó para las bacterias *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *S. aureus* y *E. faecalis*. En el caso de las bacterias *Hi* y *S. pneumoniae* no se realizó el primer paso de preparación del medio de cultivo ya que el ensayo se realizó en placas comerciales que ya estaban preparadas. Las bacterias *Hi* se inocularon en placas de agar chocolate y *S. pneumoniae* en placas de agar sangre. Los cultivos con estas dos últimas bacterias se incubaron en condiciones anaerobias, por lo que se introdujeron en una jarra de anaerobiosis.

4.2.2. Método de dilución: determinación de CIM y CBM

La cuantificación de la actividad in vitro de los antimicrobianos se evaluó mediante métodos de dilución basados en el crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encontraba diluido en medio BHI. En este estudio se determinó la CIM y CBM de las muestras de eritromicina y de las AgNPs de 10 nm para *E. coli* y *S. aureus*.

Se prepararon diluciones seriadas a la mitad a partir de una dilución madre de la eritromicina y de las AgNPs. Las concentraciones estudiadas fueron 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 y 1 $\mu\text{g/mL}$, y un control positivo de medio BHI en ausencia de antibiótico y NPs. En cada pocillo de la placa se añadieron 80 μL de la disolución correspondiente.

Una vez preparadas las placas con las muestras de eritromicinas y AgNPs, se preparó el inóculo a partir de suspensiones del 0,5 de la escala McFarland mediante el procedimiento descrito en el apartado anterior de preparación de la suspensión de bacterias y estandarización del inóculo. Posteriormente, se añadieron 20 μL de esta suspensión en cada uno de los pocillos de la placa. En la Fig. 8 se muestra un esquema de la distribución de las muestras en las placas.

Se incubaron las placas en la estufa durante 24 horas a 37°C. Tras la incubación se procedió a la lectura de los resultados observando la turbidez de los pocillos para determinar la CIM.

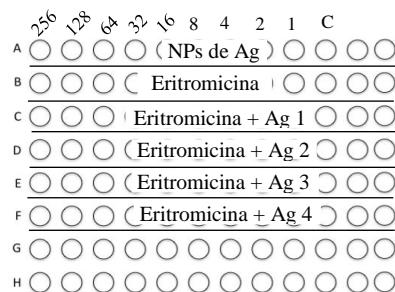


Fig. 8: Esquema de la placa

A continuación, para determinar la CBM se sembraron en placa las diluciones de aquellos pocillos en los que no se observó turbidez y se cuantificó el número de bacterias viables mediante el recuento en placa. Se incubaron en la estufa durante 24 horas a 37°C. Tras la incubación se procedió a la lectura de los resultados.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Detección, caracterización y cuantificación de las nanopartículas de plata en los antibióticos

Uno de los principales objetivos del presente trabajo se centró en la detección, caracterización y cuantificación de las nanopartículas de plata en las muestras de antibióticos.

5.1.1. Detección de las nanopartículas mediante reflectancia y MAS UV-vis

El primer paso consistió en la detección de las nanopartículas de plata mediante reflectancia y MAS UV-vis.

Antibióticos solubles

Las curvas espectrales de reflectancia obtenidas de las penicilinas se muestran en el Anexo (Figura F1). La presencia de un pico en torno a $\lambda=400$ nm indica la presencia de nanopartículas de plata. En estas curvas no se observó ningún pico característico de las AgNPs.

A partir de la reflectancia obtenida se calculó la absorbancia aparente como el logaritmo de la reflectancia. Se representa esta absorbancia aparente frente a la longitud de onda y se observa si aparece un pico correspondiente a las NPs. En la Fig. 9 se observa que la muestra PG no presentó ningún máximo mientras que las muestras 4A y 4B presentaron un máximo en torno a $\lambda= 430 - 440$ nm. Este pico se debió a la presencia de nanopartículas de plata en las muestras. En la muestra 4C no se observó claramente el pico de nanopartículas.

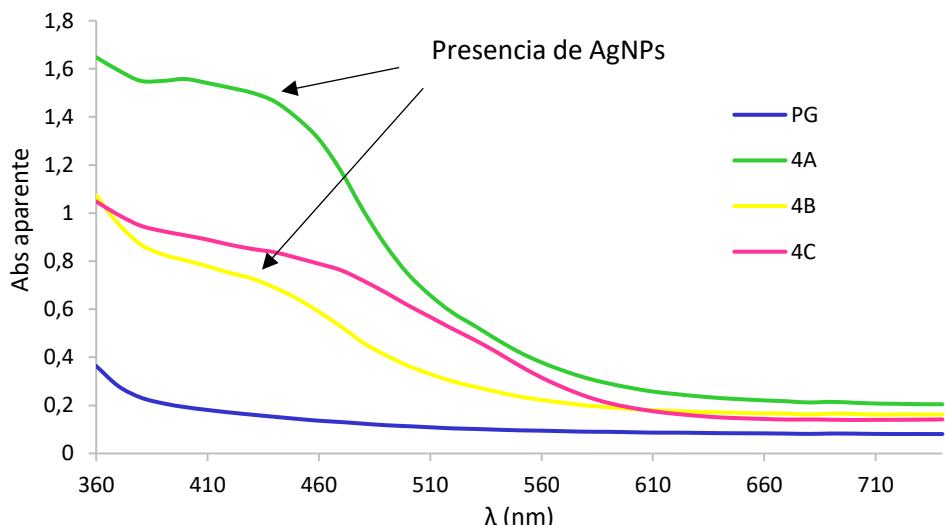


Fig. 9: Representación de la absorbancia aparente frente a la longitud de onda de las muestras de penicilinas

Otra forma de representar la reflectancia es a partir de la teoría Kubelka-Munk. En el Anexo (Figura F2) se muestra la representación de K/S frente a la longitud de onda. Se observó que las muestras 4A, 4B y 4C presentaron un máximo que indicó la presencia de nanopartículas de plata, mientras que en la de PG no apareció ningún máximo.

Otra técnica aplicable para detectar las AgNPs de las penicilinas es la MAS UV-vis. Se obtuvo el espectro de absorción de las muestras a dos concentraciones distintas ($2,4 \times 10^{-3}$ M y 0,06 M) y en ninguno de los casos se observó la presencia de un pico máximo característico de las AgNPs. Esto pudo ser debido a que la matriz enmascaró los picos debido a que se encontraba en mayor proporción que las AgNPs. En la Fig. 10 y en el Anexo (Figura F3) se muestran los espectros de absorción obtenidos.

La penicilina se caracteriza por absorber en un rango de longitudes de onda entre 230 y 280 nm.³³ La muestra 4A presentó un máximo de absorción en torno a 280 nm, lo que concuerda con la bibliografía. Al comparar la muestra PG con las muestras que contienen AgNPs se observó que los espectros presentaron la misma forma, aunque el de la 4C presentó mayores absorbancias a la misma longitud de onda que la PG, y el de la 4A estaba ligeramente desplazado, lo que pudo deberse a la distinta cantidad de penicilina de cada una de las muestras o a que la introducción de las AgNPs en la matriz de la penicilina modificara ligeramente su estructura y con ello, sus propiedades ópticas.

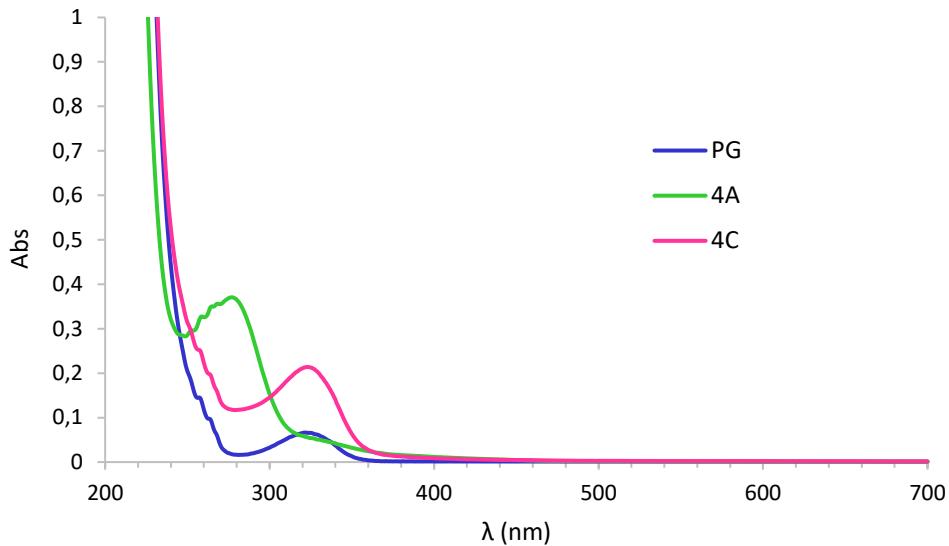


Fig. 10: Espectro de absorción UV-vis de las muestras de penicilinas $2,4 \times 10^{-3} M$

Antibióticos no solubles

Las curvas espetrales de reflectancia obtenidas para los antibióticos no solubles se muestran en el Anexo (Figura F4). Como en el caso de las penicilinas, en estas curvas no se observó el máximo característico de las AgNPs.

En la Fig. 11 se representa la absorbancia aparente frente a la longitud de onda. Se observa que en el caso de E2, E3 y E4 apareció un máximo de absorción en torno a $\lambda=420-430$ nm que indicó la presencia de las nanopartículas de plata. Las tres muestras presentaron el mismo espectro de absorción. En el caso de E1 no apareció el pico de absorción y el espectro obtenido tuvo la misma forma que el de E y una mayor absorbancia aparente a las mismas longitudes de onda.

En el caso de la pimaricina + AgNPs se observó ligeramente un máximo de absorción a $\lambda=420$ nm aproximadamente, mientras que en el espectro de la pimaricina no se observó pico, lo que indicó la ausencia de AgNPs.

A partir de la representación de K/S frente a la longitud de onda, que se muestra en el Anexo (Figura F5) también se observó el máximo de absorción a $\lambda=420-430$ nm característico de las AgNPs en las muestras E2, E3, E4 y pimaricina + AgNPs.

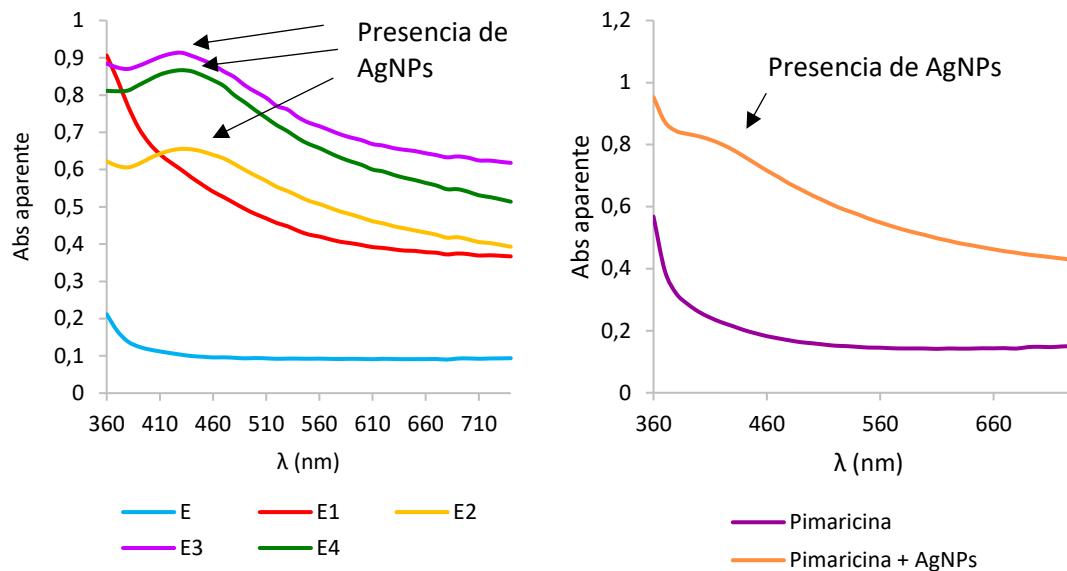


Fig. 11: Representación de la absorbancia aparente frente a la longitud de onda de los antibióticos no solubles

Debido a que los antibióticos no eran solubles en agua se dificultó la identificación de las AgNPs mediante MAS UV-vis debido a que no se liberaba la totalidad de la plata de las muestras. Se realizó una prueba para detectar las AgNPs en la pimaricina + AgNPs. Se midió el espectro de absorción de la disolución lixiviada de la pimaricina y pimaricina + AgNPs a dos concentraciones distintas ($1,9 \times 10^{-3}$ M y $9,0 \times 10^{-3}$ M) y no se observó ningún máximo de absorción debido a que la matriz orgánica enmascaraba el pico ya que se encontraba en mayor proporción que las NPs. En la Fig. 12 se observa el espectro UV-vis obtenido para las muestras de pimaricina.

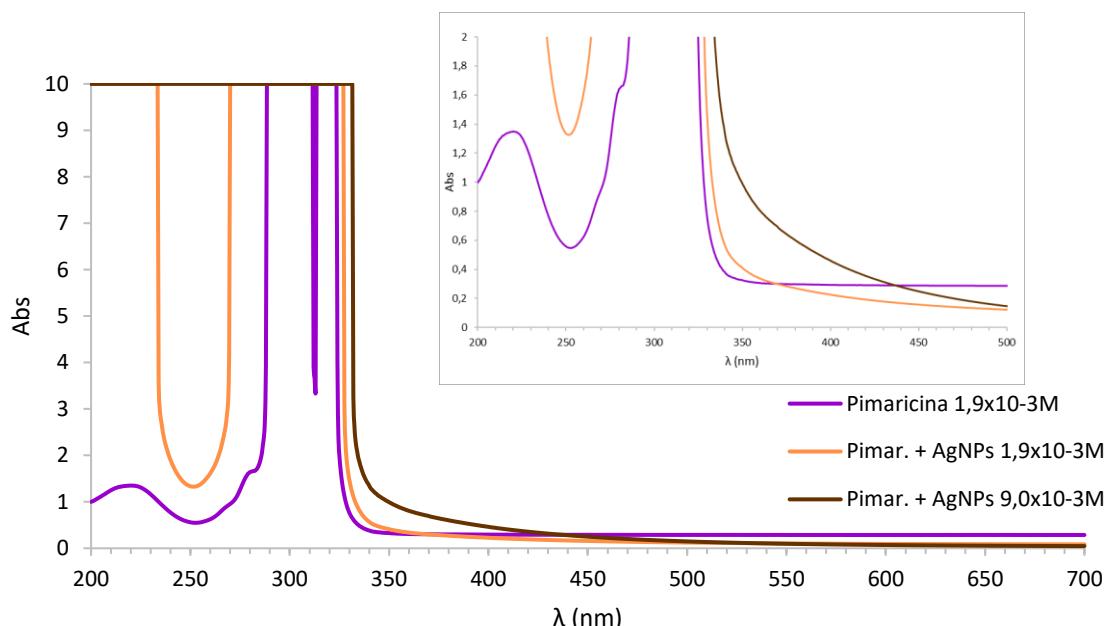


Fig. 12: Espectro de absorción UV-vis de las muestras de pimaricina

Debido a que la MAS UV-vis resultó no ser una buena técnica para detectar AgNPs en muestras no solubles no se llevaron a cabo las medidas del espectro para el resto de antibióticos no solubles.

5.1.2. Cuantificación de la plata total mediante digestión ácida

Tras la detección de las AgNPs en los antibióticos se llevó a cabo una digestión ácida para eliminar la matriz orgánica y transformar las AgNPs en Ag(I) con el objetivo de cuantificar la plata total de las muestras mediante F-AAS.

Antibióticos solubles

Se realizó la digestión ácida con HNO_3 concentrado, diluyendo con agua ultrapura para obtener una disolución de HNO_3 1%. Se midió el contenido total de plata mediante F-AAS tras realizar una dilución previa.

El resultado de plata total obtenido en la muestra atacada se comparó con la muestra disuelta directamente en agua ultrapura. Los resultados obtenidos en %Ag total (m/m) en el antibiótico al realizar tres réplicas de cada muestra de penicilinas se muestran en la Tabla 1.

Muestra	% Ag total (m/m) Con digestión ácida	% Ag total (m/m) Sin digestión ácida
PG	< 0,07	< 0,07
4A	$1,14 \pm 0,08$	$1,14 \pm 0,02$
4B	$0,89 \pm 0,01$	$0,87 \pm 0,01$
4C	$0,89 \pm 0,08$	$0,82 \pm 0,02$

Tabla 1: %Ag total (m/m) en las muestras de penicilina, con y sin digestión ácida. Resultado expresado como media \pm SD

Se realizó un test t para determinar si existían diferencias significativas entre los resultados obtenidos por los procedimientos. La tabla con los resultados para el test t con un nivel de confianza del 95% se muestran en el Anexo (Tabla T1). No existían diferencias significativas entre el %Ag total (m/m) en el antibiótico determinado por ambos procedimientos.

Por tanto, se llegó a la conclusión de que no era necesario realizar una digestión ácida para cuantificar el contenido total de plata de las muestras de penicilina debido a que se

obtuvieron los mismos resultados al disolver las muestras en agua ultrapura como consecuencia de que las muestras de penicilinas eran solubles en agua.

Antibióticos no solubles

Se realizó la digestión ácida con HNO_3 concentrado y unas gotas de H_2O_2 . En el caso de las muestras de pimarcina, el residuo se diluyó con agua ultrapura para obtener una disolución de HNO_3 1%.

Cuando se añadió agua ultrapura a las muestras de eritromicina se formó una suspensión blanquecina. Ante la posibilidad de que la Ag(I) estuviera precipitando con alguna especie presente en la matriz, la muestra atacada se diluyó con NH_3 1%, obteniéndose una disolución clara. Posteriormente, todas las muestras se midieron mediante F-AAS para cuantificar el contenido total de plata en el antibiótico tras una dilución previa en el correspondiente medio.

Los resultados obtenidos en %Ag total (m/m) al realizar tres réplicas de cada muestra se muestran en la Tabla 2.

Muestra	% Ag total (m/m)
E	< 0,07
E1	$0,56 \pm 0,09$
E2	$2,58 \pm 0,29$
E3	$4,68 \pm 0,23$
E4	$1,72 \pm 0,20$
Pimarcina	< 0,07
Pimaric. + AgNPs	$3,91 \pm 0,31$

Tabla 2: %Ag total (m/m) en las muestras de antibióticos no solubles. Resultado expresado como media \pm SD

5.1.3. Estudio de liberación de plata mediante disolución en agua ultrapura

Debido a que las muestras de eritromicinas y pimarcinas no eran solubles en agua se realizó un estudio de la liberación de plata en agua con el fin de establecer su comportamiento en cuanto a su capacidad de liberar plata, ya que éste está relacionado con su capacidad antimicrobiana.

Tras agitar las muestras durante 1 hora en ausencia de luz y a temperatura ambiente se centrifugó y se obtuvieron dos fases. Se decantó el lixiviado y se diluyó para posteriormente medir mediante F-AAS la cantidad de Ag liberada de las muestras. En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos al realizar dos réplicas de cada muestra, excepto para E1 que se realizó una réplica.

Muestra	% Ag liberada (m/m)
E	< 0,07
E1	0,04
E2	0,79 ± 0,06
E3	2,29 ± 0,08
E4	0,50 ± 0,09
Pimaricina	< 0,07
Pimaric. + AgNPs	-

Tabla 3: %Ag liberada (m/m) en las muestras de antibióticos no solubles. Resultado expresado como media ± SD

Con las condiciones utilizadas en la centrifugación se obtuvo que las nanopartículas mayores de 50 nm se depositaban en el fondo del tubo, por lo tanto, las muestras que tuvieran nanopartículas o agregados mayores de este tamaño las perderían en el residuo que queda tras la centrifugación y no se medirían mediante F-AAS.

En la pimaricina + AgNPs se realizaron cinco réplicas y se obtuvieron resultados muy diferentes entre sí. Entre la medida de la primera y la última réplica hubo una diferencia de dos meses de tiempo y conforme pasó el tiempo el porcentaje de plata liberada que se obtuvo fue menor. Esto pudo deberse a que la muestra de pimaricina + AgNPs era inestable y conforme pasó el tiempo se formaron agregados de nanopartículas de mayor tamaño, por lo que estos agregados se depositaron en el fondo del tubo tras la centrifugación y con ello, disminuyó la concentración de plata medida mediante F-AAS y el porcentaje de plata liberada.

Posteriormente, se comparó el %Ag total (m/m) en el antibiótico obtenido mediante digestión ácida y el %Ag liberada (m/m) y se observó que en el caso de las eritromicinas gran parte de la plata se quedó retenida en la matriz orgánica debido a la baja solubilidad de los antibióticos. El residuo que quedó de la matriz orgánica tras la lixiviación de las muestras justificó estos resultados.

En la Fig. 13 se muestran los porcentajes de plata liberada respecto a la plata total en cada una de las muestras estudiadas.

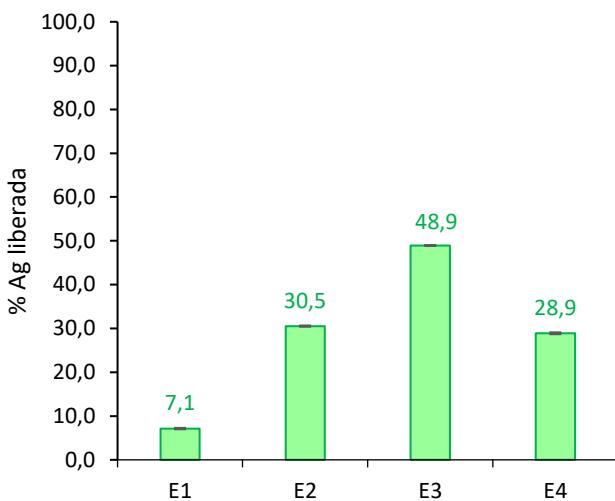


Fig. 13: % Ag liberada respecto a la plata total en los antibióticos no solubles

5.1.4. Determinación de la fracción de Ag(I) liberada mediante ultrafiltración

Tras cuantificar en el antibiótico se realizó una ultrafiltración para determinar la fracción de Ag(I) que se liberaba de la muestra. Teniendo en cuenta que en las muestras de antibióticos modificados la plata está en forma de nanopartículas, al ponerlas en medio acuoso estas nanopartículas pueden oxidarse a Ag(I).

Por diferencia con la cantidad de plata total en el caso de los antibióticos solubles, y de la plata liberada en el caso de los antibióticos no solubles se determinó la cantidad de plata que quedó en forma de nanopartículas y que no se oxidó a Ag(I).

Evaluación del método con patrones

Para verificar que la ultrafiltración era una buena técnica para separar AgNPs de la plata iónica y que las NPs no pasaban a través de la membrana del filtro se llevó a cabo el procedimiento con una muestra comercial de AgNPs de 100 mg/L con un tamaño de 10 nm. Se midió la suspensión de AgNPs antes de ultrafiltrar y se obtuvo una concentración de $105,2 \pm 2,2$ mg/L Ag, y la concentración en el ultrafiltrado fue $0,53 \pm 0,01$ mg/L Ag, correspondiente al 0,5%. Por tanto, se pudo concluir que la membrana de ultrafiltración de 3kDa retenía cuantitativamente las AgNPs de 10 nm, y por ello, era adecuada para separar Ag(I) y AgNPs de estos tamaños.

Antibióticos solubles

Se disolvieron las penicilinas en agua ultrapura y se ultrafiltraron con el objetivo de separar las NPs de la Ag(I) liberada. Se midieron mediante F-AAS tras una dilución previa.

Los resultados obtenidos en porcentaje de Ag(I) y AgNPs respecto a la plata total de las penicilinas al realizar tres réplicas se muestran en la Fig. 14.

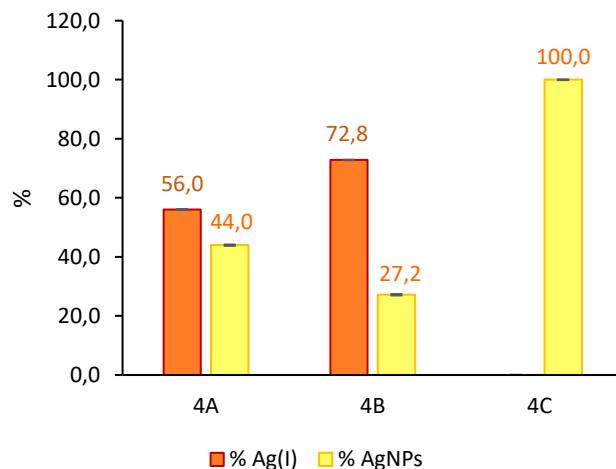


Fig. 14: %Ag(I) y %AgNPs respecto a la plata total de las penicilinas

Antibióticos no solubles

Tras realizar la lixiviación de los antibióticos no solubles se llevó a cabo una ultrafiltración y se determinó mediante F-AAS la fracción de Ag(I) respecto a la plata liberada de las muestras.

Los resultados obtenidos en porcentaje de Ag(I) y AgNPs respecto a la plata liberada de los antibióticos se muestran en la Fig. 15.

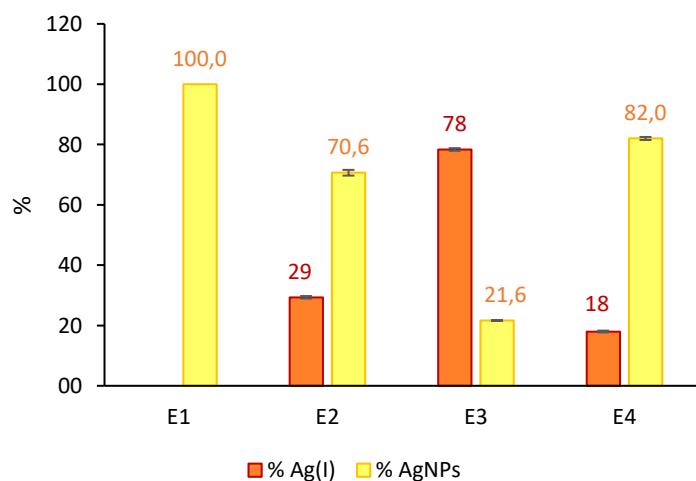


Fig. 15: %Ag(I) y %AgNPs respecto a la plata liberada de los antibióticos no solubles

En la pimaricina + AgNPs se realizaron tres réplicas y se obtuvieron resultados diferentes entre sí, como ocurrió en el apartado anterior. Esto pudo ser debido a que la muestra era inestable y con el tiempo se formaron agregados mayores que se depositaron en el fondo durante la lixiviación por lo que no se pudo estimar correctamente el porcentaje de Ag(I) de las muestras.

5.1.5. Determinación de la fracción de nanopartículas de plata mediante CPE

Tras cuantificar indirectamente las nanopartículas de plata a partir de las medidas de ultrafiltración, se estudió la eficacia de la extracción en punto de nube, un método que permite la cuantificación directa de las NPs.

El medio de la disolución que se mide mediante F-AAS contenía glicerol 1% y Triton X-114 5%, por lo que se comprobó que no existían interferencias al analizar una muestra de patrón de Ag(I).

Evaluación del método con patrones

Se llevó a cabo la extracción de una suspensión de AgNPs de 10 nm para comprobar que el método era adecuado para la extracción de AgNPs. El rendimiento de extracción obtenido para esta suspensión fue $79,6 \pm 1,4\%$.

Posteriormente, se comprobó que las AgNPs y la Ag(I) de las muestras se separaban en las dos fases y que la medida de F-AAS obtenida en las muestras de antibióticos correspondía sólo a las AgNPs. Para ello se añadió patrón de Ag(I) a la muestra de penicilina convencional PG y se llevó a cabo la extracción. Se obtuvo una concentración de Ag por debajo del límite de detección, por lo que se determinó que en la extracción la Ag(I) se retenía en la fase acuosa y las AgNPs en la fase del Triton, por lo que se producía la separación de ambas especies.

Antibióticos solubles

Se llevó a cabo la extracción de las AgNPs de las disoluciones de penicilinas y se observó que se extrajo un porcentaje muy pequeño de las NPs. En la Fig. 17 y en la Fig. 16 se recogen los %AgNPs respecto a la plata total para cada una de las muestras y el rendimiento de extracción respecto al %AgNPs obtenido mediante ultrafiltración, respectivamente.

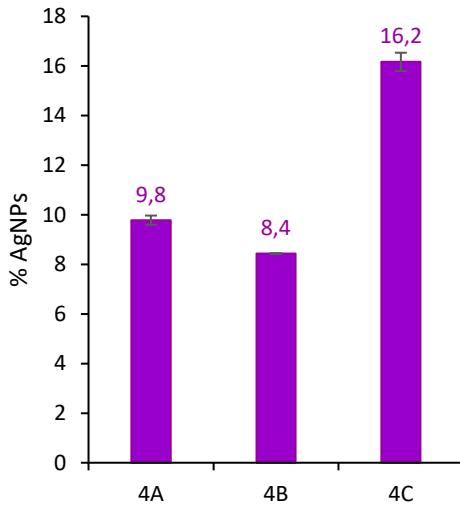


Fig. 17: %AgNPs respecto a la plata total obtenido mediante CPE en las penicilinas

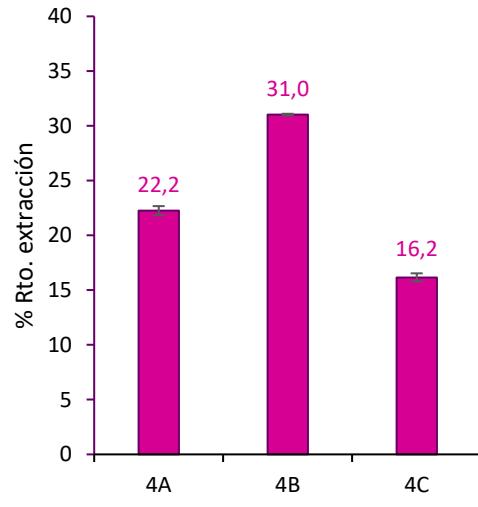


Fig. 16: Rendimiento de extracción en las penicilinas

Debido a que se obtuvo un mayor rendimiento de extracción para las AgNPs comerciales, se comprobó si la matriz orgánica de las muestras interfería en la extracción. Para ello se adicionaron AgNPs de 10 nm a la muestra PG y se obtuvo un rendimiento de extracción de $62,0 \pm 3,8\%$. Al adicionar la matriz de penicilina el rendimiento de extracción disminuyó, por lo que se demostró que la matriz afectaba a la extracción.

Se repitió la adición de AgNPs de 10 nm a la PG, se dejó agitar en ausencia de luz durante una hora y se llevó a cabo la CPE. Se obtuvo un rendimiento de extracción de $54,1 \pm 5,4\%$. Esta disminución del rendimiento concordó con el resultado anterior y reafirmó que la matriz interfería en la extracción, ya que cuando aumentaba el tiempo de agitación, se mezclaban más las AgNPs con la matriz de penicilina y se extraían menos AgNPs.

A la vista de los resultados obtenidos, se llegó a la conclusión de que el método de extracción en punto de nube no era adecuado para la extracción cuantitativa de AgNPs en las muestras de penicilinas ya que se obtenían rendimientos de extracción muy bajos.

Antibióticos no solubles

Tras los resultados obtenidos en el caso de las penicilinas, se probó la CPE en una de las muestras de eritromicinas que contenía mayor cantidad de AgNPs.

Tras la lixiviación de la muestra E4 se llevó a cabo la extracción y se obtuvo que se extrajo un $7,7 \pm 0,4\%$ AgNPs respecto a la plata liberada, lo que correspondía a un rendimiento de extracción del $9,4 \pm 0,5\%$.

Para demostrar que en este caso también afectaba la matriz de eritromicina, se adicionaron AgNPs de 10 nm a la muestra de E y se obtuvo una medida por debajo del límite de detección, lo que verificó las interferencias de la matriz.

A la vista de los resultados, no se probó la CPE para el resto de antibióticos no solubles, y se concluyó que este método no era adecuado para la cuantificación cuantitativa de AgNPs en estas muestras.

5.1.6. Caracterización de nanopartículas de plata mediante FESEM

Por último, para finalizar la caracterización de las AgNPs de los antibióticos se observaron las muestras en el microscopio electrónico de barrido. Las medidas se realizaron a 3,00 kV y una distancia de trabajo de 4,1 mm.

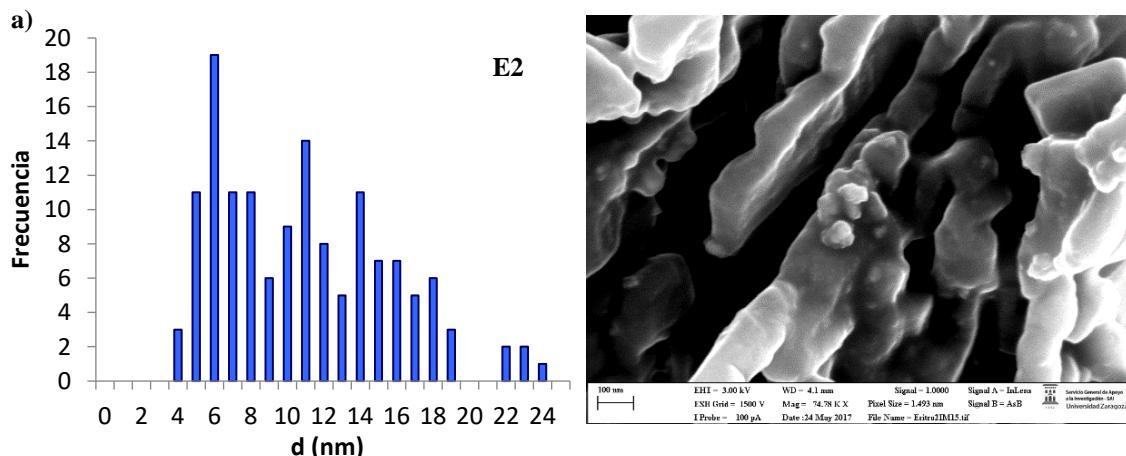
Antibióticos solubles

Las muestras sólidas se suspendieron en unos μL de agua ultrapura y se depositaron en la rejilla. Debido a la solubilidad de las penicilinas en el agua se formó una capa de penicilina que impidió la observación de las AgNPs.

Para evitar esto, se ultrafiltró la disolución de penicilinas y se depositaron unos microlitros en la rejilla. En este caso la capa de penicilina que se formó fue delgada pero también impedía observar las AgNPs.

Antibióticos no solubles

Se observaron las muestras sólidas en el microscopio electrónico. En la Fig. 18 se muestran las distribuciones de tamaño, las imágenes obtenidas mediante FESEM y el espectro de dispersión de rayos X de las muestras.



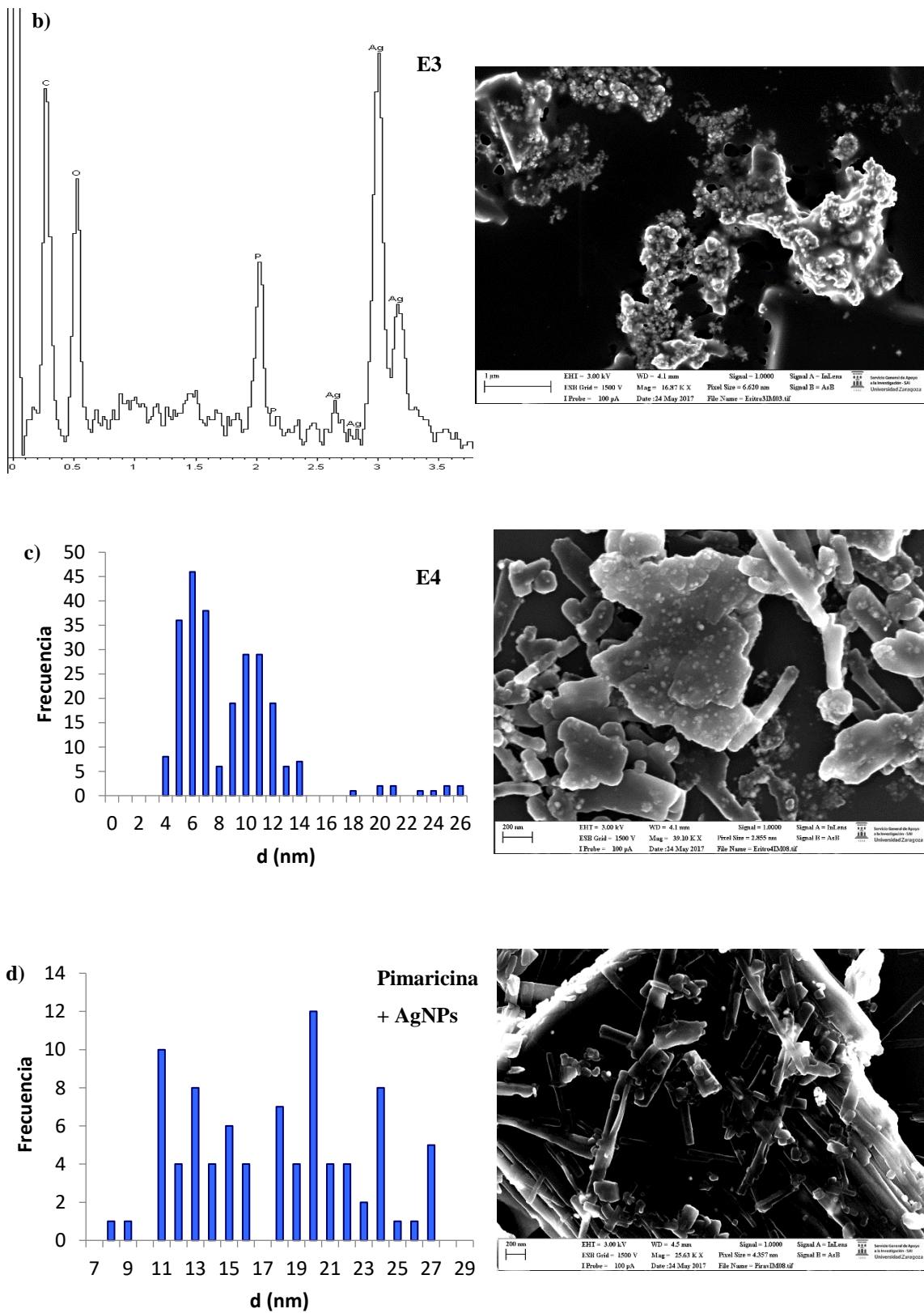


Fig. 18: Distribución de tamaños, espectro de dispersión de rayos X e imágenes obtenidas mediante FESEM de las muestras a) E2, b) E3, c) E4 y d) Pimaricina + AgNPs

En la muestra E2 se observaron partículas primarias de plata y agregados de nanopartículas. Las partículas primarias tenían un diámetro medio de $9,9 \pm 4,2$ nm, lo que indicó que había una gran polidispersión. Los agregados tenían un tamaño en torno a 22 nm.

En la muestra E3 las AgNPs se encontraron muy agregadas y gran parte de la plata se encontraba formando cristales triangulares o cúbicos de fosfato de plata, como se observa en el espectro de dispersión de rayos X.

La muestra E4 estaba formada por AgNPs esféricas distribuidas homogéneamente y agregados. Las partículas primarias presentaron un diámetro medio de $7,6 \pm 2,6$ nm, lo que indicó que había cierta polidispersión. Los agregados que formaban las partículas primarias tenían tamaños comprendidos entre 18 y 26 nm.

En la pimaricina + AgNPs se observaron tanto partículas primarias como agregados de AgNPs. El tamaño medio de las partículas primarias fue $18,3 \pm 5,2$ nm y los agregados tenían tamaños que iban desde 40 nm hasta 300 nm, por lo que la distribución de tamaños tenía una gran polidispersión. Estos resultados concordaron con los obtenidos en la cuantificación de la plata liberada. Se demostró la existencia de agregados superiores a 50 nm, por lo tanto con las condiciones utilizadas en la centrifugación estos agregados se depositaron en el fondo del tubo y no se cuantificaron mediante F-AAS.

En el Anexo (Figura F6) se observan los espectros de dispersión de rayos X de las muestras E4 y pimaricina + AgNPs que demostraron que las nanopartículas eran de plata. Los picos de Al, Cu y C pertenecían a la rejilla en la que se depositaron las muestras.

5.2. Determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos

La última parte de este trabajo se centró en el estudio del efecto antibacteriano de las muestras de antibióticos y en la determinación de la posible existencia de efectos sinérgicos frente a distintas bacterias.

5.2.1. Método de difusión: antibiogramas

En este trabajo se utilizó el método de halo de inhibición como una primera aproximación para determinar la sensibilidad bacteriana de la eritromicina y la penicilina frente a varios microrganismos.

En la Fig. 19 se observan los halos de inhibición obtenidos mediante este método:

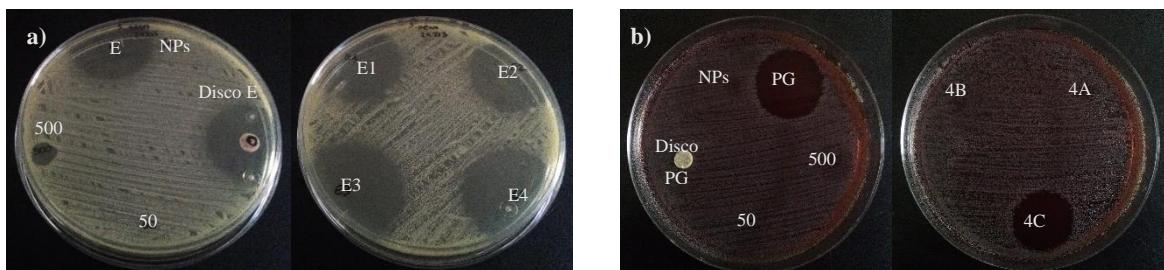


Fig. 19: Halos de inhibición frente a a) *S. aureus* y b) *S. pneumoniae*

En un primer ensayo de la penicilina con una concentración de 1,25 µg/mL frente a *E. coli* y *P. aeruginosa* no se observaron halos de inhibición. En la Tabla 4 se recogen los halos del ensayo repetidos con una concentración diez veces mayor de las muestras de penicilina y del control del disco de penicilina comercial.

En las placas de *E. coli*, dentro de los halos se observaron colonias de bacterias. Esto pudo deberse a un mecanismo de resistencia adquirida; las bacterias que se observaron dentro de los halos produjeron betalactamasas que eran capaces de romper el anillo de las penicilinas inactivando el antibiótico

Muestra	Conc.	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. pneumo.</i>	<i>Hi</i>
PG	12,5 µg/mL	28	24	22	35 ± 1
4A	12,5 µg/mL	0	8	5	9 ± 2
4B	12,5 µg/mL	0	0	0	0
4C	12,5 µg/mL	19	25	19	30
Disco penicilina	10 U (6 µg/carga)	0	0	0	0

Tabla 4: Halos de inhibición en mm para la penicilina

En las bacterias *E. coli*, *S. pneumoniae* y *Hi* se observó que no existían efectos aditivos en los antibióticos modificados 4A, 4B y 4C respecto a la penicilina convencional PG. En el caso de *E. faecalis* en el antibiótico 4C se observó un efecto similar al producido por PG. El control del disco de penicilina comercial no produjo ningún efecto en ninguna de las cepas.

Para determinar la sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos estudiados se compararon los resultados obtenidos con los halos de inhibición aceptables según las normas del NCCLS (Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico), que actualmente se conoce como CLSI (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio).³⁴

Además, para verificar que los halos obtenidos eran aceptables se compararon con los rangos de control de calidad que se adjuntan en el mismo documento del CLSI.

Para considerar las bacterias *S. pneumoniae* susceptibles a la penicilina el halo de inhibición debe ser ≥ 20 mm, por lo que asumiendo un cierto error en la medida del halo, se pudo considerar que estas bacterias eran susceptibles a las muestras PG y 4C. En el caso de *E. faecalis* mostró susceptibilidad frente a las muestras PG y 4C (halo ≥ 15 mm) y resistencia frente a 4A (≤ 14 mm). Para las bacterias *E. coli* y *Hi* no existen datos para la penicilina ya que no es aplicable frente a estas bacterias; sin embargo, los resultados obtenidos para algunas de las muestras de penicilinas mostraron efecto bactericida, pero esto pudo ser debido a que las penicilinas estudiadas tenían concentraciones diez veces mayores que las de los discos control.

El rango del halo de inhibición del control de calidad de las bacterias *S. pneumoniae* ATCC 49619 frente al disco de penicilina es de 24 a 30 mm. En el caso del disco de penicilina comercial estudiado no se obtuvo halo lo que podría indicar que la penicilina se había deteriorado y había perdido su efecto bactericida frente a estas bacterias, lo que pudo ocurrir también en el caso de *E. faecalis*.

Para las muestras estudiadas los halos obtenidos para *S. pneumoniae* fueron menores que los controles de calidad del CLSI. La acción bactericida de la penicilina se debe a la estructura básica formada por el sistema cíclico β -lactámico unido a un anillo tiazolidínico. La disminución del efecto bactericida que se observó pudo deberse a que la introducción de las AgNPs en la estructura de la penicilina durante su síntesis pudo modificar esta estructura básica.

Teniendo en cuenta que las muestras 4A, 4B y 4C se sintetizaron a partir de distintos precursores utilizando la misma penicilina que la muestra PG, la estructura final del antibiótico será distinta. Esto concuerda con la explicación anterior de que la modificación de la estructura disminuye ligeramente el efecto bactericida respecto a PG en el caso de la muestra 4C; y significativamente en las muestras 4A y 4B.

En la Tabla 5 se recogen los resultados de los halos de inhibición obtenidos para las muestras de eritromicina y los controles del disco de eritromicina comercial, las AgNPs de 10 nm y AgNO_3 frente a los distintos microorganismos.

Muestra	Conc.	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Salmonella ent.</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. pneumo.</i>	<i>Hi</i>
E	3 µg/mL	14 ± 2	17 ± 2	9	30	19	0	28 ± 3
E1	3 µg/mL	17 ± 1	11	10	33	19	4	28 ± 1
E2	3 µg/mL	17 ± 1	11 ± 4	11	32	23	0	28 ± 1
E3	3 µg/mL	15 ± 3	11 ± 4	10	31	12	0	28 ± 1
E4	3 µg/mL	16 ± 6	13 ± 4	10	32	20	0	27 ± 1
Disco eritromicina	15 µg/carga	12 ± 1	12	11	29	18	0	26 ± 1
AgNPs	50 µg/mL	0	0	0	0	ND	ND	ND
AgNPs	100 µg/mL	0	0	0	0	4	4	7
AgNO ₃	50 µg/mL	0	0	0	0	0	0	0
AgNO ₃	500 µg/mL	8	9	8	9 ± 1	9 ± 1	7 ± 2	8

Tabla 5: Halos de inhibición en mm para la eritromicina y los controles de NPs y AgNO₃ (ND: no determinado)

Debido a que para la mayoría de las bacterias se realizó un único ensayo no se pudo determinar con certeza si existían efectos aditivos o antagónicos en las diferentes muestras. A primera vista y teniendo en cuenta los posibles errores de medición de los halos, se observó que la eritromicina (E) produjo efectos inhibitorios similares a los producidos por el control del disco de eritromicina comercial en todas las bacterias estudiadas, excepto en *P. aeruginosa* que se observó un mayor halo en E. Los controles de 500 µg/mL AgNO₃ presentaron el mismo efecto en todas las bacterias estudiadas, mientras que el de 50 µg/mL AgNO₃ y el de 50 µg/mL AgNPs no produjeron inhibición bacteriana.

Al comparar las muestras de eritromicina modificadas con nanopartículas (E1, E2, E3 y E4) con la eritromicina convencional E se observaron efectos similares en la *Salmonella ent.* y *Hi*. En *S. pneumoniae* se observaron efectos inhibitorios para la muestra E1, y en *E. coli* y *S. aureus* podrían existir efectos aditivos para E1, E2, E3 y E4. Por el contrario, en *P. aeruginosa* podría observarse una disminución respecto a E y efectos similares al control comercial. En *E. faecalis* se produjeron efectos similares, aditivos y antagónicos según la muestra de eritromicina con NPs estudiada.

Para considerar las bacterias *S. aureus* susceptibles a la penicilina el halo de inhibición debe ser ≥ 23 mm³⁴, por lo que se pudo considerar a estas bacterias susceptibles a todas las muestras de eritromicina estudiadas. En el caso de *E. faecalis*, las bacterias fueron susceptibles a la muestra E2 (halo ≥ 23 mm), mientras que tuvieron una susceptibilidad intermedia frente a E, E1 y E4 (halo de 14-22 mm) y fueron resistentes a

E3 (halo \leq 13 mm). Las bacterias *S. pneumoniae* resultaron ser resistentes a todas las muestras de eritromicinas estudiadas (halo \leq 15 mm) y para las bacterias *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella ent.* y *Hi* no existen datos ya que la eritromicina no es aplicable, aunque los resultados obtenidos mostraron que todas las muestras de eritromicina estudiadas presentaron un efecto bactericida.

El rango del halo de inhibición del control de calidad de las bacterias *S. pneumoniae* ATCC 49619 frente al disco de eritromicina es de 25 a 30 mm.³⁴ En las muestras y en el disco de eritromicina no se obtuvieron halos o fueron significativamente menores lo que pudo deberse a que las bacterias estudiadas desarrollaron resistencia frente a la eritromicina por la modificación de la diana de acción de la misma o por la existencia de bombas de eflujo.

5.2.2. Método de dilución: determinación de CIM y CBM

La determinación de la CIM y CBM permitió cuantificar la acción bactericida del agente de una manera más precisa que en el caso del halo de inhibición. Debido a que la CIM se determina visualmente a partir de la turbidez de los pocillos de la placa, se supone un error de ± 1 dilución en los resultados obtenidos.

En la Fig. 20 se muestra la placa de 96 pocillos tras la incubación de *E. coli* en las que se observó la distinta turbidez en función de la concentración de muestra. En el Anexo (Figura F7) se muestra la placa en el caso de *S. aureus*. La CIM se considera la concentración mínima en la que ya no se observa turbidez.

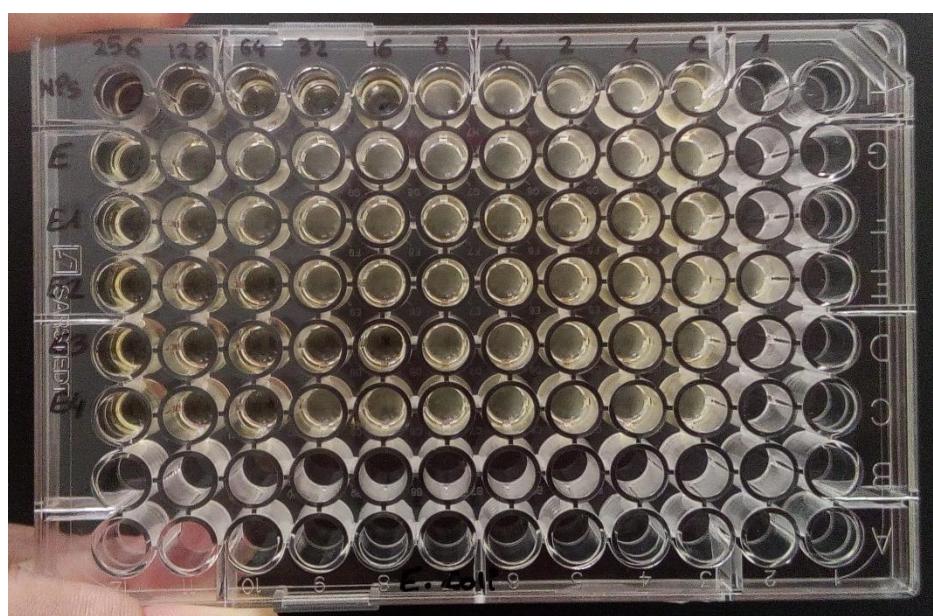


Fig. 20: Placa con distinta turbidez para determinar la CIM en *E. coli*

En la Fig. 21 se muestran las placas de Petri que permitieron la determinación de la CBM a partir de la observación de la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano.

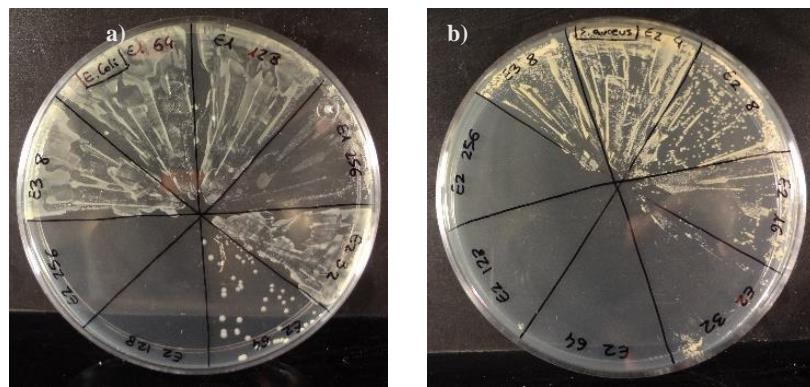


Fig. 21: Placas de Petri para la determinación de la CBM de a) E1, E2 y E3 en *E. coli* y b) E2 y E3 en *S. aureus*

En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos de la CIM y CBM de las distintas eritromicinas y AgNPs para *E. coli* y *S. aureus*. Debido a que la determinación de la CIM se realiza utilizando una escala discontinua (concentraciones crecientes en base 2), los valores reales de la CIM se encontrarán en algún valor situado entre la CIM experimentalmente obtenida y la concentración inmediatamente inferior.

Muestra	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)
E	256	>256	8	64
E1	128	>256	16	64
E2	64	128	8	64
E3	16	16	16	64
E4	64	128	8	64
AgNPs	16	32	256	> 256

Tabla 6: Valores obtenidos de la CIM y CBM para *E. coli* y *S. aureus*

Se observó que para *E. coli* la CIM y CBM de E presentaron valores muy altos y al combinar la eritromicina con las AgNPs se produjo una disminución de hasta 16 órdenes de magnitud. Los valores obtenidos de las AgNPs de 10 nm fueron mucho menores que los de E y la mayoría de las muestras de eritromicina modificadas. Sin embargo, los valores de las eritromicinas modificadas con AgNPs y el de las AgNPs de 10 nm no se pudieron comparar entre sí debido a que en las muestras la cantidad de AgNPs era menor que en la suspensión de AgNPs de 10 nm.

En *S. aureus* los resultados obtenidos fueron menores que en *E. coli*, excepto los de las AgNPs, por lo que se pudo determinar que *S. aureus* (Gram +) era más sensible que *E. coli* (Gram -) a la eritromicina.

Resulta muy complicado comparar los resultados obtenidos con la bibliografía ya que el efecto bactericida de las AgNPs depende de la concentración, el tamaño, el estado de agregación o el recubrimiento de las NPs. Franci et al. obtuvieron una CIM de AgNPs de 10-15 nm sin recubrir para *E. coli* de 25 µg/mL y para *S. aureus* de 100 µg/mL,³⁵ por lo que teniendo en cuenta que las AgNPs de 10 nm estaban recubiertas de citrato las diferencias observadas con las CIM en este trabajo pudieron ser justificadas por el diferente recubrimiento y los valores obtenidos pudieron ser aceptables. Las CIM obtenidas experimentalmente demostraron que las bacterias Gram-negativas (*E. coli*) eran más susceptibles que las Gram-positivas (*S. aureus*) a las AgNPs, lo que concordaba con la bibliografía.³⁶

En la Fig. 22 se muestran las placas de Petri que permitieron el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC).

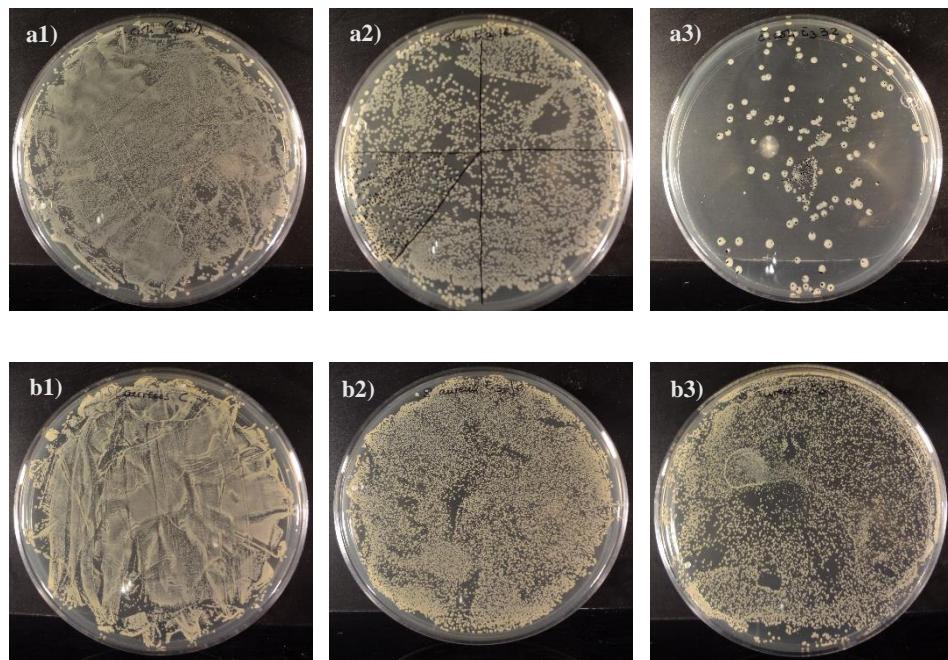


Fig. 22: Crecimiento bacteriano de a) *E. coli* y b) *S. aureus* en las muestras de 1) control, 2) 16 µg/mL E3 y 3) 32 µg/mL E3

En la Tabla 7 y Tabla 8 se recogen los resultados del recuento de bacterias en UFC/mL para la concentración de la CIM y la inmediatamente inferior, y de la reducción del crecimiento bacteriano en unidades logarítmicas respecto al control. También incluye la concentración de eritromicina y de NPs que tenía cada una de las muestras estudiadas para posteriormente comparar las diferencias obtenidas.

Muestra	[] µg/mL*	Eritromicina (µg/mL)	Ag total (µg/mL)	Ag NPs (µg/mL)	Ag (I) (µg/mL)	UFC/mL	Reducción (unidad log)
E	128	128	0	0	0	10^5	1
	256	256	0	0	0	18560	2
E1	128	127,28	0,72	0,72	0	10^5	1
	256	254,57	1,43	1,43	0	10^5	1
E2	64	62,35	1,65	0,49	1,16	10^5	1
	128	124,70	3,30	0,97	2,33	10^5	1
E3	16	15,25	0,75	0,59	0,16	51840	2
	32	30,50	1,50	1,17	0,33	2370	3
E4	64	62,90	1,10	0,20	0,90	10	5
	128	125,80	2,20	0,40	1,80	20	5
AgNPs	16	0	16	16	0	20	5
	32	0	32	32	0	50	5
Control	-	-	-	-	-	2×10^6	-

Tabla 7: Recuento de bacterias en UFC/mL y reducción del crecimiento bacteriano de *E. coli* en función de la concentración de las muestras. * Eritromicina + Ag total

Muestra	[] µg/mL*	Eritromicina (µg/mL)	Ag total (µg/mL)	Ag NPs (µg/mL)	Ag (I) (µg/mL)	UFC/mL	Reducción (unidad log)
E	8	8	0	0	0	5×10^4	2
	16	16	0	0	0	40	5
E1	16	15,91	0,09	0,09	0	10^6	0
	32	31,82	0,18	0,18	0	5×10^4	2
E2	8	7,79	0,21	0,06	0,15	5×10^4	2
	16	15,59	0,41	0,12	0,29	4×10^4	2
E3	8	7,63	0,37	0,29	0,08	5×10^4	2
	16	15,25	0,75	0,59	0,16	4×10^4	2
E4	8	7,86	0,14	0,02	0,12	5×10^4	2
	16	15,72	0,28	0,05	0,23	4×10^4	2
AgNPs	128	0	128	128	0	10^5	1
	256	0	256	256	0	10^5	1
Control	-	-	-	-	-	2×10^6	-

Tabla 8: Recuento de bacterias en UFC/mL y reducción del crecimiento bacteriano de *S. aureus* en función de la concentración de las muestras. * Eritromicina + Ag total

Tanto en las figuras de las placas como en las tablas anteriores se observa que con todas las muestras y las AgNPs se produjo una disminución de UFC/mL respecto al control en distintos órdenes de magnitud. En la Fig. 22, que corresponde con la muestra E3, se observa que al aumentar la concentración de muestra disminuyó considerablemente el crecimiento de las dos bacterias estudiadas. Lo mismo ocurrió con la muestra E, E1, E2 y E4 en *S. aureus*. En el caso de las AgNPs en ambas bacterias y de E1, E2 y E4 en *E. coli* no se observó una disminución significativa al aumentar la concentración.

Debido a que sólo se realizó un ensayo de cada una de las bacterias no se pudieron obtener resultados cuantitativos que demostrarán efectos sinérgicos o aditivos al combinar las AgNPs con la eritromicina. Cuando se compararon cualitativamente los resultados de E con el resto de muestras modificadas se observó que para *E. coli* la muestra E3 presentó efectos sinérgicos ya que disminuyendo significativamente la cantidad de eritromicina y combinándolo con una pequeña cantidad de AgNPs se produjo un aumento en la reducción de las bacterias. La muestra E4 también presentó efectos sinérgicos ya que al combinar una pequeña cantidad de AgNPs con aproximadamente la misma de eritromicina que E se obtuvo un significativo aumento en la reducción de bacterias. En E1 y E2 no se observaron estos efectos sinérgicos. Para *S. aureus* no se observaron efectos sinérgicos en ninguna de las muestras.

6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de este trabajo se exponen a continuación:

1. Se ha detectado la presencia de las AgNPs en las muestras de penicilina, en las muestras de eritromicina modificadas E2, E3 y E4 y en la pimaricina + AgNPs tras realizar medidas de reflectancia. En el caso de E1 no se han detectado nanopartículas debido a que la matriz interfiere en la medida y enmascara los picos. En las medidas de MAS UV-vis tampoco se han observado los máximos de absorbancia correspondientes con la presencia de AgNPs, lo que también puede deberse a que la matriz orgánica enmascara dichos picos debido a que se encuentra en mayor proporción.

2. Se ha demostrado que en el caso de las muestras de penicilina no es necesario realizar una digestión ácida para cuantificar la plata total ya que debido a su solubilidad se obtuvieron los mismos resultados tras la disolución de las muestras en agua ultrapura y posterior medida mediante F-AAS. Para el resto de antibióticos es necesario realizar una digestión ácida para cuantificar la plata total.

3. Tras el estudio de liberación de plata se ha obtenido que, debido a la poca solubilidad de la eritromicina en agua, gran parte de la plata se queda retenida en la matriz orgánica. En la pimaricina + no se ha podido determinar la cantidad de plata que se libera debido a que la muestra es inestable con el tiempo y se forman grandes agregados de NPs.

4. Tras la determinación de la fracción de Ag(I) liberada en cada una de las muestras, se ha verificado que en el proceso de ultrafiltración se produce la separación eficiente de las AgNPs y de la plata disuelta y que no se producen pérdidas significativas por el paso de las AgNPs a través de la membrana.

5. Tras el estudio de la eficacia del método de extracción en punto de nube se ha llegado a la conclusión de que este método no es adecuado para la extracción de AgNPs en estas muestras. Esto se debe a los bajos rendimientos de extracción que se obtienen debido a que la matriz orgánica de los antibióticos interfiere en la extracción.

6. Las nanopartículas de plata de las muestras de penicilinas no se han podido caracterizar mediante FESEM debido a que se forma una capa de penicilina que impide su observación. En la muestra de pimaricina + AgNPs se ha observado la presencia de grandes agregados, lo que confirman los resultados obtenidos en la cuantificación de la plata liberada. En las muestras de eritromicina se ha observado la presencia de nanopartículas primarias de pequeño tamaño y de agregados de AgNPs, con una cierta polidispersión.

7. Tras determinar la sensibilidad bacteriana se ha obtenido que las bacterias *S. pneumoniae* y *E. faecalis* son susceptibles a la penicilina y a la penicilina modificada 4C. La disminución del efecto bactericida del resto de las muestras de penicilina puede deberse a que la introducción de las AgNPs en la matriz de penicilina haya modificado la estructura básica de ésta, que es la principal responsable de la acción bactericida.

S. aureus ha resultado ser susceptible a todas las muestras de eritromicina mientras que *S. pneumoniae* es resistente. En el caso de *E. faecalis* ha habido diversidad de resultados según la muestra de eritromicina estudiada. Al comparar con la bibliografía disminución o ausencia del halo de inhibición del crecimiento de *S. pneumoniae* se ha obtenido que las bacterias estudiadas desarrollaron resistencia frente a la eritromicina probablemente por la modificación de la diana de acción o por el desarrollo de bombas de eflujo.

8. Por último, se ha obtenido que frente a *E. coli* las muestras de eritromicina modificadas E3 y E4 presentan efectos sinérgicos ya se produce un aumento en la reducción del crecimiento bacteriano al combinar una pequeña cantidad de AgNPs con la eritromicina. A la vista de estos resultados, probablemente aumentando la concentración de AgNPs en las muestras de eritromicina se podrían aumentar los efectos sinérgicos frente a *E. coli*, ya que se ha observado que las AgNPs producen una reducción del crecimiento bacteriano cuando la concentración de nanopartículas es alta. Sin embargo, tras relacionar la cantidad de Ag(I) y AgNPs obtenidas en las muestras con los efectos sinérgicos observados, no se ha podido concluir que la aparición de éstos esté asociada exclusivamente a la presencia de AgNPs ni a la de Ag(I), sino que puede ser un efecto de ambas especies.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Debido al creciente problema que está causando la resistencia de las bacterias a los antibióticos, se requiere una mayor investigación en el campo de la combinación de los antibióticos con nanopartículas de plata, ya que como han demostrado alguno de los resultados de este trabajo puede ser una estrategia muy interesante para combatir y solucionar esta resistencia antibacteriana. Concretamente, al combinar la eritromicina con las AgNPs se ha demostrado la aparición de efecto sinérgicos, lo que puede dar lugar a una futura línea de investigación y la posibilidad de extenderlo a otros antibióticos que se utilizan cotidianamente.

Además, como primer contacto con otros tipos de microorganismos se realizó un ensayo en el que se pusieron en contacto amebas (protozoos) con las muestras de eritromicina y penicilina anteriores. La observación en el microscopio óptico mostró que las amebas se encontraban en el estadio de quiste y dentro de éstos no se observó movimiento de las bacterias endosimbiontes ni de los orgánulos cuando entraron en contacto con algunas de las muestras de penicilinas modificadas. Se requieren más estudios para explicar estas observaciones que pueden llegar a ser relevantes y dar lugar a futuras líneas de investigación.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Alós, J. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2015, 33, 692-699.
- ² Oromí Durich, J. Medicina Integral. 2000, 36, 367-370
- ³ Huh, A. J.; Kwon, Y. J. *J.Controlled Release*. **2011**, *156*, 128-145.
- ⁴ Nikaido, H. *Annu.Rev.Biochem.* 2009, 78, 119-146.
- ⁵ Gilman, A., Rall, T., Nies, A., Taylor, P. 8^a edición. Editorial Médica Panamericana, Argentina, 1991.
- ⁶ Benito Peña, M.E. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias, 2006.
- ⁷ Goodman, A., Rall, T.W., Nies, A.S., Taylor, P. 8^a edición. Editorial Médica Panamericana, México, 1993.
- ⁸ Page, C.P., Curtis, M.J., Sutter, M.C., Walker, M.J.A., Hoffman, B.B. Harcourt Brace, Madrid, 1998.
- ⁹ Marín, M., Gudiol, F. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2002, 21, 42-55
- ¹⁰ Seija, V., Vignoli, R. En Temas de Bacteriología y Virología Médica, 2008, pp. 631-647.
- ¹¹ Pimaricina: <http://www.pimaricina.com/origen-de-la-natamicina>
- ¹² Panacek, A.; Smekalova, M.; Vecerova, R.; Bogdanova, K.; Roderova, M.; Kolar, M.; Kilanova, M.; Hradilova, S.; Froning, J. P.; Havrdova, M.; Prucek, R.; Zboril, R.; Kvitek, L. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2016, 142, 392-399.
- ¹³ Dakal, T. C.; Kumar, A.; Majumdar, R. S.; Yadav, V. *Frontiers in Microbiology*. 2016, 7, 1831.
- ¹⁴ Mohanbaba, S. and Gurunathan, S. In *Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy* Grumezescu, A. M.; William A. 2016, pp. 193-227.
- ¹⁵ Reidy, B.; Haase, A.; Luch, A.; Dawson, K. A.; Lynch, I. *Materials*. 2013, 6, 2295-2350.
- ¹⁶ Baker, S.; Pasha, A.; Satish, S. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2017, 25, 44-51.

¹⁷ Laborda, F.; Bolea, E.; Cepriá, G.; Gómez, M. T.; Jiménez, M. S.; Pérez-Arantegui, J.; Castillo, J. R. *Analytica Chimica Acta*. 2016, 904, 10-32.

¹⁸ Abad-Alvaro, I.; Bolea, E.; Laborda, F.; Castillo, J. R. *J.Anal.At.Spectrom.* 2017, 32, 1101-1108.

¹⁹ Abad-Alvaro, I.; Peña, E.; Bolea, E.; Bermejo, P.; Castillo, J. R.; Laborda, F. *ICP-MS Spectrometry. Application Note*. Perkin Elmer. 2016.

²⁰ Cepriá, G.; Cordova, W. R.; Cespedes, O.; Sanchez-Garcia, L.; Ferrer, P.; Gianolio, D.; Castillo, J. R. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016, 408, 6589-6598.

²¹ Sanchez-Garcia, L.; Bolea, E.; Laborda, F.; Cubel, C.; Ferrer, P.; Gianolio, D.; da Silva, I.; Castillo, J. R. *Journal of Chromatography A*. 2016, 1438, 205-215.

²² Cepriá, G.; Pardo, J.; Lopez, A.; Pena, E.; Castillo, J. R. *Sensors and Actuators B-Chemical*. 2016, 230, 25-30.

²³ Jimenez-Lamana, J.; Laborda, F.; Bolea, E.; Abad-Alvaro, I.; Castillo, J. R.; Bianga, J.; He, M.; Bierla, K.; Mounicou, S.; Ouerdane, L.; Gaillet, S.; Rouanet, J.; Szpunar, J. *Metalomics*. 2014, 6, 2242-2249.

²⁴ Bolea, E.; Jimenez-Lamana, J.; Laborda, F.; Abad-Alvaro, I.; Blade, C.; Arola, L.; Castillo, J. R. *Analyst*. 2014, 139, 914-922.

²⁵ Color y brillo (método SCE y SCI):
<http://www2.konicaminolta.eu/eu/Measuring/pcc/es/part3/02.html>

²⁶ Zook, J. M.; Long, S. E.; Cleveland, D.; Geronimo, C. L. A.; MacCuspie, R. I. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011, 401, 1993-2002.

²⁷ Verma, P. In *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*, Schwalbe, R., Steele-Moore, L., Goodwin, A.C. 2007, pp. 257-298.

²⁸ Piddock, L. *J.Appl.Bacteriol.* 1990, 68, 307-318.

²⁹ Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaffer M.A. 6^a edición, Elsevier, 2009.

³⁰ Picazo J.J., Procedimientos en Microbiología Clínica, SEIMC 2000

³¹ Andrews, J. *J.Antimicrob.Chemother.* 2001, 48, 5-16.

³² Chao, J.; Liu, J.; Yu, S.; Feng, Y.; Tan, Z.; Liu, R.; Yin, Y. *Anal.Chem.* 2011, 83, 6875-6882.

³³ A. Alañon Molina, Universidad de Castilla La Mancha, 1992.

³⁴ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), M100 – Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 27^a Edición, 2017.

³⁵ Franci, G.; Falanga, A.; Galdiero, S.; Palomba, L.; Rai, M.; Morelli, G.; Galdiero, M. *Molecules*. 2015, 20, 8856-8874.

³⁶ Kim, J. S.; Kuk, E.; Yu, K. N.; Kim, J.; Park, S. J.; Lee, H. J.; Kim, S. H.; Park, Y. K.; Park, Y. H.; Hwang, C.; Kim, Y.; Lee, Y.; Jeong, D. H.; Cho, M. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*. 2007, 3, 95-101.

ANEXOS

Tabla T1. Test t realizado para las muestras de penicilinas con y sin digestión ácida.

	4A	4B	4C
t_{exp}	0,15	2,15	1,53
t_{teor}	4,30	3,18	4,30
	$t_{exp} < t_{teor}$	$t_{exp} < t_{teor}$	$t_{exp} < t_{teor}$

Figura F1. Curvas espectrales de reflectancia de las muestras de penicilina.

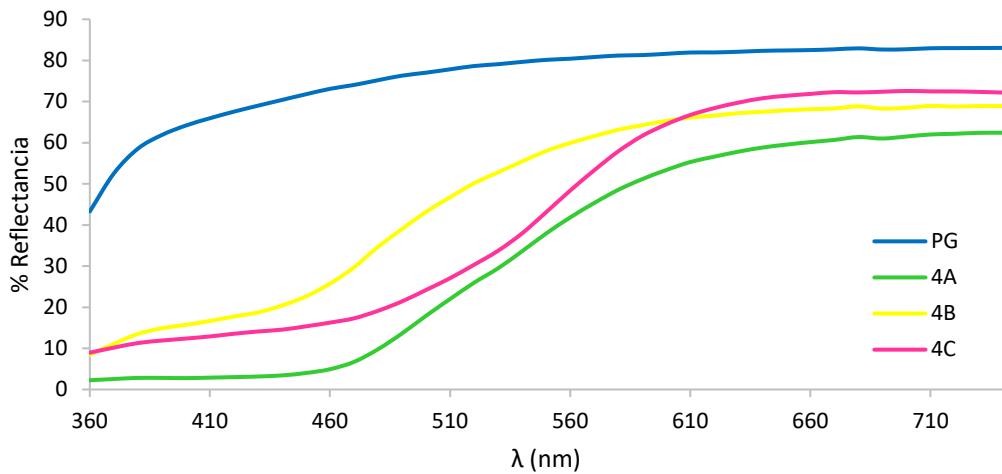


Figura F2. Representación de K/S frente a la longitud de onda de las muestras de penicilina.

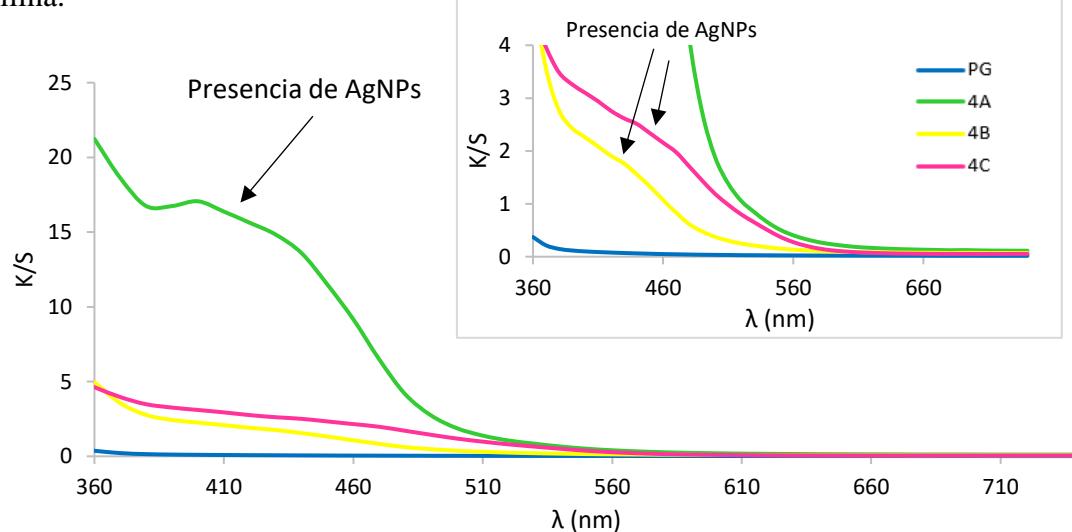


Figura F3. Espectro de absorción UV-vis de las muestras de penicilinas 0,06 M.

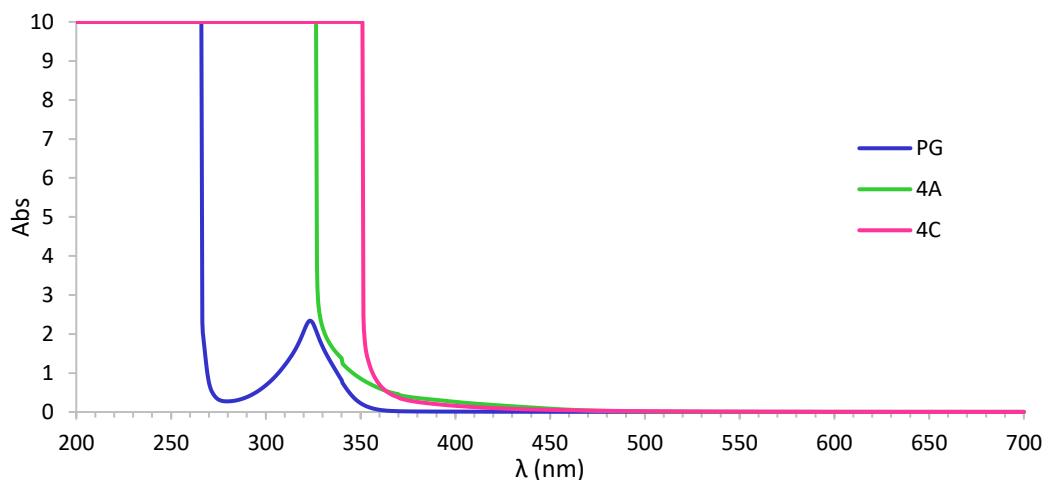


Figura F4. Curvas espectrales de reflectancia de las muestras de antibióticos no solubles.

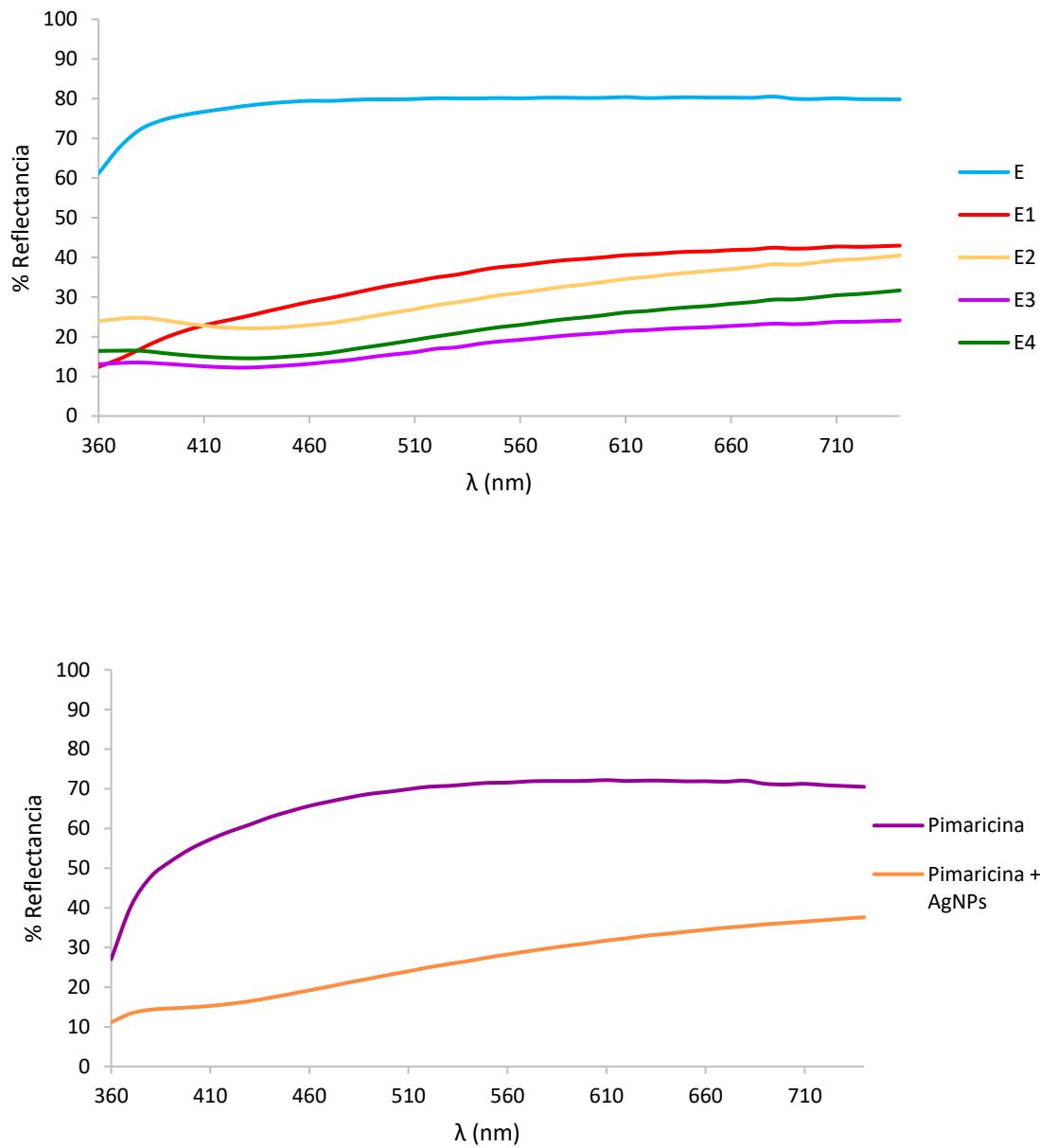


Figura F5. Representación de K/S frente a la longitud de onda de las muestras de antibióticos no solubles.

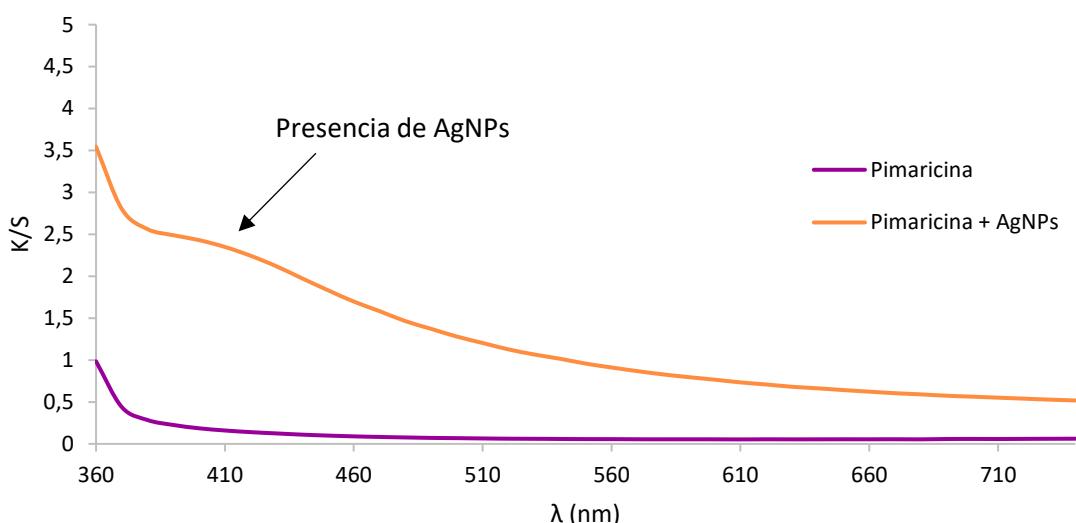
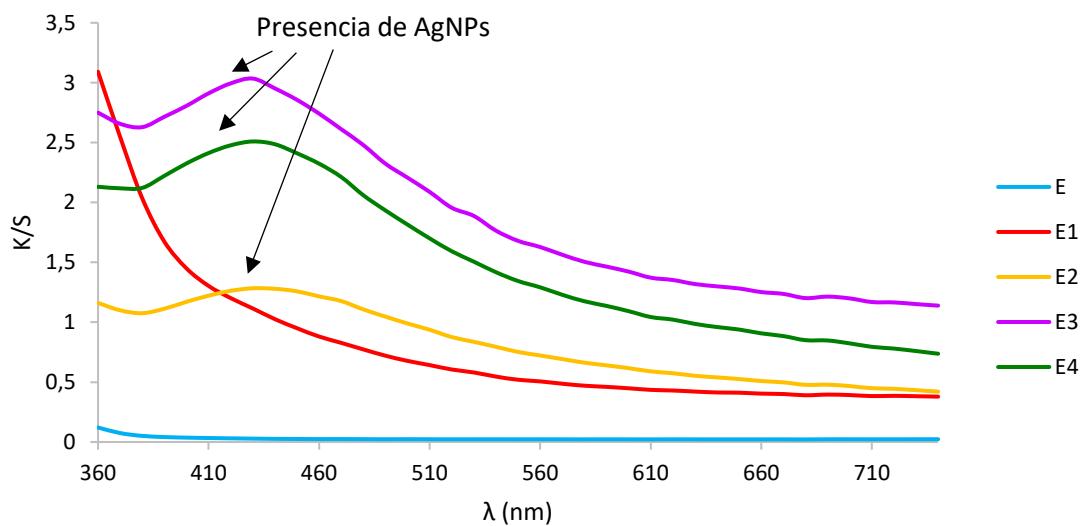
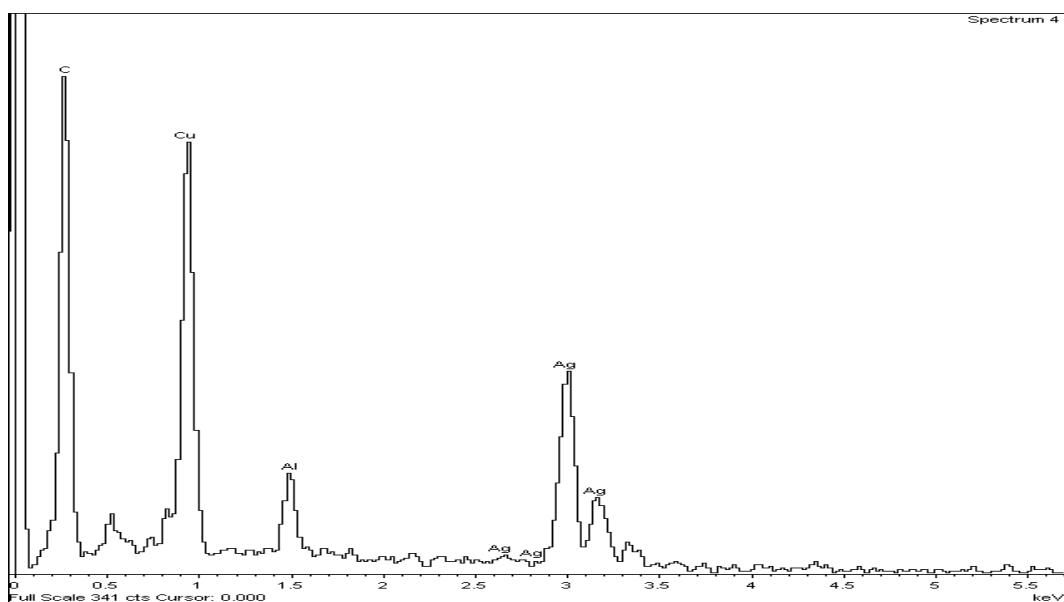


Figura F6. Espectros de dispersión de rayos X de las muestras de a) E4 y b) Pimaricina + AgNPs.

a)



b)

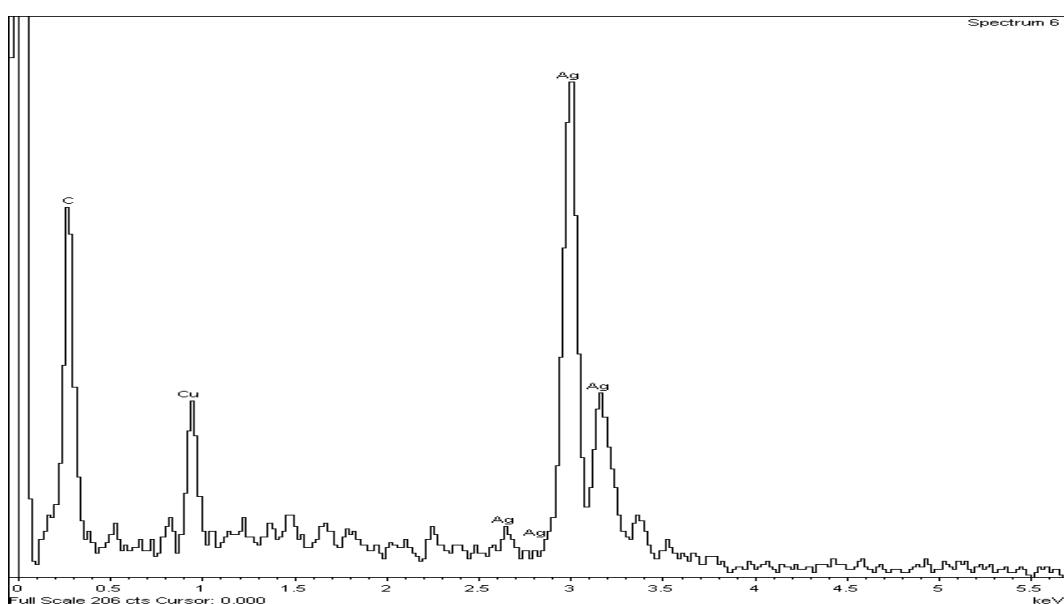


Figura F7. Placa de 96 pocillos tras la incubación de *S. aureus* para la determinación de la CIM.

