



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

Desarrollo de formulaciones antimicrobianas conteniendo nanopartículas de Ag y Silica: estudios de nanotoxicidad, de actividad antibacteriana e inhibición de la formación de biofilms.

Tesista: Carolina Blaiotta

Director: Dr. Martín F. Desimone

Codirector: Dr. Ignacio E. León

Año: 2022

Agradecimientos

En primer lugar, el mayor de mis agradecimientos va dirigido a mis padres, Graciela y Walter, debido a que nada de esto hubiese sido posible sin su apoyo incondicional. Y seguramente, donde sea que estén, hoy estarían orgullosos de sus tres hijos.

A mis hermanos, Cecilia y Agustín, por estar presentes siempre y por haberme dado el mejor regalo de todos, a mis sobrínxs.

A mi novio, Agustín, por bancarme en todas, las buenas, las malas y las más o menos. Y con quién me divierto mucho.

A Javier Viqueira, presidente de Adox, quién me dio la oportunidad de desarrollar esta etapa de mi carrera, en su empresa, con total libertad.

A mis directores Ignacio y Martín, por acompañarme en este proceso de aprendizaje.

A todos y cada una de las personas que trabajan y trabajaron en Adox, con quienes he compartido muchos años, siendo este un ambiente de trabajo excepcional.

A mis amigos de la facultad (GS), son parte de mi familia luego de tantos años, viajes y momentos compartidos.

A Mara, por tantas charlas compartidas acerca de la tesis y demás cuestiones.

A Sara Margarita, por transmitirme su conocimiento y por sobre todo por la química que tenemos.

Al grupo Hybridon, de quienes he aprendido mucho durante todo este tiempo.

A CONICET por haberme otorgado la posibilidad de realizar la tesis.

A todos y cada uno de ustedes....

....Gracias

Índice

CAPÍTULO 1 – Introducción –	2
▣ Infecciones intrahospitalarias	2
▣ <i>Biofilms</i>	3
▣ <i>Quorum sensing (QS)</i>	5
▣ Factores de Virulencia y QS en <i>P. aeruginosa</i>	6
▣ Tratamientos alternativos a los antibióticos	7
▣ Nanotecnología – Definiciones e Historia -	8
▣ Control de infecciones utilizando nanotecnología	8
▣ Vías de obtención de nanopartículas	10
▣ Nanopartículas metálicas	10
▣ Nanopartículas obtenidas por el método Sol-Gel	12
▣ Nanopartículas <i>Core Shell</i>	14
▣ Nanotoxicidad	15
▣ Bibliografía	16
CAPÍTULO 2 – Hipótesis y Objetivos -	22
Hipótesis	22
Objetivo General	22
▣ Objetivos específicos	22
CAPÍTULO 3 -Nanopartículas de plata (NpsAg)-	24
▣ Resumen	24
▣ Introducción	25
Pectina.....	25
Polivinilpirrolidona	26
▣ Materiales y métodos	27
Síntesis de NpsAg con borohidruro de sodio en ausencia de agentes estabilizantes (síntesis 1A)	27
Síntesis de NpsAg con borohidruro de sodio en presencia de agente estabilizante (síntesis 1B)	27
Síntesis de NpsAg con hidróxido de sodio y polivinilpirrolidona, a diferentes escalas (síntesis 2).....	28
Caracterizaciones fisicoquímicas.....	29
Determinación del espectro de absorción (UV-Visible).....	29
Caracterización por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)	30
Determinación del potencial Zeta (ζ).....	30

Caracterizaciones microbiológicas	32
Purificación del microorganismo	32
Determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM)	32
Microscopía de barrido (SEM) sobre superficies con biofilm de <i>P. aeruginosa</i> (PAO1)	35
Tinciones <i>Live/Dead</i> TM <i>Backlight</i> TM –Thermo Fisher Scientific-	35
Por otro lado, para observar el efecto antimicrobiano de las NpsAg se utilizó el kit comercial <i>Live/Dead</i> TM <i>Backlight</i> TM –Thermo Fisher Scientific-	35
El Kit <i>Live/Dead</i> TM <i>Backlight</i> TM –Thermo Fisher Scientific-se compone de dos colorantes: yoduro de propidio (PI) que emite fluorescencia en el rojo, y <i>SYTO</i> [®] 9 que emite fluorescencia en el verde. Ambos tienen la capacidad de fijarse a los ácidos nucleicos, pero difieren en la capacidad de penetrar en las células. Su mecanismo de acción depende de la integridad de la membrana de las células microbianas.	36
▣ Resultados	37
▣ Conclusiones del capítulo 3	49
▣ Bibliografía	50
CAPÍTULO 4 - Partículas <i>core shell</i> –	52
▣ Resumen	52
▣ Introducción	53
Partículas <i>Core Shell</i>	53
Polifenoles	53
▣ Materiales y métodos	55
Síntesis de partículas <i>Core Shell</i> (NpsAg@SiO ₂), en dos etapas (CS-1)	55
Síntesis de partículas <i>Core Shell</i> (NpsAg@SiO ₂), en base acuosa (CS-2)	56
Adsorción de polifenoles sobre las nanopartículas <i>Core Shell</i> (NpsAg@SiO ₂ - (Polifenoles))	58
Agregado de Quercetina en la etapa de síntesis de las partículas <i>Core Shell</i>	59
Caracterizaciones fisicoquímicas	60
Espectroscopía UV-Visible	60
Microscopía Electrónica de Transmisión	61
Caracterización de las partículas NpsAg@SiO ₂ - (Polifenol), utilizando espectroscopía infrarroja con modulo de reflectancia (FTIR-ATR)	61
Cinética de liberación de Ag ⁺ de las partículas NpsAg@SiO ₂ y NpsAg@SiO ₂ - Polifenoles	62
Medición de porosidad y área superficial utilizando el método BET (Brunauer, Emmett y Teller)	63
Determinación de la concentración NpsAg como Ag ⁺ en el <i>core</i> de las partículas <i>Core Shell</i>	63
Determinación de tamaño de partícula por <i>Dynamic Light scattering</i> y Potencial Zeta	63
Isotermas de adsorción de los polifenoles sobre partículas <i>Core shell</i>	64
Cinéticas de adsorción de polifenoles	66
▣ Resultados	67
▣ Conclusiones del capítulo 4	92

▣	Bibliografía	93
	CAPÍTULO 5 – <i>Biofilms</i> -	96
▣	Resumen	96
▣	Introducción	97
	<i>Biofilms</i>	97
	Polifenoles como inhibidores de <i>biofilms</i>	98
▣	Materiales y métodos	99
	Determinación de la Concentración Inhibitoria mínima (CIM) y bactericida (CBM) de los polifenoles frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PAO1) y posterior observación al microscopio óptico.....	99
	Determinación de Concentración Inhibitoria mínima de <i>biofilms</i> (CIMb) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PAO1) tratados con polifenoles.	99
	Estudio de la formación del <i>biofilm</i> sobre placa multipocillos, en la etapa de Adhesión.	101
	Estudio de formación de <i>biofilm</i> sobre placa multipocillos, en la etapa de Maduración.	102
	Formación de <i>biofilm</i> sobre cupones, en reactor (sistema de cultivo continuo)..	102
	Análisis cuantitativo con cristal violeta (0,1%) de la biomasa total desarrollada sobre los cupones.	107
	Reactor de flujo por goteo (<i>Drip Flow Reactor</i>) para formación de <i>biofilm</i> sobre superficies de vidrio.	107
	Tratamiento de <i>biofilms</i> con detergente no iónico	110
	<i>Quorum sensing</i>	110
	Factores de virulencia	110
	Movilidad por <i>swarming</i> y <i>swimming</i>	111
▣	Resultados	112
▣	Conclusiones del capítulo 5	128
▣	Bibliografía	129
	CAPÍTULO 6- Nanotoxicidad-	132
▣	Resumen	132
▣	Introducción	133
▣	Materiales y métodos	134
	Ensayo de viabilidad celular	134
	Determinación de citotoxicidad por citometría de flujo	135
▣	Resultados	137
▣	Conclusiones del capítulo 6	140
▣	Bibliografía	141
	CAPÍTULO 7 – Elaboración de producto-	143
▣	Resumen	143
▣	Introducción	144
▣	Materiales y métodos	145
	Diseño y Desarrollo de productos Cosméticos, Higiene Oral y Domisanitarios..	145

Descripción del proceso de Diseño y Desarrollo	145
1. Evaluación preliminar del diseño.....	145
2. Datos de entrada del diseño	146
3. Diseño e Implementación	146
4. Verificación del diseño y desarrollo (Ver procedimiento de programa de estabilidad, efectividad antimicrobiana y efectividad frente a <i>biofilms</i>)	146
4.1. Programa de estabilidad para el producto final.....	147
4.2. Ensayo de efectividad antimicrobiana según la Norma <i>Japanese Industria Standard Antibacterial products- Test for antibacterial activity and efficacy- JIS Z 2801: 2010 (E)-</i>	148
4.3. Ensayo para cuantificar desarrollo de biofilm de PAO1 en el producto final	150
5. Validación del diseño y desarrollo.....	150
6. Documentación de la fórmula patrón.....	150
7. Modificación de la fórmula.....	151
▣ Resultados.....	152
▣ Conclusiones del capítulo 7	161
▣ Bibliografía	162
CAPÍTULO 8 – Conclusiones finales –.....	164
ANEXO	167

Figuras

CAPÍTULO 1- Introducción -

Figura 1	4
Figura 2	5
Figura 3	6
Figura 4	9
Figura 5	10
Figura 6	11
Figura 7	11
Figura 8	12
Figura 9	13
Figura 10	14

CAPÍTULO 3- Nanopartículas de plata (NpsAg) -

Figura 1	25
Figura 2	26
Figura 3	28
Figura 4	29
Figura 5	31
Figura 6	37
Figura 7	38
Figura 8	39
Figura 9	39
Figura 10.....	40
Figura 11	40
Figura 12	41
Figura 13	42

Figura 14	43
Figura 15	44
Figura 16	45
Figura 17	46
Figura 18	47
Figura 19	47
Figura 20	48
CAPÍTULO 4- Partículas Core Shell -	
Figura 1	54
Figura 2	57
Figura 3	57
Figura 4	58
Figura 5	59
Figura 6	59
Figura 7	66
Figura 8	67
Figura 9	68
Figura 10	69
Figura 11	70
Figura 12	73
Figura 13	74
Figura 14	74
Figura 15	75
Figura 16	76
Figura 17	77
Figura 18	78
Figura 19	78
Figura 20	80
Figura 21	81
Figura 22	81
Figura 23	82
Figura 24	83
Figura 25	84
Figura 26	85
Figura 27	86
Figura 28	86
Figura 29	87
Figura 30	88
Figura 31	89
CAPÍTULO 5- Biofilms -	
Figura 1	96
Figura 2	103
Figura 3	104
Figura 4-A.....	107
Figura 4-B.....	107
Figura 5	112
Figura 6	115
Figura 7	115
Figura 8	116
Figura 9	117

Figura 10	117
Figura 11	119
Figura 12	120
Figura 13	121
Figura 14	123
Figura 15-A.....	125
Figura 15-B.....	125
Figura 16-A.....	126
Figura 16-B.....	126
CAPÍTULO 6- Nanotoxicidad-	
Figura 1	136
Figura 2	137
CAPÍTULO 7- Elaboración de producto -	
Figura 1	148
Figura 2	157
Figura 3	158
Figura 4	159
ANEXO	
Figura 1	167
Figura 2	167
Figura 3	167

Tablas

CAPÍTULO 3- Nanopartículas de plata (NpsAg) –

Tabla 1	39
Tabla 2	39
Tabla 3	40
Tabla 4	40
Tabla 5	42
Tabla 6	43
Tabla 7	44
Tabla 8	45
Tabla 9	46

CAPÍTULO 4- Partículas *Core Shell* -

Tabla 1	54
Tabla 2	64
Tabla 3	70
Tabla 4	71
Tabla 5	71
Tabla 6	75
Tabla 7	76
Tabla 8	77
Tabla 9	82
Tabla 10	83
Tabla 11.....	84
Tabla 12	87
Tabla 13.....	88
Tabla 14.....	89

Tabla 15.....	90
Tabla 16.....	90
CAPÍTULO 5- <i>Biofilms</i> -	
Tabla 1	99
Tabla 2	105
Tabla 3	111
Tabla 4	112
Tabla 5	113
Tabla 6	114
Tabla 7	125
Tabla 8	126
CAPÍTULO 6- Nanotoxicidad-	
Tabla 1	138
CAPÍTULO 7- Elaboración de producto -	
Tabla 1	146
Tabla 2	146
Tabla 3	147
Tabla 4	152
Tabla 5	153
Tabla 6	155
Tabla 7	156
Tabla 8	156
Tabla 9	157
Tabla 10	157

Abreviaturas

AHLS: acil-homoserin lactonas

AI: autoinductores

ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

ASTM: *American Society for Testing and Materials*

CBM: concentración bactericida mínima

CBMb: concentración bactericida mínima de *biofilms*

CIM: concentración inhibitoria mínima

CIMb: concentración inhibitoria mínima de *biofilms*

CS-2-A-AE: *Core Shell-2-A-Ácido Elágico*

CS-2-A-Q: *Core Shell-2-A-Quercetina*

CS-2-A-R: *Core Shell-2-A-Resveratrol*

CS-2-A: *Core Shell-2-A*

CS: *Core Shell*

CTAB: Bromuro de cetiltrimetilamonio

CV: cristal violeta

DLS: *dynamic light scattering*

DMEM: *Dulbecco's modified Eagles Medium*

DO: densidad óptica

ERO: especies reactivas de oxígeno

IACS: infecciones asociadas a los cuidados de salud

MET: microscopía electrónica de transmisión

MPTMS: 3-(mercaptopropil)-trimetoxisilano

NpsAg: nanopartículas de plata

PVP: Polivinilpirrolidona

QS: *Quorum sensing*

SEM: scattering electronic microscopy – microscopía electrónica de barrido-

SFB: suero fetal bovino

SPE: sustancias poliméricas extracelulares

TEOS: tetraetoxisilano

TSA: triptein soya agar – agar tripteína soja –

TSB: triptein soya broth – caldo tripteína soja –

UFC: unidades formadoras de colonias

Capítulo 1

Introducción

CAPÍTULO 1 – Introducción –

▣ Infecciones intrahospitalarias

Las infecciones intrahospitalarias o infecciones asociadas a los cuidados de salud (IACS), son adquiridas en el período donde el paciente transcurre en el nosocomio, siendo una afección que no estaba presente al momento de su admisión. Las IACS se encuentran entre los eventos adversos más comunes en cuidados de salud. La persona internada o sometida a una intervención quirúrgica, se encuentra susceptible y por lo tanto propensa a infectarse con algún microorganismo (bacterias, virus u hongos), siendo los microorganismos multi resistentes otra gran complicación que frecuentan y padecen los centros de salud.

Las IACS afectan tanto a hospitales públicos como privados, en todas partes del mundo y a todos los estratos sociales. Los porcentajes de pacientes hospitalizados que contraen una IACS se encuentran en 3,2% Estados Unidos (Magill et al., 2018) y 6,5% Unión Europea (Suetens et al., 2018). De los países en vías de desarrollo, sólo el 15,6% cuentan con sistemas de vigilancia a nivel nacional o regional (Allegranzi et al., 2011). En Argentina se estima que las IACS incrementan los días de internación en 6,4 días, con una mortalidad atribuible de 11,5%, representando a nivel nacional, 1.600.000 días extras de internación y 29.000 muertes con un costo de \$3.200 millones de pesos por año (Rosenthal et al., 2018). En el año 2005, en nuestro país se inició **el Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Hospitalarias de la República Argentina (VIHDA)** que brinda reportes anuales vinculados a la vigilancia de las infecciones asociadas a dispositivos en Unidades de Cuidados Intensivos, como así también de sitios quirúrgicos. Es por esto que resulta de suma importancia que los protocolos de limpieza y desinfección se encuentren correctamente validados en los centros de salud. Una incorrecta limpieza de superficies o de instrumental favorece la presencia de materia orgánica, la cual puede actuar de protección para los microorganismos ante la aplicación del producto desinfectante. Ello estaría favoreciendo que los microorganismos se desarrollen en comunidad, es decir, como *biofilms*, siendo esta problemática aún más difícil de erradicar. Existen guías internacionales (<https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/>) donde se plasman las directrices que permitirían llevar a cabo, de modo seguro, procesos de limpieza y desinfección de centros de salud, teniendo en cuenta la relevancia de cada sector, es decir, diferenciando zonas críticas de semi críticas. Si nos centramos en los procesos de desinfección, ya sea de superficies como de instrumental, un punto crítico sería la concentración y tiempos de uso de los desinfectantes. Utilizar concentraciones subletales de producto o permitir tiempos de contacto inferiores al recomendado por el fabricante, podría favorecer la persistencia de los microorganismos sobre las superficies (Luden et al., 2003).

▣ *Biofilms*

La formación de *biofilms* microbianos en dispositivos médicos (Djeribi et al., 2012), instrumental quirúrgico reutilizable y superficies (Alfa, 2019), es una problemática común y generalizada de los centros de salud.

El desarrollo de microorganismos en *biofilms* favorece a que los mismos adquieran genes de resistencia a antibióticos por transferencia horizontal de genes, tal información puede quedar en la bacteria como plásmido o integrarse al genoma de la misma. También encontramos presencia de microorganismos persistentes, los cuales sobreviven ante eventuales tratamientos, y presentes en *biofilms* son más difíciles de erradicar. Todo ello conlleva a que estas comunidades sean miles de veces más tolerantes a antibióticos o agentes antimicrobianos, convirtiéndolos en grandes amenazas para este sector.

Por definición, los *biofilms* microbianos son comunidades de células en estado sésil, caracterizadas por estar irreversiblemente adheridas entre sí y/o a un sustrato o interfaces, se encuentran embebidos en una matriz de sustancia polimérica extracelular que ellos mismos producen, y exhiben un alterado fenotipo respecto a la tasa de desarrollo y transcripción genética (Donlan & Costerton, 2002).

La formación de *biofilms* ocurre en diferentes etapas (**Figura 1**):

1. Bacterias en estado planctónico en contacto con una superficie logran adherirse irreversiblemente.
2. Una vez en la superficie comienzan a producir sustancias poliméricas extracelulares (SPE).
3. Acto seguido la comunidad comienza a desarrollar una estructura tridimensional.
4. Finalmente, una parte de los microorganismos se desprenden del *biofilm*, pudiendo colonizar otras superficies.

Etapas del desarrollo de *biofilms*

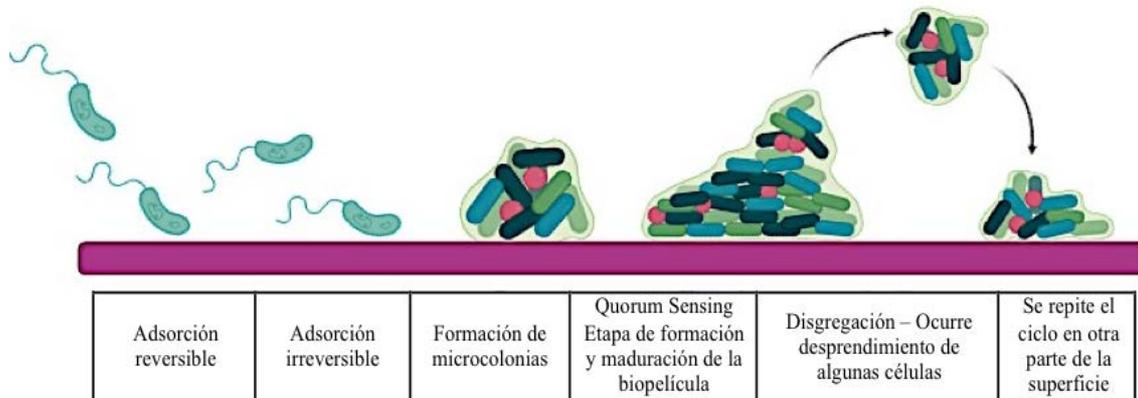


Figura 1: Esquema de las diferentes etapas involucradas en la formación de *biofilms*.

Adhesión:

En esta primera etapa las bacterias se encuentran en estado planctónico, es decir que las mismas se encuentran libres y movilizándose en un medio líquido. Para que la bacteria se adhiera a una superficie, deberá existir una “película acondicionante” que facilite su adhesión irreversible. La película condicionante está formada por componentes como proteínas, restos celulares, polisacáridos, etc., adsorbidos sobre la superficie donde se irán a formar las primeras micro-colonias.

Durante la adhesión, los microorganismos en estado planctónico deben vencer dos fuerzas para lograr adherirse a la superficie (**Figura 2**): 1) Fuerzas de *Van der Waals*, actúan a cortas distancias; 2) Fuerzas electrostáticas, en bacterias la carga neta es negativa, actúan a distancias de 10 a 20 nm; 3) Interacciones específicas, a través de *pilis*, flagelos y adhesinas, a cortas distancias (1-5 nm). A su vez, a estas distancias la turbulencia disminuye, haciendo más probable las interacciones con la superficie.

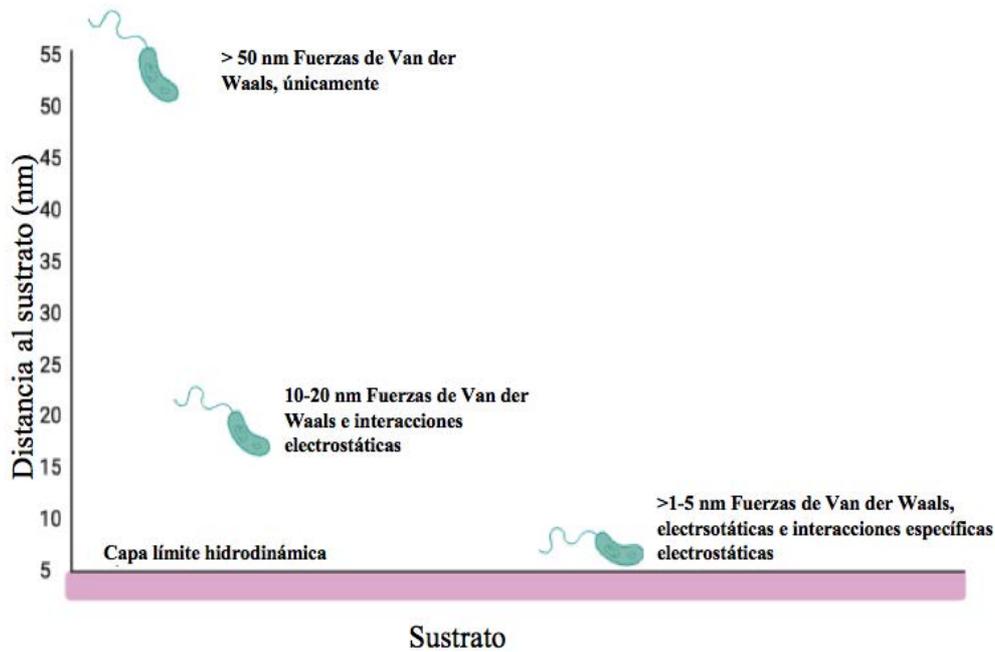


Figura 2: Fuerzas involucradas en la adhesión de microorganismos a un sustrato.

La interacción inicial de las bacterias a la superficie puede darse por:

Twitching motility: es un movimiento de locomoción a través del cual algunas bacterias logran movilizarse (Kalidasan & Neela, 2020). Para ello utilizan un *pilus (tipo IV)* que una vez en contacto con la superficie, contraen y logran movilizarse hacia adelante.

Spinning: el movimiento se da a través de la rotación de su flagelo. Cuando el microorganismo se adhiere a la superficie, el flagelo queda fijo mientras su motor flagelar sigue rotando.

Contacto azaroso con la superficie: los microorganismos avanzan con la corriente de líquido, contactando con la superficie de modo esporádico y reversible.

▣ *Quorum sensing (QS)*

Las bacterias pueden comunicarse entre ellas a través de un proceso que se ha dado a llamar *Quorum sensing* (Hawver et al., 2016) y lo hacen utilizando señales moleculares o autoinductores (AI) que a determinadas concentraciones son reconocidos por los receptores de las bacterias involucradas, que pueden ser de la misma especie o inter especie, pudiendo de este modo responder con la expresión de determinados genes que podrían dar como resultado formación o dispersión del *biofilm*, producción de factores de virulencia, bioluminiscencia, etc.

Las bacterias Gram positivas utilizan pequeños péptidos para comunicarse entre ellas, mientras que las bacterias Gram negativas se comunican a través moléculas llamadas acil-homoserin lactonas (AHLs), producidas por AHL sintetasas de tipo *LuxI* utilizando precursores de AHLs.

Cuando la molécula señal se acumula en el medio extracelular y se llega a una concentración de saturación, ingresa a las bacterias. En Gram negativas ingresa por difusión a través de la membrana celular y en Gram positivas lo hace uniéndose a un receptor quinasa. Una vez en el interior se conjuga con genes reguladores de la transcripción específicos, que a su vez promueven la expresión de genes diana (**Figura 3**).

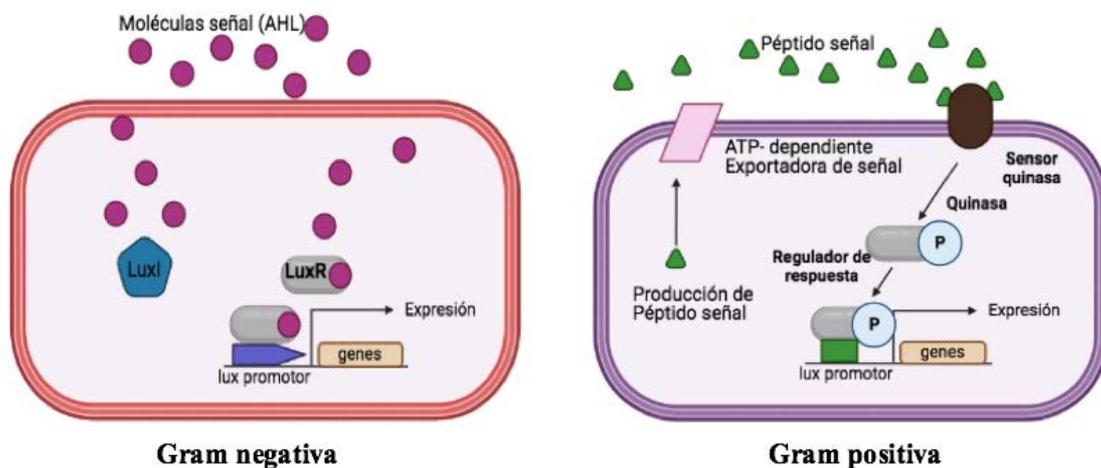


Figura 3: Esquema del proceso de Quorum sensing en bacterias Gram positivas y negativas.

Un ejemplo muy conocido de Sistema de señalización por QS es el de bioluminiscencia en bacterias *Vibrio fischeri* y *Vibrio harveyi* siendo controlado por homólogos de proteínas reguladoras LuxI y LuxR (Engebrecht et al., 1983; Miyashiro & Ruby, 2012; Waters & Bassler, 2006).

▣ Factores de Virulencia y QS en *P. aeruginosa*

Las moléculas señales involucradas en el mecanismo de *quorum sensing*, pueden inducir la expresión de factores de virulencia que podrían tener implicancias severas sobre su hospedador.

Pseudomonas aeruginosa (Kievit et al., 2001) es una cepa ejemplo respecto a las infecciones intrahospitalarias, dentro de los factores de virulencia podemos mencionar piocianina, pioverdina motilidad mediada por *swarming* y formación de *biofilms*, los cuales lo vuelven un microorganismo peligroso si logra colonizar tejidos, siendo muy complejo de combatir con antibióticos, aún de amplio espectro (Wagner et al., 2016).

▣ Modos de inhibir el *Quorum Sensing* (QS)

Un método para inhibir la comunicación célula-célula en bacterias Gram negativas, puede ser a través del sistema denominado como *Quorum Quenching* (Brackman & Coenye, 2014) y este mecanismo se puede llevar a cabo de diferentes modos.

Uno de ellos puede ser por **degradación enzimática**, es decir que enzimas atacan a la molécula señal y por ende las mismas no se acumulen en el medio extracelular, impidiendo la comunicación. Algunas enzimas que ejercen este efecto son: AHL lactonasas y AHL acilasas, presentes en plantas o en organismos eucariotas.

Otro mecanismo de inhibición podría ser a través de **compuestos análogos a las moléculas AHLs**. Por lo tanto, el compuesto se uniría a receptores o reguladores, pero no activaría la cascada de transducción de genes involucrados en la formación de *biofilms* o factores de virulencia, entre otros.

▣ Tratamientos alternativos a los antibióticos

Como se mencionó anteriormente, la presencia de microorganismos multi resistentes en ambientes hospitalarios ha incrementado velozmente. Las causas pueden ser varias, entre ellas: **i)** consumo indiscriminado e indebido de antibióticos; **ii)** transferencia horizontal de material genético favorecidos aún más cuando se encuentran formando parte de un *biofilm*; **iii)** mutaciones azarosas del genoma microbiano que le podrían conferir ventajas adaptativas, entre otras. Por estas razones, la ciencia ha puesto foco en encontrar alternativas para hacer frente a esta problemática, ya sea pensando en utilizar los antibióticos vigentes de manera cíclica (Bergstrom et al. 2004), o por el uso de compuestos naturales, como también probando nuevos principios activos basados en la nanotecnología.

Dentro de los compuestos extraídos de la naturaleza los más extensivamente estudiados apuntan al control de *biofilms* interfiriendo con el QS (Brackman & Coenye, 2014) por ser análogos estructurales de las moléculas señales o actuar como inhibidores, ya sea por su degradación o unión a los mismos. Estos mecanismos son promisorios tratamientos frente a enfermedades debido a la baja toxicidad que podría enfrentar el hospedador que los consume.

De los compuestos bioactivos obtenidos por medios naturales y probados para este fin podemos mencionar polifenoles (Huber et al., 2003) como ácido gálico, ácido tánico, ácido elágico, resveratrol, etc (He et al., 2016).

Dentro de los polifenoles, los flavonoides han demostrado ser inhibidores de microorganismos como por ejemplo *P. aeruginosa* (Quecan et al., 2019), inhibiendo específicamente el QS por vía antagonista uniéndose a receptores *LasR* (Gopu et al., 2015) y *RhlR* (Paczkowski et al., 2017) a su vez ello genera inhibición de factores de virulencia (Gopu et al., 2015), poniendo a estos compuestos como *targets* interesantes para tratar infecciones en humanos. Dentro de la familia de los flavonoides, quercetina ha

demostrado inhibición en QS y factores de virulencia sobre *Candida albicans* (Singh et al., 2015).

▣ Nanotecnología – Definiciones e Historia -

La nanotecnología es la ciencia que estudia la materia en la escala nanométrica. El nanómetro es una unidad de medida que equivale a una mil millonésima parte de 1 metro, es decir que 1 nm equivale a 10^{-9} m. Por su lado la ASTM (*American Society for Testing and Materials*) la define como, “campo que mide, manipula o incorpora materiales con una o varias de sus dimensiones comprendidas entre 1 a 100 nm (ASTM, 2008).”

Si nos remontamos en la historia, allá por 1959, el premio Nobel de Física Richard P. Feynman, presentó una charla llamada “*There is plenty of room at the bottom*” en la que hacía referencia a los ensayos que se empezaban a realizar en los laboratorios utilizándose materia cada vez más minúscula, donde deriva que se podían extender hasta el límite atómico (Feynman R., n.d.). Por otra parte, en 1974, se adjudica a Norio Taniguchi haber sido el primer científico que utilizó el término “nanotecnología” para hacer referencia a la escala de tamaño. En el año 1981, al mismo tiempo en el que IBM crea el microscopio de efecto túnel, el científico Eric Drexler, del MIT (*Massachusetts Institute of Technology*), publica “*Engines of the creation*” haciendo referencia a la creación de nuevos dispositivos imitando mecanismos existentes en la naturaleza. En 1985, Harold Kroto, Richard E, Smalley y Robert F, Curl, de la Universidad de Rice, descubren el C_{60} , que estructuralmente tenía forma de pelota de fútbol (*fulerenos*), recibiendo por este descubrimiento el premio Nobel de química en 1996. Cinco años después, en 1991, surgen los nanotubos de carbono. Desde allí a la fecha se evidencian grandes avances referidos a productos nanotecnológicos, quedando aún mucho por responder y analizar en cuanto a regulaciones, nanotoxicidad, entre otras cosas.

▣ Control de infecciones utilizando nanotecnología

Entre las aplicaciones encontradas para los sistemas particulados, una de las que podemos mencionar es el transporte de agentes terapéuticos (*drug delivery*), pudiéndose efectuar por internalización de la molécula en las partículas (Borges et al., 2020), o sobre sus superficies actuando de soporte inerte (Zhou et al., 2009) (**Figura 4**).

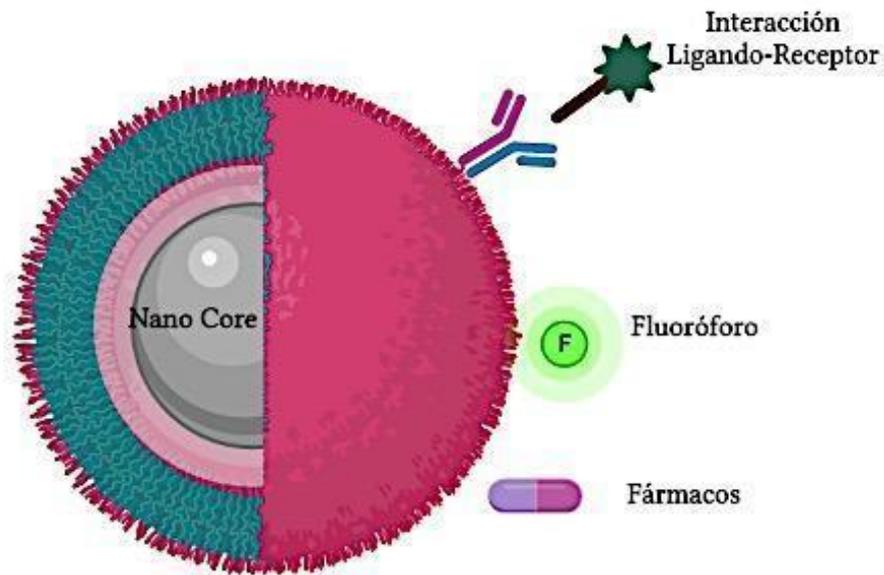


Figura 4: Esquema de la estructura de nanopartículas y sus potencialidades para unir diferentes moléculas.

El espectro de acción de las nanopartículas como agentes antimicrobianos es muy amplio, siendo potencialmente activas frente a microorganismos multirresistentes (Panáček et al., 2016).

Los mecanismos por los cuales las nanopartículas de plata (NpsAg) ejercería su acción antimicrobiana son: *i*) daños sobre el ADN cromosomal y mitocondrial (Morones et al., 2005); *ii*) especies reactivas de oxígeno (ERO) (Kim et al., 2007); *iii*) daño de la membrana citoplasmática (Pal et al., 2007); (Sondi & Salopek-Sondi, 2004). A su vez, al no tener un sitio de acción definido resulta más complicado para el microorganismo evadirlas. Las nanopartículas deben su propiedad como antimicrobianas a la solubilidad en medios acuosos, a su tamaño y a la liberación controlada de iones (Yamanaka et al., 2005); (Raghunath & Perumal, 2017); (Feng et al., 2000).

A su vez, se han realizado trabajos donde demuestran que la administración de nanopartículas de plata sintetizadas con extractos naturales a concentraciones subletales inhiben factores de virulencia controlados por *Quorum Sensing* (QS) en bacterias Gram negativas (Ali et al., 2017), por supresión de la vía de producción de AHL en concentraciones no tóxicas para el microorganismo en cuestión.

El uso de partículas de tamaño nanométrico suele ser muy versátil, como por ejemplo para terapias de contraste, biosensores, vehiculización de fármacos entre otros. Este hecho se debe a la posibilidad de obtener nanopartículas con diferentes morfologías, incluyendo sólidas, porosas, huecas, núcleo-cápsula (*Core Shell*) y a su vez en todas ellas pueden realizarse modificaciones químicas para unir ligandos, fluoróforos o fármacos.

▣ Vías de obtención de nanopartículas

Los materiales nanométricos pueden obtenerse por las técnicas de: 1) *top-down* (de arriba hacia abajo), es decir, partiendo de estructuras de mayor tamaño y mediante tratamientos ya sea físicos o químicos se lograrían obtener compuestos de tamaño nanométrico y 2) *bottom-up* (de abajo hacia arriba), aquí se parten moléculas y átomos que por diferentes reacciones o ensamblado permiten obtener estructuras de tamaño nanométrico (**Figura 5**).

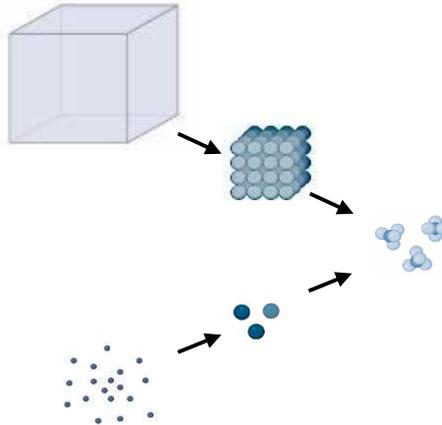


Figura 5: Representación de las vías de obtención de nanopartículas

▣ Nanopartículas metálicas

Las nanopartículas metálicas, obtenidas por el método *bottom-up*, pueden sintetizarse a partir de la reducción de un metal que puede estar formando parte de un ácido o una sal. La reacción puede ocurrir en medio acuoso o alcohólico, utilizándose o no un agente estabilizante. La reducción del metal se visualiza con un cambio persistente en las propiedades ópticas de la solución, siendo muy característico dependiendo del metal, su tamaño y forma. A su vez, sus propiedades fisicoquímicas y por lo tanto futuras aplicaciones, varían según la forma que hayamos obtenido durante la síntesis (Li et al., 2014). En todos los casos, el tamaño, forma y distribución, dependen de los parámetros de la reacción (pH, temperatura, precursores, tiempos de agregado de reactivo y de la duración del proceso de síntesis, etc) pudiendo controlarlos externamente.

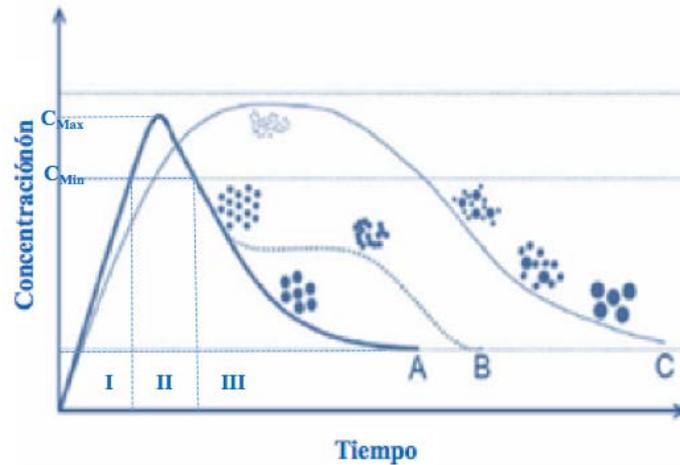


Figura 6: Etapas del proceso de obtención de nanopartículas

La obtención de las nanopartículas se basa en reacciones de precipitación, iniciándose con el proceso de nucleación, donde los átomos o moléculas se reúnen para formar un sólido, este proceso es controlado termodinámicamente. En la **figura 6** se muestran como los núcleos se pueden formar por diferentes rutas A, B o C, dependiendo de las condiciones de crecimiento. La ruta A es la clásica ruta propuesta por *LaMer*, donde se propone que para la obtención de sólidos monodispersos es necesario que el proceso pase por tres etapas. Etapa I, etapa de inducción, donde el aumento en la concentración de átomos o moléculas alcanzan la sobresaturación y posteriormente un valor denominado concentración mínima de nucleación. Etapa II, nucleación, donde se producen los primeros núcleos sólidos. Etapa III, crecimiento, donde los núcleos crecen por adición de especies solubles en la superficie de los mismos. Variar algunas condiciones de trabajo podrían resultar en la aparición de núcleos sucesivos, obteniéndose sistemas heterogéneos (curvas B y C). Un modo de evitar obtener sistemas heterogéneos por agregación de las partículas, es adicionar un agente estabilizante, por ejemplo, un polímero sintético o de origen natural, que al adsorberse en la superficie de las partículas evitarían su interacción por impedimento estérico (**Figura 7**).

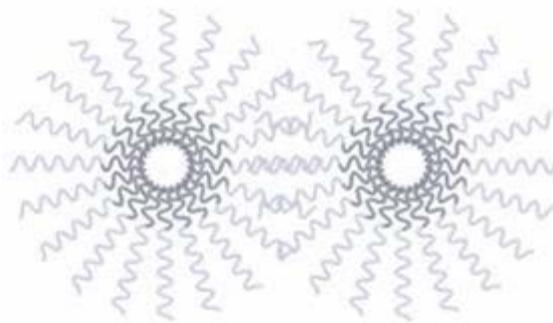


Figura 7: Estabilización de nanopartículas por impedimento estérico.

La particularidad de la materia en la escala nanométrica radica en que sus propiedades fisicoquímicas cambian respecto al material en *bulk* (Heiligttag & Niederberger, 2013). Esta situación resulta interesante debido a que, dependiendo del tamaño, forma e interacciones entre ellos, podemos decidir obtener materiales con propiedades únicas. Por ejemplo, el *bulk* del metal plata es grisáceo, si disolvemos la sal de plata en agua la solución es incolora y translúcida, al reducir la misma a nanopartículas de plata esféricas, el color rondará en los tonos amarillos (**Figura 8**) y si realizamos un barrido espectral en el UV-Visible, veremos un máximo de absorción en el rango de [400-450] nm. Ello se debe a que las partículas pequeñas, exhiben resonancia de plasmón superficial localizada (Cruz et al., 2012.).



Figura 8: Nanopartículas de plata de diferentes tamaños y grados de agregación. Su tamaño decrece de izquierda a derecha. Los coloides se sintetizaron en el laboratorio.

▣ Nanopartículas obtenidas por el método Sol-Gel

Es un método que se utiliza desde 1845 siendo M. Ebelmen quien realizó la primera publicación (Livage et al., 1994), en donde obtenía un material incoloro como resultado de la hidrólisis de un éster de ácido silícico. A su vez, esta metodología ya se venía utilizando en la industria como una alternativa para preparar vidrios y cerámicas a temperaturas considerablemente bajas.

Las síntesis con el método Sol-Gel involucran dos componentes, como su nombre lo indica. Si los analizamos por separado diríamos que los “soles” son partículas sólidas en un líquido y los geles son estructuras continuas polimerizadas que contienen líquido. Entonces, el proceso Sol-Gel involucra la formación de “soles” en un líquido que luego se conectarán formando una red, y al evaporarse el líquido se podrá obtener polvos, películas delgadas o sólidos monolíticos (**Figura 9**).

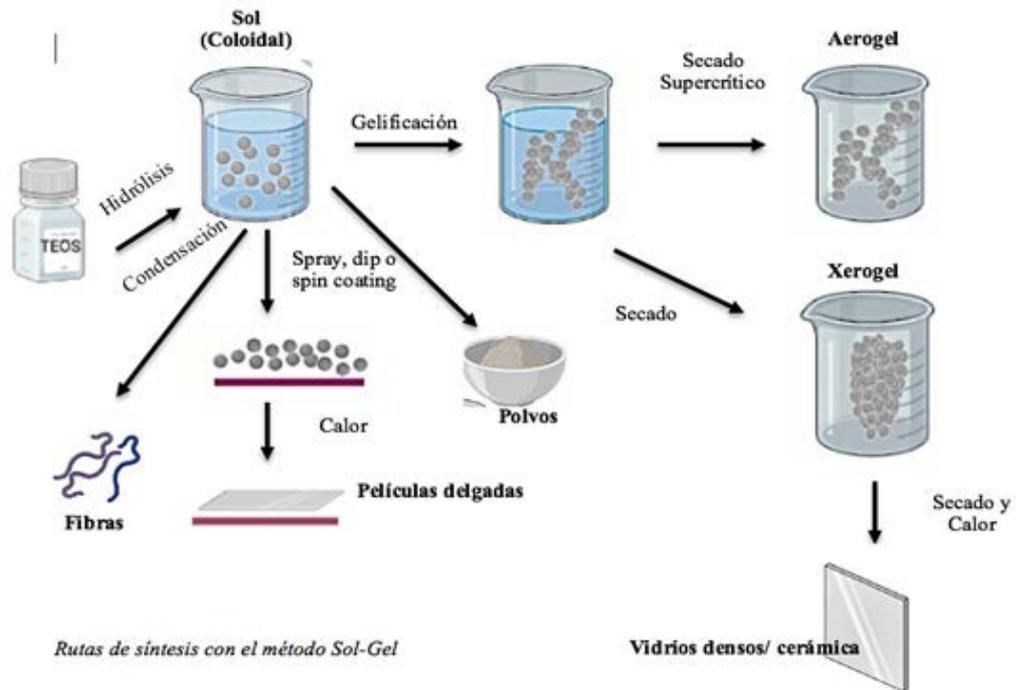
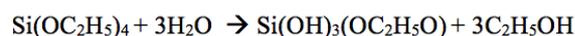
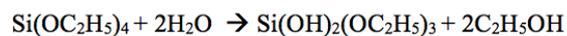


Figura 9: Rutas de síntesis de partículas sólidas utilizando el método Sol-Gel.

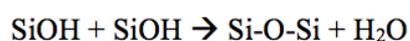
La ruta de síntesis parte de la hidrólisis de los precursores y posterior condensación, seguida de una policondensación (muchas unidades hidrolizadas unidas), gelación y secado.

Los precursores que se utilicen deberán tener la capacidad de formar geles, dentro de los que se utilizan podemos encontrar: 1) alcóxidos $M(\text{ROH})_n$ ($M = \text{Cación}$ (Ej.: Al, Si); $R = \text{Alcohol}$ (Ej.: metanol, etanol)); 2) sales metálicas MX ($M = \text{Cación}$ (Ej.: Cd^{+2}); $X = \text{anión}$ (Ej.: Cl)).

Un alcóxido muy utilizado es el tetraetilortosilicato (TEOS) $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$. Para iniciar la reacción de condensación se pone en contacto al TEOS con agua y entonces ocurrirá la hidrólisis del mismo, siendo las reacciones las siguientes:



Policondensación: Los grupos silanoles (SiOH) reaccionan entre sí formando un grupo siloxano (Si-O-Si) en sus tres dimensiones.



Los soles se forman al ocurrir interconexiones entre los grupos silanoles, comportándose como partículas coloidales.

Los geles se forman cuando los soles comienzan a formar redes tridimensionales por condensación, luego ocurre un proceso de sinéresis en el que se expulsa el líquido de la estructura que se está formando. Finalmente, la viscosidad comienza a aumentar y se forma un sólido que adopta la forma del molde que lo contiene.

▣ Nanopartículas *Core Shell*

Las nanopartículas *Core Shell*, como su nombre lo indica, se componen de un *Core* (núcleo) y un *Shell* (coraza o envoltura) (**Figura 10**), ambos deben ser de materiales distintos y por lo tanto las propiedades fisicoquímicas de las mismas difiere respecto de las propiedades de cada material por separado. Su síntesis suele ser muy sensible a las variaciones en temperatura, concentración de reactivos, agitación, etc. y requiere de un elevado control que nos asegurará la formación de las partículas. Si la reacción no se controla apropiadamente podrían resultar partículas con los *core* agregados o partículas vacías, es decir con sus núcleos separados del *shell*, o bien *shell* incompletos.

Dentro de los métodos de síntesis podemos encontrar, precipitación, polimerización, micro emulsión, condensación Sol-Gel de micelas reversas, etc.

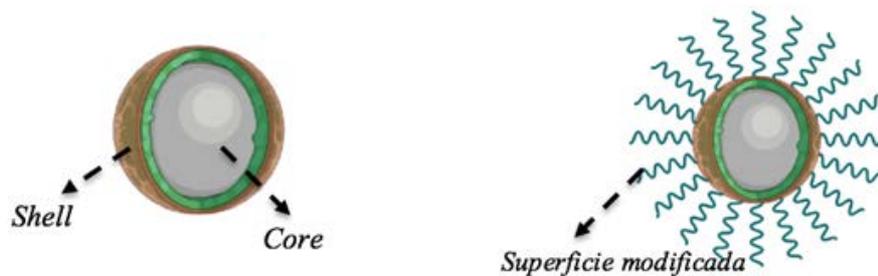


Figura 10: Representación de partículas *Core Shell*

Las partículas pueden sintetizarse con prácticamente todos los materiales, como semiconductores, metales, etc.

La razón por la que se elige trabajar con estos sistemas suele ser para proveer estabilidad a los coloides, disminuir su toxicidad, proveer de propiedades luminiscentes, *drug delivery*, etc.

▣ **Nanotoxicidad**

Los desarrollos nanotecnológicos han tenido un avance importante en las últimas décadas. Si bien ello ha permitido la obtención de nuevos materiales, tecnologías y aplicaciones en el sector sanitario, ha de ser muy importante estudiar responsablemente su impacto tóxico en humanos, animales y sobre el medio ambiente.

El gran problema con la nanotecnología reside en el pequeño tamaño de las partículas, permitiendo un aumento de la absorción e interacción con células o tejidos. Debido a su pequeño tamaño logran viajar por el torrente sanguíneo y depositarse en distintos órganos del cuerpo, siendo el hígado (Dziendzikowska et al., 2012) el órgano donde más se ha observado acumulación de las mismas. Mientras que las vías de eliminación más comunes son a través de heces y orina. Se ha demostrado que la toxicidad de las nanopartículas no sólo depende de su tamaño (Cho et al., 2018); (Souza et al., 2016), sino que también de las propiedades del agente estabilizante que las rodea. En el trabajo realizado por (Nallanthighal et al., 2017) se observó que para NpsAg de tamaño medio 20 nm cuando se encuentran recubiertas con polivinilpirrolidona resultan menos genotóxicas que las recubiertas con citrato. Siguiendo por la línea de las NpsAg, hemos encontrado reportes donde informan que la citotoxicidad ejercida por las mismas es mayor para células cancerosas respecto a las ocasionadas para células normales (Guo et al., 2013); (Arora et al., 2015); (Mohammadi et al., 2020), pudiendo ser ello una característica ventajosa frente a nuevas terapias oncológicas.

Por otro lado, las nanopartículas de sílice son ampliamente utilizadas en la industria alimenticia, cosmética y biomédica (Mebert et al., 2017). Las mismas se utilizan como un aditivo en alimentos, siendo aprobadas por la Unión Europea bajo el código E551. En el sector cosmético se utilizan ampliamente en la elaboración de productos para el pelo, uñas, piel, etc. Algunos protectores solares contienen nanopartículas de sílice para proveer protección a la radiación UV.

▣ **Bibliografía**

- Alfa, M. J. (2019). Biofilms on instruments and environmental surfaces: Do they interfere with instrument reprocessing and surface disinfection? Review of the literature. In *American Journal of Infection Control* (Vol. 47, pp. A39–A45). Mosby Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2019.02.027>
- Ali, S. G., Ansari, M. A., Khan, H. M., Jalal, M., Mahdi, A. A., & Cameotra, S. S. (2017). Crataeva nurvala nanoparticles inhibit virulence factors and biofilm formation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Basic Microbiology*, 57(3), 193–203. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600175>
- Allegranzi, B., Nejad, S. B., Combescure, C., Graafmans, W., Attar, H., Donaldson, L., & Pittet, D. (2011). Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, 377(9761), 228–241. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61458-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61458-4)
- Arora, S., Tyagi, N., Bhardwaj, A., Rusu, L., Palanki, R., Vig, K., Singh, S. R., Singh, A. P., Palanki, S., Miller, M. E., Carter, J. E., & Singh, S. (2015). Silver nanoparticles protect human keratinocytes against UVB radiation-induced DNA damage and apoptosis: potential for prevention of skin carcinogenesis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11(5), 1265–1275. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.02.024>
- Bergstrom CT, Lo M, Lipsitch M (2004) Ecological theory suggests that antimicrobial cycling will not reduce antimicrobial resistance in hospitals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13285–13290. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402298101>
- Borges, A., de Freitas, V., Mateus, N., Fernandes, I., & Oliveira, J. (2020). Solid lipid nanoparticles as carriers of natural phenolic compounds. In *Antioxidants* (Vol. 9, Issue 10, pp. 1–24). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox9100998>
- Brackman, G., & Coenye, T. (2014). Quorum Sensing Inhibitors as Anti-Biofilm Agents. *Current Pharmaceutical Design*, 21(1), 5–11. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140905114627>
- de Kievit, T. R., Gillis, R., Marx, S., Brown, C., & Iglewski, B. H. (2001). Quorum-Sensing Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Their Role and Expression Patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1865–1873. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1865-1873.2001>
- Cho, Y.-M., Mizuta, Y., Akagi, J., Toyoda, T., Sone, M., & Ogawa, K. (2018). Size-dependent acute toxicity of silver nanoparticles in mice. *Journal of Toxicologic Pathology*, 31(1), 73–80. <https://doi.org/10.1293/tox.2017-0043>
- Cruz, D. A., Rodríguez, M. C., López, J. M., Herrera, V. M., Orive, A. G., & Creus, A. H. (2012). Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda. *Metallic nanoparticles and Surface plasmons: a Deep relationship*. http://www.exeedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/

- Djeribi, R., Bouchloukh, W., Jouenne, T., & Mena, B. (2012). Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters. *American Journal of Infection Control*, 40(9), 854–859. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2011.10.009>
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
- Dziendzikowska, K., Gromadzka-Ostrowska, J., Lankoff, A., Oczkowski, M., Krawczyńska, A., Chwastowska, J., Sadowska-Bratek, M., Chajduk, E., Wojewódzka, M., Dušínská, M., & Kruszewski, M. (2012). Time-dependent biodistribution and excretion of silver nanoparticles in male Wistar rats. *Journal of Applied Toxicology*, 32(11), 920–928. <https://doi.org/10.1002/jat.2758>
- Engelbrecht, J., Nealson, K., & Silverman+, M. (1983). Bacterial Bioluminescence: Isolation and Genetic Analysis of Functions from *Vibrio fischeri*. In *Cell* (Vol. 32).
- Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., & Kim, J. O. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52(4), 662–668. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20001215\)52:4<662::AID-JBM10>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20001215)52:4<662::AID-JBM10>3.0.CO;2-3)
- Feynman R. (n.d.). *Lecture at the California Institute of Technology; 1959. December 29.*
- Gopu, V., Meena, C. K., & Shetty, P. H. (2015). Quercetin influences quorum sensing in food borne bacteria: In-vitro and in-silico evidence. *PLoS ONE*, 10(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134684>
- Guo, D., Zhu, L., Huang, Z., Zhou, H., Ge, Y., Ma, W., Wu, J., Zhang, X., Zhou, X., Zhang, Y., Zhao, Y., & Gu, N. (2013). Anti-leukemia activity of PVP-coated silver nanoparticles via generation of reactive oxygen species and release of silver ions. *Biomaterials*, 34(32), 7884–7894. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.015>
- Hawver, L. A., Jung, S. A., & Ng, W. L. (2016). Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 40, Issue 5, pp. 738–752). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw014>
- He, Z., Huang, Z., Zhou, W., Tang, Z., Ma, R., & Liang, J. (2016). Anti-biofilm activities from resveratrol against: *Fusobacterium nucleatum*. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUL). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01065>
- Heiligtag, F. J., & Niederberger, M. (2013). The fascinating world of nanoparticle research. *Materials Today*, 16(7–8), 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.07.004>
- Huber, B., Eberl, L., Feucht, W., & Polster, J. (2003). Influence of Polyphenols on Bacterial Biofilm Formation and Quorum-sensing. In *Z. Naturforsch* (Vol. 58). <http://www.znaturforsch.com>
- Kalidasan, V., & Neela, V. K. (2020). Twitching motility of *Stenotrophomonas maltophilia* under iron limitation: In-silico, phenotypic and proteomic approaches. *Virulence*, 11(1), 104–112. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1713649>
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J.-H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, Y. K., Park, Y. H., Hwang, C.-Y., Kim, Y.-K., Lee, Y.-S., Jeong, D. H., & Cho, M.-H. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*:

- Nanotechnology, Biology and Medicine, 3(1), 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>
- Li, N., Zhao, P., & Astruc, D. (2014). Anisotropic Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties, Applications, and Toxicity. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(7), 1756–1789. <https://doi.org/10.1002/anie.201300441>
- Livage, J., Babonneau, F., & Sanchez, C. (1994). Sol-Gel Chemistry for Optical Materials. In *Sol-Gel Optics* (pp. 39–58). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2750-3_2
- Lunden, J., Autio, T., Markkula, A., Hellstrom, S., Korkeala, H. 2003. Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology* 82, 265-272. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00312-4](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00312-4)
- Magill, S. S., O’Leary, E., Janelle, S. J., Thompson, D. L., Dumyati, G., Nadle, J., Wilson, L. E., Kainer, M. A., Lynfield, R., Greissman, S., Ray, S. M., Beldavs, Z., Gross, C., Bamberg, W., Sievers, M., Concannon, C., Buhr, N., Warnke, L., Maloney, M., ... Edwards, J. R. (2018). Changes in Prevalence of Health Care–Associated Infections in U.S. Hospitals. *New England Journal of Medicine*, 379(18), 1732–1744. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1801550>
- Mebert, A. M., Baglolle, C. J., Desimone, M. F., & Maysinger, D. (2017). Nanoengineered silica: Properties, applications and toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 753–770. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.054>
- Miyashiro, T., & Ruby, E. G. (2012). Shedding light on bioluminescence regulation in *Vibrio fischeri*. In *Molecular Microbiology* (Vol. 84, Issue 5, pp. 795–806). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08065.x>
- Mohammadi, G., Zangeneh, M. M., Zangeneh, A., & Haghghi, Z. M. S. (2020). Chemical characterization and anti-breast cancer effects of silver nanoparticles using Phoenix dactylifera seed ethanolic extract on 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary gland carcinogenesis in Sprague Dawley male rats. *Applied Organometallic Chemistry*, 34(1). <https://doi.org/10.1002/aoc.5136>
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346–2353. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>
- Nallanthighal, S., Chan, C., Bharali, D. J., Mousa, S. A., Vásquez, E., & Reliene, R. (2017). Particle coatings but not silver ions mediate genotoxicity of ingested silver nanoparticles in a mouse model. *NanoImpact*, 5, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.01.003>
- Paczkowski, J. E., Mukherjee, S., McCreedy, A. R., Cong, J. P., Aquino, C. J., Kim, H., Henke, B. R., Smith, C. D., & Bassler, B. L. (2017). Flavonoids suppress *Pseudomonas aeruginosa* virulence through allosteric inhibition of quorum-sensing Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 292(10), 4064–4076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.770552>
- Pal, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (2007). Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1712–1720. <https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06>

- Panáček, A., Smékalová, M., Večeřová, R., Bogdanová, K., Röderová, M., Kolář, M., Kiliánová, M., Hradilová, Š., Froning, J. P., Havrdová, M., Pucek, R., Zbořil, R., & Kvítek, L. (2016). Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant Enterobacteriaceae. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 142, 392–399. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.03.007>
- Quecan, B. X. V., Santos, J. T. C., Rivera, M. L. C., Hassimotto, N. M. A., Almeida, F. A., & Pinto, U. M. (2019). Effect of quercetin rich onion extracts on bacterial quorum sensing. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00867>
- Raghunath, A., & Perumal, E. (2017). Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(2), 137–152. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.11.011>
- Rosenthal, V. D., Desse, J., Maurizi, D. M., Chaparro, G. J., Orellano, P. W., Chediack, V., Cabrera, R., Golschmid, D., Silva, C. G., Vimercati, J. C., Stagnaro, J. P., Perez, I., Spadaro, M. L., Montanini, A. M., Pedersen, D., Paniccia, T. L., Ríos Aguilera, A. M., Cermesoni, R., Mele, J. I., ... Oyola, C. (2018). Impact of the International Nosocomial Infection Control Consortium's multidimensional approach on rates of ventilator-associated pneumonia in 14 intensive care units in 11 hospitals of 5 cities within Argentina. *American Journal of Infection Control*, 46(6), 674–679. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2017.11.021>
- Singh, B. N., Upreti, D. K., Singh, B. R., Pandey, G., Verma, S., Roy, S., Naqvi, A. H., & Rawat, A. K. S. (2015). Quercetin sensitizes fluconazole-resistant *Candida albicans* to induce apoptotic cell death by modulating quorum sensing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(4), 2153–2168. <https://doi.org/10.1128/AAC.03599-14>
- Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275(1), 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012>
- Souza, T. A. J., Franchi, L. P., Rosa, L. R., da Veiga, M. A. M. S., & Takahashi, C. S. (2016). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles of different sizes in CHO-K1 and CHO-XRS5 cell lines. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 795, 70–83. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.11.002>
- Suetens, C., Latour, K., Kärki, T., Ricchizzi, E., Kinross, P., Moro, M. L., Jans, B., Hopkins, S., Hansen, S., Lyytikäinen, O., Reilly, J., Deptula, A., Zingg, W., Plachouras, D., & Monnet, D. L. (2018). Prevalence of healthcare-associated infections, estimated incidence and composite antimicrobial resistance index in acute care hospitals and long-term care facilities: Results from two european point prevalence surveys, 2016 to 2017. *Eurosurveillance*, 23(46). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.46.1800516>
- Wagner, S., Sommer, R., Hinsberger, S., Lu, C., Hartmann, R. W., Empting, M., & Titz, A. (2016). Novel Strategies for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(13), 5929–5969. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01698>

- Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2006). The *Vibrio harveyi* quorum-sensing system uses shared regulatory components to discriminate between multiple autoinducers. *Genes and Development*, 20(19), 2754–2767. <https://doi.org/10.1101/gad.1466506>
- Yamanaka, M., Hara, K., & Kudo, J. (2005). Bactericidal Actions of a Silver Ion Solution on *Escherichia coli*, Studied by Energy-Filtering Transmission Electron Microscopy and Proteomic Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7589–7593. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7589-7593.2005>
- Zhou, J., Ralston, J., Sedev, R., & Beattie, D. A. (2009). Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 331(2), 251–262. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.12.002>.

Capítulo 2

Objetivos

CAPÍTULO 2 – Hipótesis y Objetivos -

Hipótesis

Debido a que las infecciones intrahospitalarias se encuentran relacionadas con superficies contaminadas de los espacios comunes al paciente y los trabajadores de la salud. Y que en general, los desarrollos de microorganismos se dan por formación de *biofilms*, debido a que es un modo de supervivencia y permanencia de los mismos en ambientes hostiles. Creemos que obtener un principio activo con nanotecnología y acción dual, es decir antimicrobiano e inhibidor de la formación de *biofilms* podría resultar una buena estrategia para la elaboración de un producto a aplicarse en zonas críticas y semi críticas de entornos de salud.

Objetivo General

Como objetivo general de la presente tesis doctoral se plantea la obtención del principio activo mencionado en la hipótesis utilizando nanopartículas *Core Shell* de plata y sílice funcionalizadas con moléculas inhibitoras de la comunicación célula-célula como por ejemplo polifenoles.

▣ **Objetivos específicos**

- 1) Sintetizar y caracterizar nanopartículas de plata
- 2) Sintetizar y caracterizar nanopartículas *Core Shell* utilizando las nanopartículas de plata para formar parte del *Core* y sílice como *Shell* y posterior funcionalización con los polifenoles (quercetina, resveratrol y ácido elágico).
- 3) Determinar porcentajes de adsorción en matrices y establecer cinéticas de adsorción y desorción de iones y de las moléculas anti-*quorum sensing*.
- 4) Estudiar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas sintetizadas (nanopartículas de plata y *Core Shell*) y efectos en la formación de *biofilms* por parte de los polifenoles.
- 5) Investigar la acción citotóxica de las nanopartículas en células de fenotipo normal.
- 6) Desarrollar formulaciones y obtener productos antimicrobianos.

El último objetivo planteado está desarrollado debido al interés manifestado para la comercialización del producto por parte de la empresa ADOX S.A. que cofinanció la beca doctoral.

Capítulo 3

Nanopartículas de plata

CAPÍTULO 3 -Nanopartículas de plata (NpsAg)-

▣ Resumen

En el presente capítulo se describen los ensayos dónde realizamos la evaluación de tres síntesis de nanopartículas de plata y elegimos continuar con el escalado de una de ellas. Dos síntesis se formularon con el agregado de un polímero estabilizante (pectina o polivinilpirrolidona), siendo un componente importante para evitar la aglomeración de las NpsAg y por ende su precipitación. Los reactivos seleccionados son de grado no analítico, el motivo de tal elección se debió a que la finalidad de este desarrollo es poder obtener un material que sea económicamente acorde a un posterior proceso de escalado en la empresa ADOX S.A., por lo cual la mayoría de los reactivos utilizados son provistos por proveedores locales a granel.

La obtención de nanopartículas de plata utilizando borohidruro de sodio como agente reductor, fue la primera síntesis ensayada, por ser una síntesis modelo. A su vez, esta síntesis nos permitió visualizar la importancia de utilizar un polímero estabilizante si se quiere tener una formulación estable, con partículas dispersas, y sin formación de cúmulos que precipitan. En segunda instancia sintetizamos NpsAg utilizando polivinilpirrolidona como agente estabilizante y reductor en medio básico, siendo este proceso el que se continuó en las etapas de escalado a 3L y 25L.

▣ Introducción

Las nanopartículas de plata (NpsAg) han demostrado tener efecto microbicida sobre una amplia variedad de microorganismos como virus, bacterias y hongos (Webster & Seil, 2012) (Lara et al., 2011). Como se mencionó en la introducción, los daños que ejercen las NpsAg sobre los microorganismos serían, perturbaciones en las funciones de la membrana celular alterando la permeabilidad (Pal et al., 2007); (Sondi & Salopek-Sondi, 2004) y la respiración celular (Morones et al., 2005), alteraciones a nivel proteico, ADN, daños debido a generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales resultan letales para las células (Kim et al., 2007).

En el proceso de síntesis de las NpsAg suelen utilizarse polímeros que permitan estabilizar a las partículas evitando que se acerquen lo suficiente entre ellas y por ello se aglomeren y precipiten. A continuación, nombramos los dos polímeros que utilizamos en el presente trabajo.

Pectina

La pectina es un heteropolisacárido aniónico complejo, obtenido de la pared celular de plantas superiores. El componente mayoritario de las pectinas es el homogalacturonano, formado por residuos de ácido galacturónico unidos mediante enlaces α (1-4). Las posibles modificaciones se muestran en la **figura 1** (Willats et al., 2006).

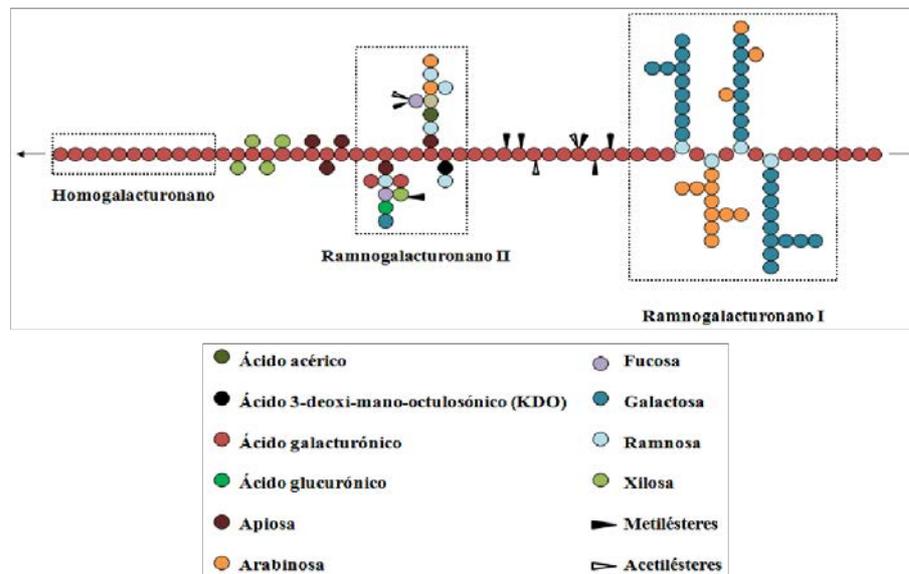


Figura 1: Estructura básica de la pectina. Modificada por Willats y col.

Polivinilpirrolidona

La polivinilpirrolidona (PVP) es un polímero vinílico que se obtiene a partir de la polimerización del monómero vinilpirrolidona (**Figura 2**). Es soluble en agua y otros solventes polares. El polímero en estado puro es completamente inocuo, a diferencia de su monómero. Se utiliza como aglutinante de muchos comprimidos farmacéuticos, entre otras muchas aplicaciones para uso humano. También se suele utilizar como agente dispersante y estabilizante de soluciones y suspensiones. La viscosidad de la solución puede aumentarse de acuerdo a la concentración utilizada y al peso molecular del polímero. Las PVPs de menor peso molecular como K17 y K30, tienen un efecto marginal en la viscosidad al utilizarse entre un 5 a 10 %, mientras que las variantes de mayor peso molecular como K90, pueden quintuplicar la viscosidad del medio que lo contiene.

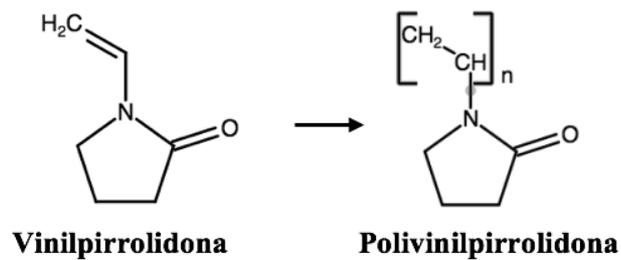


Figura 2: Estructura química de la vinilpirrolidona y de su polímero polivinilpirrolidona.

▣ Materiales y métodos

Síntesis de NpsAg con borohidruro de sodio en ausencia de agentes estabilizantes (síntesis 1A)

Para sintetizar las nanopartículas de plata, se utilizaron los siguientes reactivos:

Nitrato de plata (Biopack), borohidruro de sodio (Sigma Aldrich), agua desionizada.

Los materiales utilizados para esta etapa fueron:

Platina con agitación y temperatura (Faithful), balanza analítica (Mettler Toledo), frasco de vidrio 100 ml (Sigmax), probetas de vidrio, pipetas automáticas p1000 (Dragonlab®), reservorio con hielo molido, barra magnética para agitación.

Procedimiento

Sobre 30 ml de una solución de borohidruro de sodio (2 mM), que se encuentra en baño de agua/hielo a 0 °C, se agregó 10 ml de AgNO₃ (2 mM), a razón de 1 gota por segundo. La mezcla de reacción se dejó agitando vigorosamente, hasta disolución completa de la sal de plata. Luego se mantuvo la agitación por 30 minutos.

Síntesis de NpsAg con borohidruro de sodio en presencia de agente estabilizante (síntesis 1B)

Para sintetizar las nanopartículas de plata, se utilizaron los siguientes reactivos:

Nitrato de plata (Biopack), borohidruro de sodio (Sigma Aldrich), agua desionizada, pectina de bajo metoxilo 33% esterificación (CP Kelko).

Procedimiento

Sobre 30 ml de una solución de borohidruro de sodio (2 mM), que se encuentra en baño de hielo, se agregó 10 ml de AgNO₃ (2 mM), a razón de 1 gota por segundo. Inmediatamente se adicionó un volumen de 10 ml de pectina (1 % p/v), a razón de 1 ml cada 15 segundos. La agitación se continuó por 1 hora.

Síntesis de NpsAg con hidróxido de sodio y polivinilpirrolidona, a diferentes escalas (síntesis 2)

A continuación, se describe el método de síntesis de nanopartículas de plata seleccionado para escalar en la empresa Adox S.A.

Para sintetizar las nanopartículas de plata, se utilizaron los siguientes reactivos:

Nitrato de plata AgNO_3 (Cicarelli), polivinilpirrolidona K30 (BASF), hidróxido de sodio (Serquim), alcohol etílico (Qca. Callegari), agua desionizada.

Los materiales utilizados para la síntesis a escala laboratorio fueron:

Platina con control de agitación y temperatura (Faithful), balanza analítica (Mettler Toledo), frasco de vidrio 500 ml (Sigmax), probetas de vidrio, pipetas automáticas p200 p1000 (Dragonlab®), termómetro, barra magnética para agitación.

Los materiales utilizados para la síntesis en balón de vidrio fueron (**Figura 3**):

Balón de vidrio de tres bocas y 3L de capacidad, tubo refrigerante, ampolla para ingreso de reactivos, mangueras de silicona, soporte, agitador a hélice, motor para agitador, termómetro, pinzas, reservorio de agua, resistencia de calentamiento, conexión a toma de agua, embudo, balanza analítica (Mettler Toledo), balanza granataria (Ohaus), tubo de nitrógeno.

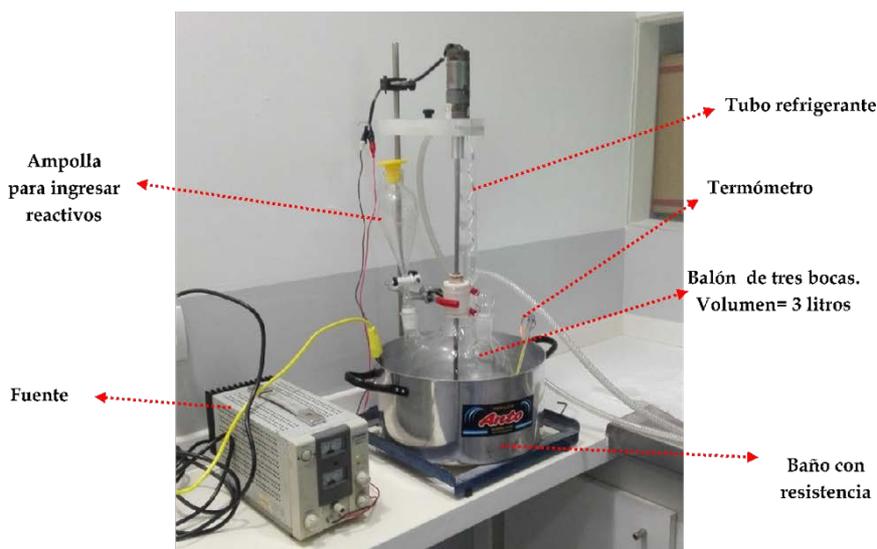


Figura 3: Fotografía del equipamiento utilizado en el laboratorio para sintetizar las NpsAg en balón de 3 L.

Los materiales utilizados para la síntesis en reactor de 50 L (**Figura 4**), fueron:

Reactor de 50 L de vidrio con camisa (Purui), el cual consta con dos bocas para ingreso de reactivos, conexión para tubo de gas, tubo refrigerante, motor, hélice tipo ancla. Sumado a ello utilizamos: un equipo de calentamiento (Purui), embudos, balanza analítica (Mettler Toledo), balanza granataria (Ohaus), tubo de nitrógeno.



Figura 4: Reactor de vidrio de capacidad 50 L.

Procedimiento

El protocolo para sintetizar las nanopartículas de plata a escala laboratorio, se efectuó a partir de una modificación de (Li et al., 2010). Inicialmente se mezcló 100 ml de etanol con 50 ml de agua desionizada mientras la solución se agitó a 300 rpm y se calentó. Una vez que el sistema llegó a 80 °C, se agregó 10 ml de AgNO_3 0,05 M, y se continuó agitando por 5 minutos a 80 °C. A continuación, se adicionaron 20 ml de PVP K30 (10 % p/v) por goteo en un tiempo total de 5 minutos, siendo este componente el que actúa como agente estabilizante y reductor de los iones plata. La agitación, se continuó por 20 minutos a 80 °C y finalmente se agregó 2,8 ml de NaOH 0,1 M, por goteo en un tiempo total de 7 minutos. En esta etapa se apagó la fuente de calor y se dejó agitando por 2 horas a 300 rpm.

Las síntesis a mayores volúmenes (balón y reactor), se realizaron con atmósfera de nitrógeno, con la finalidad de impedir que ocurran reacciones adversas en el proceso. Esto no se llevó a cabo en la síntesis realizada en escala de laboratorio debido a que las reacciones adversas que puedan ocurrir no se aprecian en volúmenes tan pequeños.

Caracterizaciones fisicoquímicas

Determinación del espectro de absorción (UV-Visible)

Los materiales utilizados en la caracterización fueron:

Espectrofotómetro (Shimadzu UV1800), cubetas de plástico descartables de 1,5 ml y paso de luz de 10 mm, pipetas p200 p1000 (Dragonlab®).

Procedimiento

La medición de la dispersión se realizó tomando agua desionizada. El barrido espectral se realizó a partir de los 300 nm hasta 600 nm.

Se tomó 150 μL de la síntesis de NpsAg y se agregó 1350 μL de agua desionizada (en dos alícuotas de 675 μL), se mezcló la muestra por agitación en vórtex.

Caracterización por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Las caracterizaciones en MET se realizaron en el Centro Científico de Bahía Blanca, siendo el Microscopio Electrónico de transmisión *JEOL 100 CX II*.

El procedimiento se basó en depositar con una película pequeñas gotas de la muestra en solución acuosa sobre rejillas de cobre recubiertas de carbono, luego de un minuto, el líquido se absorbió con papel de filtro (*Whatman* n° 4), y las muestras quedaron listas para observar.

Se consideró como descriptor del tamaño, el diámetro de las partículas. No se incluyeron en la distribución las partículas curvadas y alargadas con formas irregulares. El error estimado en los cálculos es del 10%.

D_L = media aritmética

$$D_L = \frac{\sum n_i \cdot d_i}{\sum n_i}$$

Siendo:

n_i : número de partículas

d_i : diámetro de partícula

Determinación del potencial Zeta (ζ)

La medida se realizó en el Centro Tecnológico de Recursos Minerales y Cerámica (CETMIC, CONICET-CIC), utilizándose un equipo analizador de Punto Zero Carga *Brookhaven, modelo 90 plus Z*, en el rango de pH de [3 -7].

Determinación de la concentración (ppm) de iones plata (Ag^+) y nanopartículas de plata presentes en cada síntesis

Se determinó la concentración de nanopartículas de plata y la concentración de iones plata presentes en el coloide que se dio a llamar “síntesis 2”.

Los materiales utilizados en esta determinación fueron:

Espectrómetro de absorción atómica con horno de grafito (Buck Scientific®) modelo 210 VGP, lámpara de cátodo hueco de plata (Buck Scientific®), centrífuga (Presvac®), tubos de ultracentrífuga (Vivaspin Sartorius®)*, pipetas automáticas p20, p200 y p1000 (Dragonlab®).

(*)Los tubos de ultracentrífuga Vivaspin Sartorius® (**Figura 5**), poseen un reservorio central donde se introduce la muestra líquida. Este reservorio está conformado por una membrana con un tamaño de poro inferior a 10 nm, por lo tanto, las nanopartículas de plata quedan retenidas en este espacio y la solución con iones Ag^+ difunden libremente por la membrana, pudiendo de este modo separar las NpsAg de los iones Ag^+ en la solución.



Figura 5: Fotografía del tubo de ultracentrífuga tipo Vivaspin Sartorius®.

Los reactivos utilizados fueron:

Agua destilada, ácido nítrico fumante (65%).

Determinación de iones Ag^+ en solución (medición directa): Se centrifugaron 10 ml de las respectivas nanopartículas en los tubos de ultracentrífuga Vivaspin Sartorius®. A continuación, se tomó una muestra del reservorio externo (**Figura 5**) se determinó el contenido de iones Ag^+ utilizando el espectrofotómetro de absorción atómica.

Determinación de Ag^0 (medición indirecta): En simultáneo, se tomó una muestra de las nanopartículas retenidas por la membrana del reservorio central (**Figura 5**), y se agregó ácido nítrico fumante (65%), con la finalidad de destruir las nanopartículas de plata y determinar qué concentración de iones Ag^+ se encontraba como Ag^0 previamente.

La concentración de plata en ambos casos se determinó a través de la curva de calibración realizada utilizando patrones de una sal de plata y teniendo en cuenta las diluciones, en caso de haberlas realizado.

Caracterizaciones microbiológicas

Purificación del microorganismo

Todos los ensayos microbiológicos realizados con bacterias parten de un inóculo inicial, que se purifica y se cultiva como se indica a continuación.

Todos los trabajos con microorganismos se llevaron a cabo dentro de una cabina de bioseguridad, utilizando material estéril. Las muestras bacterianas que se utilizaron en el ensayo se prepararon a partir de inóculos purificados por medio de repiques en medio sólido, en tres días consecutivos. Finalmente, con el último repique se inoculó un tubo con caldo tripteína soja (siglas en inglés TSB) y se creció bajo agitación por 18-24 h a 35°C.

Las cepas utilizadas en este capítulo fueron:

- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y (PAO1)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 65389)
- *Escherichia coli* (ATCC 650622)
- *Bacillus cereus* (ATCC 10987)

Inóculo inicial

Se tomó 1 ml de inóculo crecido *overnight* de la respectiva bacteria, y se midió su valor de absorbancia a 620 nm. A continuación, se ajustó el valor de densidad óptica a 0,1 ($DO_{620nm}=0,1^*$), utilizando como diluyente caldo TSB, siendo este último utilizado como blanco.

(*). El valor $DO_{620nm}=0,1$, se corresponde a una concentración de aproximadamente 1.0×10^8 Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/ml.

Determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM).

El método que se utilizó es el de microdilución en caldo. Esta metodología está descrita para antibióticos de acuerdo al documento CLSI 2017 (*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*) y se utiliza para determinar la concentración con la que se iniciaría a formular un producto.

Los materiales que se utilizaron en el ensayo fueron:

Placas multipocillos (96 pocillos) estéril, pipetas automáticas p200 p1000, placas de petri estériles descartables, tubos de ensayo de vidrio, ansa metálica, mechero, estufa de cultivo, pH metro (Hanna), espectrofotómetro (Shimadzu UV1800), cubetas de plástico descartables de 1,5 ml y paso de luz de 10 mm.

Los medios de cultivos que se usaron para este ensayo fueron:

Caldo Mueller Hinton (Merck), Agar Triptona caseína soya (Biokar).

Los microorganismos ensayados fueron:

- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 65389)

Principio del método

Esta metodología se utiliza para establecer la concentración inhibitoria mínima (CIM) de un agente antimicrobiano de bacterias aerobias o anaerobias facultativas. El ensayo se realiza de acuerdo al documento CLSI 2017 (*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*) descrito para determinar la CIM con antibióticos. La capacidad de las bacterias de producir crecimiento en microplacas de 96 pocillos, se visualiza por presencia o ausencia de turbidez del medio en los pocillos que, a su vez, contienen diluciones seriadas de los antimicrobianos (dilución en caldo).

La concentración inhibitoria mínima (CIM), se refiere a la menor concentración de agente antibacteriano que inhibe el desarrollo de los microorganismos dentro de una serie de diluciones (Andrews, 2001).

La concentración bactericida mínima (CBM) se define como la mínima concentración de agente antimicrobiano necesaria para matar el 99,9% de la población microbiana (*National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobials. 1999; M 26-A, n.d.*). En el método de dilución en caldo, la CBM se determina repicando a los cultivos con ausencia de turbidez en un medio sólido, incubando 24 a 48 h a una temperatura de 35 °C.

Procedimiento

Se tomó 200 µL del inóculo inicial, y se introdujo en 19,8 ml de caldo Mueller Hinton (dilución 1/100), quedando la $DO_{620nm} = 0,001$, que equivale aproximadamente a 1×10^6 UFC/ml. Esta suspensión bacteriana se utilizó para llevar a cabo todo el ensayo.

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Se inocularon 100 µL de la suspensión bacteriana (anteriormente descrita) sobre los pocillos que contenían el antimicrobiano en sus respectivas diluciones. A continuación, las microplacas se incubaron bajo agitación durante 24 h a 35°C.

El valor de CIM se determinó por la concentración más baja en la cual no se observó turbidez, que es un indicativo de ausencia de desarrollo bacteriano.

Determinación de la concentración bactericida mínima (CBM)

De los pocillos con ausencia de turbidez, se tomaron 10 μ L y se sembraron en una placa con agar tripteína soya (TSA). A continuación, las placas se llevaron a estufa 18-24 h a 35 °C.

Por último, se observó presencia o ausencia de desarrollo de colonias por sobre el medio de cultivo sólido.

La CBM será la mínima concentración a la cual no se observó desarrollo bacteriano en el medio sólido.

Curvas de crecimiento e inhibición en presencia de NpsAg

El objetivo es observar qué efecto ejerce el agregado de NpsAg en un inóculo bacteriano creciendo en fase exponencial.

Los materiales que se utilizaron en el ensayo fueron:

Erlenmeyers de 100 ml, estufa de cultivo con agitación, espectrofotómetro (Shimadzu UV1800), cubetas de plástico descartables de 1,5 ml y paso de luz de 10 mm.

El medio cultivo utilizado fue:

Caldo Triptona caseína soya (Biokar).

Los microorganismos a ensayados fueron:

- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 65389)

Procedimiento

En un *erlenmeyer* se colocó caldo TSB estéril y a continuación se agregó un inóculo bacteriano crecido *overnight* en estufa, con agitación a 35°C, hasta llegar a una $DO_{620nm}=0,1$. A partir de ese momento se realizaron mediciones en espectrofotómetro cada 1 hora y se continuaron hasta obtener el valor de densidad óptica a 620 nm de 0,3. A continuación, se dividió el inóculo en dos nuevos *erlenmeyers* y a uno de ellos se adicionaron las NpsAg a la concentración inhibitoria mínima. La DO_{620nm} se continuó midiendo cada 1 hora por un lapso total de 6 horas. Por último, se realizó el gráfico de Absorbancia versus tiempo.

Microscopía de barrido (SEM) sobre superficies con biofilm de *P. aeruginosa* (PAO1)

Aquí se estudió el efecto de las NpsAg en contacto con un cultivo microbiano de PAO1 creciendo sobre una superficie de vidrio.

Los materiales que se utilizaron en el ensayo fueron:

Estufa de cultivo, portaobjetos, pipetas p200 y p1000.

El medio de cultivo utilizado fue:

Caldo Triptona caseína soya (Biokar) a una concentración de 3 g/L.

El microorganismo utilizado fue:

- *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1)

Procedimiento

Sobre la superficie de un vidrio se sembraron 100 μ L del inóculo con $DO_{620nm}=0,1$ y se lo dejó en contacto por 1 hora. A continuación, se retiró el inóculo y se cubrió la superficie con medio de cultivo, dejando la misma incubar por 24 h en estufa a 35°C. Una vez transcurrido ese lapso, a un grupo se las trató con NpsAg en la concentración igual a la CIM. Luego, se lavaron ambos grupos con solución fisiológica para retirar bacterias en estado planctónico y neutralizar a las NpsAg del grupo que se dio en llamar *Tratado*. Por último, se procedió a realizar la fijación de las bacterias. Para ello se sumergió el cubreobjetos en glutaraldehído al 2% por un lapso de tiempo de 2 horas. A continuación, se lavó la muestra con buffer fosfato de pH igual a 7,0 y luego se procedió a la deshidratación de la muestra en un tren creciente de una mezcla etanol/agua hasta llegar a sumergirla en etanol absoluto (30% - 50% - 70% - 90% - 99,5%), dos veces. Ambos grupos de muestras se observaron en microscopio electrónico de barrido.

Tinciones *Live/Dead™ Backlight™* –Thermo Fisher Scientific-

Por otro lado, para observar el efecto antimicrobiano de las NpsAg se utilizó el kit comercial *Live/Dead™ Backlight™* –Thermo Fisher Scientific-

El soporte utilizado para realizar el desarrollo del microorganismo fue vidrio (cubreobjetos) y un catéter de goma.

Los microorganismos ensayados fueron:

- *Escherichia coli* (ATCC 650622)
- *Bacillus cereus* (ATCC 10987).

Principio del método

El Kit *Live/DeadTM BacklightTM* –Thermo Fisher Scientific-se compone de dos colorantes: yoduro de propidio (PI) que emite fluorescencia en el rojo, y *SYTO^{®9}* que emite fluorescencia en el verde. Ambos tienen la capacidad de fijarse a los ácidos nucleicos, pero difieren en la capacidad de penetrar en las células. Su mecanismo de acción depende de la integridad de la membrana de las células microbianas.

El colorante *SYTO^{®9}* tiene la capacidad de penetrar en todas las células, independientemente del estado de su membrana, mientras que el **yoduro de propidio** solo tiene la capacidad de penetrar en aquellas células que se encuentran dañadas. Por lo tanto, las células dañadas o con pérdida de la integridad de su membrana emiten fluorescencia de color rojo (el yoduro de propidio que reduce la fluorescencia verde del SYTO^{®9}), mientras que una célula con la membrana intacta emite fluorescencia de color verde.

Procedimiento

Se tomaron dos alícuotas de 1 ml del inóculo creciendo en fase exponencial y se lo centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos. Luego se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet con solución fisiológica, con la finalidad de lavar las células y se volvió a centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos. A continuación, se retiró el sobrenadante y a un tubo se le adicionó 1 ml de solución fisiológica y a otro grupo las NpsAg en su concentración igual a la CIM utilizándose como diluyente agua bidestilada y dejando actuar por 10 minutos. Por último, se centrifugaron los tubos nuevamente y se resuspendió el pellet con solución fisiológica, luego se tomaron 500 µL para mezclarlo con 1,5 µL de los componentes del kit *Live/DeadTM BacklightTM* –Thermo Fisher Scientific-. A la mezcla se la dejó reposar 15 minutos en oscuridad y se la observó en microscopio de fluorescencia.

▣ Resultados

Caracterizaciones fisicoquímicas

Nanopartículas de plata – Reducción con borohidruro de sodio (1A y 1B)-

Las nanopartículas de plata (**1A**), fueron obtenidas por la reducción de una sal de plata (AgNO_3) utilizando borohidruro de sodio. Las mismas se sintetizaron en ausencia de un polímero estabilizante, pudiendo visualizar (**Figura 6**), inicialmente, que el color resultante era violáceo, dando indicios de aglomeramiento y consecuente precipitación. En las micrografías (**Figura 6**) se observó que las mismas se aglomeran, impidiendo realizar las respectivas mediciones para determinar sus tamaños.

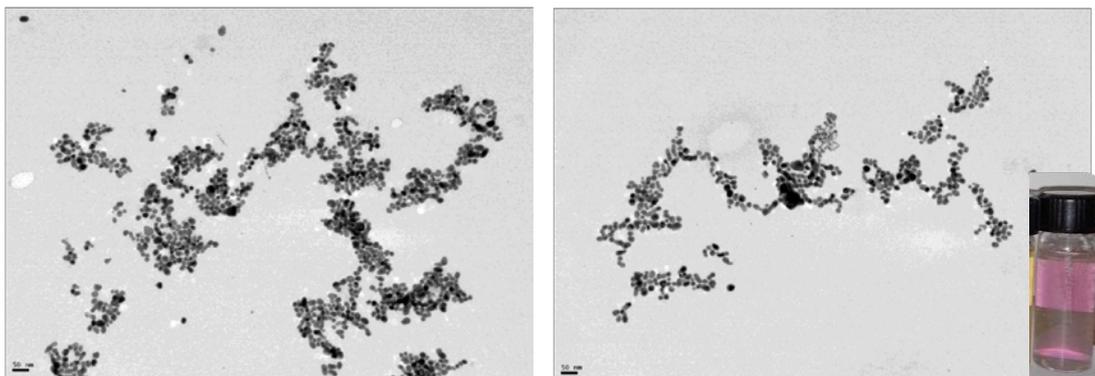


Figura 6: MET de las nanopartículas de plata producidas con borohidruro de sodio sin agente estabilizante (1A) y fotografía del coloide obtenido.

Las nanopartículas de plata (**1B**), se obtuvieron del mismo modo que la síntesis 1A, pero adicionando un agente estabilizante en el medio de reacción. En este caso el coloide se observó color amarillento (**Figura 7**) y en las micrografías se observó que las NpsAg de la síntesis **1B** (**Figura 7**), se encuentran bien distribuidas en el espacio, sin formación de cúmulos o agregados, con tamaños de partículas entre 8 a 10 nm.

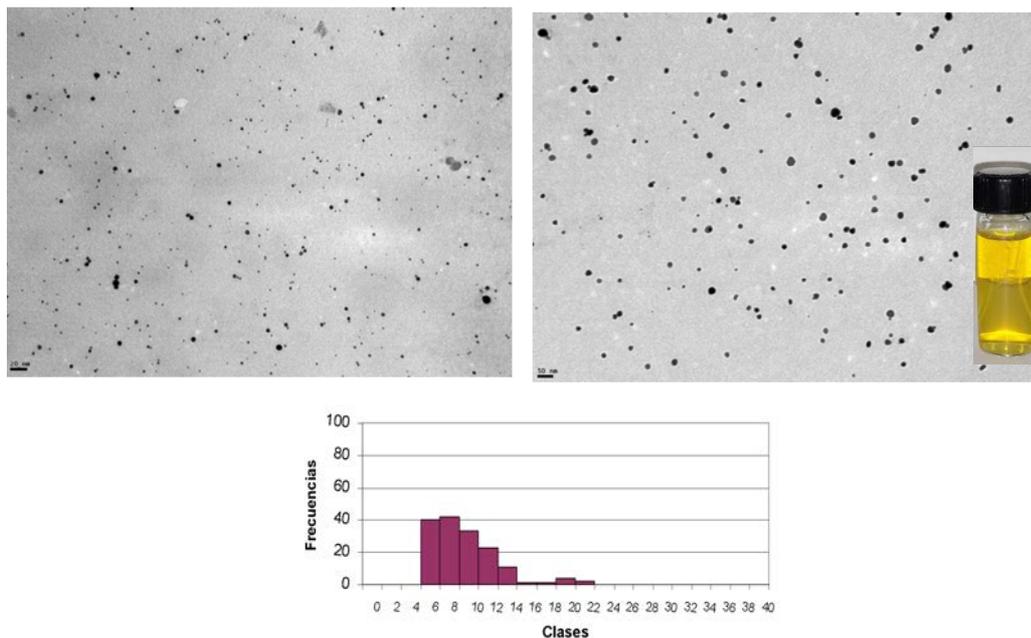


Figura 7: MET de nanopartículas de plata reducidas con borohidruro de sodio con el agregado de pectina como agente estabilizante (1B). En el histograma se muestra la distribución de tamaño de las nanopartículas.

Nanopartículas de plata – Sintetizadas con NaOH y PVP- Síntesis 2-

Puesta a punto de la síntesis

Para la obtención de las nanopartículas de plata (**Síntesis 2**), se utilizó una sal de plata (AgNO_3), efectuándose su reducción en presencia de polivinilpirrolidona (PVP) e hidróxido de sodio. Su síntesis se encuentra descrita en la página 28 del presente capítulo (sección materiales y métodos).

El método de síntesis se optimizó analizando la banda de plamones superficiales de las nanopartículas de plata obtenidas en cada síntesis y observando la coloración de las dispersiones, considerando que, al aumentar el tamaño de las Nps, los máximos de absorbancia se desplazan hacia valores más grandes de longitudes de onda y visualmente el coloide se observa más anaranjado, siendo lo contrario cuando las partículas disminuyen su tamaño, tornándose más amarillentos (Solomon et al., 2007). A su vez, se analizó ensanchamientos en la banda de los espectros de absorción de las NpsAg, dándonos indicios de variaciones de su tamaño y/o formas.

Los parámetros que se variaron fueron: temperatura, tiempo de agitación, tiempos de agregado de NaOH y concentración de PVP.

Al variar la temperatura observamos cambios importantes en la coloración de la dispersión, pasando por las tonalidades amarillas para temperaturas inferiores a los 80°C , y más anaranjados para temperaturas de 80°C o superiores. Acompañado con el cambio

visual se observó un aumento en los máximos de absorbancia. Por lo tanto, se concluye que la temperatura es una variable crítica en la síntesis de las nanopartículas. (**Figura 8 y Tabla 1**).

Tabla 1: Máximos de absorbancia del plasmón superficial para las diferentes síntesis realizadas variando la temperatura durante el proceso.



Nombre de la muestra	Condición variable Temperatura (°C)	Máximo de absorbancia plasmón superficial (nm)
2T1	60	423
2T2	70	426
2	80	430
2T3	83	443

Figura 8: Fotografía de los coloides obtenidos luego de realizar su síntesis variando la temperatura del proceso, siendo 2T1 a 60 °C, 2T2 a 70 °C, 2 a 80 °C y 2T3 a 83 °C.

Modificar los tiempos de agitación luego de haber adicionado todos los reactivos generó cambios en las nanopartículas. Dejar agitando las dispersiones durante tiempos mayores y menores a 2 h provocó la obtención de partículas más grandes (**Figuras 8 y Tabla 2**).

Tabla 2: Máximos de absorbancia del plasmón superficial para las diferentes síntesis realizadas modificando los tiempos de agitación luego de agregar todos los reactivos.



Nombre de la muestra	Condición variable tiempo (horas)	Máximo de absorbancia plasmón superficial (nm)
2A	1,0	450
2A1	1,5	450
2	2,0	430
2A2	2,5	447

Figura9: Fotografía de los coloides obtenidos luego de variar los tiempos de agitación luego de agregar todos los reactivos siendo 2A a 1,0 h, 2A1 a 1,5 h, 2 a 2,0 h y 2A2 a 2,5.

Adicionar NaOH en alícuotas no mostró variaciones significativas en la dispersión, pero cuando el NaOH se agregó abruptamente, pudimos ver un aumento en el máximo de absorción y aparejada variación en la coloración del coloide hacia la tonalidad amarronada (**Figura 10 y Tabla 3**).

Tabla 3: Máximos de absorbancia del plasmón superficial para las diferentes síntesis realizadas variando la velocidad de adición de NaOH 0,10 M.



Nombre de la muestra	Condición variable Vol. NaOH (0,10 M)/tiempo (ml/30 seg)	Máximo de absorbancia plasmón superficial (nm)
2	0,05	450
2B	0,2	450
2B1	Todo de una vez	430

Figura 10: Fotografía de los coloides obtenidos luego de realizar su síntesis variando el tiempo de agregado de NaOH a una concentración fija de 0,10 M, siendo 2 a 0,05 ml/30 seg, 2B a 0,2 ml/ 30 seg y 2B1 todo de una vez.

Introducir la mitad o el doble de PVP en el proceso de síntesis de las nanopartículas de plata, podría estar generando variaciones en el tamaño de las nanopartículas debido a los aumentos en los máximos de absorción (**Figura 11 y Tabla 4**).

Tabla 4: Máximos de absorbancia del plasmón superficial para las diferentes síntesis realizadas variando la concentración de polivinilpirrolidona.



Nombre de la muestra	Condición variable Concentración PVP (%p/p)	Máximo de absorbancia plasmón superficial (nm)
2P	5	441
2	10	430
2P1	15	443

Figura 11: Fotografía de los coloides obtenidos luego de realizar su síntesis variando la concentración del polímero polivinilpirrolidona (PVP), siendo 2P a [PVP]= 5 % p/p, 2 a [PVP]= 10 % p/p, 2P1 a [PVP]= 15 % p/p.

De acuerdo a las variaciones efectuadas para con la síntesis 2, pudimos determinar la temperatura y tiempo óptimo del proceso. A su vez, realizar cambios en el modo de agregado de NaOH, nos permitió plantear un agregado por goteo en la etapa de escalado esperando obtener Nps con características similares a las obtenidas en laboratorio. Respecto al PVP, se decidió seguir con la misma concentración establecida en el método encontrado en bibliografía (Li et al., 2010).

Caracterizaciones de las nanopartículas obtenidas en la síntesis 2

Las imágenes de microscopía (**Figura 12**), corresponden a las nanopartículas de plata obtenidas mediante la **síntesis 2** efectuada a escala laboratorio, en la cual se observó partículas con buena dispersión, sin formación de cúmulos o agregados. Los tamaños

oscilan entre 4 a 14 nm, siendo su mayor población de 6 a 8 nm. Las partículas poseen forma esférica con algunas excepciones, donde se observan partículas con forma triangular.

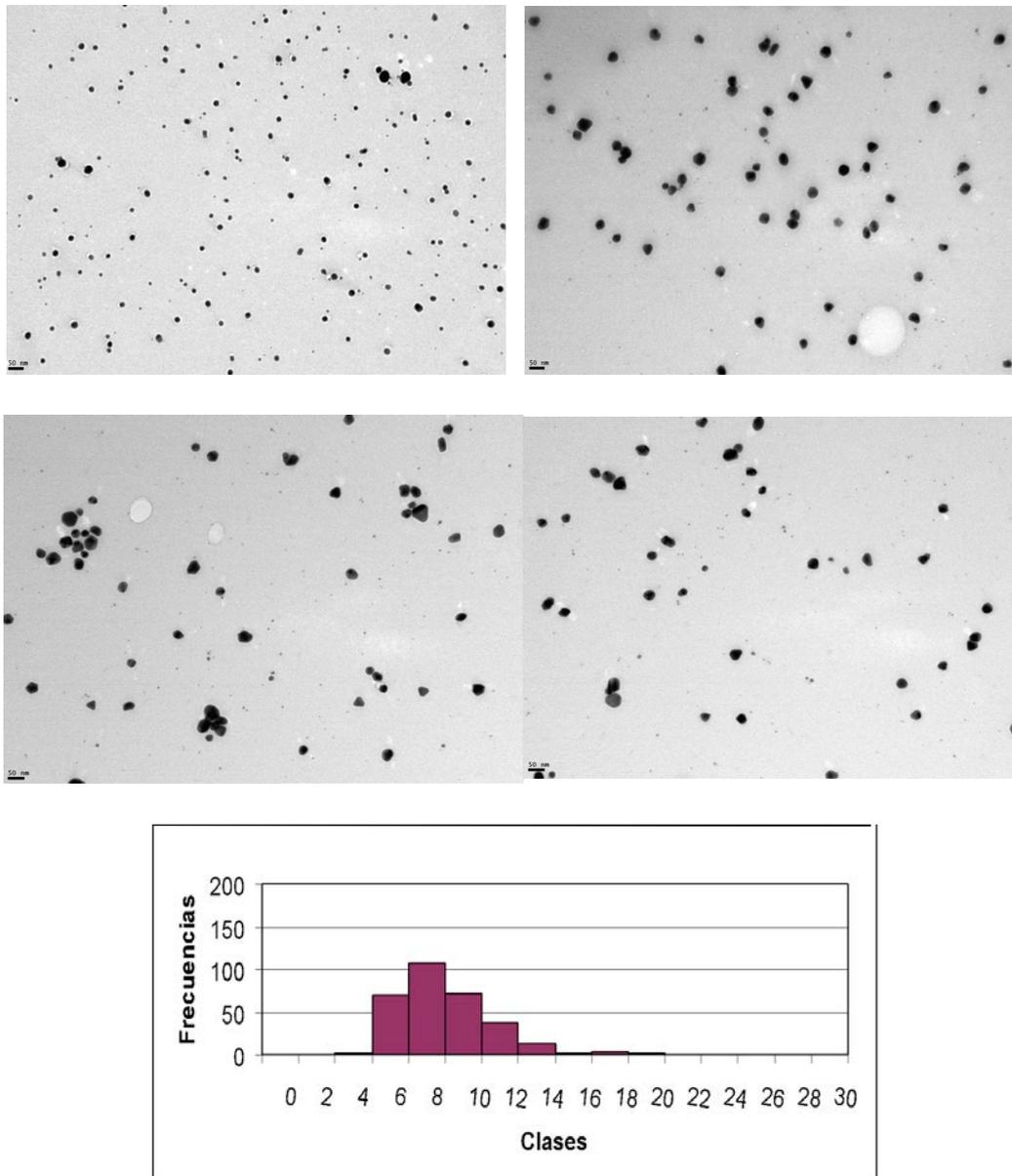


Figura 12: Parte superior: MET de las nanopartículas de plata sintetizadas con NaOH y polivinilpirrolidona. (Síntesis 2). Parte inferior: distribución de tamaños registrada.

Potencial Zeta

Siguiendo con los ensayos de caracterización, se midió el potencial Zeta (**Figura 13**), ensayo del cual se observó que la carga se ve influenciada por los cambios en el pH

del medio, siendo el rango entre 7 y 8 donde se observaron valores más altos y negativos, indicando una mayor estabilidad o repulsión entre las partículas, y por lo tanto menos probabilidad de aglomeración y precipitación.

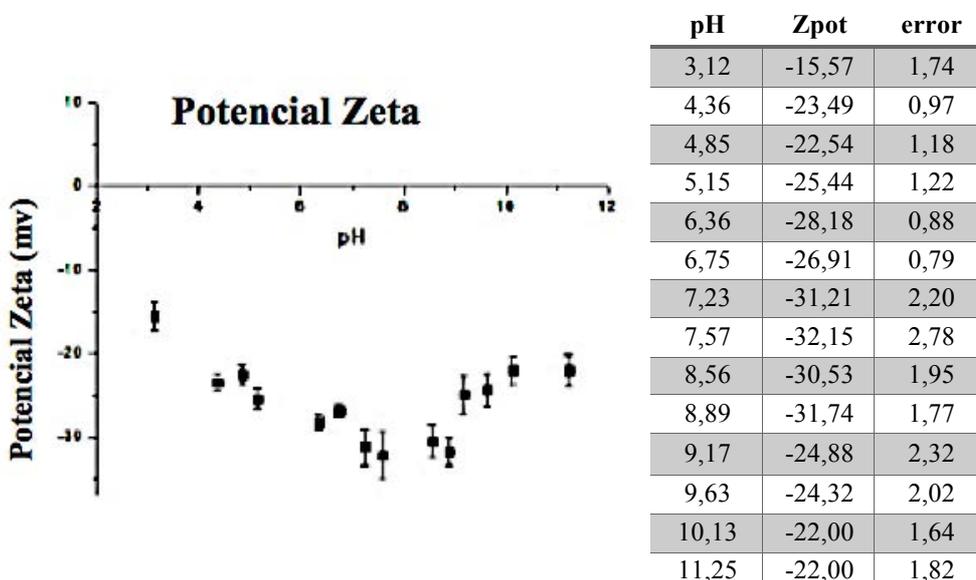


Figura 13: Análisis de Potencial Zeta de las nanopartículas de plata a diferentes valores de pH.

Dynamic Light Scattering (DLS)

Para las NpsAg en medio acuoso, se observó que el diámetro hidrodinámico promedio de las mismas (Tabla 5) resultó ser igual a 87,19 nm, valor diez veces mayor al observado en MET (Figura 12). La variación entre los tamaños determinados por MET y DLS se deben a que en este último las mediciones se realizan sobre el diámetro hidrodinámico de las Nps contemplándose el polímero que las rodea y su esfera de hidratación, mientras que con las micrografías de MET se muestra una imagen únicamente de las Nps, sin tener en cuenta todo el contexto previamente mencionado, siendo la medida del diámetro efectivo de las mismas.

Tabla 5: Diámetro hidrodinámico de las NpsAg (síntesis 2) en medio acuoso.

Muestra	Diámetro hidrodinámico (nm)	Desv.Std
Síntesis 2	87,19	2,74

Espectro UV-Visible

El valor máximo en el espectro de absorción de las nanopartículas de la síntesis 2 a diferentes escalas (0,5 L, 3 L y 25 L) (Tabla 6), se encuentra entre las longitudes de onda 428-430 nm.

La síntesis 2 realizada en balón de 3 L nos sirvió de punto intermedio antes de pasar al reactor, donde observamos la necesidad de utilizar atmósfera de nitrógeno para evitar que ocurran reacciones no deseadas, como aoxidaciones de la plata, debido a que uno de los lotes realizados en esta escala se oxidó tornándose de color negruzco y con ausencia de resonancia de los plamones superficiales.

En la **figura 14** se observan fotografías de los diferentes volúmenes de reacción utilizados para esta parte de la tesis.

Tabla 6: Espectroscopia UV-Visible de la síntesis 2.

<i>Volumen (L)</i>	0,5	3,0	25,0
<i>Longitudes de onda correspondientes a la absorbancia máxima</i>	430	430	428



Figura 14: NpsAg obtenidas de la síntesis nombrada como síntesis 2, a diferentes escalas: 0,25 L, 3 L y 25 L.

Lotes de 25 L en reactor de vidrio y capacidad máxima de 50 L

En reactor de 50 L, efectuamos dos lotes de 25 L cada uno, dados a llamar del siguiente modo:

L01NPA-02052018 y L02NPA-17102019.

Para ambos casos observamos similares resultados en relación al aspecto visual como también en sus propiedades fisicoquímicas (**Tabla 7**).

Las imágenes de MET (**Figura 15**) del lote **L01NPA-02052018** nos permitió observar la formación de NpsAg dispersas y sin formación de cúmulos. Los tamaños fueron inferiores a 20 nm, más específicamente en el rango de 4 a 6 nm, ligeramente más pequeñas que las obtenidas en laboratorio.

Tabla 7: Longitudes de onda (nm), pH, densidad (gr/ml) y aspecto visual efectuadas a las NpsAg sintetizadas en reactor de 50 L.

Lote	Longitudes de onda (nm) Absorbancia Max.	pH	Densidad (gr/ml)	Aspecto visual
L01NPA-02052018	428	5,0	0,917	Líquido color ámbar
L02NPA-17102019	427	4,7	0,919	Líquido color ámbar

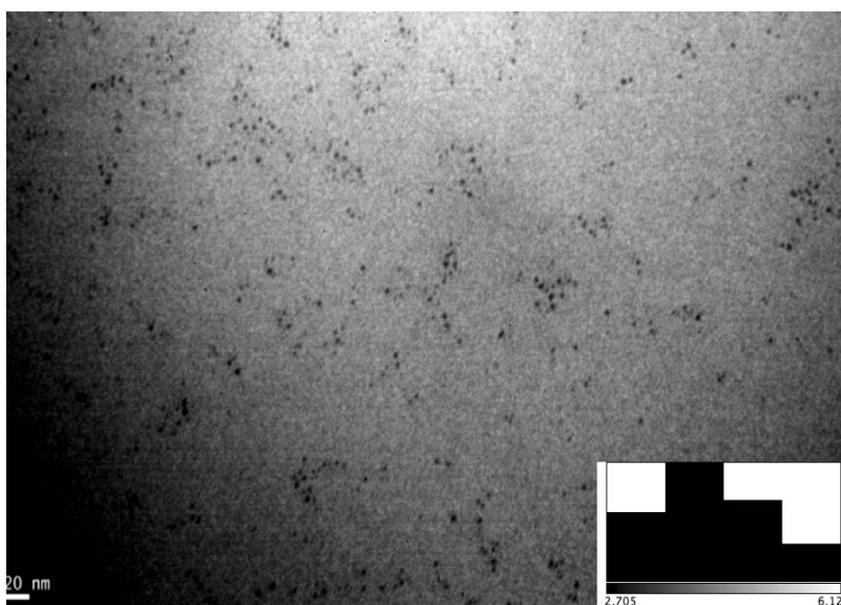


Figura 15: MET de las NpsAg sintetizadas en reactor de 50 L L01NPA-02052018.

Determinación de la concentración (ppm) de iones plata (Ag^+) y nanopartículas de plata para la síntesis 2 (L01NPA-02052018) de 25L.

La determinación de la concentración de iones plata (**Tabla 8**) en sus dos estados de oxidación, llevado a cabo por el método de absorción atómica utilizando su

correspondiente curva de calibración (**Figura 16**), fueron realizados para el lote con el que continuamos trabajando durante todo el trabajo de tesis.

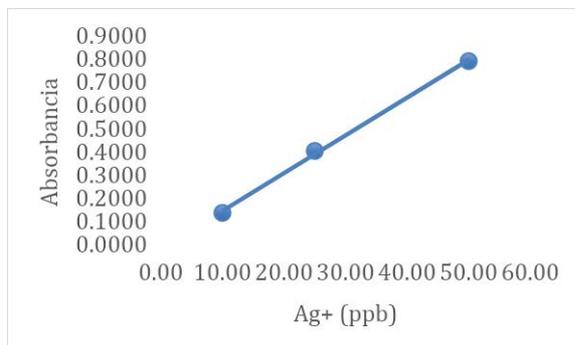


Figura 16: Curva de calibración, absorbancia versus concentraciones de iones Ag^+ (ppb). Medidas realizadas en espectrómetro de absorción atómica con horno de grafito Buck Scientific® modelo 210 VGP.

Tabla 8: Concentración en partes por millón (ppm) de plata (Ag), como Ag^+ y Ag^0 (nanopartículas de plata) para la síntesis 2 (L01NPA-02052018).

Muestra	Concentración Ag^0 (ppm)	Concentración Ag^+ (ppm)
NpsAg	4429	3,16

A sabiendas que la concentración de AgNO_3 utilizada para la síntesis fue de 5400 ppm, entonces el rendimiento en la obtención de las NpsAg fue del 82%.

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y bactericida mínima (CBM) para las nanopartículas de la síntesis 2 (L01NPA-02052018).

La determinación de la CIM se realizó utilizando el método propuesto por *CLSI 2017 (Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically)* descrito para determinar la CIM con antibióticos, donde se observó que los valores de CIM (**Tabla 9**) para las nanopartículas de la síntesis 2 son iguales a $0,22 / 1,6 \times 10^{-4}$ mg/ml de Ag^0 y Ag^+ , respectivamente, habiéndose realizado diluciones de 1/20 del lote inicial.

La concentración bactericida mínima (CBM) (*National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobials. 1999; M 26-A, n.d*), son iguales a $0,44 / 3,2 \times 10^{-4}$ mg/ml de Ag^0 y Ag^+ (**Tabla 9**), respectivamente, habiéndose realizado diluciones de 1/10 del lote inicial.

Tabla 9: Concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima de la síntesis 2 (L01NPA-02052018) frente a *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

Microorganismos	Control (UFC/ml)	CIM (mg/ml) Ag ⁰ /Ag ⁺	CBM (mg/ml) Ag ⁰ /Ag ⁺
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,0 x 10 ⁷	0,22 / 1,6x10 ⁻⁴	0,44 / 3,2x10 ⁻⁴
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,0 x 10 ⁷	0,22 / 1,6x10 ⁻⁴	0,44 / 3,2x10 ⁻⁴

Curvas de crecimiento de *P. aeruginosa* y *S. aureus* y adición de NpsAg (síntesis 2) en fase exponencial.

Las curvas de crecimiento se realizaron midiendo los valores de absorbancia a una longitud de onda de 620 nm a diferentes tiempos sobre los cultivos de las respectivas bacterias (*P. aeruginosa* y *S. aureus*) (Figura 17). Se observó que el agregado de las NpsAg de la síntesis 2 (a la concentración inhibitoria mínima) en la fase exponencial de *P. aeruginosa* y *S. aureus*, generó inhibición en su desarrollo, visualizándose con la caída de la absorbancia a 620 nm debido a la lisis de las mismas (Figura 17).

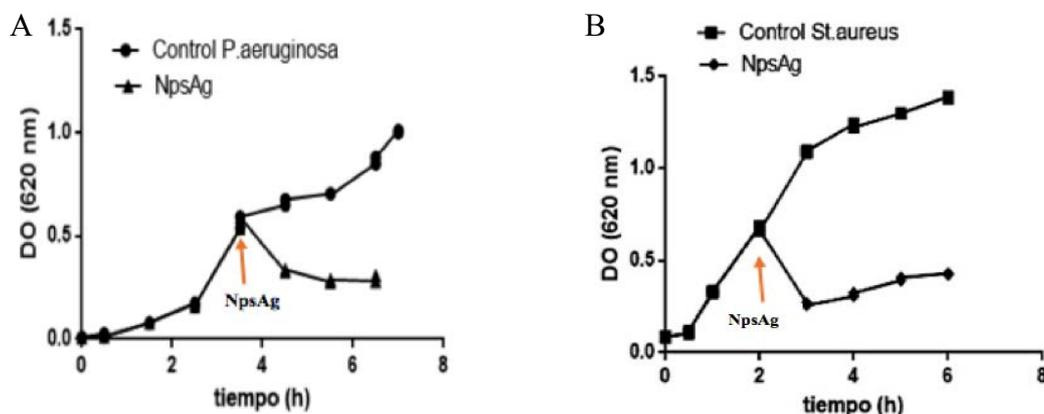


Figura 17: Curva de crecimiento de: A) *Pseudomonas aeruginosa* Control (•) y en luego del agregado de la síntesis 2 en su CIM (Δ); B) *Staphylococcus aureus* Control () y en luego del agregado de la síntesis 2 (◇) en su CIM.

Tinciones *Live/Dead™ BackLight™*

A continuación, realizamos una tinción (*Live/Dead™ Backlight™*) para dos modelos de bacterias Gram negativas (*E. coli* y *PAOI*) y Gram positivas (*B. cereus*). En las micrografías (Figuras 18, 19 y 20), se observó que el tratamiento con la síntesis 2 genera daño y muerte microbiana, tanto en bacterias Gram negativas (*E. coli* y *PAOI*) como en Gram positivas (*B. cereus*).

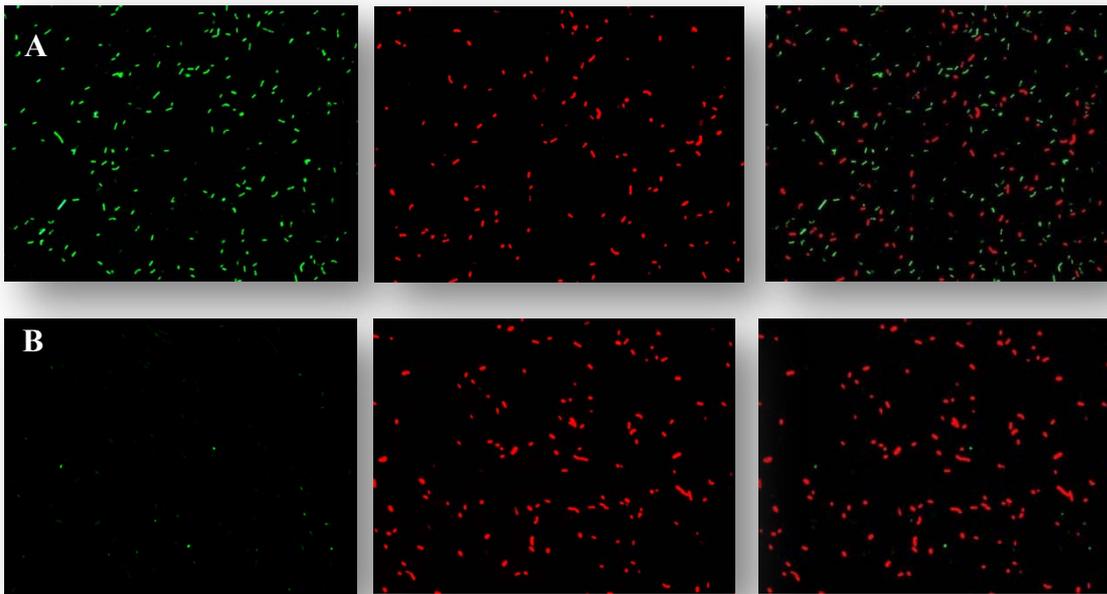


Figura 18: Microscopía de fluorescencia de *Escherichia coli* para A) control y B) luego del tratamiento con las NpsAg obtenidas de la síntesis 2. Las bacterias vivas se observan color verde y las bacterias no viables (dañadas) color rojo. Para bacterias vivas (verde) utilizando excitación entre 510 y 550 nm y emisión a 590 nm. Para bacterias muertas o dañadas (rojo) utilizando excitación entre 460 y 490 nm y emisión 520 nm. La tercera imagen de las hileras A y B, representa la superposición de las micrografías 1 y 2 de cada hilera.

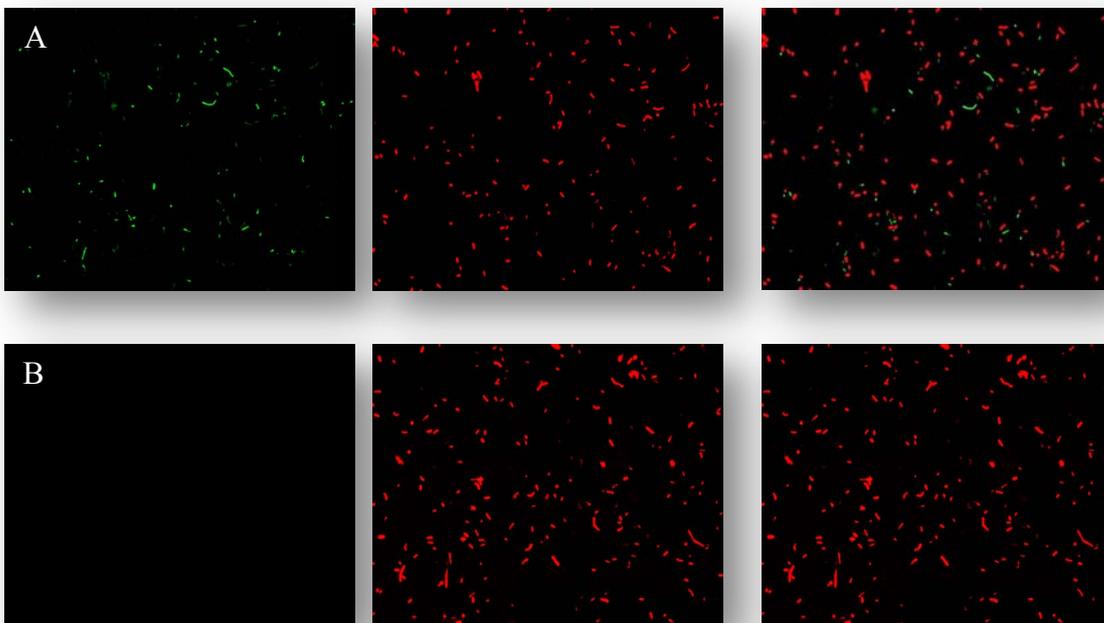


Figura 19: Microscopía de fluorescencia de *Bacillus cereus* para A) control y B) luego del tratamiento con las NpsAg obtenidas de la síntesis 2. Las bacterias vivas se observan color verde y las bacterias no viables (dañadas) color rojo. Para bacterias vivas (verde) utilizando excitación entre 510 y 550 nm y emisión a 590 nm. Para bacterias muertas o dañadas (rojo) utilizando excitación entre 460 y 490 nm y emisión a 590 nm.

emisión 520 nm. La tercera imagen de las hileras A y B, representa la superposición de las micrografías 1 y 2 de cada hilera.

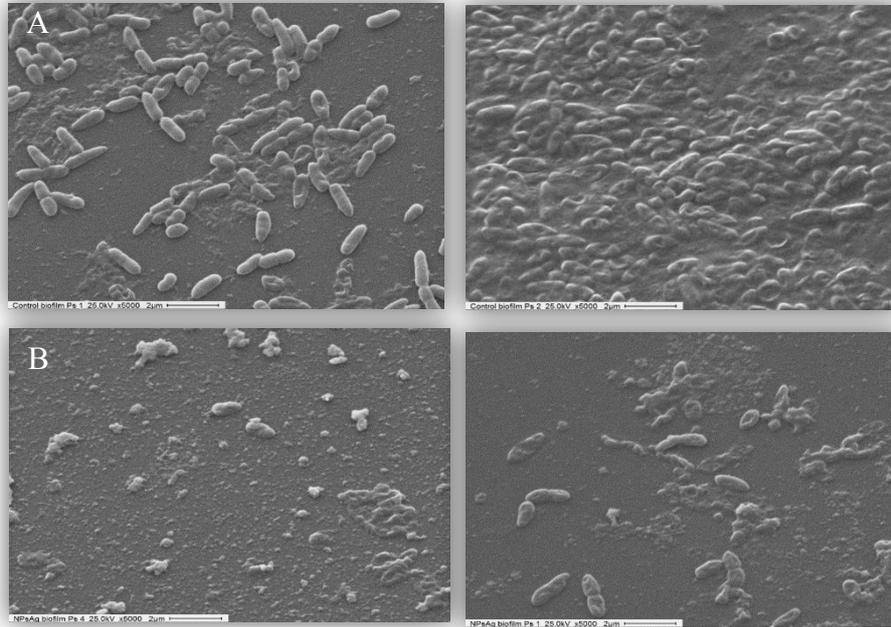


Figura 20: Micrografía electrónica de barrido (SEM) de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1), creciendo en superficies de vidrio A) Control; B) luego del tratamiento con las NpsAg obtenidas de la síntesis 2 por un tiempo de 20 min.

▣ Conclusiones del capítulo 3

En este capítulo se describe el trabajo realizado en dos sistemas o síntesis diferentes, en la primera etapa se trabajó en dos tipos de síntesis de nanopartículas de plata. En una de ellas se utilizó borohidruro de sodio como agente reductor y se observó la importancia de utilizar pectina como agente estabilizante en el proceso de síntesis para poder mantener estables a los coloides (**síntesis 1 A y 1B**).

En la segunda etapa, sintetizamos las partículas con las que continuamos trabajando durante toda la tesis. Se utilizó NaOH y polivinilpirrolidona para permitir la reducción de los iones de plata a nanopartículas (**síntesis 2**). Las variaciones en los parámetros de las síntesis 2, nos permitió identificar a la temperatura y tiempo de agitación como parámetros críticos en el proceso, siendo los mismos 80°C y 2 h, respectivamente. En las caracterizaciones observamos que el pico máximo aportado por el plasmón de superficie de las NpsAg en el rango UV-Visible se encuentra en 430 nm. Mediante las caracterizaciones en el MET se determinó que los tamaños de las Nps se encontraban entre 4 y 14 nm. En medio acuoso, el diámetro hidrodinámico de las mismas fue superior.

La síntesis se escaló a balón de 3 litros, de este proceso destacamos la importancia del uso de una atmósfera de nitrógeno para impedir que ocurran reacciones adversas durante el proceso.

Por último, las NpsAg se sintetizaron en reactor de 50 L, para un volumen final de 25 L. Este proceso se realizó en dos oportunidades siendo llamados cada lote como: **L01NPA-02052018** y **L02NPA-17102019**. En las caracterizaciones de ambos lotes observamos que sus propiedades fisicoquímicas y aspecto visual se mantuvieron en los parámetros esperados respecto a lo observado en la escala de laboratorio. Los picos máximos aportados por el plasmón de superficie de los dos coloides se encuentran entre 428 y 427 nm, correspondiéndose con tamaños de las nanopartículas inferiores a 20 nm. Según la caracterización realizada en MET para el lote **L01NPA-02052018**, los tamaños de las partículas se encuentran en el rango de 4 a 6 nm.

En las determinaciones de plata total se observó que la concentración de Ag^+ fue igual a 3,16 ppm y la de Ag^+ derivada de las NpsAg fue igual a 4429 ppm, con un rendimiento de un 82% respecto a la reducción de los iones de plata a Nps.

La concentración inhibitoria y bactericida mínima para bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*) se obtuvo de diluir 20 y 10 veces la solución madre, siendo estos valores iguales a $0,22 / 1,6 \times 10^{-4}$ y $0,44 / 3,2 \times 10^{-4}$ mg/ml de Ag^0 y Ag^+ , respectivamente.

Con el uso de la microscopía SEM, pudimos apreciar el daño en las bacterias (*P. aeruginosa*) al entrar en contacto con las NpsAg.

▣ **Bibliografía**

- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl_1), 5–16.
https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J.-H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, Y. K., Park, Y. H., Hwang, C.-Y., Kim, Y.-K., Lee, Y.-S., Jeong, D. H., & Cho, M.-H. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1), 95–101.
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>
- Lara, H. H., Garza-Treviño, E. N., Ixtapan-Turrent, L., & Singh, D. K. (2011). Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(1), 30. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-30>
- Li, C., Mei, J., Li, S., Lu, N., Wang, L., Chen, B., & Dong, W. (2010). One-pot synthesis of Ag@SiO₂@Ag sandwich nanostructures. *Nanotechnology*, 21(24), 245602.
<https://doi.org/10.1088/0957-4484/21/24/245602>
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346–2353. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobials*. 1999; M 26-A. (n.d).
- Pal, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (2007). Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1712–1720. <https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06>
- Solomon, S., Bahadori, M., Jeyarajasingam, A. v, Rutkowsky, S. A., Boritz, C., & Mulfinger, L. (2007). *Synthesis and Study of Silver Nanoparticles*. [doi:10.1021/ed084p322](https://doi.org/10.1021/ed084p322)
- Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275(1), 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012>
- Webster, T. J., & Seil, I. (2012). Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. *International Journal of Nanomedicine*, 2767. <https://doi.org/10.2147/IJN.S24805>
- Willats, W. G. T., Knox, J. P., & Mikkelsen, J. D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, 17(3), 97–104.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.10.008>

Capítulo 4

Partículas *Core Shell*

CAPÍTULO 4 - Partículas *core shell* –

▣ Resumen

En el siguiente capítulo el objetivo se centró en la obtención de un principio activo que presente actividad antimicrobiana e inhibidora de *biofilms* en la misma partícula.

Para ello trabajamos en el proceso de obtención de partículas del tipo *Core Shell*, conformadas por un núcleo o *core* de plata, de las cuales se abordó su síntesis en el **capítulo 3**, y una coraza o *shell* de sílice. Las partículas *Core Shell* a su vez se utilizaron como *carrier* de tres polifenoles, quienes podrían ejercer su acción como inhibidores en la formación de los *biofilms*. Los polifenoles utilizados fueron quercetina, resveratrol y ácido elágico.

En el presente capítulo se describen dos métodos de obtención para las partículas, una de ellas se realizó en dos etapas, utilizando tetraetoxisilano (TEOS) como precursor en medio alcohólico (alcohol etílico y alcohol isopropílico) y alcalinizado con hidróxido de amonio.

La segunda síntesis se realizó utilizando 3-(mercaptopropil)-trimetoxisilano (MPTMS) como precursor en medio acuoso alcalinizado con hidróxido de amonio. Luego avanzamos con las partículas obtenidas con esta última metodología, la cual se escaló en un reactor de 4 L. La razón por la cual se decidió continuar con ellas es por su buena reproducibilidad, factor muy importante en la industria. A continuación, las mismas se sometieron a procesos de caracterización que nos permitieron comprender su comportamiento en diferentes medios, su estructura y composición. Dentro de las técnicas de caracterización utilizadas se encuentran MET, FTIR, espectroscopía UV-Visible, BET, DLS, potencial Zeta.

▣ Introducción

Partículas Core Shell

Las partículas del tipo *Core Shell* están formadas por un núcleo que puede ser un óxido metálico, metal o un polímero. Su envoltura ha de estar formada por otro material que podría ser silícea, polimérica, metálica, etc. Por lo tanto, las propiedades fisicoquímicas de las partículas formadas difieren de las propiedades de sus componentes por separado.

La sílice es un elemento químico que puede aportar estabilidad a la suspensión. A su vez, protege a las nanopartículas del *Core* sin reaccionar con las mismas. Cuando se somete a la suspensión a un barrido espectral en el UV-Visible, las nanopartículas de plata podrán ser detectadas debido a que la sílice es ópticamente transparente, lo que se observará en este caso, es un corrimiento del máximo de absorción de las NpsAg hacia mayores longitudes de onda.

Polifenoles

Los compuestos polifenólicos se encuentran presentes en hojas, frutos, semillas, etc, de organismos vegetales. Los mismos han demostrado tener propiedades biológicas muy interesantes, entre ellas como antioxidantes, anticancerígenos (Hu et al., 2011); (Vladimir-Kneevi et al., 2012), moduladores de la comunicación célula-célula de microorganismos (Quecan et al., 2019); (Gopu et al., 2015); (Paczkowski et al., 2017) entre otras.

Los polifenoles son compuestos químicos que se caracterizan por tener más de un anillo bencénico en su estructura molecular, siendo en general dos anillos aromáticos (A y B) unidos por una cadena lineal de 3 carbonos que pudieran formar o no un tercer anillo (C). A su vez, uno o más grupos de hidroxilos (-OH) unidos a uno o más de sus anillos bencénicos.

A continuación, se muestra la clasificación de polifenoles (**Tabla 1**):

Tabla 1: Clasificación de polifenoles. Los compuestos resaltados en negrita son los que utilizamos en el presente trabajo.

Polifenoles	Ácidos fenólicos	Hidroxicinamicos (Cafeico) Hidroxibenzoicos (Elágico)
	Flavonoides	Flavononas (Naringenina) Flavonoles (Quercetina) Flavanoles (Catequinas) Antocianidinas (Pelargonidina) Isoflavonas (Genisteina)
	Estilbenos	Resveratrol
	Lignanós	---

En la **figura 1** se muestran las estructuras químicas de los polifenoles utilizados en el trabajo de tesis:

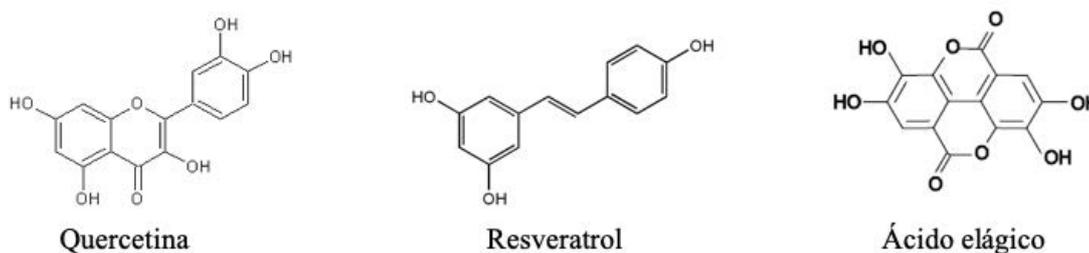


Figura 1: Fórmula química de los polifenoles utilizado en el trabajo de tesis.

▣ Materiales y métodos

A continuación, se describen los dos procedimientos utilizados para la síntesis de las partículas *Core Shell*. La primera síntesis utilizada estuvo basada en el método descrito por Yoon en el año 2007 (Yoon et al., 2007).

Síntesis de partículas Core Shell (NpsAg@SiO₂), en dos etapas (CS-1)

Para la **primera etapa** de síntesis de las NpsAg@SiO₂, se utilizaron los siguientes reactivos:

Nanopartículas de plata sintetizadas en el laboratorio NpsAg (Lote: 02052018), agua deionizada, etanol (Qca. Callegari), hidróxido de amonio 30% (Sigma Aldrich), tetraetoxisilano (TEOS) 98% (Sigma Aldrich) CAS 78-10-4.

Para la **segunda etapa** de síntesis de las NpsAg@SiO₂, se utilizaron los siguientes reactivos:

Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Sigma Aldrich), etanol e isopropanol (Qca. Callegari), hidróxido de amonio 30% (Sigma Aldrich), tetraetoxisilano (TEOS) 30% (Sigma Aldrich), agua desionizada.

Los materiales utilizados para ambas etapas fueron:

Platina con control de agitación y temperatura (Faithful), barra magnética para agitación, balanza analítica (Mettler Toledo), frasco de vidrio 250 ml (Sigmax), probetas de vidrio, pipetas automáticas p 200, p1000 (Dragonlab®), estufa de secado (Venticell), mufla (Nabertherm).

Procedimiento

Primera etapa

Se mezclaron 20 ml de una combinación de alcoholes (etanol e isopropanol 50:50) con 4 ml de hidróxido de amonio (30 %) y 0,5 ml de las NpsAg, bajo condiciones de agitación a 300 rpm y 35 °C. A continuación, se adicionó el TEOS en 5 alícuotas de 40 µL, para un volumen final de 200 µL. La agitación se mantuvo por 6 h. Luego de alcanzar las 6 h de agitación, se procedió a centrifugar la muestra con la finalidad de separar las partículas formadas y continuar con la segunda etapa del proceso, donde se suman capas de sílice. La centrifugación se llevó a cabo a 12.000 rpm por un lapso de 15 minutos

utilizando tubos de microcentrífuga de 2 ml. A continuación, se retiró el sobrenadante y se adicionó agua desionizada, luego se resuspendió el precipitado y se repitió el proceso de centrifugación (15 minutos a 12.000 rpm).

Segunda etapa

Para esta segunda etapa se disolvió 30 mg de CTAB en una mezcla etanol (6 ml) y agua desionizada (10 ml) bajo agitación vigorosa. Una vez que el CTAB se disolvió por completo, se agregó 0,1 ml de hidróxido de amonio (30%) y se dejó agitando por 5 minutos. A continuación, se adicionaron 2 ml de las partículas obtenidas en la **primera etapa**. Inmediatamente se agregaron 12 alícuotas de 5 μ L de TEOS. Se dejó agitando la mezcla por 48 h a 300 rpm y 35°C.

Luego de transcurridas las 48 h, se continuó con el proceso de centrifugación de las partículas, que constó de dos etapas de centrifugaciones a 12.000 rpm por 10 minutos, intercalando lavados y resuspensión en agua desionizada. Al sólido precipitado se lo sometió a procesos de secado en estufa por 24 h a 110°C, y calcinado en rampas de calentamiento a 350°C durante 30 minutos y 550°C durante 4 horas.

Síntesis de partículas Core Shell (NpsAg@SiO₂), en base acuosa (CS-2)

La síntesis utilizada es una modificación de la descrita por Shah en el año 2014. (Shah et al., 2014).

Para la síntesis de partículas *Core Shell* en base acuosa los reactivos utilizados fueron:

Nanopartículas de plata sintetizadas en el laboratorio NpsAg (Lote: 02052018), agua desionizada, hidróxido de amonio 30% (Sigma Aldrich), 3-(mercaptopropil) trimetoxisilano –MPTMS-(Evonik) CAS 4420-74-0.

Los materiales utilizados para la síntesis a escala **laboratorio** fueron:

Platina con agitación y temperatura (Faithful), balanza analítica (Mettler Toledo), frasco de vidrio 250 ml (Sigmax), probetas de vidrio, pipeta p 200, p1000 (Dragonlab®), barra magnética para agitación, estufa de secado (Venticell), mufla (Nabertherm).

Los materiales utilizados para la etapa de **escalado** en reactor de 4 L (**Figura 2**), fueron:

Reactor de 4L de vidrio con camisa y agitador de paleta (teflón), baño termostaticado (Lauda), mangueras, pipeta p 10.000 (Eppendorf), balanza analítica (Mettler Toledo), balanza granataria (Ohaus).



Figura 2: Sistema utilizado para realizar síntesis de las partículas *Core Shell*, siendo la capacidad máxima del reactor de 4 L.

Procedimiento

Para iniciar el ensayo, se debió pre-hidrolizar el MPTMS. Para ello se mezcló 0,1 ml de MPTMS con 30 ml de agua desionizada a 25°C bajo agitación vigorosa durante un tiempo de 45 minutos o hasta que no se observó reactivo sin disolver. A continuación, se adicionaron 0,3 ml de hidróxido de amonio (20%), siendo el valor del pH final igual a 10. Al final del proceso, se adicionó 20 ml de NpsAg (Lote: 02052018). La mezcla se continuó agitando durante 5 h a 25°C. Para el escalado se realizaron los cálculos pertinentes para un volumen final de 3 L. En la **figura 3** se muestra un esquema de lo que ocurre durante la síntesis de las partículas.

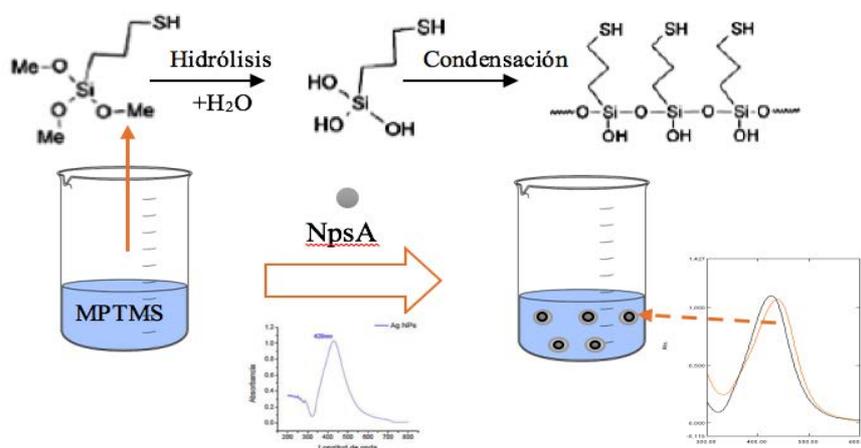


Figura 3: Representación de la síntesis de las partículas *Core Shell* y espectros de los plasmones superficiales correspondientes a la NpsAg (negro) y NpsAg formando parte en del Core (naranja) de las partículas.

Proceso de secado y calcinado de las muestras: La etapa de secado se efectuó en primer instancia utilizando el secador por spray (*Lab Plant – SD Basic*) (**Figura 4**), y a continuación a una tanda de partículas (**CS-2-A**) se las calcinó en mufla utilizando una rampa de temperaturas 30 min a 350 °C y 4 h a 550 °C y a otro grupo (**CS-2-B**) se los expuso, únicamente, a secado en estufa a 130 °C durante 6 h, sin pasar por un proceso de calcinación en mufla.



Figura 4: Secador por spray Lab Plant (SD-Basic) utilizado para secar las partículas.

Adsorción de polifenoles sobre las nanopartículas *Core Shell* (NpsAg@SiO₂- (Polifenoles)).

Los materiales utilizados fueron:

Balanza analítica (Mettler Toledo), espectrofotómetro (Shimadzu UV1800), shaker (Venticell), vidrio de reloj, vasos de precipitado, platina con agitación y temperatura (Faithful), barra agitadora magnética, espátulas.

Los reactivos utilizados fueron:

Resveratrol (pureza 99%) (extracto de *Polygonum Cuspidatum*) **quercetina** (pureza 99%) (extracto de *Sophora Japonica*), **ácido elágico** (pureza 40%) (extracto de cáscara de granada) todos comprados en la empresa *Natural field*, etanol (Qca. Cellegari), partículas *core shell*.

A cada polifenol, por separado, se los disolvió en medio etanólico y luego se adicionaron las partículas NpsAg@SiO₂-SH al sistema (**Figura 5**).

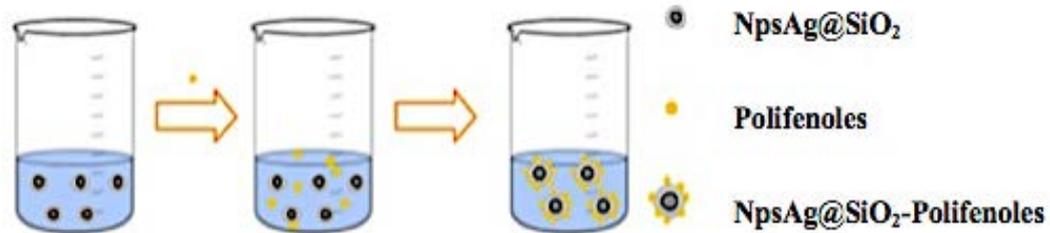


Figura 5: Esquema de la adsorción de los polifenoles sobre las partículas *Core Shell*.

Agregado de Quercetina en la etapa de síntesis de las partículas *Core Shell*

En este caso, se probó de agregar quercetina directamente en el proceso de elaboración de las partículas *Core Shell* (**Figura 6**). Lo que nos permitió este ensayo, es evaluar si era posible obtener las partículas *Core Shell* con los polifenoles adsorbidos en un sólo *batch*, y de esta forma optimizar tiempos y costos. En base a estos resultados, se decidió evaluar de hacer lo mismo con resverastrol y ácido elágico.

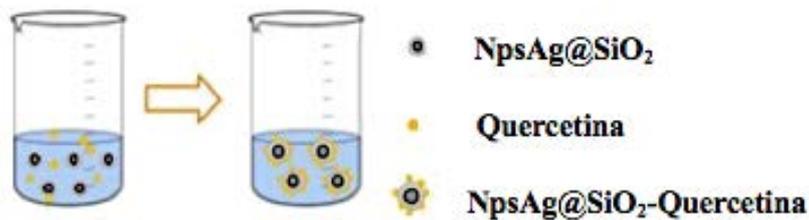


Figura 6: Representación de la síntesis de las partículas *Core Shell* y adición de quercetina en un mismo *batch*.

Procedimiento

Opción 1:

Inicialmente se pre hidrolizó el MPTMS en agua desionizada. Para ello se mezcló 0,1 ml de MPTMS con 30 ml de agua desionizada, a temperatura ambiente bajo agitación vigorosa por un tiempo de 45 minutos o hasta que no se observó reactivo sin disolver. A continuación, se adicionaron 0,20 mg de quercetina y se continuó agitando por 5 minutos, acto seguido se agregó 20 ml de NpsAg. Luego, adicionaron 0,3 ml de hidróxido de amonio (20%), siendo el valor del pH final igual a 10. La mezcla se continuó agitando por 5 h a 25°C.

Opción 2:

Se prehidrolizó el MPTMS. Para ello se mezcló 0,1 ml de MPTMS con 30 ml de agua desionizada, a temperatura ambiente bajo agitación vigorosa por un tiempo de 45 minutos ó hasta que no se observó reactivo sin disolver. A continuación, se adicionaron 0,3 ml de hidróxido de amonio (20%), siendo el valor del pH final igual a 10. Luego, se adicionaron 20 ml de NpsAg y, por último, se agregó 0,20 mg de quercetina. La mezcla se continuó agitando por 5 h a 25°C.

Caracterizaciones fisicoquímicas

Espectroscopía UV-Visible

En este ensayo se midieron y compararon los espectros en el UV-Visible [300-600] nm, para las NPsAg y *Core Shell*.

Los materiales utilizados en la caracterización fueron:

Espectrofotómetro (Shimadzu UV1800), cubetas de plástico descartables de 1,5 ml y paso de luz de 10 mm, pipetas p200 p1000 (Dragonlab®).

Las partículas analizadas fueron:

- NpsAg
- NpsAg@SiO₂
- NpsAg@SiO₂-(Polifenoles)

Procedimiento

La medición se realizó frente a una solución blanco que, en estos casos, fue agua desionizada. El barrido espectral se realizó a partir de los 300 nm hasta 600 nm.

NpsAg@SiO₂: Se tomaron 400 µL de las nanopartículas y se agregaron 1100 µL de agua desionizada (en dos alícuotas de 550 µL), se mezcló la muestra por agitación. Se compararon los espectros de las NpsAg con el obtenido para NpsAg@SiO₂.

NpsAg@SiO₂-(Polifenoles): Se tomaron 400 µL de las nanopartículas y se agregaron 1100 µL de agua desionizada (en dos alícuotas de 550 µL), se mezcló la muestra por agitación. Se compararon los espectros de las NpsAg, NpsAg@SiO₂ con NpsAg@SiO₂-(Polifenoles).

Microscopía Electrónica de Transmisión

Las caracterizaciones en MET se realizaron en el Instituto de Biología Celular y Neurociencia (IBCN-LANAIS-MIE), siendo el Microscopio Electrónico de transmisión Zeiss EM 109T equipado con cámara digital Gatan ES1000W.

Las partículas analizadas fueron:

- NpsAg@SiO₂
- NpsAg@SiO₂-(Polifenoles)

Procedimiento

El procedimiento se basó en depositar pequeñas gotas de las partículas en agua desionizada sobre rejillas de cobre recubiertas de carbono, luego de un minuto el líquido se absorbió con papel de filtro (Whatman no. 4), las mismas quedaron listas para observar.

Caracterización de las partículas NpsAg@SiO₂-(Polifenol), utilizando espectroscopía infrarroja con modulo de reflectancia (FTIR-ATR)

El equipo que se utilizó para la realización del ensayo fue:

Nicolet™ iS™ 50 ATR-IR Spectrometer – Thermo Fisher Scientific.

Las partículas caracterizadas fueron:

- NpsAg@SiO₂
- NpsAg@SiO₂-Polifenoles
- Polifenoles: Quercetina, resveratrol, ácido elágico

Procedimiento

Se tomaron aproximadamente 10 mg de partículas. A continuación, se colocaron en el módulo ATR y se realizó la medida. El equipo se limpió con solución alcohólica, pre y post uso.

Los datos se obtuvieron mediante el uso del programa OMNIC 8™ Spectra *Software* - Thermo Fisher Scientific.

El análisis se efectuó comparando los resultados obtenidos con la bibliografía.

Cinética de liberación de Ag^+ de las partículas NpsAg@SiO_2 y NpsAg@SiO_2 -Polifenoles.

Los materiales utilizados en la caracterización fueron:

Tubos de plástico de 15 ml, pipetas p200 y p1000 (Dragonlab®), shaker (Venticell), medidor multiparamétrico, electrodo ión selectivo (ISE) plata.

Las partículas analizadas fueron:

- NpsAg@SiO_2
- NpsAg@SiO_2 -Polifenoles (Quercetina, resveratrol, ácido elágico)

Procedimiento

Se pesaron 1,0 mg de partículas y se las colocó en tubos de 15 ml con 10 ml de agua desionizada. Se realizó una primer medida a tiempo cero y se agitó mediante el uso de vórtex. Las medidas se realizaron en intervalos de 1 hora.

Calibración del electrodo

Los reactivos utilizados fueron:

Solución estándar de nitrato de plata, agua desionizada.

Los materiales utilizados fueron:

Matraces de vidrio aforados, medidor multiparamétrico Hanna® HI-5521, electrodo ión selectivo combinado (ISE) plata/sulfuro HI-4115, agitador magnético.

Procedimiento

La calibración del electrodo se llevó a cabo directamente utilizando el modo de medición ISE con estándares de AgNO_3 de concentración conocida en el rango $[1 \times 10^{-6}$ - $0,1]$ M.

A continuación la medida se realizó directamente con el electrodo arrojando la concentración Molar de los iones Ag^+ detectados. Para realizar los cálculos se tuvo en cuenta el volumen de agua adicionada y la cantidad de partículas pesadas.

Medición de porosidad y área superficial utilizando el método BET (Brunauer, Emmett y Teller).

El estudio se realizó utilizando el equipo *Quantosorb de Quantochrome Corp.* El equipo permite llevar a cabo la adsorción del gas nitrógeno A 77,5 K en la que el mismo se comporta como un líquido en un modo de flujo dinámico. De este modo se logra determinar el área superficial real de las muestras y la distribución de tamaños de porosidad.

Las partículas analizadas fueron:

- NpsAg@SiO₂ (calcinadas) (CS-2-A)
- NpsAg@SiO₂ (sin calcinar) (CS-2-B)

Porosidad por método BET

El modelo se fundamenta en los siguientes puntos:

- ▣ La adsorción se efectúa en una serie de sitios fijos.
- ▣ Los sitios son energéticamente idénticos.
- ▣ No se consideran las interacciones laterales entre las moléculas adsorbidas (adsorbato-adsorbato).

Determinación de la concentración NpsAg como Ag⁺ en el core de las partículas Core Shell

El ensayo se realizó en la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), en la división de servicios analíticos. El análisis se efectuó por ICP-Masas. El tratamiento que se realizó a la muestra sólida fue tratamiento con ácido nítrico fumante para disolver la sílica y pasar las Ag⁰ a Ag⁺, de modo de realizar la medida.

Determinación de tamaño de partícula por *Dynamic Light scattering* y Potencial Zeta

La determinación del radio hidrodinámico y potencial zeta (ξ) de las partículas se realizó en el Instituto de Nanosistemas INS-UNSAM, utilizando el equipo *Brookhaven instrument*. Las determinaciones de DLS se realizaron resuspendiendo las partículas en medio acuoso y etanólico.

Isotermas de adsorción de los polifenoles sobre partículas *Core shell*

Los materiales utilizados fueron:

Espectrofotómetro (Shimadzu UV1800), cubetas de plástico descartables de 1, 5 ml y paso de luz de 10 mm, pipetas p200 p1000 (Dragonlab®).

Las partículas analizadas fueron:

- NpsAg@SiO₂
- NpsAg@SiO₂-Polifenoles (Quercetina, resveratrol y ácido elágico)

Curva de Calibración

Se prepararon soluciones de concentraciones conocidas [0,1-2,0] mg/ml de quercetina, resveratrol y ácido elágico, en matraz aforado. A continuación, se midió el valor de absorbancia a la longitud de onda característica para cada molécula, pudiéndose construir la curva de Absorbancia *versus* Concentración (mg/ml).

Procedimiento

Se prepararon soluciones, por triplicado, de cada polifenol a distintas concentraciones, desde 0,1 mg/ml a 2,0 mg/ml, en etanol 96°. A continuación, se adicionó a cada tubo la misma cantidad de partículas *Core shell* (2,5 mg). Luego, las muestras se dejaron agitando a 100 rpm durante 18-24 h a 25 °C. Una vez transcurrido ese tiempo, las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos y se analizó el sobrenadante de cada muestra midiendo absorbancia a sus respectivas longitudes de onda (**Tabla 2**), respetando los máximos de absorción para cada polifenol.

Tabla 2: Máximos de absorción de los polifenoles, quercetina, resveratrol y ácido elágico.

Polifenoles	Máximo de absorción UV-Visible (nm)
Quercetina	368
Resveratrol	312
Ácido elágico	362

Para analizar las isotermas de adsorción se recurrió a dos modelos, el modelo de *Langmuir* y el de *Freundlich*.

Modelo de *Langmuir*

Se usó el modelo de *Langmuir* para realizar los ajustes correspondientes a cada isoterma. Este modelo plantea que la interacción entre el sorbato (polifenoles) y el sorbente (partículas *Core Shell*) es homogéneo, siendo los sitios de unión homogéneos, es decir que sus sitios de unión son idénticos y equivalentes entre sí. Este proceso ocurrirá hasta que se complete la monocapa en la superficie del sorbente y una vez que una molécula ocupa un sitio, no se puede absorber otra en el mismo sitio. En esta situación cada molécula posee entalpías constantes y en la gráfica se observará una meseta en el equilibrio siendo el mismo el punto de saturación. La teoría de *Langmuir* relaciona la rápida disminución de las fuerzas de atracción intermoleculares, conforme aumenta la distancia.

La ecuación de *Langmuir* está representada por la siguiente ecuación:

$$q_e = (q_m \cdot K_a \cdot C_{eq}) / (1 + K_a \cdot C_{eq}) \quad (1)$$

Siendo:

q_e : capacidad de adsorción en el equilibrio (mg/ml)

q_m : capacidad máxima de adsorción (mg/ml)

C_{eq} : concentración de la molécula en el equilibrio (mg/ml)

K_a : constante de equilibrio

Modelo de *Freundlich*

El otro modelo que se utilizó es el de *Freundlich*. Este modelo es un modelo empírico que ajusta mejor cuando los sitios de interacción entre el sorbato y el sorbente son heterogéneos, describiendo una adsorción no ideal y reversible, que no se encuentra restringida a la formación de la monocapa sino de multicapas. También supone que a medida que aumenta la concentración de adsorbato se suma a la superficie del adsorbente.

La ecuación del modelo de *Freundlich* es la siguiente:

$$q_e = K_F \cdot C_e^{1/n} \quad (2)$$

Siendo:

q_e : capacidad de adsorción en el equilibrio (mg/ml)

K_F : constante de *Freundlich*

C_e : concentración de la molécula en el equilibrio (mg/ml)

n: parámetro arbitrario

Cinéticas de adsorción de polifenoles

Los materiales utilizados en la caracterización fueron:

Espectrofotómetro (Shimadzu UV1800), cubetas de plástico descartables de 1, 5 ml y paso de luz de 10 mm, pipetas p200 p1000 (Dragonlab®), shaker (Venticell).

Las partículas analizadas fueron:

- NpsAg@SiO₂
- Polifenoles (Quercetina, resveratrol, ácido elágico)

Procedimiento

Se pesó 1,0 mg de partículas y a continuación se las incubó con 1ml de cada uno de los polifenoles a una concentración de 1,0 mg/ml con etanol como solvente (preparados en matraces de vidrio aforados).

A los tubos se los incubó en estufa a 35°C con agitación a 100 rpm y se tomó muestra de sobrenadante a cada hora previo centrifugación a 12.000 rpm. Se midió la absorbancia en espectrofotómetro al máximo de absorción de cada polifenol (**Tabla 2**).

Los valores de absorbancia obtenidos se ingresaron a sus respectivas curvas de calibración (Absorbancia tomada del máximo de absorción propio de cada polifenol (**Tabla 2**) versus concentración (mg/ml)), este valor se corresponde con la cantidad de polifenol que no se adsorbió sobre la superficie de las partículas. Por lo tanto, la determinación fue indirecta, es decir que se obtuvo de restar éste último valor de concentración a 1 mg/ml de polifenol. Ver curvas de calibración de cada polifenol en el ANEXO adjunto.

Determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM).

Se utilizó el procedimiento descrito en el capítulo 3, página 33.

▣ Resultados

Síntesis de NpsAg@SiO₂ en dos etapas (CS-1)

Se logró sintetizar las partículas *Core Shell* (CS-1) se sintetizaron según método descrito en bibliografía (Yoon et al., 2007), observándose en las micrografías MET (**Figura 7**), partículas monodispersas con un *Shell* de sílice (color gris claro) y un *Core* de NpsAg (color negro). A su vez, se vió que el espectro (UV-Visible) de las partículas CS-1 tiene un leve corrimiento a la zona de mayores longitudes de onda, en comparación con el espectro de las NpsAg, lo cual nos da un indicio de su formación. Ello se debe a un aumento en el índice de refracción de la capa de sílice que rodea a las NpsAg.

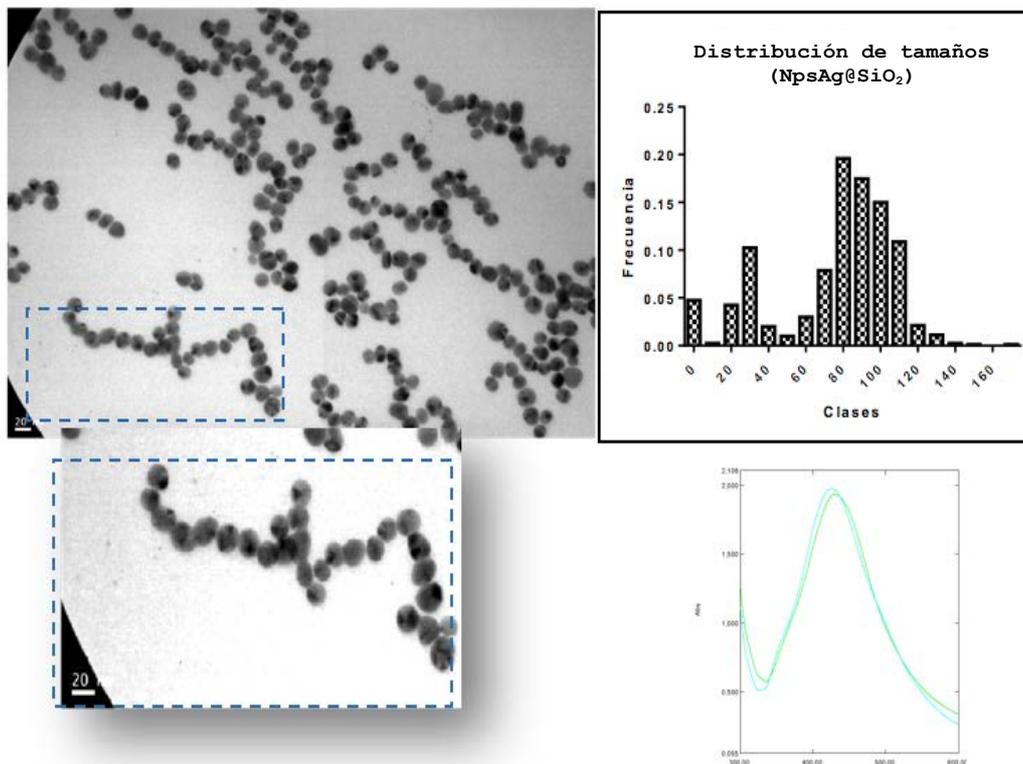


Figura 7: MET de las partículas *Core Shell*, distribución de tamaños de las partículas y espectros de absorbancia del plasmón superficial de las NpsAg (azul) y NpsAg@SiO₂.

Sin embargo, el método de obtención no resultó ser reproducible lote a lote (**Figura 8**), siendo este el motivo por el que no continuamos trabajando con la misma. Los espectros de las partículas CS-1 (**Figura 8-B**) no siempre presentaron corrimiento a la derecha respecto al espectro de las NPsAg, de hecho, no podríamos diferenciarlos.

Cuando estas partículas se observaron en el MET (**Figura 8-A**), se observó que las mismas se encontraban vacías, es decir, que no lograron introducir a las NpsAg en su interior, por lo que el espectro observado corresponde a las NPsAg dispersas en el medio circundante.

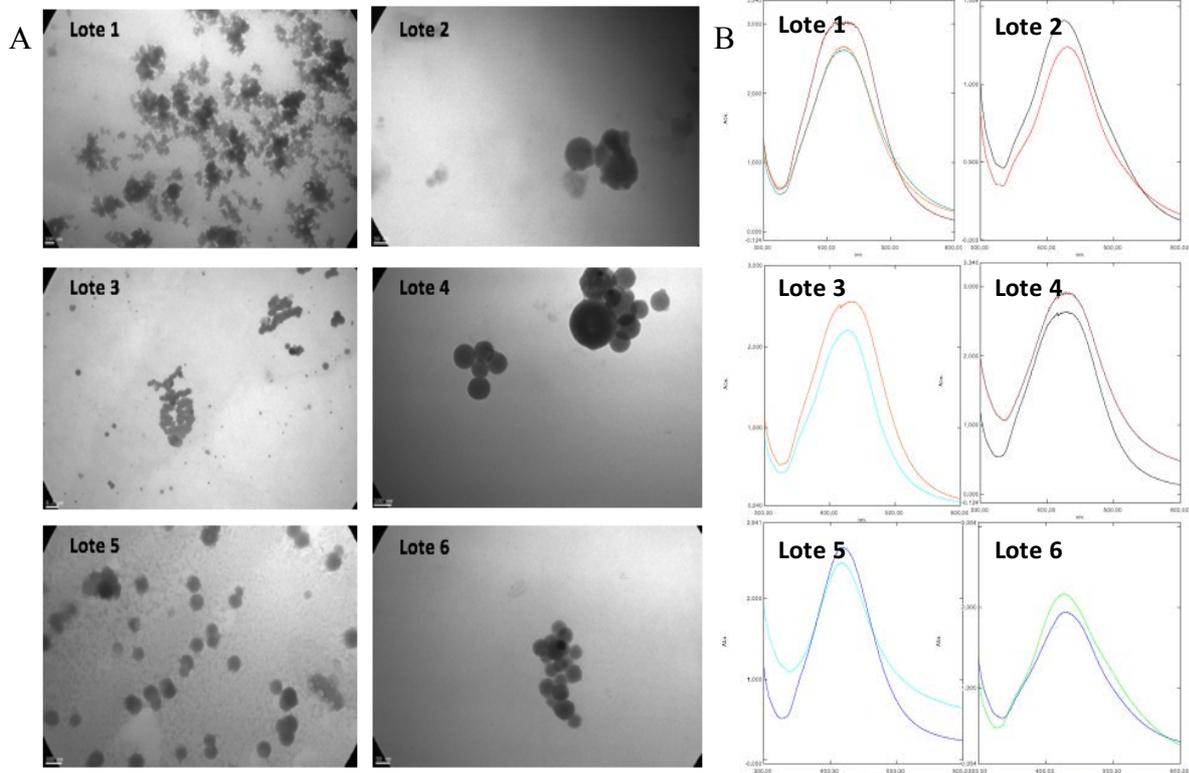


Figura 8: A) MET de la síntesis CS-1 donde se observan partículas vacías y B) sus respectivos espectros de absorción en el UV-Visible.

Síntesis de partículas *Core Shell* en base acuosa (CS-2)

Las partículas del tipo *Core Shell*, se obtuvieron basándose en el método descrito en la sección materiales y métodos del presente capítulo página 57, observándose por MET (**Figura 9-A**) la presencia de una coraza de sílice en un color gris más claro y su núcleo de NpsAg como un punto color negro.

De acuerdo al análisis de distribución de tamaños (**Figura 9-B**), se puede decir que su mayor población posee un tamaño comprendido entre 22 a 30 nm.

Cuando las partículas se sometieron a un análisis en espectrofotómetro en el rango [300-600] nm (**Figura 9-C**), se observó para las NpsAg@SiO₂ un leve desplazamiento del máximo de absorbancia hacia mayores longitudes de onda siendo éste igual a 440 nm, en comparación con el espectro observado para el plasmón superficial de las nanopartículas de plata (síntesis 2) siendo este valor igual a 430 nm.

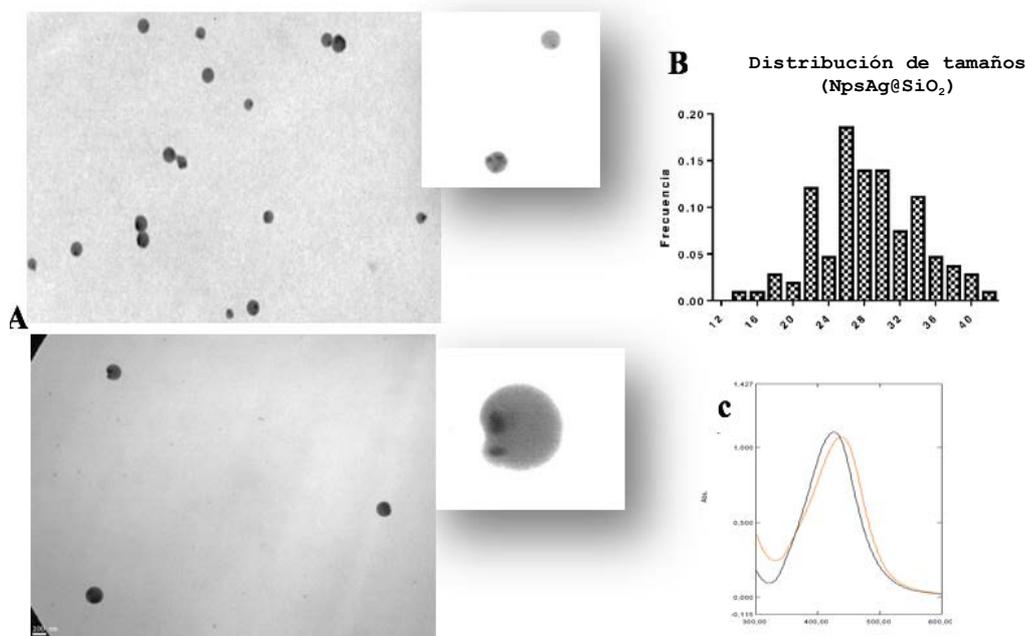


Figura 9: A) MET de partículas *Core Shell*, sintetizadas con 3-(mercaptopropil) trimetoxisilano, como precursor; B) histograma de distribución de tamaños; C) espectro UV-Visible de las NpsAg (negro) con máx-Absorbancia=430 nm vs partículas *Core Shell* (CS-2) (naranja) con Máx.Absorbancia=440 nm.

Cinética de liberación de iones Ag⁺ de partículas *Core Shell* (CS-2-A) y (CS-2-B) sometidas a diferentes tratamientos térmicos

Como se mencionó en materiales y métodos (página 57-58), las partículas se secaron en un secador por spray y a continuación se sometieron a diferentes tratamientos térmicos, por lo tanto, a partir de aquí las mismas se llamarán: **(CS-2-A)** grupo de partículas que se calcinó en mufla utilizando una rampa de temperaturas 30 min a 350°C y 4 h a 550°C y el otro grupo **(CS-2-B)** al cuál se los expuso, únicamente, a secado en estufa a 130°C durante 6 h, sin pasar por un proceso de calcinación en mufla.

Debido a que los tratamientos térmicos a los que se sometieron a las partículas fueron diferentes **(CS-2-A)** y **(CS-2-B)**, y que por ello el comportamiento de liberación de los iones de plata podría verse afectado, se realizó un ensayo de cinética de liberación de Ag⁺ para ambos modelos de partículas (**Figura 10**). Lo que se observó fue que las partículas sometidas a calcinación **(CS-2-A)** (**Figura 10-A**) lograban liberar iones Ag⁺ en medio acuoso, siendo la concentración máxima alcanzada igual a 0,045 mg/ml. Por el contrario, para las partículas sometidas sólo a un proceso de secado en estufa **(CS-2-B)** (**Figura 10-B**), se observó que su liberación fue muy baja, siendo la misma igual a $2,0 \times 10^{-8}$ mg/ml.

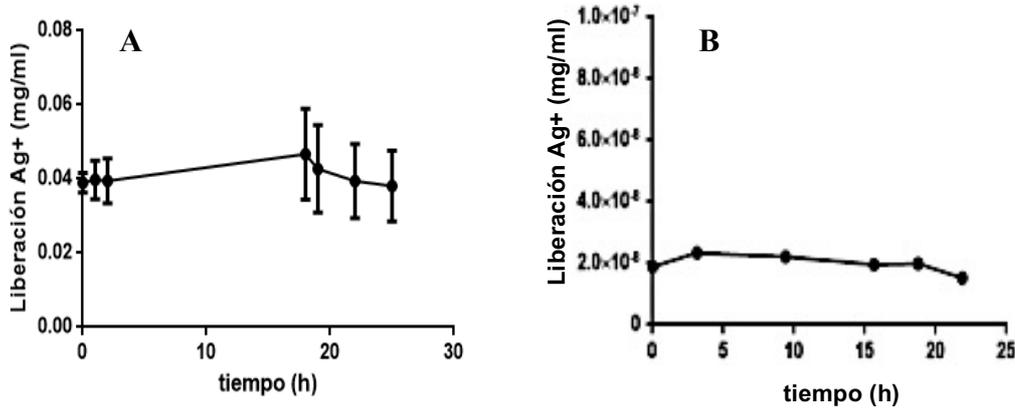


Figura 10: A) Cinética de liberación de iones Ag^+ (mg/ml) de partículas *Core Shell* (CS-2-A) en un lapso de tiempo de 20 horas. B) Cinética de liberación de iones Ag^+ (mg/ml) de partículas *Core Shell* (CS-2-B) sin calcinar en un lapso de 20 horas.

Determinación de porosidad (método BET) de las partículas *Core Shell* (NpsAg@SiO_2) sometidas a diferentes tratamientos térmicos (CS-2-A y CS-2-B).

Respecto a los resultados obtenidos en el ensayo previo, se planteó la hipótesis de que la liberación de los iones Ag^+ desde las partículas CS-2-A (calcínadas) se debió a que durante el proceso de calcinación se formaron “poros” sobre la superficie, y que no habría ocurrido lo mismo para las partículas CS-2-B (secado en estufa). Entonces, se decidió realizar un estudio de área superficial para ambas partículas.

En el ensayo de determinación de área superficial, se observó que las partículas CS-2-A tienen un área superficial ($151,11 \text{ m}^2/\text{g}$) considerablemente superior a las partículas CS-2-B ($38,72 \text{ m}^2/\text{g}$) (**Tabla 3**).

Cuando se analizó la porosidad promedio nos encontramos con que las partículas calcínadas (CS-2-A) poseen tamaños de poros con un diámetro 25% superior en relación a las sin calcinar (**Tabla 3**). Lo que podría estar sucediendo es que al someter a las partículas CS-2-B a un proceso de secado en estufa más lento (6 h a 130°C), pueden tener lugar reacciones de condensación de grupos silanoles formando uniones siloxano, lo que conlleva a la formación de poros más pequeños o incluso al colapso de alguno de ellos, resultando una menor área superficial expuesta. Mientras que en las partículas sometidas al proceso de calcinado (350°C por 30 minutos y 550°C por 4 horas), tales reacciones de condensación no serían tan marcadas.

En consecuencia, CS-2-A tiene una mayor superficie, por ende tienen mayor interacción con el medio circundante y por lo tanto una mayor posibilidad de establecer equilibrios que resultan en la mayor liberación de iones observada.

Con estas determinaciones, decidimos continuar trabajando con las partículas CS-2-A en las siguientes etapas de la tesis.

Tabla 3: Valor del área de superficie y tamaño promedio de poro según método BET para las partículas *Core Shell* que se sometieron a un proceso de calcinación y otras que no se calcinaron post secado por spray.

Partículas	Área de superficie (m ² /g)	Tamaño promedio de poro (nm)
Partículas calcinadas CS-2-A	151,11	3,97
Partículas s/calcinar CS-2-B	38,72	3,16

Espectro FTIR partículas *Core Shell* (NpsAg@SiO₂) (CS-2-A)

El espectro FTIR de las partículas *Core Shell* (**Figura 11**), muestra una banda pronunciada a 1070 cm⁻¹, que se corresponde con la vibración O-Si-O. La banda a 900 cm⁻¹, se asigna a la vibración del enlace Si-OH (Silanol). A menor intensidad, entre 629 y 790 cm⁻¹, se observa un pico que se corresponde al C-S (*stretch*) en el grupo tiol (Catauro et al., 2015)(Polonca Nedeljko et. al., 2016).

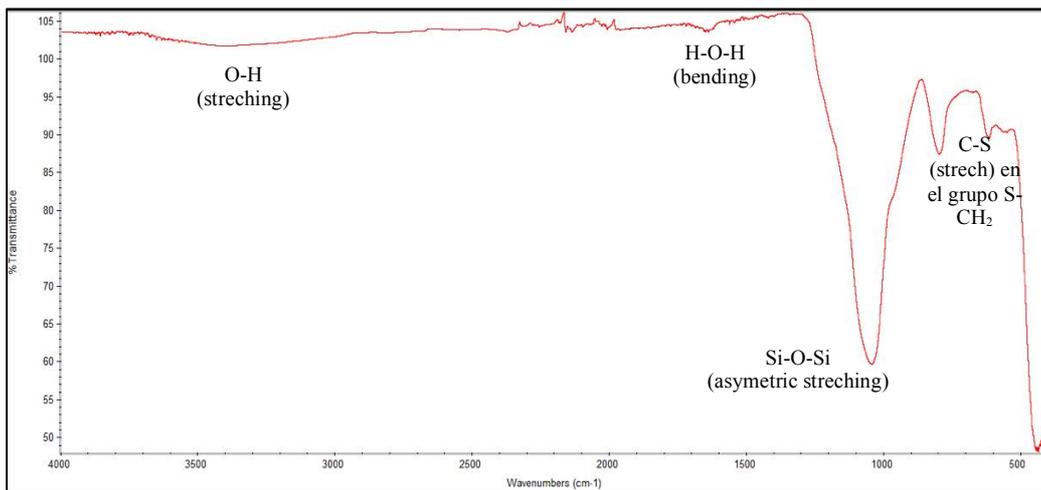


Figura 11: Espectro FTIR de las partículas *Core Shell* sintetizadas en medio acuoso, secadas y calcinadas.

Determinación de la concentración de nanopartículas de plata (mg/g) de Ag⁰ en el interior de las partículas CS-2-A.

A las partículas CS-2-A se les determinó la masa de nanopartículas que se encontraban en su interior. El ensayo se realizó disgregando el *Shell* de silica a través de un tratamiento con ácido fuerte, debido a ello las NpsAg pasaron a estado de oxidación Ag⁺. Por lo tanto, la medición se efectuó de modo indirecto y utilizando un equipo ICP-Masas.

En el ensayo se vio que las partículas *Core Shell* internalizan 16 mg de Ag por gramo de CS-2-A (**Tabla 4**).

Tabla 4: Contenido (mg/g) Ag^0 (nanopartículas de plata) en el interior de las partículas CS-2-A.

Muestra	Concentración Ag^0 (mg/g)
NpsAg@SiO ₂ (CS-2-A)	16 ± 2

Potencial Zeta y diámetro hidrodinámico de las partículas NpsAg@SiO₂ (CS-2-A).

Para continuar con las caracterizaciones de las partículas CS-2-A, se realizó la determinación del potencial Zeta y diámetro hidrodinámico (**Tabla 5**). Se observó que las partículas CS-2-A poseen un potencial Zeta muy bajo negativo, lo cual nos da un indicio de que son poco estables en solución, tendiendo a precipitar, lo cuál también se observó en los coloides. A su vez, se observó que el diámetro hidrodinámico es igual a 1818 ± 259 nm, valor muy superior al establecido por MET (**Figura 9 - página 69**) para las mismas partículas (22-30 nm). Estos resultados nos dan indicios de que las partículas CS-2-A pudieran aglomerarse y por ende precipitar.

Tabla 5: Potencial Zeta y diámetro hidrodinámico de las partículas *Core Shell* (CS-2-A) en medio acuoso.

Partículas	Pot.Zeta (mv)	Dsv Std	Diam.Hidr (nm)	DsvStd
CS-2-A	-6,11	0,27	1812,83	259,03

De acuerdo a los resultados obtenidos hasta aquí, podemos decir que la síntesis seleccionada para realizar el trabajo de tesis doctoral (en medio acuoso), nos permitió obtener partículas del tipo *Core Shell* (CS-2-A). Basándonos en las caracterizaciones y observando inicialmente el espectro UV-Visible, vemos un leve corrimiento hacia la derecha en comparación al espectro de las NpsAg, dándonos el primer indicio de formación de las partículas. A partir de las micrografías de MET, corroboramos su formación y observamos que poseen tamaños que van de 22 a 30 nm, siendo sus núcleos de NpsAg. En medio acuoso las partículas presentan un diámetro hidrodinámico de 1818 nm. Y de acuerdo a los resultados arrojados en la medición de potencial zeta ($-6,11 \pm 0,27$ mV), las partículas no son estables en agua, pudiéndose observar que se aglomeran inmediatamente. La composición de las partículas y sus enlaces se pudieron caracterizar mediante espectroscopía FTIR.

Por otro lado, en el análisis de liberación de iones Ag^+ pudimos observar que cuando las partículas no se someten al proceso de calcinación (CS-2-B), no liberan iones Ag^+ al medio, siendo la concentración de iones Ag^+ liberada igual a $2,0 \times 10^{-8}$ mg/ml, en un lapso de tiempo de 20 h. En cambio, para CS-2-A, luego de transcurridas 20 horas, la liberación de Ag^+ alcanza un valor de 0,045 mg/ml. A continuación, se realizó un estudio del área superficial de ambas partículas para analizar si la baja liberación de los iones Ag^+ en CS-

2-B se debe a la ausencia de poros en su superficie. En el análisis, observamos que las partículas calcinadas poseen un área de superficies considerablemente mayor (151,11 m²/g) respecto a las partículas que no se sometieron al proceso de calcinación (38,71 m²/g), pudiendo ocurrir reacciones de condensación de grupos silanoles formando uniones siloxano, lo que conllevaría a la formación de poros mas pequeños o incluso al colapso de alguno de ellos, resultando una menor área superficial expuesta.

Por lo tanto, entendemos que calcinar las partículas es de superlativa importancia para lograr la liberación de la plata, que difundirá al medio circundante.

▣ **NpsAg@SiO₂-Quercetina (CS-2-A-Quercetina)**

Las partículas CS-2-A se sometieron a un proceso de adsorción con cada uno de los polifenoles en medio etanólico (ver materiales y métodos – Página 58-59).

En las micrografías (**Figura 12**), se pudo observar que las partículas presentan un fino halo claro a su alrededor que podría adjudicarse a la quercetina adsorbida en su superficie. Las partículas conservan su forma.

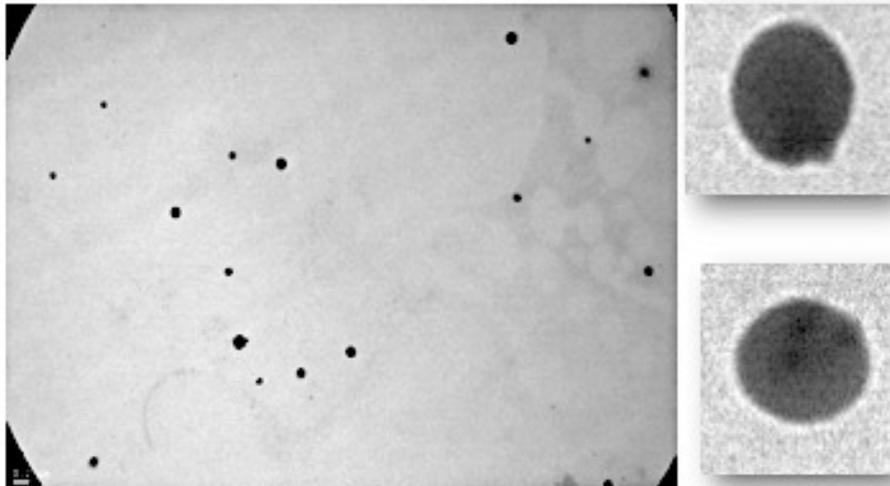


Figura 12: MET de las partículas *Core Shell*, con quercetina adsorbida.

Espectros FTIR

El espectro FTIR para quercetina (**Figura 13**), muestra una banda característica propia del estiramiento (*stretching*) de los grupos OH, detectado entre 3400 a 3280 cm⁻¹. Por otro lado, se detecta una banda a 1379 cm⁻¹, correspondiente a la flexión (*bending*) de los grupos OH de anillos fenólicos. La absorción correspondiente al estiramiento de C=O, se evidencia a los 1666 cm⁻¹. Mientras que los enlaces C=C de los anillos aromáticos se detectan a 1610, 1560 y 1510 cm⁻¹. A los 1317 cm⁻¹, se detecta la banda de flexión del enlace C-H (en el plano), mientras que fuera del plano se evidencian las bandas de flexión C-H a 933, 820 y 600 cm⁻¹. Picos en 1263, 1200 y 1.165 cm⁻¹ se atribuyen al estiramiento C – O en el anillo de éter, estiramiento C – O en fenol y C – CO – C estiramiento y flexión en cetona, respectivamente (Catauro et al., 2015).

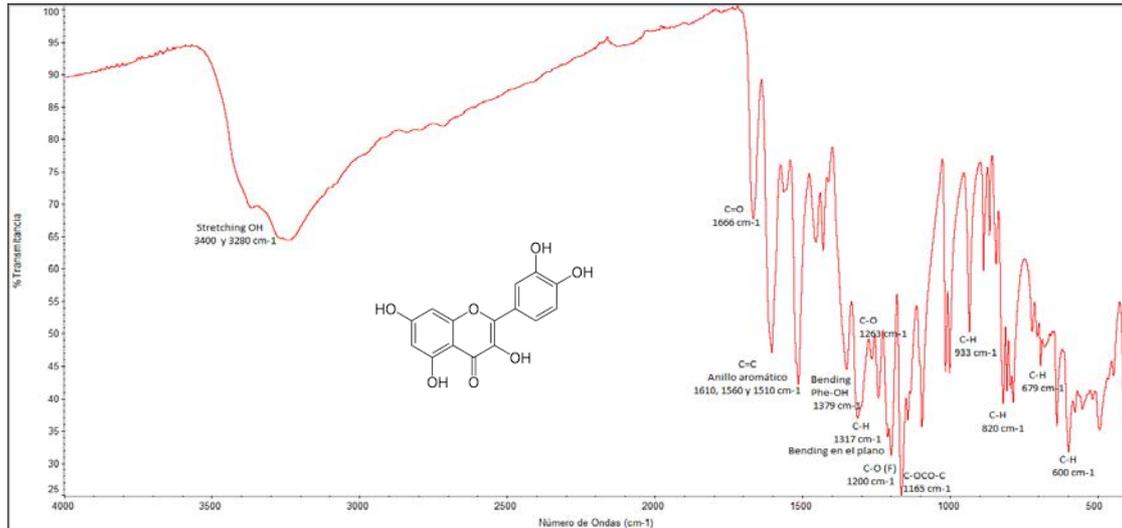


Figura 13: Espectro FTIR de quercetina.

En el espectro de partículas *Core Shell* adsorbidas con quercetina (azul) (**Figura 14**), podemos resaltar los característicos picos pertenecientes a quercetina: una pronunciada banda OH a 3400 cm^{-1} , 2925 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} , 1380 cm^{-1} , 1050 cm^{-1} , 830 cm^{-1} , 650 cm^{-1} y 590 cm^{-1} (Vanaraj Sekar, et al, 2017). Luego se observó una pequeña banda a 1100 cm^{-1} que se atribuye a la vibración O-Si-O de las partículas. La pequeña banda a 900 cm^{-1} , se asigna a la vibración del enlace Si-OH (Silanol). Entre 629 y 790 cm^{-1} , se observa un pico que podría corresponder al C-S (*stretch*) en el grupo tiol.

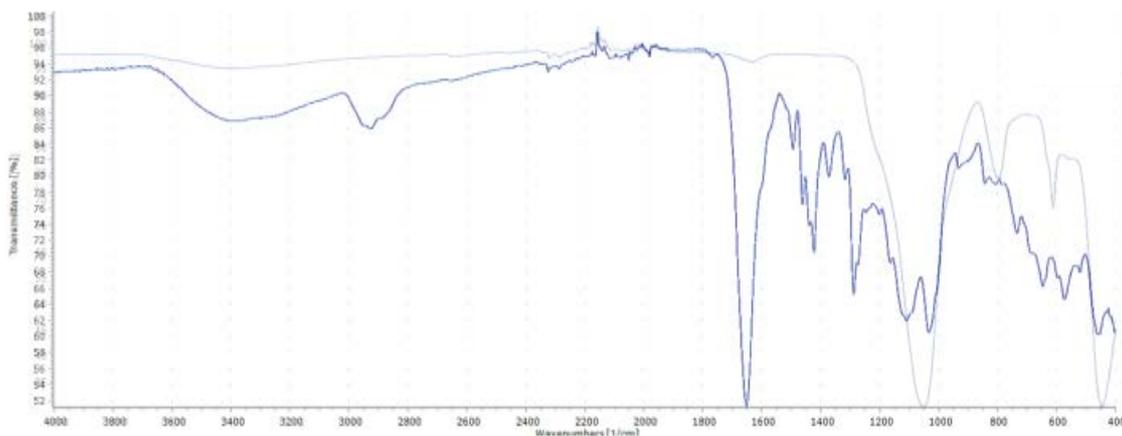


Figura 14: Espectro FTIR de partículas NpsAg@SiO₂ (gris) y NpsAg@SiO₂-Quercetina (azul).

Isoterma de adsorción

A las partículas CS-2-A se las enfrentó a concentraciones crecientes de quercetina para estudiar la capacidad de carga máxima y comprender la interacción del polifenol con la matriz silíceas, a temperatura constante. Para ello se realizó una isoterma de adsorción (**Figura 15**) y se realizaron estudios de su comportamiento utilizando los parámetros experimentales y ajustando a las ecuaciones correspondientes a cada modelo (*Langmuir* y *Freundlich*) (**Tabla 6**).

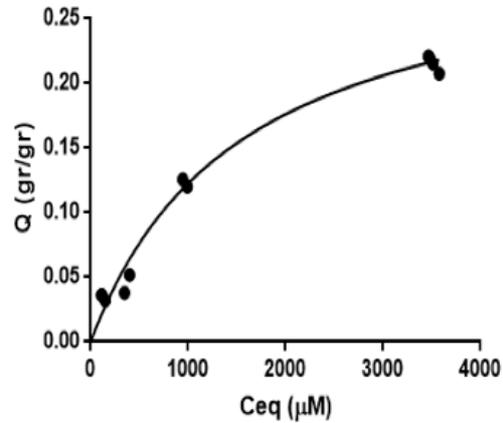


Figura 15: Isoterma de adsorción de quercetina sobre partículas *Core Shell* (NpsAg@SiO₂-SH) a 25 °C.

Tabla 6: Análisis de isotermas según los modelos de *Langmuir* y *Freundlich* para la adsorción de quercetina en partículas *Core Shell* (NpsAg@SiO₂-SH).

Modelo	Parámetro	Valores	Error (R ²)
<i>Langmuir</i>	Q _{max} (gr/gr)	0,303	0,932
	K _a (L/gr)	2,320	
<i>Freundlich</i>	K	0,0000378	0,951
	N	0,613	

Con el estudio realizado se pudo determinar la concentración máxima de adsorción del polifenol, siendo este igual a 0,303 gr/gr.

En los análisis de los distintos modelos se pudo observar que el mejor ajuste se obtuvo con el modelo de *Freundlich*. El mismo tiene como premisa que la interacción entre el sorbato (quercetina) y el sorbente (superficie de las partículas *Core Shell*) es heterogénea y reversible.

Cinética de adsorción/desorción de quercetina

Las partículas CS-2-A fueron sometidas a un estudio que se corresponde con la cinética de adsorción de quercetina sobre su superficie (**Figura 16-A**) y luego la cinética de desorción en medio acuoso y etanólico (**Figura 16-B**).

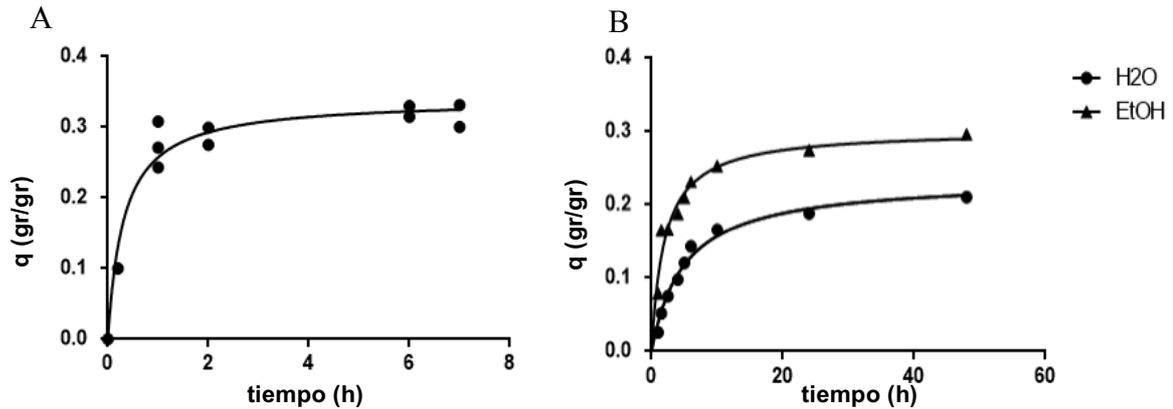


Figura 16: A) Cinética de adsorción de quercetina sobre partículas *Core shell* a 25 °C ($q_{(max)}=0,31$ gr/gr); B) Cinética de desorción de quercetina en medio acuoso (•) ($q_{(max)}=0,235$ gr/gr) y etanólico (Δ) ($q_{(max)}=0,308$ gr/gr) a 25°C.

En los gráficos, en los que se representa la liberación de quercetina en el tiempo (**Figura 16-B**), se observó que, para un lapso de tiempo de 48 horas, encontrándose las partículas dispersas en medio acuoso, el valor de $q_{(max)}$ fue de 0,235 gr/gr; mientras que, para el mismo lapso de tiempo, en medio etanólico, el valor de $q_{(max)}$ fue de 0,308 gr/gr. Considerando que el valor de máxima adsorción de quercetina ($q_{(max)}$) fue de 0,31 gr/gr (**Figura 16-A**), podríamos decir que quercetina ha sido liberada por completo de aquellas partículas que se encuentran dispersas en medio etanólico.

Potencial Zeta y diámetro hidrodinámico

Con la finalidad de poder comparar ambas partículas (CS-2-A y CS-2-A-Quercetina), y de analizar las ventajas y desventajas de modificar la superficie de CS-2-A; se las sometió a un estudio de su potencial Zeta y diámetro hidrodinámico. A su vez, este estudio se realizó en dos medios diferentes (acuoso y etanólico), lo cual nos permitió analizar las posibilidades de utilizar uno u otro medio para la formulación final dependiendo del comportamiento que se observe (**Tabla 7 y Tabla 8**).

Tabla 7: Potencial Zeta y diámetro hidrodinámico para las partículas *Core Shell* y *Core Shell*-quercetina, en medio acuoso.

Medio acuoso				
Partícula	Pot.Zeta (mv)	Dsv Std	Diam.Hidr. (nm)	Dsv Std
CS-2-A	-6,11	0,27	1812,83	259,03
CS-2-A-Q	-33,73	1,13	347,44	20,57

Tabla 8: Potencial Zeta y diámetro hidrodinámico para las partículas *Core Shell* y *Core Shell*-quercetina, en etanol (96°).

Medio etanólico				
Partícula	Pot.Zeta (mv)	Dsv Std	Diam.Hidr. (nm)	Dsv Std
CS-2-A	-8,26	0,90	3778,79	1403,28
CS-2-A-Q	-9,18	0,51	3839,78	1506,43

En base a los resultados obtenidos para las caracterizaciones respecto al potencial Zeta y diámetro hidrodinámico, podemos decir que las partículas *CS-2-A*-quercetina dispersas en medio acuoso (**Tabla 7**), poseen un diámetro hidrodinámico menor respecto a las *CS-2-A* ($347,44 \text{ nm} \pm 20,57$ vs $1812,83 \text{ nm} \pm 259,03$). A su vez, el valor de potencial zeta (**Tabla 7**) para *CS-2-A*-quercetina fue igual a $-33,73 \text{ mv} \pm 1,13$, frente a un valor de $-6,11 \text{ mv} \pm 0,32$ para *CS-2-A*. Estos datos nos dan otro indicio acerca del devenir en la adsorción de quercetina sobre la superficie de las partículas, las cuales estarían reduciendo la aglomeración entre ellas, y por lo tanto arrojando valores más bajos de diámetro hidrodinámico y potencial zeta más grande y negativo.

Por otro lado, cuando las partículas se dispersan en medio etanólico, se observó que el diámetro determinado por DLS, es considerablemente superior al observado en las partículas dispersas en medio acuoso para ambos casos (**Tabla 8**). La explicación podría basarse en la formación de coágulos o flóculos, arrojando valores de tamaño de partículas más elevados respecto a los obtenidos para las mismas partículas dispersas en medio acuoso. Sumado a ello, se observaron valores de potencial Zeta bajos (*CS-2-A*: $-8,26 \text{ mv} \pm 0,90$; *CS-2-A-Q*: $-9,18 \text{ mv} \pm 0,51$), siendo ello un indicador de agregación (**Tabla 8**).

En relación a la similitud en el tamaño de las partículas en medio etanólico, podría deberse a que las partículas que han adsorbido quercetina, hayan liberado gran porcentaje del flavonoide como se observa en el gráfico de la **figura 16-B**, comportándose entonces como partículas sin quercetina.

Cinética de liberación de iones Ag^+ en partículas *CS-2-A-Quercetina*

A las partículas *CS-2-A-Quercetina* le realizamos un estudio de liberación de los iones Ag^+ (**Figura 17**), con la finalidad de compararlo con el mismo ensayo efectuado para las partículas sin quercetina adsorbida (**Figura 10-A**), y determinar si la adsorción del polifenol interfiere con la liberación de plata.

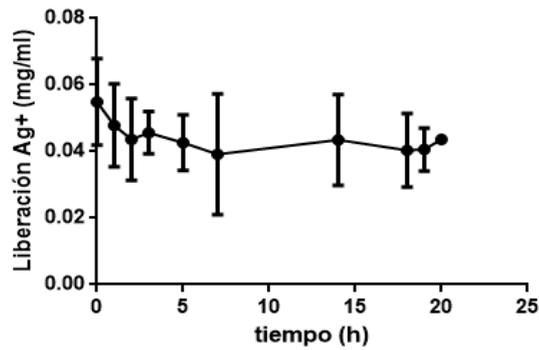


Figura 17: Liberación de iones Ag^+ mg/ml de partículas *Core Shell*-Quercetina versus tiempo (horas).

Se observó que la concentración de iones Ag^+ liberados por las partículas *Core Shell* adsorbidas con quercetina (**Figura 17**) es similar al obtenido para las partículas sin polifenoles adsorbidos (**Figura 10-A**), siendo la concentración promedio 0,04 mg/ml.

Por lo tanto, la adsorción de quercetina no estaría interfiriendo en la liberación de los iones de plata.

Inicialmente, se observó que los iones Ag^+ disminuyen su concentración de 0,06 mg/ml hasta estabilizarse en 0,045 mg/ml. Entonces, quercetina podría estar actuando como agente reductor de los iones Ag^+ a Ag^0 (NpsAg) (Vanaraj Sekar, et al, 2017), (Chahardoli, et.al.,2021).

▣ **Opciones para partículas *Core Shell* con quercetina adicionadas en el mismo *batch***

Con la finalidad de evaluar la posibilidad de adicionar los polifenoles en el medio de reacción y realizar todo el proceso en un solo paso, sin la necesidad de pasar por los procesos de secado y calcinación de las muestras para finalmente modificarlas con los polifenoles, es que evaluamos dos opciones de síntesis contrastando los resultados con microscopías y espectros de absorción UV-Visible (**Figuras 18 y 19**).

Opción 1: Quercetina adicionada luego del pre hidrolizado de MPTMS

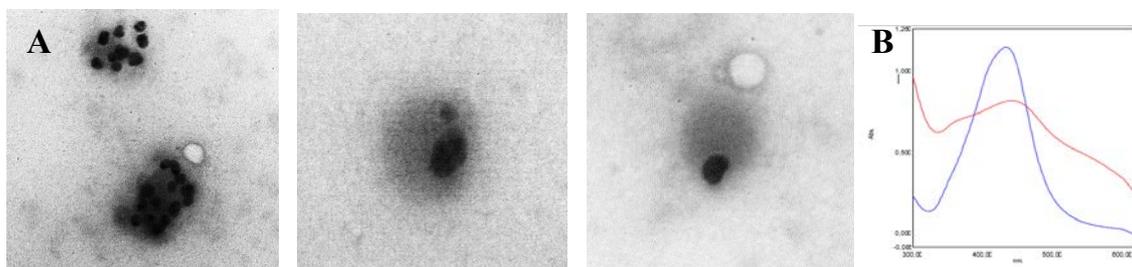


Figura 18: A) MET de las partículas *Core Shell*, siendo quercetina el segundo componente adicionado luego de MPTMS; B) Espectro UV-Visible de NpsAg (Azul) y NpsAg@SiO₂ + Quercetina (Rojo), se observa un corrimiento a la derecha de las partículas *Core Shell*, respecto a las NpsAg, y se ve un hombro a 368 nm, que se correspondería a quercetina.

Opción 2: Adición de quercetina como último componente del *batch*.

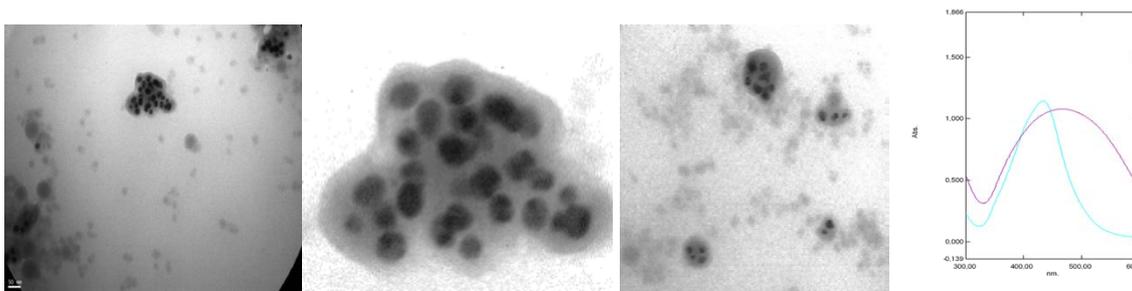


Figura 19: MET de las partículas obtenidas luego de la síntesis (opción 2), donde se realiza la síntesis de partículas *Core Shell* y al final se adiciona quercetina. El respectivo espectro de absorción en el UV-Visible se visualiza a la derecha. NpsAg (celeste) y NpsAg@SiO₂ + Quercetina (Violeta), se observa un corrimiento del máximo de absorción hacia la derecha de las partículas *Core Shell*, respecto a las NpsAg.

En las micrografías (**Figuras 18 y 19**), podemos observar que las partículas *Core Shell*, se encuentran rodeadas por una matriz, que podría ser de sílice y quercetina (aspecto de nube). Las partículas obtenidas con estas dos metodologías no resultaron viables para la formulación del producto final debido a que no resultaban ser unidades monodispersas sino más bien un aglomerado de ellas, no siendo un activo posible para la industria.

A partir de aquí, los criterios utilizados para realizar los ensayos son los mismos que los detallados para quercetina. Por lo tanto, a continuación, para resverastrol y ácido elágicos, se verán los resultados y sus análisis correspondientes a figura o tabla.

▣ NpsAg@SiO₂-Resveratrol (CS-2-A-Resveratrol)

En las imágenes de microscopía (**Figura 20**) se observó a las partículas *Core Shell* rodeadas de un halo más claro que podría adjudicarse a resverastrol adsorbido sobre la superficie de las partículas.

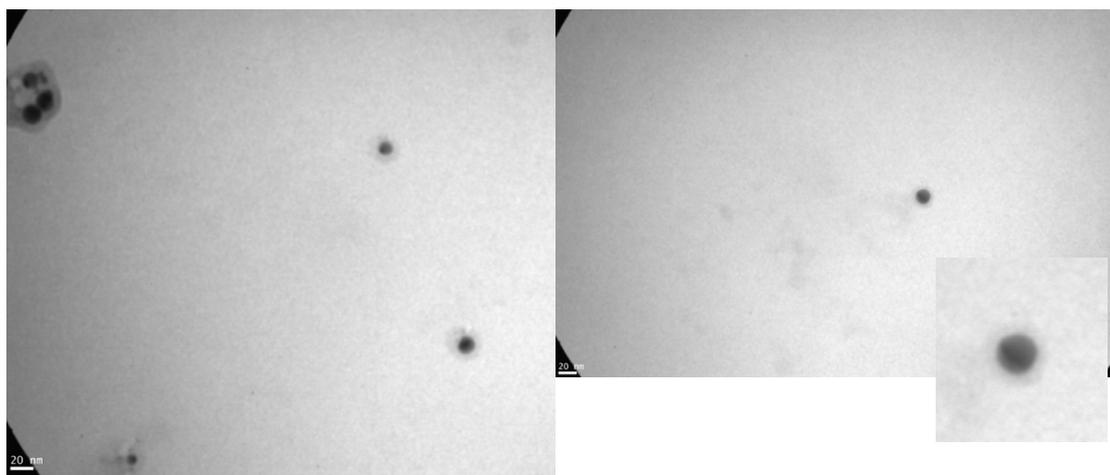


Figura 20: MET de partículas *Core Shell*, adsorbidas con resveratrol.

Espectros FTIR

En el espectro de FTIR (**Figura 21**) obtenido para resveratrol, se pudo identificar una banda a 3192 cm^{-1} adjudicada al estiramiento de los grupos fenólicos (-OH) presentes en la molécula. La banda de baja intensidad presente a 3017 cm^{-1} está relacionada con el estiramiento axial =C-H del hidrógeno aromático, confirmando la presencia de una insaturación. A su vez, se observan tres bandas relacionadas con los C=C de grupos aromáticos, que se encuentran a 1611 cm^{-1} y 1583 cm^{-1} y 1520 cm^{-1} (Porto, 2018). Las bandas relacionadas a los anillos bencénicos, se identificaron a 1578 cm^{-1} , 1514 cm^{-1} y 1443 cm^{-1} (Davidov-Pardo & McClements, 2014).

A 1155 cm^{-1} se encuentra una banda relacionada con el estiramiento C-O para compuestos fenólicos (Porto, 2018). El estiramiento de los O-H de los grupos fenólicos, se corresponde a la banda presente a 1377 cm^{-1} . Las bandas que caracterizan al resveratrol como trans-resveratrol se encuentra a 988 cm^{-1} (Bertacche et al., 2006) y se corresponde a la banda olefínica, y 965 cm^{-1} encontramos la banda característica de las vibraciones C=C-H (ZHOU et al., 2012).

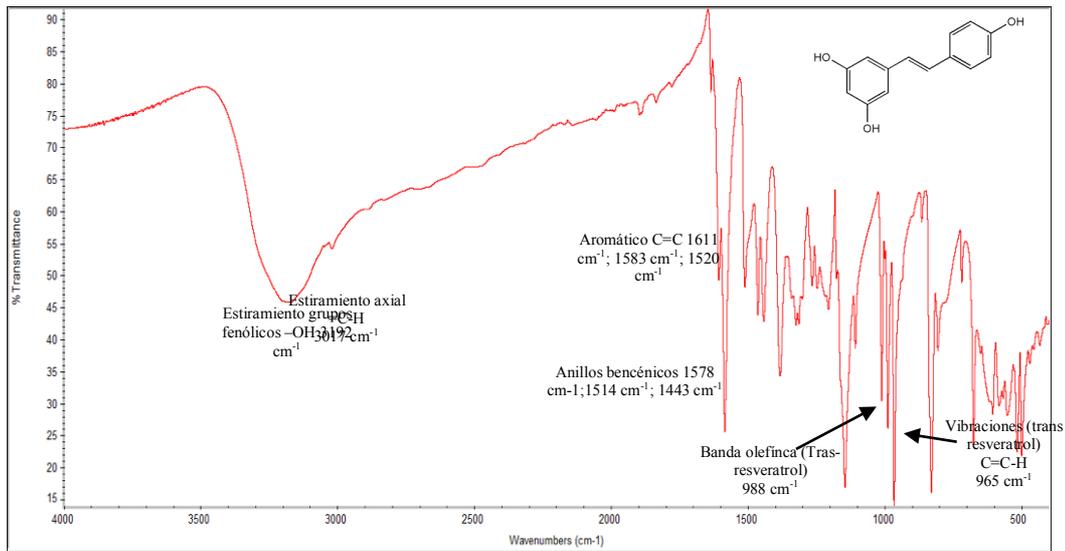


Figura 21: Espectro FTIR de resveratrol.

En el espectro de partículas *Core Shell* adsorbidas con resveratrol (Rojo) (**Figura 22**), se observan dos bandas asociadas a los enlaces C=C de los grupos aromáticos a 1610 cm⁻¹ y a 1589 cm⁻¹ correspondiente al enlace C=C de grupos alifáticos. Las bandas presentes a 1514 cm⁻¹ y 1443 cm⁻¹, podrían atribuirse a los anillos bencénicos de la molécula de resveratrol. El pico presente a 965 cm⁻¹, puede atribuirse a la vibración C=C-H característico del *trans* resveratrol. Las bandas pequeñas a 800 cm⁻¹ y 850 cm⁻¹, podrían atribuirse a las vibraciones C-H de los anillos aromáticos conjugados con el grupo olefínico.

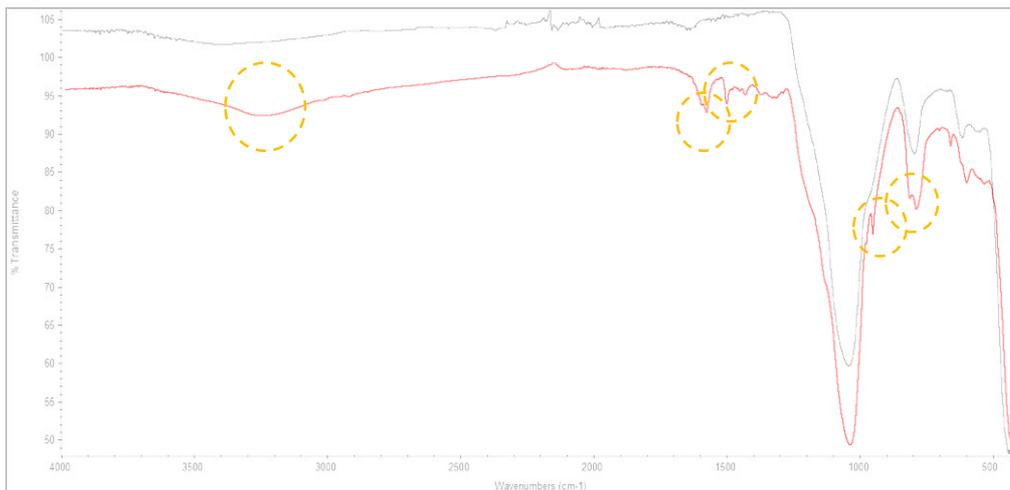


Figura 22: Espectros FTIR de partículas *Core Shell* (Negro); partículas *Core Shell* adsorbidas con Resveratrol (Rojo).

Isoterma de adsorción

A partir de la isoterma de adsorción representada con el gráfico de la (**Figura 23**), y a partir de los análisis de los modelos (**Tabla 9**), se observó que el mejor ajuste se logra con el modelo de *Freundlich*. El mismo tiene como premisa que la interacción entre el sorbato (resveratrol) y el sorbente (superficie de las partículas *Core Shell*) es heterogénea y reversible.

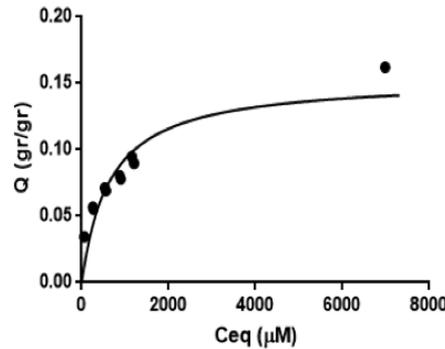


Figura 23: Isoterma de adsorción a 25 °C de resveratrol sobre CS-2-A

Tabla 9: Análisis de isotermas según los modelos de Langmuir y Freundlich para las partículas *Core Shell* adsorbidas con resveratrol.

Modelo	Parámetro	Valores	Error (R ²)
<i>Langmuir</i>	Q _{max} (gr/gr)	0,177	0,979
	K _a (L/gr)	177,34	
<i>Freundlich</i>	K	0,135	0,993
	N	0,327	

Cinética de adsorción/desorción de Resveratrol

Respecto a la liberación de resveratrol en diferentes medios (**Figura 24-B**), se pudo observar que, para las partículas dispersas en medio acuoso en un lapso de tiempo de 24 h, el valor de $q_{(max)}$ fue de 0,077 gr/gr; mientras que, para el mismo rango de tiempo, en medio etanólico, el valor de $q_{(max)}$ fue de 0,165 gr/gr. Considerando que el valor de máxima adsorción de resveratrol fue igual a $q_{(max)}=0,178$ gr/gr (**Figura 24-A**), entonces, otra vez, podríamos decir que la liberación del polifenol ha sido completa cuando las partículas se encuentran dispersas en medio etanólico.

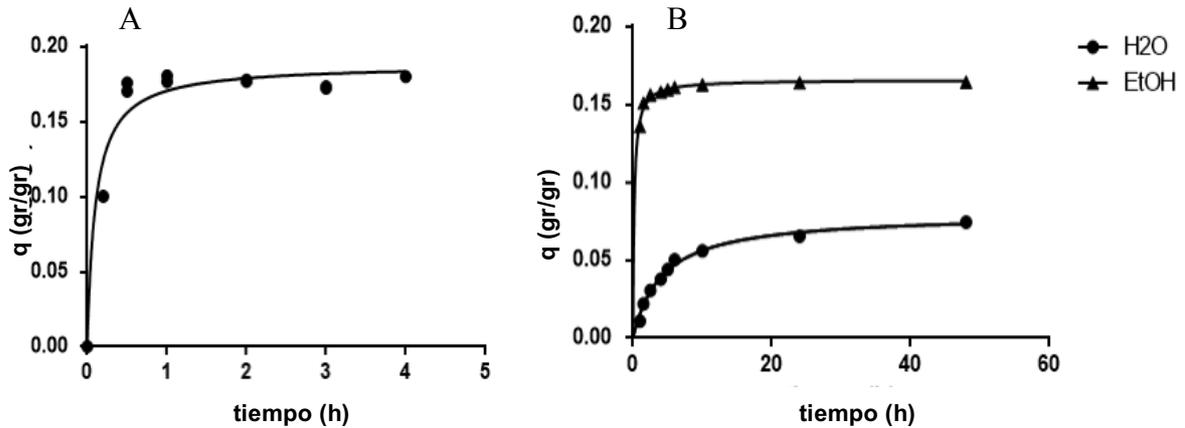


Figura 24: A) Cinética de adsorción de resveratrol sobre partículas *Core shell* ($q_{(max)}=0,178$ gr/gr) a 25 °C; B) Cinética de desorción de resveratrol en medio acuoso (•) ($q_{max}=0,077$ gr/gr) y etanólico (Δ) ($q_{max}=0,165$ gr/gr) a 25 °C. Los ensayos se llevaron a cabo midiendo en el espectrofotómetro a una longitud de onda fija igual a 212 nm.

Potencial Zeta

Podemos observar que las partículas *Core Shell*-Resveratrol dispersas en medio acuoso poseen valores de potencial zeta, altos y negativos, dando indicios que las mismas han de encontrarse dispersas y estables en dicho medio (**Tabla 10**). Respecto al diámetro hidrodinámico de las partículas, se puede deducir que los polifenoles actuarían de estabilizante, viéndose partículas con menor diámetro hidrodinámico cuando el resveratrol está presente en su superficie y con menor tendencia a formar flóculos (**Tabla 10**).

Por otro lado, en medio etanólico, las partículas poseen valores bajos de potencial zeta, dando pautas de baja estabilidad y por lo tanto posible aglomeración (**Tabla 11**).

Respecto a su diámetro hidrodinámico en dicho medio, se pudo observar que las partículas CS-2-A tienden a formar flóculos de mayor tamaño que las partículas CS-2A-Resveratrol (**Tabla 11**), siendo de todos modos, ambas muy poco estables en este medio.

Tabla 10: Potencial Zeta y diámetro hidrodinámico de las partículas *Core Shell* y *Core Shell* adsorbidas con resveratrol, dispersas en medio acuoso.

Medio acuoso				
Partícula	Pot.Zeta (mv)	Dsv Std	Diam.Hidr. (nm)	Dsv Std
CS-2-A	-6,11	0,27	1812,83	259,03
CS-2-A-R	-33,73	1,13	799,22	86,97

Tabla 11: Valores de Potencial Zeta, y diámetro hidrodinámico de las partículas *Core Shell* y *Core Shell* adsorbidas con resveratrol, dispersas en etanol (96°).

Medio etanolico				
Partícula	Pot.Zeta (mv)	Dsv Std	Diam.Hidr. (nm)	Dsv Std
CS-2-A	-8,26	0,9	3778,79	1403,28
CS-2-A-R	-7,05	0,21	1020,72	66

Cinética de liberación de iones Ag^+ en partículas CS-2-A-Resveratrol

La adsorción de resveratrol en la superficie de las partículas CS-2-A (**Figura 25**) no estaría interfiriendo con la liberación de los iones Ag^+ , siendo este valor (0,04 mg/ml) similar al obtenido para las partículas sin adsorción alguna (**Figura 10-A**). La disminución inicial de la cantidad de iones liberados puede deberse a un efecto de reducción de los iones de plata en presencia del polifenol (Park Sohyun et.al.,2016), al igual que sucede con quercetina.

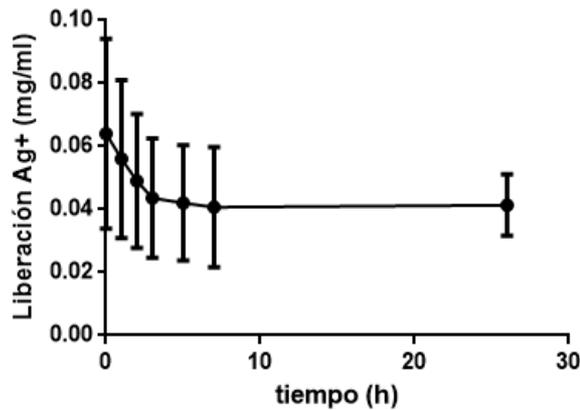


Figura 25: Liberación de iones Ag^+ mg/ml de de las partículas *Core Shell*-Resveratrol versus tiempo (horas).

▣ **NpsAg@SiO₂- Ácido elágico (CS-2-A-Ácido Elágico)**

En las microscopías (**Figura 26**) se observó a las partículas *Core Shell* rodeadas de fragmentos grandes y claros, que podrían adjudicarse a la presencia de ácido elágico rodeando la superficie de las partículas.

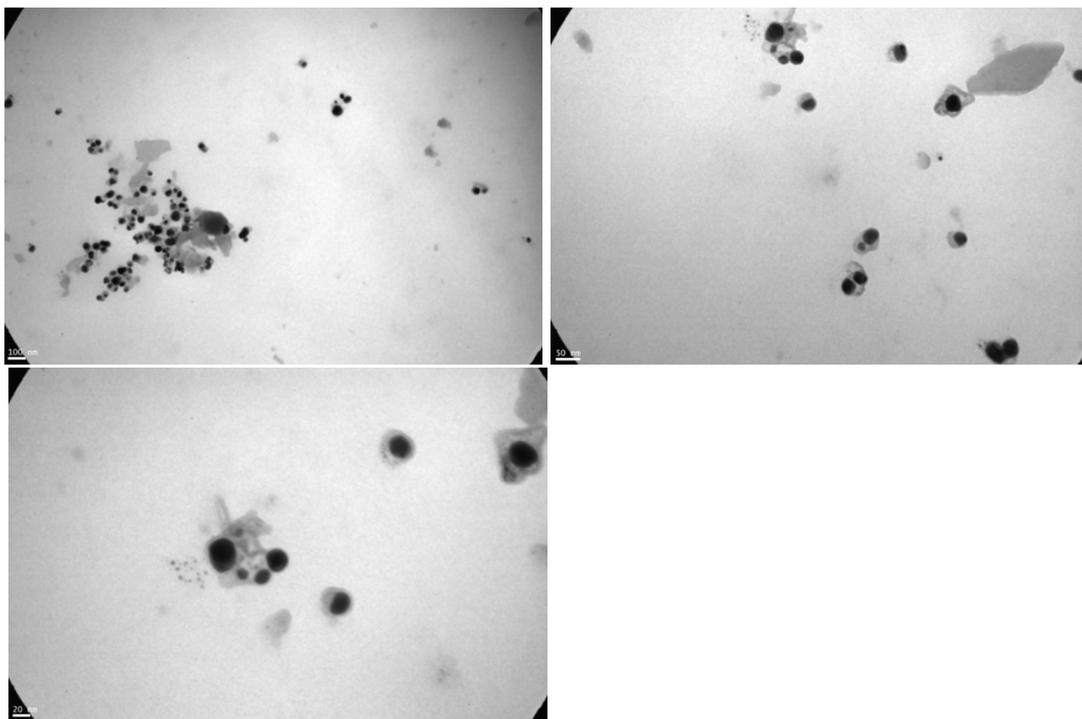


Figura 26: MET de las partículas *Core Shell*, adsorbidas con ácido elágico.

Espectros FTIR

En el espectro de ácido elágico (**Figura 27**), se pueden observar (Mady & Shaker, 2017) dos pequeños picos a 3580 cm^{-1} y 3480 cm^{-1} y un pico más amplio a 3200 cm^{-1} , que se asignan a la vibración del grupo O-H. Los picos que se observan a 1629 cm^{-1} , 1583 cm^{-1} y 1507 cm^{-1} se los atribuye a la vibración de C=C-C. Los picos a 1450 cm^{-1} y 1375 cm^{-1} se asignan a la vibración de C-H, mientras que los picos a 1330 cm^{-1} , 1270 cm^{-1} y 1200 cm^{-1} serían de estiramiento del enlace del éster C-O. A 1115 cm^{-1} y 1050 cm^{-1} los picos son del enlace éster de flexión en el plano de C-H aromáticos. Por último, los picos a 927 cm^{-1} , 874 cm^{-1} , 817 cm^{-1} , 760 cm^{-1} y 690 cm^{-1} son asignados a la flexión fuera del plano de C-H aromático, mientras que 935 cm^{-1} el pico se corresponde al enlace C-O-H aromático.

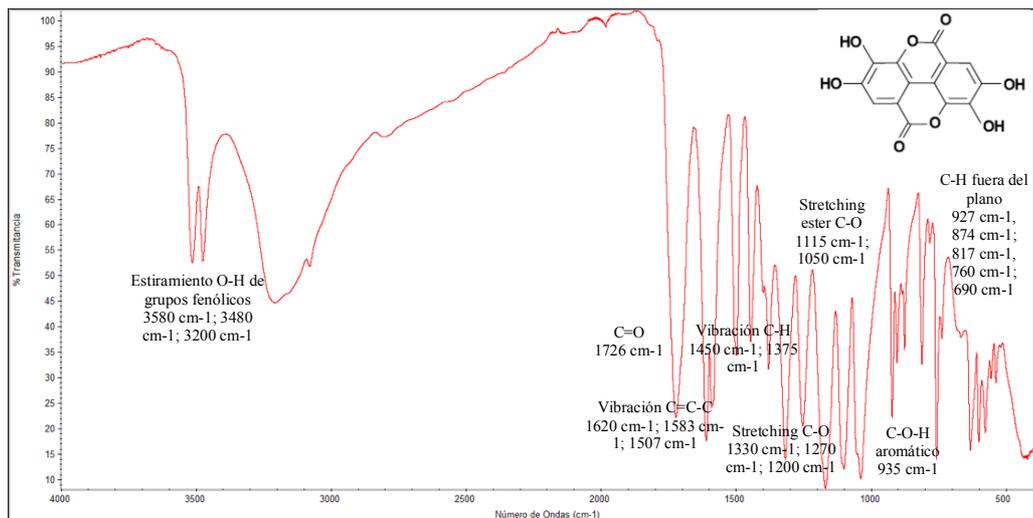


Figura 27: Espectros FTIR de ácido elágico.

Si observamos la **figura 28** vemos que como información característica y dado que lo observamos en un sector del espectro que podría considerarse como huella dactilar del compuesto [1500-600] cm⁻¹, podríamos asociar la débil banda a 690 cm⁻¹ a la flexión fuera del plano de C-H aromático.

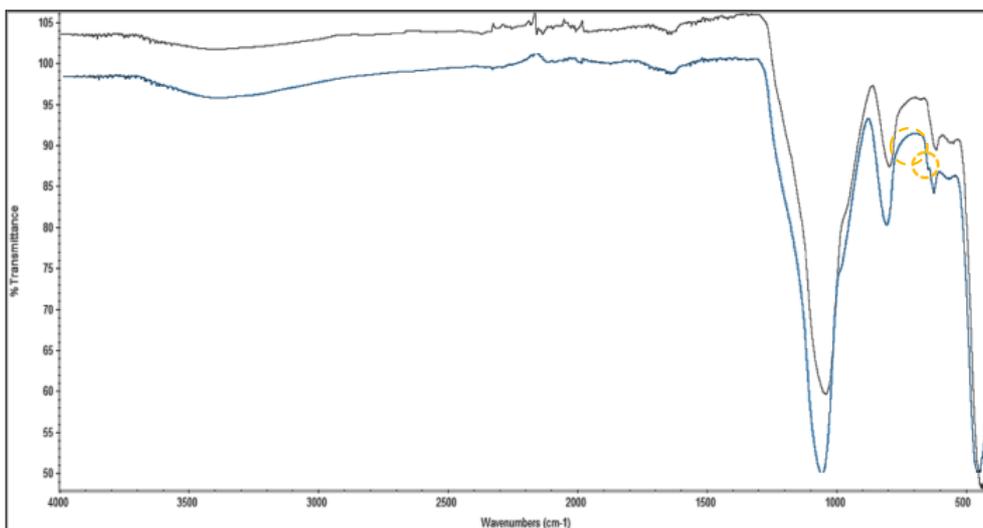


Figura 28: Espectros FTIR de partículas *Core Shell* (negro); partículas *Core Shell* adsorbidas con ácido elágico (Azul).

Isoterma de adsorción

A partir del gráfico representado para la isoterma de adsorción de ácido elágico (**Figura 29**), se determinó que la concentración máxima de ácido elágico fue igual a $Q_{max}=0,199$ gr/gr. A partir del análisis de los distintos modelos (**Tabla 12**), se observó que el mejor ajuste se obtuvo con el modelo de *Freundlich*, siendo la premisa del mismo que la interacción entre el sorbato (ácido elágico) y el sorbente (superficie de las partículas *Core Shell*) es heterogénea y reversible.

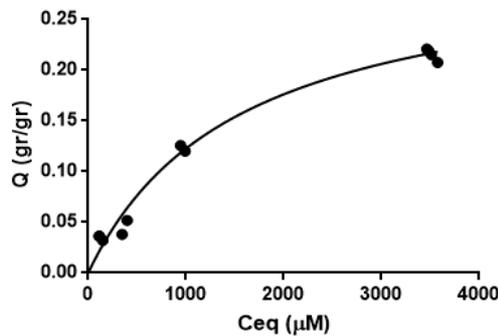


Figura 29: Isoterma de adsorción a 25°C de ácido elágico sobre partículas *Core Shell*.

Tabla 12: Análisis de isotermas según los modelos de *Langmuir* y *Freundlich* para las partículas *Core Shell* adsorbidas con ácido elágico.

Modelo	Parámetro	Valores	Error (R ²)
<i>Langmuir</i>	Qmax(gr/gr)	0,199	0,968
	K _a (L/gr)	397,85	
<i>Freundlich</i>	K	5,00	0,983
	N	2,84	

Cinética de adsorción/desorción de ácido elágico

En los gráficos en los que se representa la liberación de ácido elágico en el tiempo (**Figura 30-B**), se observó que para un lapso de tiempo de 48 horas, encontrándose las partículas dispersas en medio acuoso, el valor de $q_{(max)}$ fue igual a 0,07 gr/gr.; mientras que para el mismo lapso de tiempo, en medio etanólico, el valor de $q_{(max)}$ fue igual a 0,143 gr/gr. Considerando que el valor de adsorción de ácido elágico $q_{(max)}$ fue de 0,170 gr/gr (**Figura 30-A**), podríamos decir que el polifenol, ha sido liberado casi en su totalidad de aquellas partículas que se encuentran dispersas en medio etanólico.

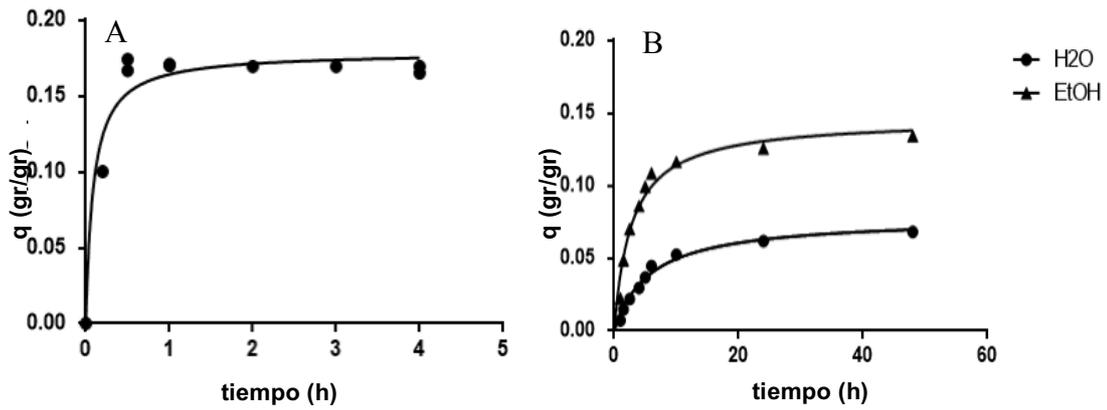


Figura 30: A) Cinética de adsorción de ácido elágico sobre partículas *Core shell* ($q_{(max)}=0,170$ gr/gr) a 25 °C; B) Cinética de desorción de ácido elágico en medio acuoso (•) ($q_{(max)}=0,07$ gr/gr) y etanólico (Δ) ($q_{(max)}=0,143$ gr/gr) a 25°C.

Potencial Zeta y diámetro hidrodinámico

Para el sistema compuesto por nanopartículas CS-2-A y CS-2-A-ácido elágico, se observó lo mismo que se ha visualizado en los sistemas compuestos por quercetina y resveratrol, donde las partículas con polifenol son estables en medio acuoso, arrojando valores de potencial Zeta grandes y negativos (**Tabla 13**). A su vez, se observó que las partículas CS-2-A-ácido elágico en medio acuoso, poseen un diámetro hidrodinámico menor (**Tabla 13**) a las partículas CS-2-A y similar a las partículas *Core Shell-Resveratrol*.

Para las partículas dispersas en medio etanólico se observaron valores de potencial Zeta bajos (**Tabla 14**), haciéndonos suponer que ocurre aglomeración e inestabilidad de las mismas debido a las características del medio. También, los valores de diámetro hidrodinámico (**Tabla 14**) nos hace suponer que ocurre aglomeración y formación de cúmulos que precipitan, siendo este comportamiento más marcado para las partículas CS-2-A.

Tabla 13: Valores de Potencial Zeta, y diámetro hidrodinámico para las partículas *Core Shell* y *Core Shell* adsorbidas con ácido elágico, dispersas en medio acuoso.

Medio acuoso				
Partícula	Pot.Zeta (mv)	Dsv Std	Diam.Hidr (nm)	Dsv Std
CS-2-A	-6,11	0,27	1812,83	259,03
CS-2-A-AE	-39,31	0,77	784,63	87,44

Tabla 14: Valores de Potencial Zeta y diámetro hidrodinámico para las partículas *Core Shell* y *Core Shell* adsorbidas con ácido elágico, dispersas en etanol (96°).

Medio etanolico				
Partícula	Pot.Zeta (mv)	Dsv Std	Diam.Hidr (nm)	Dsv Std
CS-2-A	-8,26	0,9	3778,79	1403,28
CS-2-A-AE	-6,46	0,7	676,97	18,88

Una observación que debemos realizar para con este punto es que las partículas *Core Shell* adsorbieron valores similares de ambos polifenoles (Resveratrol ($Q_{(max)}=0,177$ gr/gr (**Figura 24-A**)) y ácido elágico ($Q_{(max)}=0,170$ gr/gr (**Figura 30-A**)) y mayor cantidad de quercetina ($Q_{(max)}=0,31$ gr/gr (**Figura 16-A**)). Ello podría explicar que los tamaños de ambas partículas sean similares y que se aglomeran más que las partículas CS-2-A-Quercetina en medio acuoso.

Cinética de liberación de iones Ag^+ en partículas CS-2-A-AE

Al igual que lo observado para los anteriores sistemas particulados, la adsorción de ácido elágico en la superficie de las partículas no interfiere con la liberación de los iones Ag^+ (**Figura 31**), siendo este valor (0,04 mg/ml) similar al obtenido para las partículas sin adsorción (**Figura 10-A**).

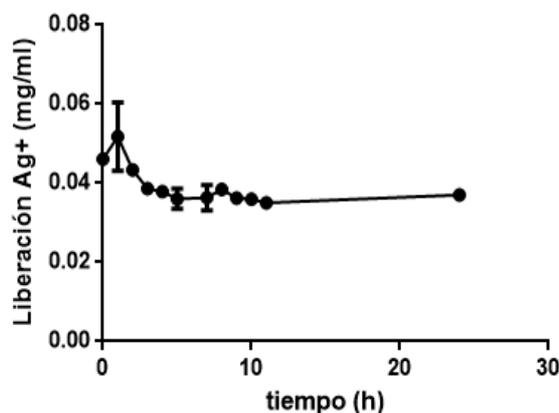


Figura 31: Liberación de iones Ag^+ mg/ml de las partículas *Core Shell*- ácido elágico versus tiempo (horas).

Ensayos microbiológicos

Determinación de CIM y CBM

La determinación de la CIM se realizó utilizando el método propuesto por CLSI 2017 (Tabla 15) y la concentración bactericida mínima (CBM) (Tabla 16) se determinó repicando a los cultivos con ausencia de turbidez en un medio sólido, incubando 24 a 48 h a una temperatura de 35 °C.

Se observó que para las partículas *Core Shell* sin polifenoles asociados, se requirió menor concentración para ejercer efecto de inhibición (Tabla 15) si se compara frente a aquellas que sí los adsorbieron. Una razón podría ser que los polifenoles se encuentren actuando como antioxidantes (Gulcin & Alwasel, 2022), contrarrestando las especies reactivas de oxígeno (EROS) generadas en las NpsAg (Kim et al., 2007), lo cual beneficiaría a los microorganismos, siendo necesario mayor proporción de partículas para ejercer su acción como antimicrobiano.

Tabla 15: Concentración inhibitoria mínima (CIM) de partículas en medio acuoso. El ensayo se realiza de acuerdo al documento M7 del NCCLS descrito para antibióticos.

Partículas/Microorganismos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Control (UFC/ml)	2,9 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁷
CS-2-A (mg/ml)	0,11	0,11
CS-2-A-Quercetina (mg/ml)	0,22	0,22
CS-2-A-Resveratrol (mg/ml)	0,22	0,22
CS2-A-Ácido elágico (mg/ml)	0,22	0,22

Tabla 16: Concentración bactericida mínima (CBM). El ensayo se realiza por repique en gota en medio sólido (TSA) de los pocillos donde no se vio turbidez.

Partículas/Microorganismos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Control (UFC/ml)	2,9 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁷
CS-2-A (mg/ml)	0,22	0,11
CS-2-A-Quercetina (mg/ml)	0,44	0,44
CS-2-A-Resveratrol (mg/ml)	0,44	0,44
CS2-A-Ácido elágico (mg/ml)	0,44	0,44

▣ Conclusiones del capítulo 4

Se realizaron dos tipos de síntesis de partículas *Core Shell*. Una de ellas se realizó con TEOS como precursor en medio amoniacal y a base de solventes alcohólicos, con baja reproducibilidad. La siguiente síntesis se realizó utilizando 3-(mercaptopropil) trimetoxisilano (MPTMS) como precursor en medio amoniacal en base acuosa. Con ésta última continuamos trabajando durante toda la tesis.

Las partículas obtenidas tienen tamaño nanométrico, encontrando su mayor población en el rango de 22 a 30 nm. En el estudio de liberación de iones Ag^+ se observó que las partículas que pasaron por la etapa de calcinación lograron liberar iones al medio y no se observó liberación de iones en aquellas que sólo se secaron en la estufa. Este comportamiento se explicaría por la formación de poros superficiales en la etapa de calcinación, siendo ello corroborado en el estudio de área superficial (BET).

La adsorción de los polifenoles se efectuó en medio etanólico. La máxima adsorción se determinó realizando las curvas de cinética de adsorción. El valor de adsorción máximo para quercetina fue igual a ($q_{max}= 0,31$ gr/gr), siendo el polifenol adsorbido en mayor proporción respecto a resveratrol ($q_{max}= 0,18$ gr/gr) y ácido elágico ($q_{max}= 0,17$ gr/gr).

En todos los casos la liberación de los polifenoles fue completa en las primeras 24 horas en medio alcohólico, siendo más lenta e incompleta en medio acuoso dentro del mismo lapso de tiempo.

En todos los casos se observó que la adsorción de los polifenoles no interfirió con la liberación de iones Ag^+ , siendo su concentración alrededor de 0,04 mg/ml. En este caso, se observó que los polifenoles podrían estar actuando como agentes reductores de los iones de plata a NpsAg debido a que se observó una reducción de los iones liberados al inicio del ensayo.

El comportamiento frente a microorganismos del tipo Gram (+) y Gram (-) resultó menos activo cuando las mismas tenían algún polifenol adsorbido en su superficie. Las hipótesis que planteamos para este comportamiento es que el efecto antioxidante de los polifenoles (Catauro et al., 2015); (Kim et al.2007), disminuiría las EROS generadas por las NpsAg y por ello beneficiaría al microorganismo, requiriendo más cantidad de partículas para ejercer su acción como antimicrobiano.

De este modo, continuamos trabajando con los tres sistemas de nanopartículas *Core Shell* adsorbidas con los tres polifenoles (quercetina, resveratrol y ácido elágico).

▣ Bibliografía

- Bertacche, V., Lorenzi, N., Nava, D., Pini, E., & Sinico, C. (2006). Host–Guest Interaction Study of Resveratrol with Natural and Modified Cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 55(3–4), 279–287. <https://doi.org/10.1007/s10847-006-9047-8>
- Davidov-Pardo, G., & McClements, D. J. (2014). Resveratrol encapsulation: Designing delivery systems to overcome solubility, stability and bioavailability issues. *Trends in Food Science & Technology*, 38(2), 88–103. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.05.003>
- Catauro, M., Papale, F., Bollino, F., Piccolella, S., Marciano, S., Nocera, P., & Pacifico, S. (2015). Silica/querctin sol–gel hybrids as antioxidant dental implant materials. *Science and Technology of Advanced Materials*, 16(3), 035001. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/16/3/035001>
- Chahardoli A., Hajmomeni P., Ghowsi M., Qalekhani F., Shokoohinia Y., Fattahi A. (2021). Optimization of Quercetin-Assisted Silver Nanoparticles Synthesis and Evaluation of Their Hemocompatibility, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antibacterial effects. <https://doi.org/10.1002/gch2.202100075>
- Gopu, V., Meena, C. K., & Shetty, P. H. (2015). Quercetin influences quorum sensing in food borne bacteria: In-vitro and in-silico evidence. *PLoS ONE*, 10(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134684>
- Gulcin, I.; Alwasel, S.H. (2022). Metal Ions, Metal Chelators Metal Chelating Assay as Antioxidant Method. MDPI journal. <https://doi.org/10.3390/pr10010132>
- Hu, M.-L. (2011). Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: more questions than answers. *Chang Gung Medical Journal*, 34(5), 449–460.
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J.-H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, Y. K., Park, Y. H., Hwang, C.-Y., Kim, Y.-K., Lee, Y.-S., Jeong, D. H., & Cho, M.-H. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1), 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>
- Mady, F., & Shaker, M. (2017). Enhanced anticancer activity and oral bioavailability of ellagic acid through encapsulation in biodegradable polymeric nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 12, 7405–7417. <https://doi.org/10.2147/IJN.S147740>
- Paczkowski, J. E., Mukherjee, S., McCready, A. R., Cong, J. P., Aquino, C. J., Kim, H., Henke, B. R., Smith, C. D., & Bassler, B. L. (2017). Flavonoids suppress *Pseudomonas aeruginosa* virulence through allosteric inhibition of quorum-sensing Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 292(10), 4064–4076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.770552>
- Park Sohyun, Cha Song-Hyun, Cho Inyoung, Park Soomin, Park Yohan Cho Seonho, Park Youmie (2015). Antibacterial nanocarriers of resveratrol with gold and silver

- nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.09.068>.
- Polonca Nedeljko, Matejka Turel, Aljosa Kosak, Aleksandra Lobnik. Synthesis of hybrid thiol-functionalized SiO₂ particles used for agmatine determinatio. *J Sol-Gel Sci Technol* (2016) 79: 487-496. <https://10.1007/s10971-016-4030-3>
- Quecan, B. X. V., Santos, J. T. C., Rivera, M. L. C., Hassimotto, N. M. A., Almeida, F. A., & Pinto, U. M. (2019). Effect of quercetin rich onion extracts on bacterial quorum sensing. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00867>
- Shah, K. W., Sreethawong, T., Liu, S.-H., Zhang, S.-Y., Tan, L. S., & Han, M.-Y. (2014). Aqueous route to facile, efficient and functional silica coating of metal nanoparticles at room temperature. *Nanoscale*, 6(19), 11273–11281.
<https://doi.org/10.1039/C4NR03306J>
- Vanaraj Sekar, B. Bhargavi Keerthana, Kathirvel Preethi (2017). Biosynthesis, Characterization of Silver Nanoparticles Using Quercetin from *Clitoria ternatea* L to Enhance Toxicity Against Bacterial Biofilm. *J Inorg Organomet Polym*.
<https://doi.org/10.1007/s10904-017-0595-8>
- Vladimir-Kneevi, S., Blaekovi, B., Bival, M., & Babac, M. (2012). Plant Polyphenols as Antioxidants Influencing the Human Health. In *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*. InTech.
<https://doi.org/10.5772/27843>
- Yoon, S. B., Kim, J.-Y., Kim, J. H., Park, Y. J., Yoon, K. R., Park, S.-K., & Yu, J.-S. (2007). Synthesis of monodisperse spherical silica particles with solid core and mesoporous shell: mesopore channels perpendicular to the surface. *Journal of Materials Chemistry*, 17(18), 1758. <https://doi.org/10.1039/b617471j>
- Zhou, R., Wang, F., Guo, Z., & Zhao, Y. L. (2012). Preparation and characterization of Resveratrol/Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent technology. *Journal of Food Process Engineering*, 35(4), 677–686.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2010.00617.x>

Capítulo 5
Biofilms

CAPÍTULO 5 – *Biofilms* -

▣ Resumen

En el presente capítulo se trabajó con *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1), siendo este un modelo bacteriano muy utilizado al momento de estudiar formación de *biofilms*.

Los ensayos iniciales y preliminares, se realizaron en placas multipocillos y luego se utilizaron modelos de reactores (reactor alimentado en continuo y reactor con flujo por goteo), los cuales nos permitieron obtener *biofilms* con características similares a los encontrados en los ambientes correspondientes.

Se trabajó estudiando las diferentes etapas de formación de *biofilms* en presencia de polifenoles (quercetina, resveratrol y ácido elágico) y de partículas *Core Shell* adsorbidas con los polifenoles, sintetizadas según se describió en el **Capítulo 4**. También se estudiaron algunos factores de virulencia (*swimming* y *swarming*) ejercidos por este modelo bacteriano en presencia de quercetina.

De los tres polifenoles estudiados, quercetina fue quien mejores resultados mostró en todo el proceso. Respecto a las partículas *Core Shell*, no se observaron diferencias significativas sobre los *biofilms* formados, entre aquellas partículas *Core Shell* sin quercetina adsorbida respecto a las sí tenían quercetina adsorbida.

▣ **Introducción**

Biofilms

Por definición, los *biofilms* microbianos son comunidades de células en estado sésil, caracterizadas por estar irreversiblemente adheridas entre sí y/o a un sustrato o interfases, encontrándose embebidos en una matriz de sustancia polimérica extracelular que ellos mismos producen, y exhiben un alterado fenotipo respecto a la tasa de desarrollo y transcripción genética (Donlan & Costerton, 2002).

En la **Figura 1** se describe el esquema de formación de *biofilms* por etapa. Algunas bacterias en estado planctónico se adhieren a la superficie, inicialmente de modo reversible y eventualmente la adherencia resulta irreversible. La bacteria inicia la adhesión irreversible utilizando polímeros de exopolisacárido del glicocálix. Los microorganismos comienzan a dividirse, uniéndose en la matriz del glicocálix e iniciando el desarrollo de micro colonias adheridas. La matriz es predominantemente aniónica, altamente hidratada de exopolímeros bacterianos y macromoléculas (Sutherland & W., 1977). En la formación del *biofilm*, por parte de los microorganismos, proliferan debido a la producción y detección de moléculas señales que son emitidas al entorno, y por medio de las cuales establecen un “medio de comunicación”. Las moléculas y mecanismos de auto inducción varían entre bacterias. Existen compuestos en la naturaleza, que ya sea, por inhibición, degradación de la molécula señal, unión al receptor que activa la cascada de transducción, podrían ser utilizados para inhibir la formación de *biofilms*. A su vez, estos compuestos podrían estar involucrados en la regulación de la expresión de factores de virulencia (Jon E. Paczkowski, 2017).

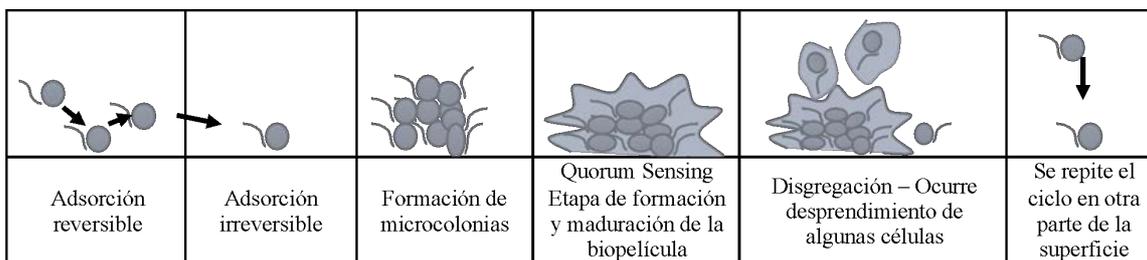


Figura 1: Esquema de las etapas en el proceso de formación y disgregación de *biofilms*.

Polifenoles como inhibidores de *biofilms*

Los polifenoles, como se mencionó en el **Capítulo 4**, son metabolitos secundarios producidos por organismos de origen vegetal, presentes principalmente en flores, aunque también se encuentran distribuidos en diferentes partes de las plantas.

Hemos encontrado reportes donde adjudican el efecto inhibitorio microbiano de los polifenoles a un daño a nivel del ADN cromosomal, siendo este efecto dosis dependiente. La inhibición estaría dada por la unión del polifenol, más específicamente de resveratrol, al anillo Z en formación, observándose en microscopías, bacterias de mayor longitud respecto a su control (Dahyub Hwang, 2015).

A su vez, se han realizado diversos estudios en los que se demuestra que administrar polifenoles en concentraciones sub-inhedoras ejercería efectos sobre los genes regulados por el *quorum sensing*, sin interferir los mismos sobre la cinética de desarrollo microbiano (Zeng et al., 2008); (Gopu et al., 2015); (Vandeputte et al., 2010); y controlando los factores de virulencia (Vandeputte et al., 2011).

▣ Materiales y métodos

Determinación de la Concentración Inhibitoria mínima (CIM) y bactericida (CBM) de los polifenoles frente a *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) y posterior observación al microscopio óptico.

El procedimiento para la determinación de CIM se encuentra en el capítulo 3-Página 32.

Los pocillos correspondientes a la concentración sub CIM, fueron analizados en el microscopio óptico previa tinción de los microorganismos.

Procedimiento

Se tomó una muestra de 20 μ L de los pocillos donde se identificó la concentración sub CIM y se sembró en un portaobjeto de vidrio. A continuación, se fijó la muestra con calor y luego se realizó la tinción con colorante cristal violeta (0,1 %). Por último, las muestras se observaron en microscopio óptico (100X). Las imágenes se obtuvieron del programa asociado al microscopio (*AmScope*).

Determinación de Concentración Inhibitoria mínima de *biofilms* (CIMb) de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) tratados con polifenoles.

Se realizó un *screening* sobre la capacidad de formación de *biofilm* de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1), permitiendo su desarrollo en presencia de los diferentes polifenoles, por un lapso de tiempo de 24 h, siguiendo un reconocido método para formar los *biofilms* (O'Toole, 2011).

Para observar y cuantificar la formación de los *biofilms*, utilizamos cristal violeta, debido a que es un colorante catiónico que se une a bacterias y componentes del exopolisacárido (EPS) específicamente.

Los materiales utilizados fueron:

Placas multipocillos (24 pocillos) estéril, pipetas automáticas p200 p1000, placas de Petri estériles descartables, tubos de ensayo de vidrio, ansa metálica, mechero, estufa de cultivo (Venticell), pH metro (Hanna), espectrofotómetro (Shimadzu UV1800), cubetas de plástico descartables de 1, 5 ml y paso de luz de 10 mm.

Los reactivos utilizados fueron:

Resveratrol 99% (extracto de *Polygonum Cuspidatum*) **quercetina** 99% (extracto de *Sophora Japonica*), **ácido elágico** 40% (extracto de cáscara de granada), etanol 96°, los polifenoles se compraron en la empresa Natural-field (<http://www.natural-field.com>).

Medios de cultivo: Caldo tripteína caseína soya (Biokar) y medio salino M63 (Tabla 1).

Tabla 1: Composición de los medios de cultivos utilizados en los ensayos de formación de *biofilms*.

Caldo tripteína caseína soya	Medio mínimo salino M63
Hidrolizado tríptico de caseína 15,0 g/l	K ₂ PO ₄ 13,6 gr/L
Peptona de soja 5,0 g/l	(NH ₄) SO ₄ 2,0 gr/L
Cloruro sódico 5,0 g/l	FeSO ₄ .7H ₂ O 0,0005 gr/L
Agar-Agar 15,0 g/l	Ajustar pH a 7,0 y esterilizar por 20 min a 121 °C, 1 atm
	MgSO ₄ .7H ₂ O (1M) 1 ml
	Dextrosa (20% p/p) 10 ml
pH del medio a punto de uso 7,3 +/- 0.2	Esterilizar por filtración (filtro jeringa 0,22 μm).

Preparación del inóculo

Se tomaron colonias aisladas de PAO1 y se las inoculó en medio TSB. A continuación, se cultivó toda la noche con agitación a 35 °C. Por último, se realizó una medición del cultivo en espectrofotómetro a la longitud de onda igual a 620 nm, con el objetivo llevar el inóculo a una DO_(620nm)=0,1, utilizándose como blanco el mismo medio (TSB).

Polifenoles

Las diluciones de los polifenoles, se realizó de modo seriado en medio TSB sobre placa multipocillos en el rango de [0,125-2,0] mg/ml.

Procedimiento

Se realizó una dilución de 100 veces del inóculo bacteriano (DO_{620nm}= 0,1) en medio mínimo (M63) y se sembró cada pocillo con 1000 μL. Cada placa se incubó por 24 ± 2 h a 35°C, con agitación. Una vez que el *biofilm* se ha formado, se procedió a retirar el contenido de cada pocillo mediante uso de micropipeta. Luego con el propósito de retirar las bacterias planctónicas que se encuentren presentes, se lavó cada pocillo con

agua destilada estéril, repitiéndose este procedimiento al menos tres veces. Acto seguido, se introdujo en cada pocillo 1000 μL de los polifenoles por separado en el rango de concentraciones de [0,22-28] mg/ml y se llevó a incubar en estufa con agitación por 24 ± 2 h a 35°C . Luego de transcurrido ese lapso de tiempo, se retiró el medio líquido y se lavó suavemente cada pocillo con agua destilada estéril.

Para analizar la concentración inhibitoria mínima de *biofilms*, se inoculó cada pocillo con medio rico y se llevó a estufa con agitación por 24 ± 2 h a 35°C , y por último se observó si existía desarrollo microbiano por presencia/ausencia de turbidez del medio. Para determinar CBM se tomó 10 μL de los pocillos que no desarrollaron (ausencia de turbidez) y se sembró en placas con TSA. Luego de incubar las placas en estufa por 24 h a 35°C , se observó presencia/ausencia de colonias.

Estudio de la formación del *biofilm* sobre placa multipocillos, en la etapa de Adhesión.

Con la finalidad de determinar qué estadio de la formación de *biofilm* se estaría inhibiendo debido a la presencia de los polifenoles, se llevó a cabo la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) sobre placas multipocillos, en presencia de diferentes concentraciones de los mismos.

Procedimiento

Cada pocillo se inoculó con 1000 μL de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) en medio mínimo (M63) ($\text{DO}_{620\text{nm}} = 0,1$) con 1000 μL de los polifenoles al doble de concentración para que al final el mismo se encuentre en un rango de [0,125-2,0] mg/ml. La placa se incubó a 35°C durante 60 minutos. Luego de transcurridos los 60 minutos se retiró cuidadosamente el medio líquido y se lavó cada pocillo con agua desionizada sucesivas veces, con la finalidad de remover bacterias en estado planctónico. A continuación, se secó la placa en estufa durante 30 min a 60°C . Luego, se adicionó 1250 μL de cristal violeta 0,1% por 10 min a temperatura ambiente. Para retirar el colorante, se invirtió la placa en un recipiente plástico y el exceso del mismo se removió por lavados sucesivos con agua destilada. El remanente líquido se terminó de remover por inversión de la placa en papel absorbente y permanencia de las placas por 1 h en la cabina de bioseguridad.

Para realizar las medidas del colorante retenido por el *biofilm* formado, se adicionó 2000 μL de etanol 96° y se dejó la placa por 15 min a temperatura ambiente. El contenido de cada pocillo se midió por espectrofotometría a 590 nm. Se realizaron diluciones en aquellos pocillos que así lo requirieron.

Estudio de formación de *biofilm* sobre placa multipocillos, en la etapa de Maduración.

Se permitió la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) sobre placas multipocillos y a continuación, sobre los pocillos con los microorganismos adheridos, se procedió a agregar los polifenoles disueltos en el medio de cultivo.

Procedimiento

Para la etapa de adhesión, se tomó un inóculo de PAO1 ($DO_{620nm}=0,1$) en medio mínimo (M63) y se sembró 1000 μ L en cada pocillo. A continuación, se llevó la placa a incubar durante 60 min a 35°C con agitación. Transcurrido ese lapso de tiempo, se retiró, cuidadosamente, el medio de cultivo en cabina de bioseguridad y se lavó suavemente con agua destilada estéril. Con esto último, se permitió que ocurra adhesión de las bacterias sobre la superficie de la placa. Por último, se sembró cada pocillo con 2000 μ L de los polifenoles, en sus respectivas diluciones, disueltos en medio de cultivo TSB. Cada placa se incubó en la estufa por 24 h a 35°C, con agitación. De este modo se permitió que se lleve a cabo la maduración de los *biofilms* en presencia de los polifenoles.

Los pasos de descarte de sobrenadante, lavado, secado, tinción y medición del colorante, que son los mismos a los descritos anteriormente.

Para todos los ensayos realizados, dos pocillos se reservaron para inocular 2000 μ L de TSB (control 1) y otros dos para inocular los polifenoles sin el inóculo bacteriano (control 2). Como control positivo, se sembraron dos pocillos con el inóculo bacteriano suplementado con TSB.

Formación de *biofilm* sobre cupones, en reactor (sistema de cultivo continuo).

Para llevar a cabo este ensayo, debimos armar un sistema similar al que se encuentra descrito en la norma ASTM E 2562 – 17 (*Standard Test Method for Quantification of Pseudomonas aeruginosa Biofilm Grown with High Shear and Continuous Flow using CDC Biofilm Reactor*). Para su confección, se trabajó junto con el personal del sector de I+D de la empresa Adox S.A. El uso de este sistema, nos permitió obtener *biofilms* similares a los encontrados en la naturaleza, debido a que, en su formación se expone a los microorganismos a situaciones de estrés, a través de la agitación y limitación de nutrientes.

Los materiales utilizados fueron:

Pipetas automáticas p200 y p1000, placas de Petri estériles descartables, tubos de ensayo de vidrio, ansa metálica, mechero, estufa de cultivo (Venticell), pH metro (Hanna), espectrofotómetro (Shimadzu UV 1800), cubetas de plástico descartables de

1,5 ml y paso de luz de 10 mm, vórtex, baño sonicador, plancha calefactora con agitación, barra magnética, balanza analítica (Mettler Toledo), autoclave, bomba peristáltica (Adox S.A), agarraderas, dos tanques esterilizables 20 L, mangueras de silicona, reactor de vidrio con sus componentes, cupones de plástico.

Medios de cultivos:

Agar tripteína soja (Biokar): Fase de batch= 0,3 gr/L / Sistema continuo = 0,1 gr/L, buffer *, agua pura.

(*) **Buffer**: KH_2PO_4 0,0425 gr/L, $\text{MgCL.6H}_2\text{O}$ 0,405 gr/L preparado en agua destilada esterilizada por filtración preparado según el método (*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Portada*, n.d.).

Etapas de trabajo:

El proceso constó de dos etapas de desarrollo, de 24 h cada una:

- 1) **Fase de *Batch***, donde ocurrió la adhesión de los microorganismos sobre la superficie de los cupones. Aquí se utilizó TSB (0,3 gr/L).
- 2) **Cultivo continuo**, donde ocurrió la maduración del *biofilm* por parte de los microorganismos que lograron adherirse a los cupones. Medio de cultivo: TSB 0,1 gr/L.

Microorganismo:

La Norma plantea el uso de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 700888 a altas fuerzas de corte por agitación.

En el laboratorio se utilizó *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1). La purificación y preparación del inóculo inicial, están descritas al inicio del capítulo.

Descripción de los componentes del sistema

El reactor consta de un vaso de borosilicato con capacidad para 1000 ml, siendo su diámetro interno de $130,0 \pm 0,5$ cm. Posee un orificio de salida a 45° que actúa como drenaje del contenido del reactor. La tapa del reactor contiene orificios para introducir seis varillas de polipropileno. Las varillas tienen en su extremo inferior cuatro perforaciones donde se encastran los cupones que sirven de soporte para el crecimiento de los *biofilms*. Los cupones poseen 1 cm de diámetro, y pueden ser de diferentes materiales.

A continuación, se muestran las imágenes del diseño de las diferentes partes del reactor (**Figura 2**), confeccionado por personal de Adox S.A.

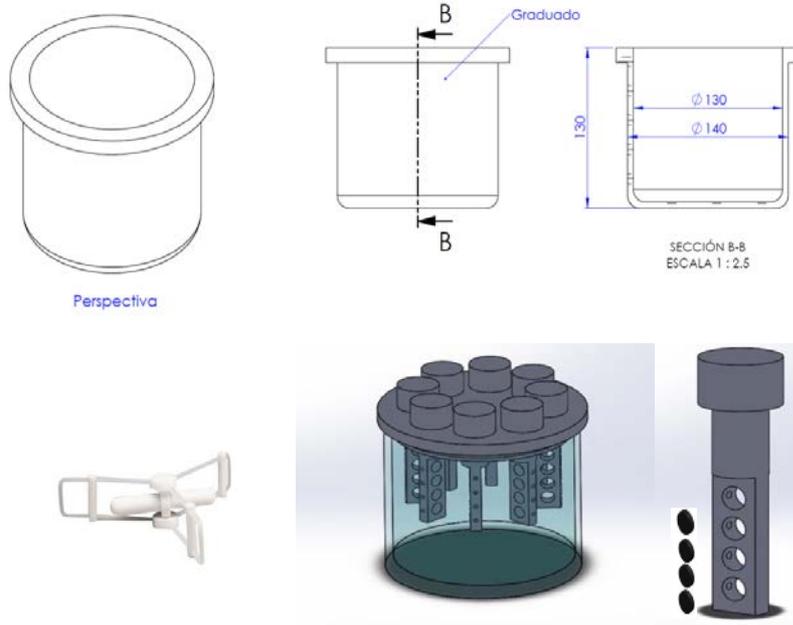


Figura 2: Diseño de los componentes del reactor de flujo continuo para formación de *biofilms* sobre cupones.

Como se muestra en la **figura 3**, el sistema completo se compone de:

- ❖ Dos tanques de polipropileno de capacidad igual a 20 L, uno de ellos se utilizó para mantener el medio de cultivo de alimentación y el segundo tanque recolectó líquido de descarte.
- ❖ Bomba peristáltica (Adox S.A.), permitió controlar el flujo de alimentación.
- ❖ Placa calefactora con agitación
- ❖ Mangueras estériles o autoclavables.
- ❖ Filtro de aire
- ❖ Pinzas y agarraderas.

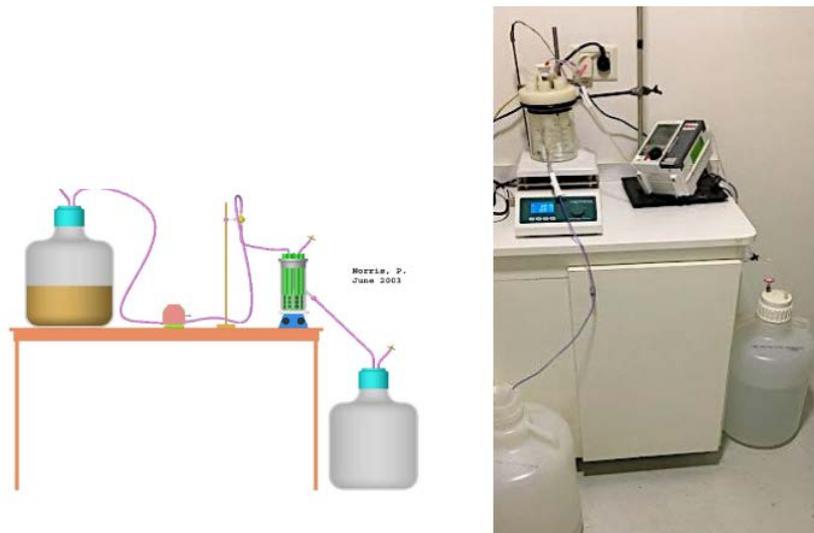


Figura 3: Sistema para formación de *biofilms*, armado y conectado en el laboratorio.

Limpieza de los cupones:

Para limpieza de los cupones, se los sometió a un ciclo de sonicación por 30 seg en una solución de agua y detergente multi enzimático a 37°C. A continuación, se los introdujo en un tubo con agua destilada estéril y se repitió el proceso de sonicación. Este último paso se repitió al menos tres veces, de modo de asegurarnos que no quedarán residuos de detergente en la superficie de los cupones.

Esterilización de los componentes:

El vaso de vidrio se esterilizó en autoclave a 121°C, 20 min y 1 atm de presión, junto con los medios de cultivo.

El tanque de alimentación de capacidad igual a 20 L, se esterilizó en autoclave con 19,5 L de agua destilada en su interior.

La tapa, las varillas y los cupones se lavaron con detergente multi enzimático y a continuación se los esterilizó utilizando una solución de ácido peracético por 20 min.

Las mangueras se compraron estériles y se descartaron en cada uso.

Procedimiento

Fase de *Batch*

En esta etapa se espera que las bacterias se adhieran sobre la superficie de los cupones.

Teniendo todo el sistema conectado y cerrado, se procedió al agregado aséptico de 500 ml de medio de cultivo, este volumen cubre la hilera de cupones presentes en cada varilla. A continuación, se inoculó el reactor con 1 ml del inóculo $DO_{620\text{ nm}} = 0,1$ y se inició la agitación del sistema a 200 ± 5 rpm a 25 ± 2 °C por 24 h.

Cultivo Continuo:

En esta etapa ocurre el crecimiento y maduración de los *biofilms* por parte de las bacterias que pudieron adherirse a los cupones en la fase de *batch*.

Inicialmente se agregó de modo aséptico el medio de cultivo concentrado al tanque de 20 L, que contenía 19,5 L de agua destilada estéril, para que finalmente la concentración del medio sea igual a 0,1 gr/L.

A continuación, se activó la bomba de alimentación con un flujo constante de 900 ml/h*.

(*) El flujo se determinó en relación al tiempo de residencia que deben estar los nutrientes en contacto con las bacterias en estado sésil.

Siendo el tiempo de residencia establecido de 30 min, y el volumen útil del reactor de 450 ml, entonces el flujo de alimentación se calcula del siguiente modo:

$$\text{Flujo (ml/min)} = \frac{450 \text{ ml}}{30 \text{ min}} = 15 \text{ ml/min}$$

Debido a que la bomba nos permite introducir el flujo en ml/h, el flujo fue de 900 ml/h.

El sistema se mantuvo operando de modo continuo bajo agitación de 200 ± 5 rpm a 25 ± 2 °C por 24 h.

Las condiciones en las cuales se realizó la adición de los polifenoles o las partículas NpsAg@SiO₂-*polifenoles*, se muestran en la **tabla 2**:

Tabla 2: Acciones llevadas a cabo para cada etapa de la obtención de los *biofilms*.

Etapa de Adhesión	Etapa de maduración
El agregado de los polifenoles, se realizó en el vaso reactor (Fase de <i>batch</i>). Luego se continuó con la etapa de maduración. Los cupones se analizaron luego de que se completó el proceso.	La adición de quercetina se realizó en el interior del tanque de alimentación.

Recuento de microorganismos viables sobre los cupones

Una vez finalizado el ensayo en el reactor, se detuvo el sistema, se retiró cada una de las varillas que contienen los cupones y se las llevó a la cabina de bioseguridad. Con

la finalidad de remover las bacterias en estado planctónico se introdujo cada varilla en el interior de un tubo cónico de 50 ml con solución fisiológica estéril. Se removió cada cupón de sus respectivos orificios y se los raspó con una espátula metálica estéril sucesivas veces en ambas caras. Cada cupón se lavó con 10 ml de solución fisiológica. Por último, los cupones se homogeneizaron en vórtex por 30 seg y habiendo hecho las diluciones de cada tubo, se sembró por duplicado en medio sólido TSA por 24 ± 2 h a 35°C .

Cálculo de la densidad bacterias en el *biofilm*:

$$(CFU/cm^2) = \left[\left(\frac{X}{B} \right) \left(\frac{V}{A} \right) (D) \right] \quad (1)$$

Donde:

X= promedio CFU B= volumen plaqueado
 V= volumen raspado A= superficie raspada D= dilución

Análisis cuantitativo con cristal violeta (0,1%) de la biomasa total desarrollada sobre los cupones.

A un grupo de cupones se los reservó para realizar tinciones con cristal violeta, de modo de poder cuantificar la biomasa total y comparar con los valores obtenidos de los recuentos de microorganismos viables.

A los cupones se los llevó a estufa por 30 min a 60°C , para permitir fijar la biomasa total. A continuación, se inoculó con 100 μL de colorante CV, dejándose actuar por 10 minutos a temperatura ambiente. Para retirar el exceso de colorante, se sumergió cada cupón en agua destilada y luego se dejó secar 1 h en cabina de bioseguridad. Para remover el colorante incorporado en la biomasa total, se introdujo cada cupón en un tubo de ensayo con 3 ml de etanol 96° . Al cabo de 15 minutos se realizó la lectura de absorbancia a 590 nm en espectrofotómetro.

Reactor de flujo por goteo (*Drip Flow Reactor*) para formación de *biofilm* sobre superficies de vidrio.

Nuevamente, para llevar a cabo este ensayo, debimos armar un sistema similar al que se encuentra descrito en la norma ASTM E2647-13 (*Standard Test Method for Quantification of Pseudomonas aeruginosa Biofilm Grown Using Drip Flow Reactor with Low Shear and Continuous Flow*). Para su confección, se trabajó junto con el personal del sector de I+D de la empresa Adox S.A. En la **figura 4-A** se muestra una

representación del sistema utilizado y en la **figura 4-B** se muestra todo el sistema conectado.

Esquema del sistema

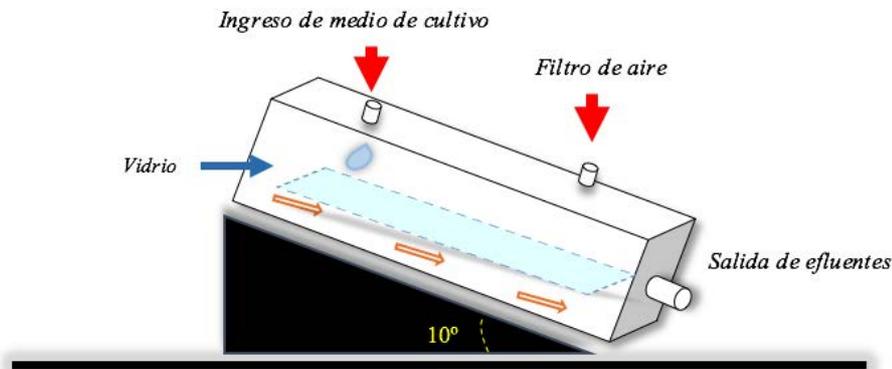


Figura 4-A: Esquema del reactor por goteo utilizado para la formación de *biofilms* sobre portaobjetos.



Figura 4-B: Sistema conectado incluyéndose el reactor por goteo utilizado para la formación de *biofilms* sobre portaobjetos, la bomba de alimentación y el tanque con el medio de cultivo.

Este sistema nos permitió obtener *biofilms* de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1), creciendo en una interfase aire/líquido con flujo continuo, a baja concentración de nutrientes y baja fuerza de corte, debido a que el flujo resultante es laminar. La forma de éstos *biofilms*, podrían simular a los que se forman en rociadores de productos, cintas

transportadoras de la industria de alimentos, en catéteres, en los pulmones de pacientes con fibrosis quística y placas dentales.

Los *biofilms* formados se observaron al microscopio óptico previa tinción con colorante cristal violeta al 0,1%.

Los materiales utilizados fueron:

Pipetas automáticas p200 y p1000, placas de Petri estériles descartables, tubos de ensayo de vidrio, ansa metálica, mechero, estufa de cultivo (Venticell), pH metro (Hanna), espectrofotómetro (Shimadzu UV1800), cubetas de plástico descartables de 1,5 ml y paso de luz de 10 mm, vórtex, balanza analítica (Mettler Toledo), autoclave, bomba peristáltica (Adox S.A), frascos de vidrio, mangueras de silicona estériles, reactor con sus componentes (se describen en el esquema), filtros de aire, microscopio óptico (Omax).

Los medios de cultivo utilizados fueron:

Caldo tripteína soja (Biokar) 3 gr/L, agua desionizada estéril.

Preparación del inóculo

Se repicó colonias de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) y se las inoculó en 100 ml de medio de cultivo TSB (3 gr/L), que luego se llevó a incubar con agitación a 35°C por 24 h. A continuación, se midió $DO_{620nm} = 0,1$, que corresponde a 10^8 UFC/ml.

Procedimiento

Fase de *Batch*

Con el bloque (reactor) en posición horizontal y el portaobjetos colocado, se adicionó 15 ml de medio de cultivo TSB (3 gr/L), que luego se inoculó con 1,0 ml del microorganismo. El sistema se incubó a 21 ± 2 °C, por 6 horas. Una vez finalizado ese período de tiempo, se vacía el reactor, inclinando el bloque, para iniciar el proceso de fase por flujo continuo.

Fase de Flujo Continuo

En esta etapa se conectó el sistema asépticamente y se colocó el reactor en su base inclinada, para permitir el descenso del medio de alimentación. A continuación, se inició el ingreso de medio de cultivo TSB (270 mg/ml), mediante una bomba peristáltica con flujo de alimentación de 50 ml/h. La formación de *biofilm* se llevó a cabo por 24 horas. Luego de ese período de tiempo el sistema se desconectó, se lavó el portaobjetos con agua

destilada para remover bacterias en estado planctónico y se dejó secar en cabina de bioseguridad.

Por último, los vidrios se recubrieron con colorante cristal violeta 0,1% por 15 minutos y se observó al microscopio óptico.

Tratamiento de *biofilms* con detergente no iónico

La finalidad de este ensayo radica en observar el efecto del detergente sobre los *biofilms* formados (Davies et. al., 1998). Si los microorganismos lograron formar un *biofilm* robusto y estable, entonces no deberíamos ver grandes modificaciones al someterlos a un tratamiento con detergente no iónico. Por el contrario, si los microorganismos forman *biofilm* en presencia de un compuesto que inhibe o debilita su formación, entonces esperaríamos ver afecciones importantes a causa de este procedimiento.

Los materiales utilizados fueron:

Reactor de flujo por goteo (*Drip Flow reactor*), portaobjetos, pipetas p1000 y p200.

Procedimiento

Una vez finalizado el proceso de formación de *biofilm* en el reactor de flujo por goteo, se lavó y secó el portaobjetos en cabina de bioseguridad. A continuación, se realizó una primera tinción con cristal violeta 0,1% por 15 minutos y luego se observó en microscopio óptico (Control).

Luego, ese mismo portaobjetos teñido y con el *biofilm* formado, se sumergió en una solución de *Tween* 80 (0,2% p/v) por 2 h y 16 h. Finalmente, se observó al microscopio óptico al cumplirse cada período de tiempo, previa tinción con colorante cristal violeta 0,1%.

Quorum sensing

Factores de virulencia

Se los define como mecanismos a través de los cuales los microorganismos logran ejercer su patogenicidad en el entorno en el que se encuentran, asegurándose de este modo su supervivencia, desarrollo y reproducción.

Con la finalidad de determinar si los polifenoles participan en la regulación de los factores de virulencia en *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1), realizamos ensayos que nos permitió visualizar qué ocurre al introducirlos en el medio circundante.

Movilidad por *swarming* y *swimming*

Ambos son mecanismos de movilidad que utilizan las bacterias para desplazarse en un medio semi sólido. La bacteria en estudio, *Pseudomonas aeruginosa*, tiene flagelos que le permite llevar a cabo tal motilidad. A su vez, producen un surfactante que les facilita llevar a cabo esta acción.

Los materiales utilizados fueron:

Placas de Petri estériles, estufa de cultivo (Venticell), autoclave, espátula de *Drigalsky*, pipetas p20, p1000.

Medios de cultivo:

Medio de cultivo mínimo M8* suplementado.

(*) M8 contiene: 12,8 gr/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 gr/L KH_2PO_4 , 0,5 gr/L NaCl, 5-7 gr/L Agar. Suplementado luego de esterilizarse con glucosa (20%), Casaminoácidos (20%), MgSO_4 (1M), a través de filtro jeringa de 0,22 μm .

Procedimiento

Con el medio M8 fundido y habiendo suplementado el resto de los componentes, se vertió aproximadamente 25 ml en el interior de las placas de Petri. Se las dejó secar en cabina de bioseguridad por 6 h. A continuación, se adicionó en diferentes placas 1 ml de quercetina [0,125-1,00] mg/ml, disuelta en etanol, y se esparció el líquido con el uso de espátula de *Drigalsky*.

Por último, para el ensayo de *Swarming* se sembró 2,5 μL del inóculo bacteriano en la superficie del agar, teniendo cuidado de no tocarla al momento de realizar la siembra. Luego, se cultivó en estufa por 24-48 h a 35°C.

Para el ensayo de *Swimming* se utilizó la punta de un *tip*, la cual se introdujo en el tubo que contenía el inóculo microbiano, y luego se procedió a picar la placa de agar. Las placas se incubaron en estufa de cultivo por 24-48 h a 35 °C.

▣ Resultados

Determinación de Concentración inhibitoria mínima (CIM) de los polifenoles (quercetina, resveratrol y ácido elálgico)

En la **Tabla 3** podemos observar que tanto la quercetina como el ácido elálgico tienen una CIM de 2.0 mg/ml, mientras con resveratrol se requiere de una concentración de 4,0 mg/ml para ejercer inhibición sobre PAO1.

Tabla 3: Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de los polifenoles (mg/ml) frente a *P. aeruginosa* (PAO1).

Microorganismo	Polifenoles	Concentración Polifenoles (mg/ml)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Quercetina	2,0
	Resveratrol	4,0
	Ácido elálgico	2,0

A continuación, se realizó un ensayo para evidenciar si los polifenoles se encuentran ejerciendo un efecto inhibitorio sobre los microorganismos debido a que generan la desregulación en la división celular, si este fuera el caso deberíamos observar bacterias de mayor longitud respecto al control para concentraciones *sub* inhibitorias (Hwang & Lim, 2015).

En el procedimiento utilizado, se tomó muestra de los pocillos correspondientes a la concentración previa a la CIM y se observó al microscopio óptico, previa tinción con cristal violeta (0,1%) (**Figura 5**).

Si observamos las imágenes tomadas con el microscopio óptico (**Figura 5**), podemos visualizar que las longitudes de las bacterias que se desarrollaron en presencia de los polifenoles (quercetina, resveratrol y ácido elálgico), resultan ser superiores a las longitudes observadas para el control (incubación sin polifenoles). Ello se corroboró realizando la medida de las mismas haciendo uso del programa ImageJ (n° imágenes=10) (**Tabla 4**).

En trabajos previos se propone que el aumento de la longitud de los microorganismos, se estaría dando debido al efecto inhibitorio de los polifenoles sobre la expresión de una proteína esencial para la división en células procariotas, siendo la misma denominada FtsZ (Hwang & Lim, 2015).

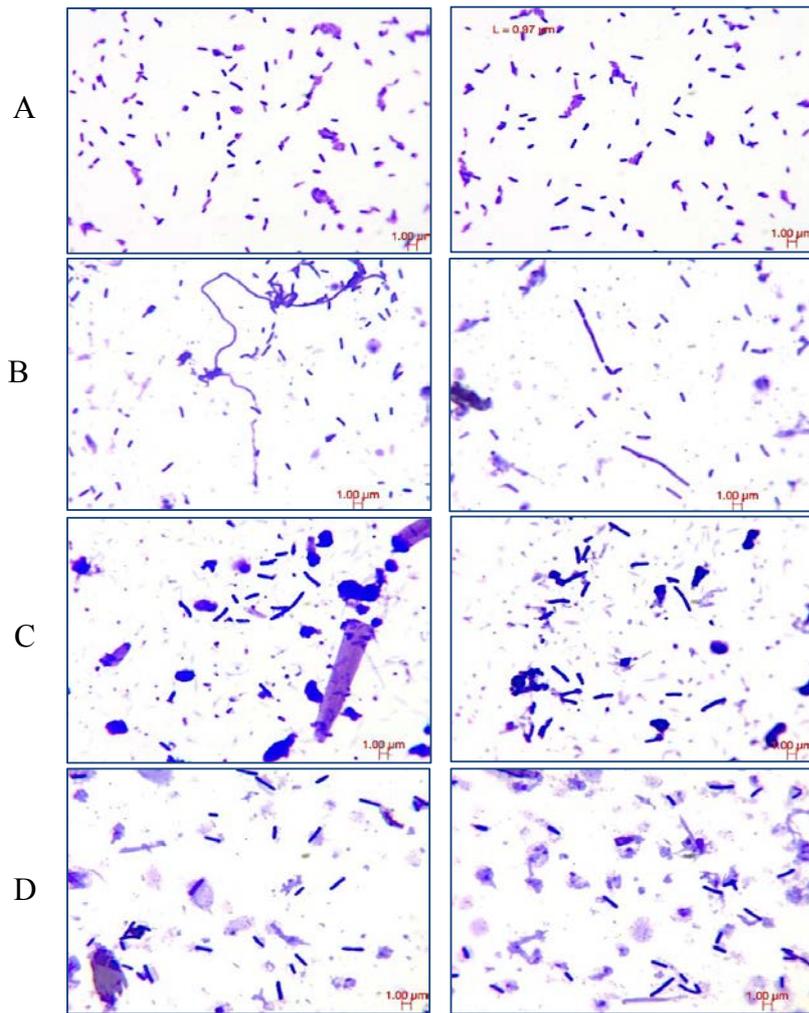


Figura 5: Microscopía óptica de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) crecidas en presencia de polifenoles a la concentración *sub* CIM: A) Controles; B) Medio de cultivo suplementado con Quercetina (1,0 mg/ml); C) Medio de cultivo suplementado con Resveratrol (2,0 mg/ml); D) Medio de cultivo suplementado con Ácido elágico (1,0 mg/ml). Tinción con Cristal Violeta (0,1 %) – Aumento 100X.

Tabla 4: Largo (μm) de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) creciendo en presencia de los respectivos polifenoles en las concentraciones *sub* CIM.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PAO1)	Largo (μm) \pm SD
Control	0,88 \pm 0,19
Quercetina (1,0 mg/ml)	1,37 \pm 0,73
Resveratrol (2,0 mg/ml)	2,28 \pm 0,78
Ácido elágico (1,0 mg/ml)	1,77 \pm 0,57

Concentración inhibitoria mínima de *biofilm* (CIMb) y concentración bactericida mínima de *biofilm* (CBMb)

Este ensayo se realizó adicionando las partículas CS-2-A y CS-2-A-Quercetina sobre *biofilms* desarrollados en placas multipocillos.

En el mismo se evidenció (**Tabla 5**) que la $CIM_{Biofilm}$ es superior a la CIM obtenidas para bacterias planctónicas, siendo los valores igual a: $CIM_{(C-2-A)} = 0,11$ mg/ml y $CIM_{Biofilm (CS-2-A)} = 0,44$ mg/ml; $CIM_{(CS-2-A-Q)} = 0,22$ mg/ml y $CIM_{Biofilm (CS-2-A)} = 0,88$ mg/ml. En ambos casos el valor es cuatro veces mayor a la CIM de PAO1 en estado planctónico.

Respecto a la $CBM_{Biofilm}$ encontramos también un aumento en sus valores para ambas partículas, siendo $CBM_{(CS-2-A)} = 0,22$ mg/ml y $CBM_{Biofilm (CS-2-A)} = 3,50-7,00$ mg/ml $CBM_{(CS-2-A-Q)} = 0,44$ mg/ml y $CBM_{Biofilm (CS-2-A)} = 7,00-14,00$ mg/ml.

Para esta condición el aumento en la concentración es considerablemente superior (12 veces mayor) para microorganismos en estado sésil respecto a microorganismos en estado planctónico, quedando demostrado de este modo, que los microorganismos en estado sésil se encuentran en condiciones de “resguardo” frente a las agresiones externas, resaltando la importancia de de identificar la condición fenotípica (planctónica o sésil) de cada microorganismo al establecer la CIM y CBM para cada microorganismo la condición en el que se encuentren, planctónico o sésil (Macia et al., 2014).

A su vez, se observó que la concentración necesaria para ejercer efecto de inhibición y bactericida resultó superior (el doble de concentración) para las partículas CS-2-A-Q respecto a CS-2-A (**Tabla 5**). Ello podría explicarse, al igual que con los microorganismos en estado planctónico, que los polifenoles se encuentren actuando como antioxidantes (Gulcin & Alwaseel, 2022), contrarrestando las especies reactivas de oxígeno (EROS) generadas por las NpsAg (Kim et al., 2007), lo cual beneficiaría a los microorganismos, siendo necesario una mayor proporción de partículas para ejercer su acción como antimicrobiano.

Tabla 5: Concentración inhibitoria mínima de *biofilm* y concentración bactericida mínima de *biofilm* para las partículas NpsAg@SiO₂ y NpsAg@SiO₂-Quercetina.

Partículas	$CIM_{Biofilm}$	$CBM_{Biofilm}$
CS-2-A	0,44	3,50-7,00
CS-2-A-Q	0,88	7,00-14,00

Formación de *biofilms* sobre placas multipocillos

Tiempo de adhesión de PAO1

Para determinar el tiempo en el que se obtiene una biomasa considerable de PAO1, se cultivó a las bacterias a diferentes tiempos, realizando luego tinción con colorante cristal violeta (0,1%) para determinar la biomasa adherida en la superficie de la placa multipocillos.

A continuación, en la **tabla 6**, se muestran diferentes tiempos en los cuales se dejó en contacto a los microorganismos con la superficie de la placa multipocillos, y sus respectivos resultados de absorbancia a 590 nm, que se corresponden con la incorporación del colorante cristal violeta (0,1%) luego de retirar el medio, lavar los pocillos y teñirlos con el colorante previamente mencionado.

Entonces, en base a los resultados expuestos en la **tabla 6** decidimos seleccionar el **tiempo de 60 minutos para estudiar adhesión de PAO1**.

Tabla 6: Valores de absorbancia a 590 nm del Cristal Violeta adherido al biofilm.

Tiempo (min)	Abs (590 nm)
30	1,081
45	1,105
60	1,432
120	1,776

Formación de *biofilms* sobre placas multipocillos en presencia de polifenoles.

Los *biofilms* se formaron en placas multipocillos de 24 *wells* utilizando medio mínimo, por un tiempo de 24 h y posterior tinción con el colorante cristal violeta (0,1%).

En el ensayo se observó (**Figura 6**) que la presencia de quercetina generó inhibición en la formación de los *biofilms* de PAO1. Tal inhibición demostró no ser dosis-respuesta dependiente, observándose disminución significativa a partir de 0,125 mg/ml. Con resveratrol y ácido elágico no se observó disminución en la retención de colorante en todo el rango de concentraciones, indicando que los mismos no ejercen inhibición en la formación de los *biofilms*.

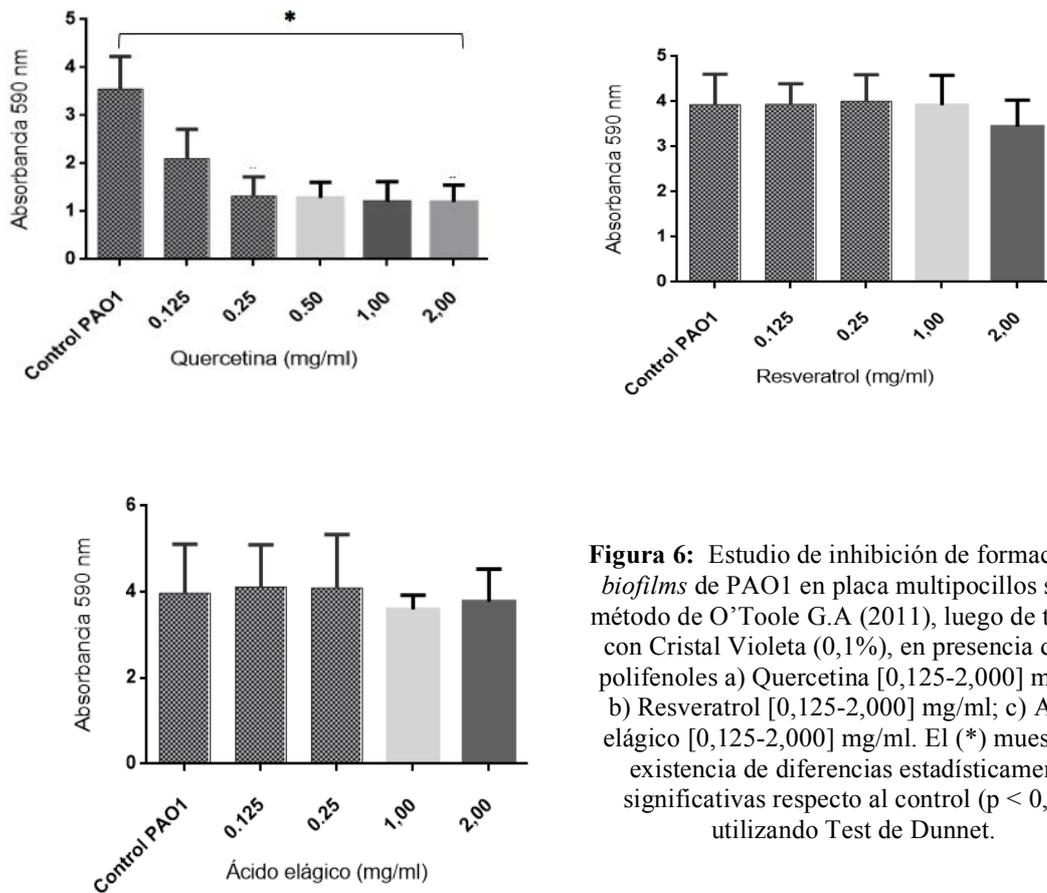


Figura 6: Estudio de inhibición de formación de *biofilms* de PAO1 en placa multipocillos según método de O’Toole G.A (2011), luego de tinción con Cristal Violeta (0,1%), en presencia de los polifenoles a) Quercetina [0,125-2,000] mg/ml; b) Resveratrol [0,125-2,000] mg/ml; c) Acido elágico [0,125-2,000] mg/ml. El (*) muestra la existencia de diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($p < 0,05$) utilizando Test de Dunnet.

Estudios en Etapa de Adhesión - Placa multipocillos-

En la **Figura 7**, se muestra el estadio de la formación de *biofilm* que se quiere estudiar.

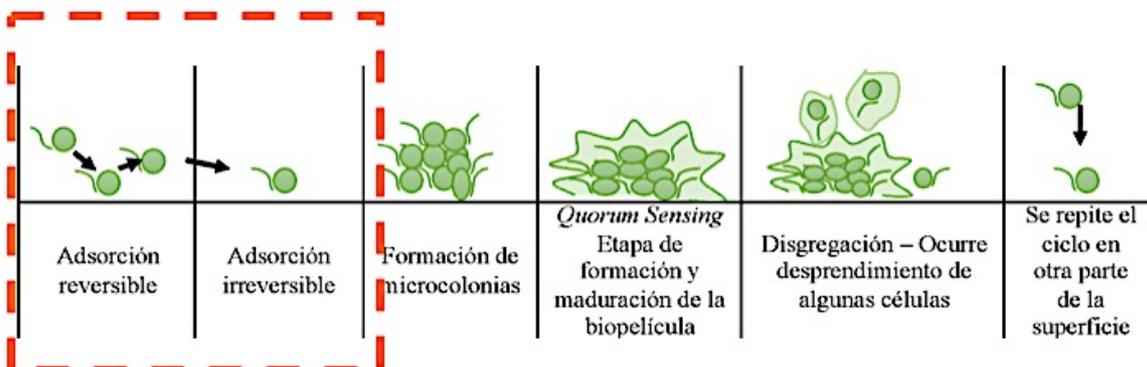


Figura 7: Representación de los estadios de la formación de *biofilms*.

Los ensayos se realizaron de acuerdo al procedimiento descrito en la sección de materiales y métodos del presente capítulo (página 100). Sobre una placa multipocillos se

llevó a cabo la adhesión de los microorganismos en presencia de los polifenoles (quercetina, resveratrol y ácido eláxico) y se comparó los resultados frente al control (ausencia de polifenoles).

Los resultados obtenidos en la **Figura 8** indican, que la quercetina actuaría inhibiendo la etapa de **adhesión** de PAO1 a partir de 0,125 mg/ml, siendo esta concentración la de menor reducción observada. Tal efecto demostró tener dependencia con la dosis administrada. Si bien el estudio se realizó sobre bacterias adheridas a la superficie de la placa, posiblemente quercetina haya actuado inhibiendo el desarrollo de bacterias en estado planctónico y por ello se observa una disminución en la adhesión siendo ello dependiente de la dosis administrada.

Para resveratrol y ácido eláxico no observamos reducción en la etapa de adhesión en relación al control.

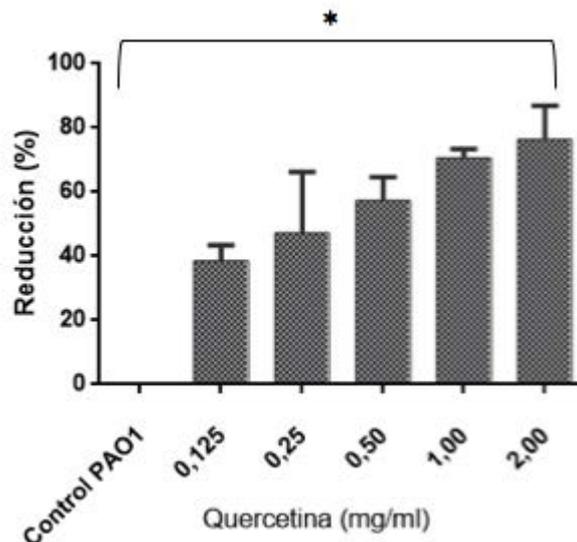


Figura 8: Tinción con Cristal Violeta (0,1%), expresado como reducción porcentual (%) para ensayo de adhesión de PAO1 sobre placa multipocillos cultivadas en presencia de quercetina [0,125-2,00] mg/ml. Los gráficos de resveratrol y ácido eláxico no se muestran debido a que no se observó inhibición en los rangos de concentración estudiados [0,125-2,00] mg/ml.

Estudio en la etapa de Maduración - Placa multipocillos-

En la **Figura 9** se muestra que momento de la formación de biofilm se está intentando inhibir con los tratamientos a efectuarse.

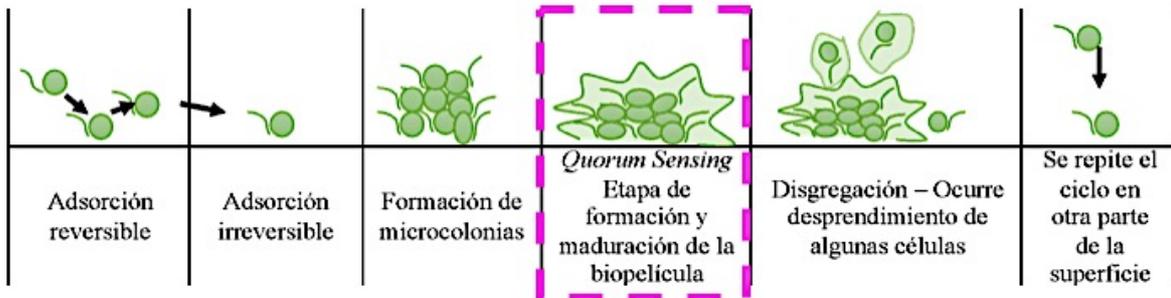


Figura 9: Representación de los estadios de la formación de *biofilms*.

Con la finalidad de estudiar el estadio de maduración de los *biofilms* formados por PAO1, se permitió la adhesión del microorganismo sobre placas multipocillos y a continuación, sobre los pocillos con los microorganismos ya adheridos, se procedió a agregar los polifenoles disueltos en medio de cultivo mínimo (ver sección materiales y métodos del presente capítulo-página 101).

Entonces, lo que se observó es que adicionar quercetina en la etapa de **maduración** (**Figura 10**) durante la formación de *biofilms* de PAO1, generó inhibición a partir de 0,125 mg/ml, siendo este efecto independiente de la concentración de quercetina administrada.

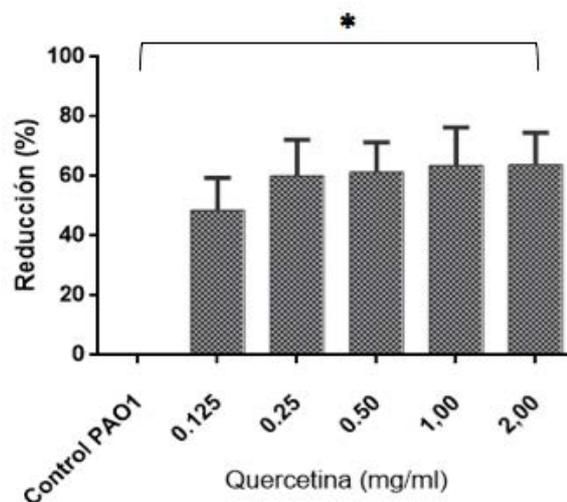


Figura 10: Reducción (%) en la etapa de maduración en la formación de los *biofilms* de PAO1 según modificación de método de O’Toole G.A (2011), en presencia de Quercetina [0,125-2,00] mg/ml. Tiempo de adhesión: 60 min. Los gráficos de resveratrol y ácido elágico no se muestran debido a que no se observó inhibición en todo el rango de concentraciones evaluadas [0,125-2,00] mg/ml.

Formación de *biofilms* en reactor de flujo continuo

Para la realización de estos ensayos se utilizó el reactor confeccionado junto con el personal de la empresa Adox, siendo el mismo descrito en la norma ASTM E 2562 – 17 (*Standard Test Method for Quantification of Pseudomonas aeruginosa Biofilm Grown with High Shear and Continuous Flow using CDC Biofilm Reactor*) (ver sección materiales y métodos del presente capítulo - página 101).

En esta etapa, se trabajó únicamente con quercetina debido a que fue el único polifenol que demostró tener efectos inhibitorios sobre la formación de los *biofilms* de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1). La concentración seleccionada fue la mínima concentración que demostró ejercer inhibición (0,125 mg/ml).

Los estudios realizados fueron:

1. Tinción con colorante Cristal Violeta (Reducción (%))
2. Recuento de microorganismos viables (Log_{10} (UFC/cm²))

Tratamiento con quercetina en las etapas de Adhesión o Maduración.

En este ensayo se utilizó el reactor de flujo continuo (CDC-Reactor) (Ver materiales y métodos- página 101), pudiéndose adicionar quercetina en la fase de batch, para estudiar la adhesión del microorganismo. También el agregado de quercetina se puede realizar en el tanque de alimentación, permitiendo estudiar la etapa de maduración del *biofilm* generado por PAO1.

Se observó (**Figura 11-A Recuadro Verde**) que adicionar quercetina (0,125 mg/ml) en la etapa de adhesión y luego continuar con el cultivo continuo, generó una reducción significativa de la biomasa final asociada a los cupones, ello se evidenció por la disminución del colorante retenido respecto al control. Sin embargo, cuando se realizó el recuento de los microorganismos viables, no se observó reducción significativa respecto al control (**Figura 11-B Recuadro Verde**).

Por otro lado, cuando se administró quercetina (0,125 mg/ml) en la etapa de maduración (**Figura 11-A Recuadro Rojo**), se observó una reducción significativa del colorante retenido, lo cual nos daría indicios de una disminución en la biomasa total formada por parte de los microorganismos presentes en los cupones. A su vez, el número de microorganismos viables disminuyó considerablemente respecto al control (**Figura 11-B Recuadro Rojo**).

En este caso podría suceder que el *biofilm* formado sea más laxo, debido a la presencia de quercetina, lo cual generaría que en parte se desprenda arrastrando consigo microorganismos viables.

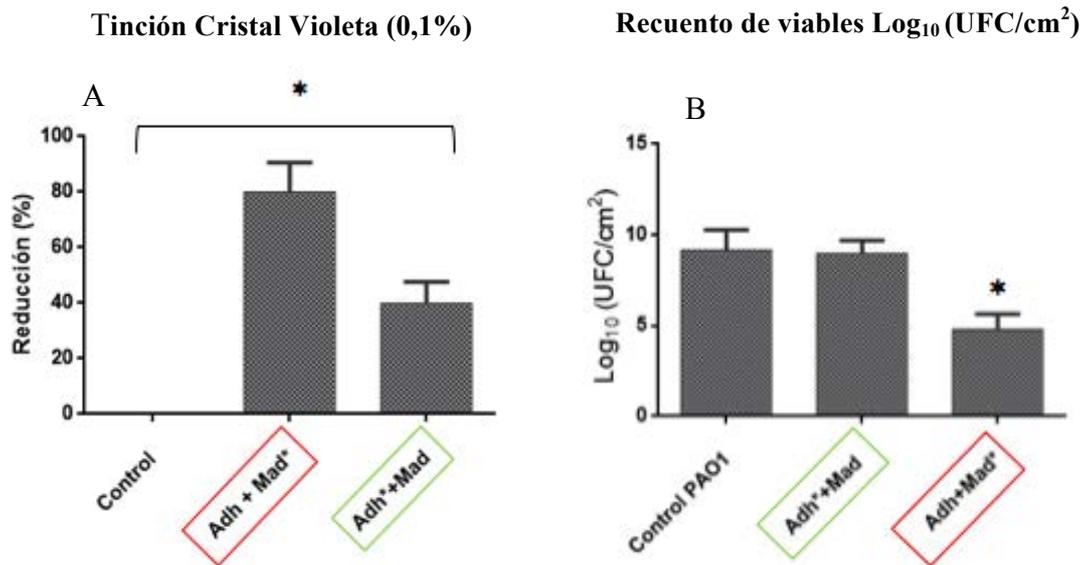


Figura 11: El (*) en el subíndice de Adh o Mad, indican en qué etapa se adicionó quercetina (0,125 mg/ml). A) Reducción (%) de la tinción con Cristal Violeta (0,1%) sobre cupones de plástico; B) Recuento de viables expresadas como Log₁₀ (UFC/cm²). Quercetina se administró en la etapa de Adhesión o Maduración, según se indique debajo de cada gráfico, para PAO1 creciendo en reactor sobre cupones de plásticos, sometidos a agitación de 200 ± 5 rpm a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h, La concentración de quercetina utilizada fue de 0,125 mg/ml. Se realizó estudio estadístico a través del Test de Dunnet ($p < 0,05$), indicándose con (*) las diferencias significativas.

Tratamiento con quercetina en las etapas de Adhesión y Maduración

Utilizando el reactor de flujo continuo, descrito en la página 101 en la sección materiales y métodos del presente capítulo, se efectuó el ensayo de estudio de *biofilms* de PAO1, en este caso, adicionando quercetina en todo el proceso de desarrollo, es decir, adhesión y maduración. Para ellos, se agregó quercetina en la fase de *batch* y luego en el tanque de alimentación.

Luego estos resultados se compararon con los obtenidos para la adición de quercetina en la etapa de maduración únicamente (**Figuras 11 A y B, Recuadros Rojos**).

Si observamos la **figura 12-A** y **figura 12-B**, veremos que tanto la reducción porcentual (dada por la tinción con CV) como el recuento de microorganismos viables, generaron efectos inhibitorios similares. Por lo tanto, el mayor efecto inhibitorio se estaría ejerciendo cuando la quercetina se encuentra presente en la etapa de maduración.

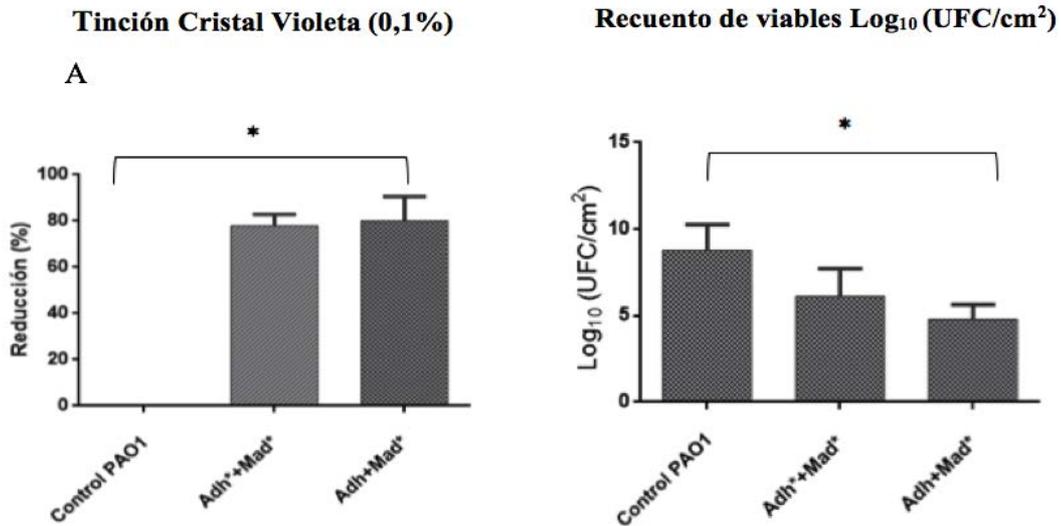


Figura 12: El (*) en el subíndice de Adh o Mad, indican en qué etapa se adicionó quercetina (0,125 mg/ml). A) Reducción (%) de la tinción con Cristal Violeta (0,1%) sobre cupones de plástico; B) Recuento de viables expresadas como Log₁₀ (UFC/cm²). Quercetina se administró en el proceso completo (Adh*+Mad*) o en la etapa Maduración (Mad*), según se indique debajo de cada gráfico, para PAO1 creciendo en reactor sobre cupones de plásticos, sometidos a agitación de 200 ± 5 rpm a 25 ± 2°C por 24 h. La concentración de quercetina utilizada fue de 0,125 mg/ml. Se realizó estudio estadístico a través del Test de Dunnet (p < 0,05), indicándose con (*) las diferencias significativas.

Separación inducida por detergente - Tween 80 (2,0%)-

En el siguiente ensayo se formaron los *biofilms* de PAO1 sobre portaobjetos de vidrio haciendo uso del reactor de flujo por goteo (ver sección materiales y métodos del presente capítulo, página 106).

Los polifenoles se administraron en el tanque de alimentación siendo introducidos al sistema gota a gota a través de una bomba peristáltica. Luego, los portaobjetos con los *biofilms* formados se trataron con detergente Tween 80 (2,0%) a diferentes tiempos. Para observar cada etapa se recurrió a la tinción con cristal violeta (0,1 %).

En las imágenes de microscopía óptica (**Figura 13**), se observó que las muestras tratadas con quercetina (0,125 mg/ml), han desarrollado un *biofilm* poco robusto, ello se evidenció en la imagen de la **Figura 13-B** en la que se pudo ver baja confluencia microbiana. Luego de tratar el portaobjetos con Tween 80 durante 2h, se evidenció pérdida de biomasa respecto al control, sin demasiados cambios al exponerse al detergente por 16 h (**Figuras 13 B1-B2**). Por lo tanto, la presencia de quercetina en la etapa de maduración generaría *biofilms* poco robustos y laxos.

Respecto a los *biofilms* tratados con resveratrol (**Figuras 13 C-C1-C2**) y ácido elágico (**Figuras 13- D-D1-D2**), no se observaron cambios significativos en aquellas muestras tratadas con Tween 80 (2h y 16h) respecto a su muestra control (**Figuras 13-A-A1-A2**), que si bien se observó pérdida de biomasa en los diferentes tratamientos, la misma no es tan marcada como en el caso de quercetina.

Con estos resultados terminamos de demostrar que tanto resveratrol como ácido elálgico no ejercen inhibición en la etapa madurativa de los *biofilms* de PAO1 para las concentraciones evaluadas (0,50 mg/ml) como si la ejercería la quercetina.

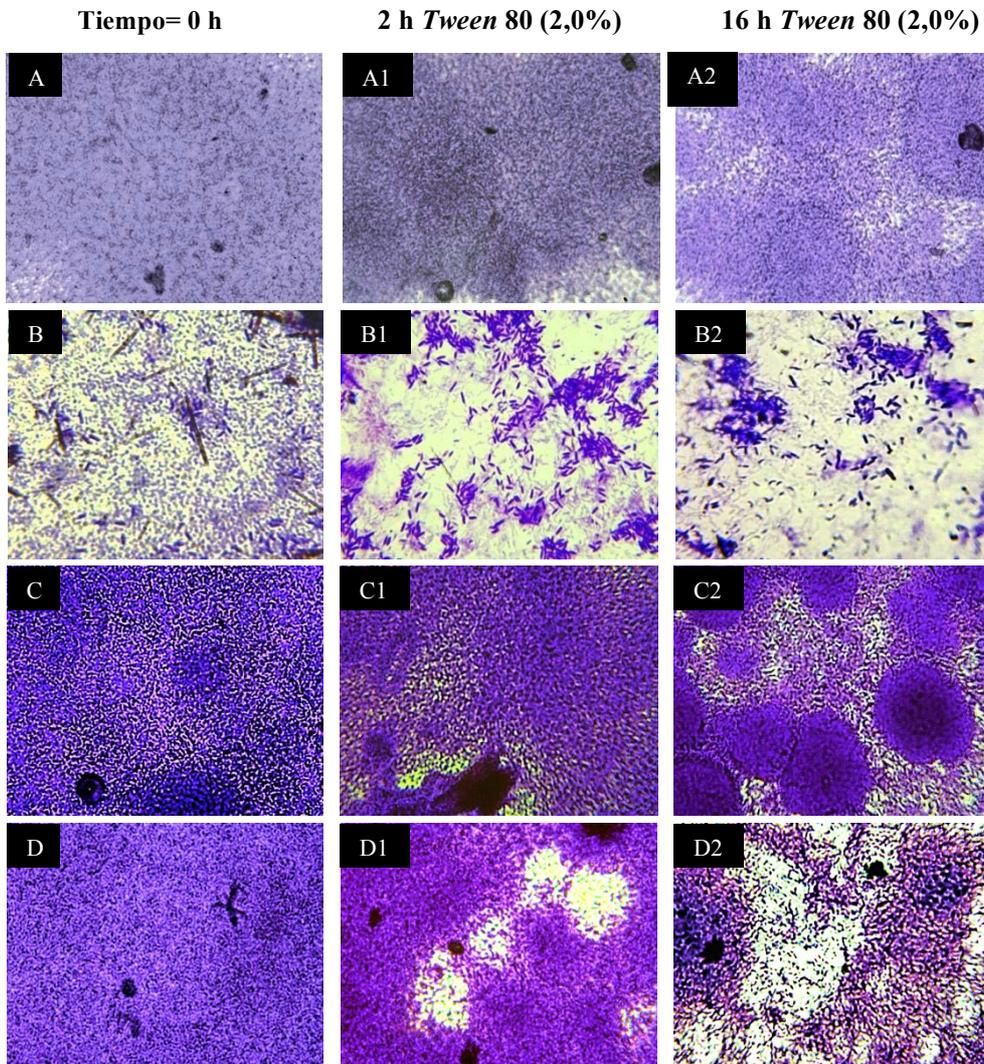


Figura 13: A) *Biofilm* Control formado sobre portaobjetos de vidrio en *drip flow reactor* (6 h de adhesión + 24 h de maduración). Tinción con colorante cristal violeta (0,1 %), aumento microscopio óptico 40X; A1) y A2) *Biofilm* control PAO1, sumergido en solución acuosa con con *Tween* 80 (2,0 %) por los tiempos de 2 h y 16 h, post enjuague con agua destilada por inmersión y posterior tinción con con cristal violeta (0,1 %); B) *Biofilm* formado sobre sobre portaobjetos de vidrio en *drip flow reactor* (6 h de adhesión + 24 h de maduración en presencia de quercetina (0,125 mg/ml)) y posterior tinción con cristal violeta (0,1 %); B1) y B2) *Biofilm* crecido en presencia de quercetina (0,125 mg/ml) durante su maduración y luego sumergido en solución acuosa con con *Tween* 80 (2,0 %) por un tiempo de 2 h y 16 h, post enjuague con agua destilada por inmersión y posterior tinción con con cristal violeta (0,1 %). C) *Biofilm* formado sobre sobre portaobjetos de vidrio en *drip flow reactor* (6 h de adhesión + 24 h de maduración en presencia de resveratrol (0,50 mg/ml)) y posterior tinción con cristal violeta (0,1 %); C1) y C2) *Biofilm* crecido en presencia de resveratrol (0,50 mg/ml) durante su maduración, sumergido en solución acuosa con con *Tween* 80 (2,0 %) por un tiempo de 2 h y 16 h, post enjuague con agua destilada por inmersión y posterior tinción con con cristal violeta (0,1 %). D) *Biofilm* formado sobre sobre portaobjetos de vidrio en *drip flow reactor* (6 h de adhesión + 24 h de maduración en presencia de ácido elálgico (0,50 mg/ml)) y posterior tinción con cristal violeta (0,1 %); D1) y D2) *Biofilm* crecido en presencia de ácido elálgico (0,50 mg/ml) durante su maduración, sumergido en solución acuosa con con *Tween*

80 (2,0 %) por un tiempo de 2 h y 16 h, post enjuague con agua destilada por inmersión y posterior tinción con con cristal violeta (0,1 %).

Biofilm formado en reactor de flujo por goteo en presencia de: CS-2-A; CS-2-A-Quercetina y Quercetina.

La metodología que se utilizó para la formación de *biofilms* sobre las superficies de los portaobjetos fue la misma que se describió previamente, utilizando el reactor de flujo por goteo.

En este caso utilizamos las partículas *Core Shell*: (CS-2-A); CS-2-A-Quercetina y Quercetina.

Figura 14- 2: Muestra las micrografías luego de un tratamiento con partículas *Core Shell* (CS-2-A) en la concentración inhibitoria mínima para bacterias en estado planctónico (0,11 mg/ml).

Figura 14- 3: Muestra las micrografías luego de un tratamiento con partículas *Core Shell* adsorbidas con quercetina (CS-2-A-Quercetina) en la concentración inhibitoria mínima de PAO1 para bacterias en estado planctónico (0,22 mg/ml).

Figura 14- 4: Muestra las micrografías luego de un tratamiento con partículas *Core Shell* adsorbidas con quercetina (CS-2-A-Quercetina) en la concentración bactericida mínima de PAO1 para bacterias en estado planctónico (0,44 mg/ml).

Figura 14- 5: Muestra las micrografías luego de un tratamiento con Quercetina (0,125 mg/ml).

Analizando las **Figuras 14 -1** (Control) vs las **Figuras 14 -2-3-4-5**, se observó que tanto las partículas *Core Shell* como las *Core Shell*-Quercetina administradas en la etapa madurativa de los *biofilms*, ejercieron un efecto de inhibición considerable respecto al control. Ello se deduce de observar baja confluencia microbiana en las figuras previamente mencionadas.

Para este ensayo no esperábamos observar inhibición total de desarrollo debido a que se utilizaron concentraciones inhibitorias y bactericidas de PAO1 en estado planctónico. Las bacterias en estado sésil pasan por cambios a nivel metabólico y de expresión genética (O'Toole & Kolter, 1998), (Davey & O'Toole, 2000), lo cual los convierte en modelos diferentes a los planctónicos (Fux et al, 2005).

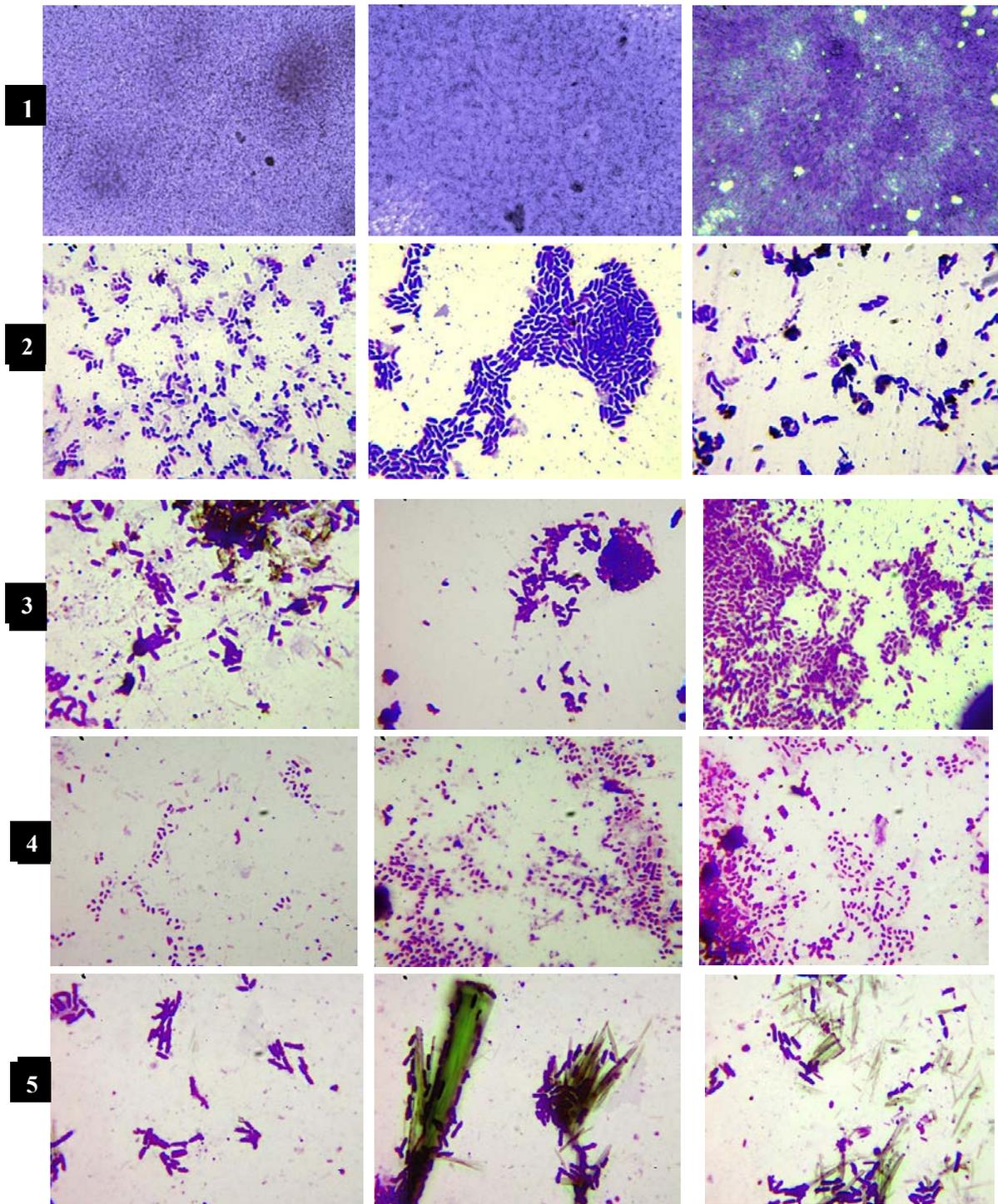


Figura 14: 1) Microscopía óptica de un *biofilm* de PAO1 sobre superficies de vidrio, desarrolladas en reactor de flujo por goteo (*drip flow reactor*). Los microorganismos se tiñeron con colorante cristal violeta (0,1%). El tiempo de adhesión fue de 6 horas, luego se maduró por 18 horas siendo las condiciones de trabajo: CONTROL medio mínimo – Aumento 40X; 2) Partículas *Core Shell* (NpsAg@SiO₂) en la concentración inhibitoria mínima (0,11 mg/ml) – Aumento 100X; 3) Partículas *Core Shell* adsorbidas con quercetina (NpsAg@SiO₂-Quercetina) en la concentración inhibitoria mínima para bacterias planctónicas (0,22 mg/ml) – Aumento 100X; 4) Partículas *Core Shell* adsorbidas con quercetina (NpsAg@SiO₂-Quercetina) en la concentración bactericida mínima para bacterias planctónicas (0,44 mg/ml) – Aumento 100X; 5) Quercetina 0,125 mg/ml - Aumento 100X.

Factores de virulencia

Los factores de virulencia que se estudiaron fueron de movilidad (*Swimming* y *Swarming*). La metodología se describe en materiales y métodos, página 109. Ambos son mecanismos de movilidad que utilizan las bacterias para desplazarse en un medio semi sólido. La bacteria en estudio, *Pseudomonas aeruginosa*, tiene flagelos que le permite llevar a cabo tal motilidad. A su vez, producen un surfactante que les facilita llevar a cabo esta acción.

En el ensayo de *Swimming* (**Figuras 15-A 15-B y Tabla 7**) se observó diferencias visuales muy marcadas en los halos de PAO1 control respecto a los observados cuando quercetina se encuentra presente en los medios semisólidos, en donde se observa la reducción del tamaño del halo, resultando tales reducciones dependientes de la concentración. Tales halos se midieron utilizando el programa ImageJ, luego se aplicó el estadístico de comparación de medias.

En el ensayo de *Swarming* (**Figuras 16-A 16-B y Tabla 8**), se observó diferencias en los halos de PAO1 control respecto a los observados cuando quercetina se encuentra presente en los medios semisólidos, resultando tales reducciones no dependientes de la concentración.

Para ambos ensayos, *Swimming* y *Swarming* se observó que la presencia de quercetina ejerce inhibición en la motilidad de PAO1. Tal inhibición resultó ser dosis dependiente para *swimming*, no así en el caso de *swarming*.

Swimming

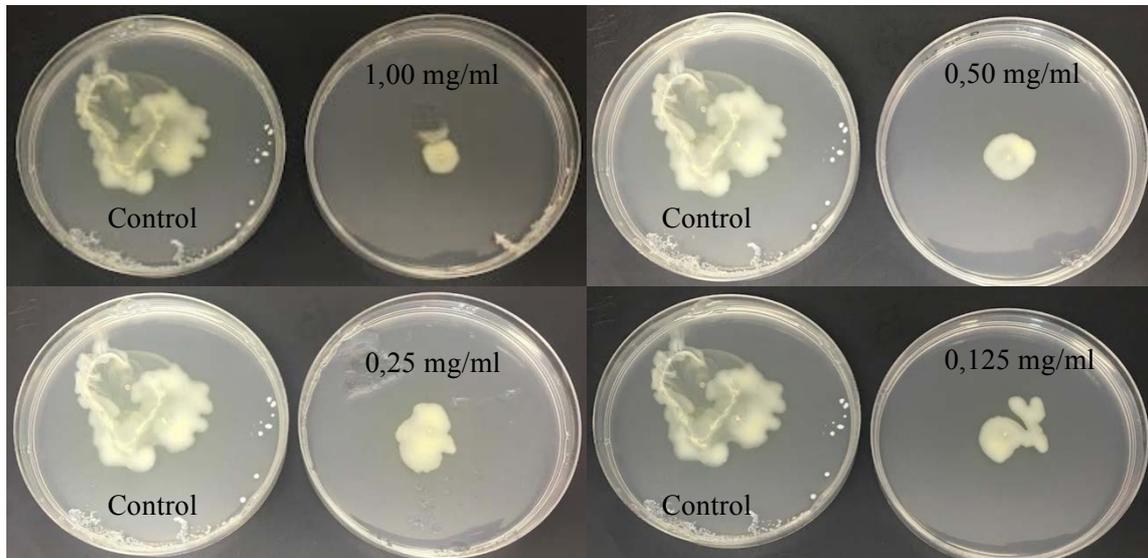


Figura 15-A: Ensayo de *Swimming* de PAO1, luego de 48 horas de incubación a 35°C, para diferentes concentraciones de quercetina presentes en las placas [0,125-1,00] mg/ml.

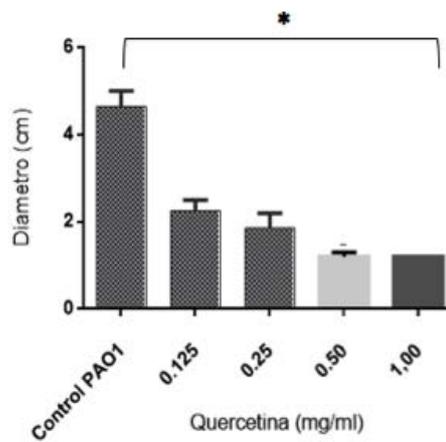


Figura 15-B: Medición de los halos del ensayo de *Swimming* de PAO1 utilizando el programa ImageJ, luego de 48 horas de incubación a 35°C, para diferentes concentraciones de quercetina presentes en las placas [0,125-1,00] mg/ml.

Tabla 7: Halos de *Swimming* de PAO1 en placas control y en presencia de quercetina [0,125-1,00] mg/ml, luego de 48 horas de incubación en estufa de cultivo a 35°C.

Quercetina (mg/ml)	Control	0,125	0,25	0,50	1,00
Diámetro (cm)	4,65	2,25	1,85	1,20	1,20
SD	0,50	0,35	0,50	0,14	0,00

Swarming

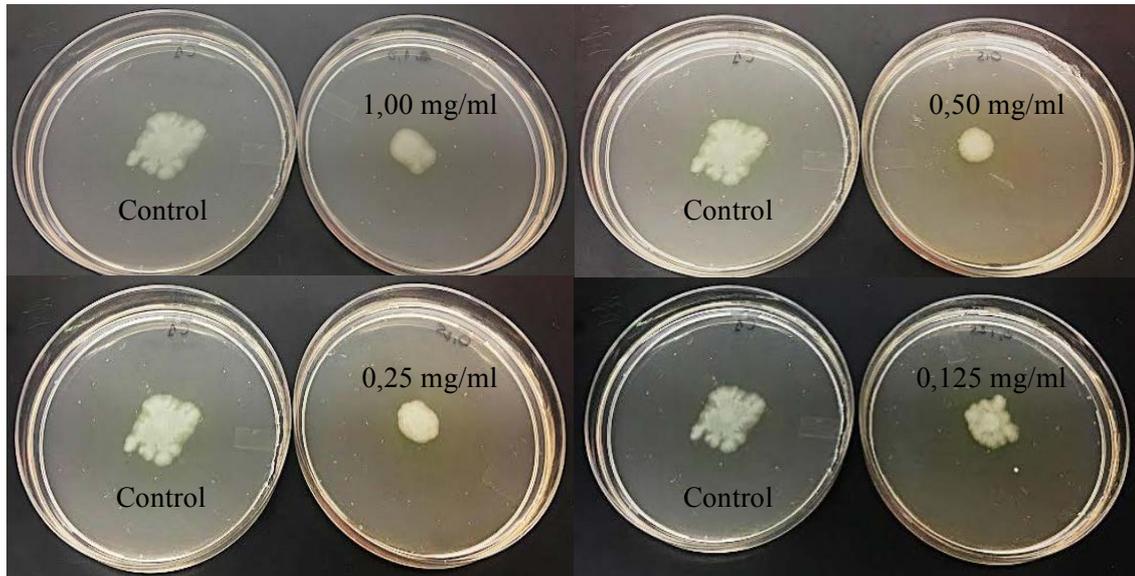


Figura 16-A: Ensayo de *Swarming* de PAO1, luego de 48 horas de incubación a 35°C, para diferentes concentraciones de quercetina presentes en las placas [0,125-1,00-] mg/ml.

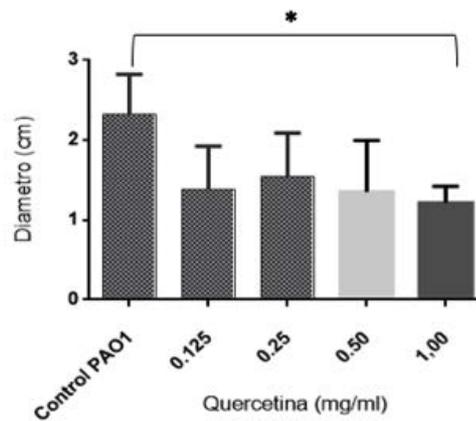


Figura 16-B: el ensayo de *Swarming* de PAO1 luego de 48 horas de incubación a 35°C, para diferentes concentraciones de quercetina presentes en las placas [0,125-1,00] mg/ml.

Tabla 8: Halos de *Swarming* PAO1 en placas control y en presencia de quercetina [0,125-1,00] mg/ml, luego de 48 horas de incubación en estufa de cultivo a 35°C.

<i>Quercetina</i> (mg/ml)	Control	0,125	0,25	0,50	1,00
<i>Diámetro (cm)</i>	2,32	1,39	1,55	1,35	1,22
<i>SD</i>	0,50	0,54	0,54	0,64	0,21

▣ Conclusiones del capítulo 5

En el presente capítulo se evidenció, en primera instancia, que los polifenoles ejercieron efecto inhibitorio sobre *P. aeruginosa* en estado planctónico, provocando desregulación en la división celular, y observándose bacterias de mayor longitud respecto al control para concentraciones *sub* inhibitorias (Hwang & Lim, 2015).

También se observó que para *biofilms* ya formados, las concentraciones inhibitorias y bactericidas mínimas aumentaron considerablemente respecto a las observadas para PAO1 en estado planctónico. Ello resalta la importancia de prevenir su formación antes de intentar erradicarlos una vez formados.

Por otro lado, cuando los *biofilms* de *P. aeruginosa* se formaron en presencia de cada uno de los polifenoles, se observó que únicamente quercetina ejerció inhibición de su desarrollo, siendo tal efecto independiente de la concentración utilizada.

Al realizar este estudio en la etapa de adhesión, se observó reducción en la retención del colorante CV respecto al control, siendo este efecto dependiente a la concentración que se utilizó. Cuando el ensayo se realizó estudiando la etapa de maduración del *biofilm*, el efecto fue similar al que se vio al estudiar la inhibición del proceso completo. Es decir, la inhibición fue independiente de la dosis utilizada.

Cuando se formaron los *biofilms* en presencia de quercetina (0,125 mg/ml) durante todo el proceso, no visualizamos diferencias significativas respecto al uso del mismo flavonoide en la etapa de maduración únicamente.

También se observó que el detergente no iónico (*Tween* 80) provocó desprendimiento de la biomasa formada por PAO1 cuando los *biofilms* se maduraron en presencia de quercetina. Ello nos llevó a concluir que los mismos son de estructura laxa y poco robustos. Esta demostración resulta interesante si se piensa en formular un producto para sectores hospitalarios, debido a que, si el producto se aplica sobre superficies y permanece en el tiempo, entonces nos permitiría removerlos con facilidad.

Si apuntamos a analizar el efecto que ejercen las partículas *Core Shell* y *Core Shell-Quercetina*, sobre los *biofilms* (ensayo en reactor por goteo), podemos concluir que no se observaron diferencias significativas en los *biofilms* al utilizarse uno u otro sistema particulado, provocando el mismo nivel de inhibición.

Respecto a los factores de virulencia estudiados (*swimming* y *swarming*), se observó que ambos mermaron en presencia de quercetina.

Por lo tanto, podemos concluir que, de los tres polifenoles evaluados, quercetina fue el único que evidenció efecto inhibitorio del *Quorum Sensing*, interfiriendo en la formación de los *biofilms* de PAO1 e inhibiendo factores de virulencia.

Las partículas candidatas a formar parte del producto final son: *Core Shell* y *Core Shell-Quercetina*. La decisión final se tomará luego de analizar los resultados que arrojen los ensayos de toxicidad con el fin de obtener un producto final activo y biocompatible.

▣ Bibliografía

- Davey ME & O’Toole GA (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol* R64: 847-867. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000>
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 1998 Apr 10. <https://doi.org/10.1126/science.280.5361.295>.
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
- Fux CA Costerton JW Stewart PS Stoodly P (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 13:34-40. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.010>
- Gopu, V., Meena, C. K., & Shetty, P. H. (2015). Quercetin influences quorum sensing in food borne bacteria: In-vitro and in-silico evidence. *PLoS ONE*, 10(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134684>
- Gulcin, I.; Alwasel, S.H. (2022). Metal Ions, Metal Chelators Metal Chelating Assay as Antioxidant Method. MDPI journal. <https://doi.org/10.3390/pr10010132>
- Hwang, D., & Lim, Y.-H. (2015). Resveratrol antibacterial activity against *Escherichia coli* is mediated by Z-ring formation inhibition via suppression of FtsZ expression. *Scientific Reports*, 5(1), 10029. <https://doi.org/10.1038/srep10029>
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J.-H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, Y. K., Park, Y. H., Hwang, C.-Y., Kim, Y.-K., Lee, Y.-S., Jeong, D. H., & Cho, M.-H. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1), 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>
- Macia, M. D., Rojo-Moliner, E., & Oliver, A. (2014). Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(10), 981–990. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12651>
- O’Toole, G. A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments*, 47. <https://doi.org/10.3791/2437>
- O’Toole, G. A. & Kolter R (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30: 295-304. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x>
- Paczkowski, J. E., Mukherjee, S., McCreedy, A. R., Cong, J. P., Aquino, C. J., Kim, H., Henke, B. R., Smith, C. D., & Bassler, B. L. (2017). Flavonoids suppress *Pseudomonas aeruginosa* virulence through allosteric inhibition of quorum-sensing Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 292(10), 4064–4076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.770552>
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* Portada. (n.d.).
- Sutherland, & W., I. (1977). Bacterial exopolysaccharides-their nature and production, in. *Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell*, 27–96. <http://ci.nii.ac.jp/naid/10011009552/en/>
- Vandeputte, O. M., Kiendrebeogo, M., Rajaonson, S., Diallo, B., Mol, A., el Jaziri, M., & Baucher, M. (2010). Identification of Catechin as One of the Flavonoids from

Combretum albiflorum Bark Extract That Reduces the Production of Quorum-Sensing-Controlled Virulence Factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1), 243–253. <https://doi.org/10.1128/AEM.01059-09>

- Vandeputte, O. M., Kiendrebeogo, M., Rasamiravaka, T., Stévigny, C., Duez, P., Rajaonson, S., Diallo, B., Mol, A., Baucher, M., & el Jaziri, M. (2011). The flavanone naringenin reduces the production of quorum sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology*, 157(7), 2120–2132. <https://doi.org/10.1099/mic.0.049338-0>
- Zeng, Z., Qian, L., Cao, L., Tan, H., Huang, Y., Xue, X., Shen, Y., & Zhou, S. (2008). Virtual screening for novel quorum sensing inhibitors to eradicate biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(1), 119–126. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1406-5>

Capítulo 6
Nanotoxicidad

CAPÍTULO 6- Nanotoxicidad-

▣ Resumen

En este capítulo testeamos a las partículas *Core Shell* con y sin polifenoles asociados frente a la línea celular de fibroblastos (L929), proveniente de tejido conectivo de ratón, realizando estudios de toxicidad a diferentes concentraciones.

Entre los estudios realizados se encuentran, determinación de la viabilidad celular midiendo actividad mitocondrial de reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) y la evaluación de la muerte celular programada utilizando la tinción anexina V-FITC/ Ioduro de Propidio por citometría de flujo.

Dentro de los resultados obtenidos, se observó que las partículas con quercetina adsorbida mostraron, de modo significativo, menor efecto citotóxico al resto de las partículas ensayadas.

▣ Introducción

La obtención de materiales con alguno de sus componentes en la escala nanométrica ha permitido introducirse en diferentes áreas, como por ejemplo salud, electrónica, ingeniería, etc., (Lem K *et al.*, 2012); (Chaloupka K *et al.*, 2010). Tales desarrollos resultan ventajosos al momento de incorporar nuevos materiales al mercado, pero en la contra cara se encuentran las implicancias toxicológicas que los mismos podrían generar en el humano y medio ambiente.

Debido a ello, es que surge la necesidad de realizar estudios en el área de la nanotoxicología, siendo este un campo emergente que evalúa los peligros y riesgos humanos o medioambientales causados por estructuras de menos de 100 nanómetros.

El tamaño nanométrico de las partículas incrementa su interacción con su entorno, siendo este factor deseable si se refiere a un tratamiento terapéutico a favor del hospedador, pero puede resultar desfavorable si a causa de este diminuto tamaño se generan radicales libres provocando estrés oxidativo (Yang H, *et al.*, 2009); (Chairuankittia P, *et al.*, 2013), daño sobre proteínas (Mittal S, *et al.*, 2014) y sobre el material genético o deposición en otros órganos, etc. (Elsaeser A & Howard C, 2012).

En lo que respecta a su aparición y relación con el ecosistema, es un tema que actualmente esta en boga, pero esta relación existe desde hace mucho tiempo (J B. Nowack, 2009), por ejemplo, las Nps de TiO₂ forman parte de pinturas para el hogar, de productos cosméticos como por ejemplo protectores solares y pastas dentales. Por otro lado, a través del aire estamos en contacto constante con ciento de partículas de tamaño nanométrico. Por lo tanto, su interacción con el suelo, el agua, el aire y los seres humanos ya lleva varios años.

Por un futuro más seguro e informado acerca de los componentes con los que estamos en contacto, es de suma importancia evaluar su toxicidad ya sea a nivel celular como medioambiental. Para ello sería necesario establecer un criterio de exigencia de acuerdo a la concentración del nanomaterial a utilizar, su tiempo de exposición, estabilidad y con ello estudiar sus implicancias en relación a las consecuencias de su contacto con humanos, animales y medio ambiente.

▣ Materiales y métodos

Ensayo de viabilidad celular

Principios del método

Se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima succinato deshidrogenasa (enzima mitocondrial), generando un compuesto coloreado (azul de formazan) que absorbe a longitudes de onda entre 545 y 595 nm, permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas.

De este modo la cantidad de células vivas se correlacionan con la cantidad de formazan producido.

Este método fue desarrollado por Mosmann (Mosmann, 1983), *siendo modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang* (Denizot & Lang, 1986).

Los reactivos utilizados fueron:

Dulbecco's modified Eagles Medium (DMEM), suero fetal bovino (SFB) 10%, L-Glutamina, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.

Los materiales utilizados fueron:

Placas multipocillos de 96 *wells*, micropipetas p200 y p1000, cabina de bioseguridad, incubadora de CO₂, cámara de *Neubauer*, botellas de cultivos, microscopio invertido (*Olimpus IX51*), lector de placas (*Thermo Fisher Scientific*).

La línea celular utilizada fue:

Fibroblastos L929 (CCL-1™ ATCC) derivado de tejido conectivo de ratón, monocapa de fibroblastos, libres de micoplasmas.

Las nanopartículas estudiadas fueron:

- NpsAg@SiO₂
- NpsAg@SiO₂-polifenoles

Procedimiento

Se creció a los cultivos de la línea celular L929 en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) (10%), con densidad de $5,00 \times 10^5$ células/ml. A las células se las incubó a 37 °C, en estufa humidificada al 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia de crecimiento superior al 80%. A continuación, a los cultivos crecidos se los observó al microscopio.

Posteriormente, se realizó el crecimiento de las células en placas de 96 pocillos (25.000 células/pocillo) por 24 h a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo de la monocapa y se reemplazó por el medio suplementado con las partículas *Core Shell* y partículas *Core Shell*-polifenoles [0,05-0,5] mg/ml, y a los controles negativos se los reemplazó con medio fresco. A las células se las incubó por 24 h a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad.

Tras el período de contacto, se procedió a analizar la viabilidad celular con MTT disuelto en medio DMEM suplementado. Para ello, se inició removiendo el medio de cultivo y se reemplazó con la solución de MTT. A continuación, la placa de cultivo se llevó a cámara húmeda con 5% de CO₂ por un tiempo de 3 h. Por último, se realizó la extracción del formazan utilizando DMSO y la placa se introdujo en el lector de placas, se agitó por unos segundos, y se llevó a cabo la lectura de absorbancia a una densidad óptica de 570 nm.

Análisis estadístico

Los experimentos fueron analizados usando ANOVA de dos vías, significancia $p < 0,05$.

En todos los casos, se calculó la media y desviación estándar (SD), y se identificó el nivel de citotoxicidad según las normas (*ISO 10993-5, I. (2009). Biological Evaluation of Medical Devices. Tests for in Vitro Cytotoxicity., Part 5., n.d.*, donde se clasifica la citotoxicidad en base al porcentaje de viabilidad celular 100-75%: No citotóxico, 74-50%: Ligeramente citotóxico, 49-25%: Moderadamente citotóxicos, 24-0%: Extremadamente citotóxico.

Determinación de citotoxicidad por citometría de flujo

Los materiales utilizados fueron:

Placas multipocillos de 12 *wells*, micropipetas p200 y p1000, cabina de bioseguridad, incubadora de CO₂, citómetro de flujo (*BD FACScalibur*)

La línea celular utilizada fue:

Fibroblastos L929 (tejido conectivo de ratón, monocapa de fibroblastos) libres de micoplasmas.

Las nanopartículas estudiadas fueron:

- NpsAg@SiO₂
- NpsAg@SiO₂-polifenoles

Procedimiento

Se cultivó $1,5 \times 10^5$ células por pocillo en placas de 12 pocillos (1000 μ L) *overnight* bajo condiciones estándar de cultivo. Posteriormente, se trató a las células con partículas *Core Shell* y *Core Shell*-polifenoles (quercetina, resveratrol, ácido elágico) por 24 horas. Una vez terminado el tratamiento, se transfirió el medio sobrenadante a tubos de centrifuga de 1,5 ml y la monocapa de células se levantó con Tryple™ (200 μ L) durante 5 minutos a 37°C. Se agregó 600 μ L de DMEM con 10% SFB y la suspensión celular se transfirió a los tubos previamente preparados.

Se centrifugó las muestras a 1000 rpm durante 5 minutos a 4°C, el sobrenadante se descartó y se lavó a las células con 500 μ L de PBS, luego se resuspendió a las células y se las centrifugó nuevamente. El PBS se descartó y se agregó 200 μ L de PBS fresco y la suspensión celular se homogeneizó. De manera consiguiente, se agregó 1 μ L del fluorocromo yoduro de propidio (IP) (1 mg/ml) y se procedió a medir la muestra.

Se analizó a las células utilizando el citómetro de flujo (BD FACScalibur). De cada muestra se adquirió 10000 eventos del *Gate* FSC vs SSC y se registró las intensidades de fluorescencia en los canales FL2 y FL3.

▣ Resultados

Viabilidad celular

En los resultados obtenidos para las partículas *Core Shell* y *Core Shell*-polifenoles (**Figura 1**), se observó que la viabilidad no se vio afectada a la concentración de 0,05 mg/ml de partículas y que a medida que aumentamos sus concentraciones, la viabilidad celular se reduce significativamente para *Core Shell*, *Core Shell*-Resveratrol y *Core Shell*-Ácido elágico.

Respecto a las partículas *Core Shell*-Quercetina (**Figura 1**), se observó que la viabilidad celular no se vio afectada en todo el rango de concentraciones estudiado [0,05-0,5] mg/ml. Por lo tanto, se decidió realizar un ensayo de citometría flujo con las partículas *Core Shell* y *Core Shell*-Quercetina con la finalidad de confirmar este efecto.

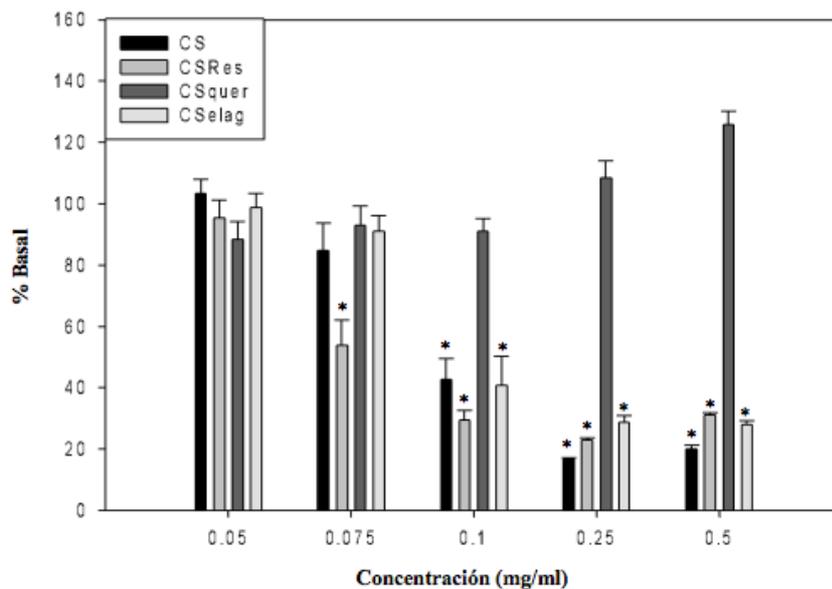


Figura 1: Porcentaje de viabilidad celular basal *versus* concentración (mg/ml) de partículas *Core Shell*, *Core Shell* -resveratrol, *Core Shell*-quercetina, *Core Shell*-ácido elágico, en contacto con la línea celular L-929 por un lapso de tiempo de 24 h. El análisis estadístico se llevó a cabo realizando comparación de medias con desvío desconocido con un error significativo ($P < 0,05$).

Análisis de muerte celular por citometría de flujo

Los resultados observados en la **figura 2 A y B** evidencian un claro incremento de la citotoxicidad por parte de las nanopartículas *Core Shell* en ambas concentraciones testeadas, observándose un efecto dosis dependiente. En una exposición con 0,05 mg/ml de *Core Shell* observamos un incremento de alrededor del 40% de células IP + y cuando

incubamos con 0.075 mg/ml este valor se incrementa a un 94% el valor de células IP + contra un 3% del control sin nanopartículas.

Estos resultados confirman los altos niveles de toxicidad que poseen las partículas *Core Shell* y que observamos anteriormente en el ensayo de viabilidad celular.

Por otra parte, es importante recalcar que las nanopartículas *Core Shell*-Quercetina no incrementaron significativamente los valores de citotoxicidad celular en ambas concentraciones testeadas confirmando el resultado obtenido para la viabilidad celular por el método de MTT. Este resultado es de gran importancia ya que confirmamos que en esas concentraciones testeadas el Sistema de *Core Shell*-Q no genera citotoxicidad que sí encontramos para su homónimo sin quercetina, destacando la importancia de la presencia del flavonoide en el nuevo activo empleado.

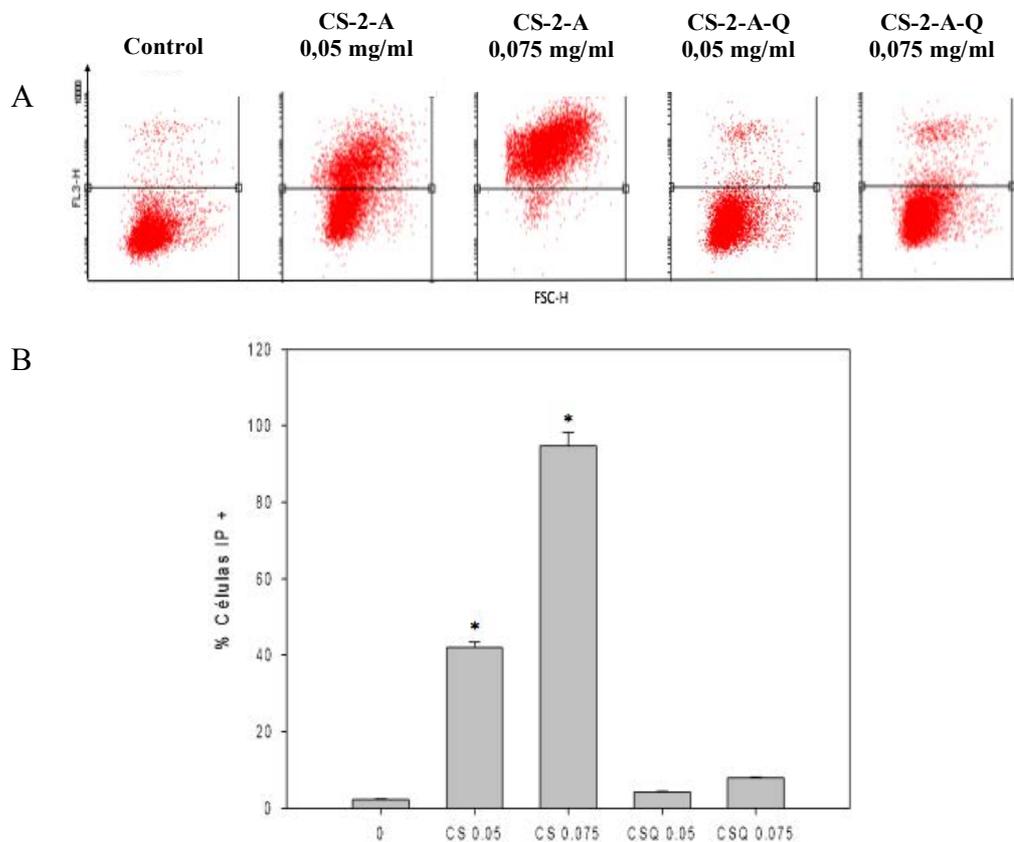


Figura 2: A) Representación biparamétrica (*Dot Plot*) de fibroblastos L929; B) Células IP+, representando células muertas.

Al analizar los valores de la **tabla 1**, observamos una confirmación de los resultados obtenidos para los *plots* en donde la media para los tratamientos con *Core Shell* se incrementa conforme aumenta la concentración por encima de la media del control, mientras que los valores para la media del Sistema *Core Shell*-Q se mantienen inalterados.

Tabla 1: Medias y desviación estándar para partículas Control; *Core Shell* 0,05 mg/ml y 0,075 mg/ml; *Core Shell-Quercetina* 0,05 mg/ml y 0,075 mg/ml

Condiciones	Media ± SD
Control	420,63 ± 7,18
CS-2-A (0,05 mg/ml)	470,50 ± 2,12
CS-2-A (0,075 mg/ml)	493,00 ± 1,41
CS-2-A-Q (0,05 mg/ml)	420,50 ± 3,54
CS-2-A-Q (0,075 mg/ml)	422,59 ± 0,71

▣ Conclusiones del capítulo 6

Se concluye que las partículas *Core Shell*, *Core Shell*-resveratrol y *Core Shell*-ácido elágico, poseen elevada toxicidad. Por el contrario, las partículas *Core Shell* adsorbidas con quercetina, poseen baja toxicidad comparado con las partículas homólogas sin adsorción del mismo.

Unas de las hipótesis planteadas asociadas a su baja toxicidad podrían estar relacionada con la capacidad de los flavonoides de reducir las especies reactivas de oxígeno (Catauro et al., 2015), las cuales podrían verse aumentadas en las células por la presencia de las NpsAg presentes en el sistema.

▣ **Bibliografía**

- Catauro, M., Papale, F., Bollino, F., Piccolella, S., Marciano, S., Nocera, P., & Pacifico, S. (2015). Silica/quercetin sol–gel hybrids as antioxidant dental implant materials. *Science and Technology of Advanced Materials*, 16(3), 035001. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/16/3/035001>
- Chairuangkittia P., Lawanpraserta S., Roytrakulb S., Aueviriyavite S. Phummiratchc D., Kulthongk K., Chanvorachotea P., Maniratanachote R. (2013). Silver nanoparticles induce toxicity in A459 cells via ros dependent and ros independent pathways. *Toxicity in vitro*, 27(1): 330-338. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.08.021>
- Chaloupka K, Malam YK, Seifalian AM. Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications. *Trends Bio-technol* 2010; 28(11): 1-9. [10.2174/187221012798109318](https://doi.org/10.2174/187221012798109318)
- Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *Journal of Immunological Methods*, 89(2), 271–277. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6)
- Elsaesser, A. y Howard, C. V. (2012). Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., 64(2), 129-137. [doi: 10.1016/j.addr.2011.09.001](https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.09.001)
- ISO 10993-5, I. (2009). *Biological Evaluation of Medical Devices. Tests for in vitro cytotoxicity., Part 5.* (n.d.).
-] B. Nowack, The behavior and effects of nanoparticles in the environment, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 1063–1064. [10.1016/j.envpol.2008.12.019](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.12.019)
- Mittal S and Pandey A. (2014). Cerium oxide nanoparticles induced toxicity in human lung cells: Role of ros mediated dna damage and apoptosis. *BioMED Research International*, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2014/891934>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Yang, H. et al. (2009). Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: The role of particle size, shape and composition. *Journal of Applied Toxicology*, 29(1): 69-78. <https://doi.org/10.1002/jat.1385>

Capítulo 7
Elaboración de Producto

CAPÍTULO 7 – Elaboración de producto-

▣ Resumen

Para la última etapa, se trabajó en la obtención de un producto, que dimos a llamar TD²², que contiene como principio activo a las partículas *Core Shell-Quercetina*, obtenidas en el trabajo de tesis.

La formulación se realizó en base a un listado de especificaciones brindadas por parte del personal directivo de la empresa Adox S.A. Por lo tanto, se trata de un producto que puede ser aplicado en superficies no porosas, con acción antimicrobiana prolongada (24 h), que a su vez, y debido a las propiedades del principio activo, el producto inhibe la formación de *biofilms* de *Pseudomonas aeruginosa*.

Por otro lado, para el desarrollo del mismo, debimos tener presentes las disposiciones del ente regulatorio Nacional, en este caso ANMAT, de modo de que el producto desarrollado pueda ser registrado por la empresa, en el caso en que la misma lo requiera.

▣ Introducción

La nanotecnología es el futuro que ya se encuentra formando parte de nuestra vida diaria. De acuerdo la investigación realizada *Emergen Research* el mercado global de nanotecnología fue de 75.80 billones de dólares en 2020 y se espera que alcance los 290.93 billones de dólares en 2028.

De las investigaciones realizadas en el campo de la nanotecnología, muy pocos de ellos tienen posibilidades de llegar al mercado, ya sea por carecer de potencial uso, falta de estudio relacionados con impacto ambiental y toxicológico, como por el costo que implica su manufactura (Medina-Peerez G & Fernandez-Luqueño F, 2018).

En la actualidad existen en el mercado alrededor de 10 mil productos con tecnología nanométrica (*StatNano*), dentro de los que podemos encontrar desinfectantes, ropa, productos cosméticos, tecnología electrónica, material de construcción, etc. Un gran porcentaje de ellos no se encuentran registrados en ningún ente regulatorio y dentro de los registrados la mayor parte se destina al sector medicinal (*StatNano*).

En nuestro país, los productos a comercializarse por empresas registradas en ANMAT, deben ser aprobados por este ente regulatorio, debiendo cumplir con la normativa vigente en el sector donde se desea registrar.

Adox S.A. es una empresa que se encuentra habilitada por ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica) como elaborador de productos para el sector hospitalario. Por lo tanto, el producto formulado debió pasar por los análisis requeridos por la Resolución N° 709/98 y cumplimentar la Disposición-ANMAT N° 7292/1998 y Disposición-ANMAT-3366-2007, para poder presentarse, en un futuro, el análisis de registro en el sector de domisanitarios como producto a aplicarse en ambientes hospitalarios.

▣ **Materiales y métodos**

Para iniciar el diseño y desarrollo de un nuevo producto cosmético, de higiene oral o domisanitario, la empresa aplica un procedimiento interno. A continuación, desarrollamos los puntos que se debió cumplir para su desarrollo.

Diseño y Desarrollo de productos Cosméticos, Higiene Oral y Domisanitarios

Objetivo: El propósito de este procedimiento es guiar los pasos a seguir para el diseño de un nuevo producto.

Alcance: Este procedimiento se aplica a todos los nuevos productos o a los productos sustancialmente modificados, desarrollados por la empresa, para cosmética, higiene personal, higiene oral y domisanitario.

Disposiciones:

- Disposición ANMAT 6477/12.
- Disposición ANMAT 692/12.
- Disposición ANMAT 345/06.
- Disposición ANMAT 6391/15.

Generalidades

El grupo de diseño tiene la responsabilidad de especificar los requisitos del diseño, verificar las etapas necesarias e implementar y validar la formulación, de acuerdo a lo establecido en este procedimiento.

Descripción del proceso de Diseño y Desarrollo

1. Evaluación preliminar del diseño

El objetivo del diseño nace a partir de una investigación iniciada por la Dirección y/o Comercialización en función de las necesidades del medio al cual se dirige la Empresa.

La evaluación preliminar de la idea de un nuevo producto o modificación de diseño de uno ya existente debe considerar un análisis de mercado y viabilidad técnica.

2. Datos de entrada del diseño

El responsable a cargo del diseño determina los requisitos que el producto debe cumplir, de acuerdo al uso pretendido y a las necesidades del mercado, pudiendo ser estos: la forma farmacéutica, el volumen de producto, tipo de envase, especificaciones físicoquímicas deseadas, funcionamiento, tipo de aplicación, etc.

3. Diseño e Implementación

Bajo la supervisión del responsable del diseño, se procede a realizar diferentes formulaciones en busca del cumplimiento de los requisitos propuestos en los datos de entrada.

El personal de laboratorio debe elaborar en mesada las formulaciones propuestas y se busca optimizar el procedimiento a aplicar a pequeña escala. Se seleccionarán los envases convenientes para el producto en diseño.

4. Verificación del diseño y desarrollo (Ver procedimiento de programa de estabilidad, efectividad antimicrobiana y efectividad frente a *biofilms*)

El responsable de Diseño debe realizar las verificaciones de los requisitos de acuerdo a los datos de entrada para confirmar que los resultados cumplen con los criterios de aceptación definidos.

Esta verificación se observa al escalar la producción con un lote piloto, que debe pasar por un estudio de **estabilidad acelerada**, en el envase primario original o uno de menor escala con la misma calidad de materiales, aplicando y cumpliendo con el *Programa de estabilidad*.

En caso de que deba demostrarse una **función específica**, la misma será comprobada, de ser posible primero internamente, y obligatoriamente, externamente mediante una organización oficial y/o reconocida (privadas o públicas).

Los ensayos realizados al producto terminado fueron:

- ❖ Estabilidad acelerada
- ❖ Efectividad antimicrobiana previo y posterior a cumplir la estabilidad
- ❖ Actividad anti *biofilm* frente a *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1)

A su vez, se deberá tener en cuenta en cuál de los sectores de ANMAT se va a querer registrar el producto, debido a que habrá ciertas especificaciones que las brindará la normativa vigente y deberán cumplimentarse.

Debido a que el producto estaba destinado a presentarse como domisanitario para el sector de hospitales, se debió tener en cuenta lo establecido en la **Resolución N° 709/98**, cumplimentar la **Disposición-ANMAT N° 7292/1998** y **Disposición-ANMAT-3366-2007**.

4.1. Programa de estabilidad para el producto final

Para poder establecer la fecha de vencimiento de un producto, en general, se utilizan normas dónde se especifican las condiciones de almacenamiento que aceleran el proceso de envejecimiento de manera representativa. Para ello se utilizó el método propuesto por *Collaborative International Pesticides Analytical Council* CIPAC MT-46.3, donde se especifican las condiciones de almacenamiento (temperatura y tiempo) para simular dos años del producto a temperatura ambiente.

Las posibilidades se muestran en la **tabla 1**:

Tabla 1: Tiempos y temperaturas a las cuales se puede exponer un producto para acelerar su envejecimiento.

<i>Tiempo (semanas)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>
4	50
6	45
8	40
12	35
18	30

Se utilizó la temperatura de 35°C por un tiempo de 12 semanas (**Tabla 1**) para envejecer la muestra.

A su vez, se registró la información detallada en la **tabla 2** para hacer seguimiento de la estabilidad del producto en desarrollo:

Tabla 2: Información que se recopila para análisis de estabilidad interna del producto.

<i>Fecha</i>	<i>Nombre del producto</i>	<i>Empaque</i>	<i>Aspecto visual</i>	<i>Temperatura de almacenamiento (°C)</i>	<i>Tiempo (semanas)</i>	<i>N° Lote</i>	<i>pH</i>	<i>Densidad aparente (gr/cm3)</i>
--------------	----------------------------	----------------	-----------------------	---	-------------------------	----------------	-----------	-----------------------------------

Al producto se le realizó estudios internos para evaluar su efectividad (**Tabla 3**) pre y post a someterlo a la etapa de estabilidad acelerada (**Tabla 1**):

Tabla 3: Información que se recopila para análisis de estabilidad interna del producto.

<i>Efectividad antimicrobiana a Norma JIS</i>	<i>Estudio de formación de biofilms (O'Toole)</i>
---	---

4.2. Ensayo de efectividad antimicrobiana según la Norma *Japanese Industrial Standard Antibacterial products- Test for antibacterial activity and efficacy- JIS Z 2801: 2010 (E)*-

Debido a que el producto se diseñó para aplicarse sobre superficies y su finalidad fue que su permanencia y efectividad sea extensiva en el tiempo (24 h), debimos buscar una norma que nos permita validar este accionar.

Los ensayos para determinar actividad antibacteriana sobre una superficie de un producto que permanece aplicado en el tiempo, ya sea plástico, metal, cerámico, etc, excluyendo textiles, se deberá evaluar según la norma internacional: *Japanese Industrial Standard Antibacterial products- Test for antibacterial activity and efficacy- JIS Z 2801: 2010 (E)*-

Los materiales utilizados fueron:

Placas de petri, pipetas p200 y p1000, tubos estériles de 50 ml, autoclave, estufa de cultivo, cabina de bioseguridad.

Los reactivos utilizados fueron:

Medios de cultivo: Agar tripeína soja (TSA), caldo tripeína soja (TSB), agua destilada estéril.

Los microorganismos estudiados fueron:

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)

Staphylococcus aureus (ATCC 65389)

Salmonella typhimurium (ATCC 14028)

Procedimiento

Preparación del inóculo

Al inóculo crecido *overnight* se le midió su densidad óptica en espectrofotómetro a 620 nm. A continuación, se realizó la dilución necesaria para llevar el inóculo a una $DO_{620nm} = 0,1$. Finalmente, se realizó una dilución 1:500 del inóculo bacteriano utilizando medio TSB hasta llegar a una concentración final de $2,0 \times 10^5$ UFC/ml.

Se recubrió un portaobjetos con el producto formulado y a continuación se dejó secar en cabina de bioseguridad por 24 h. Luego, se inoculó la superficie con 0,4 ml del microorganismo a estudiar y se cubrió con un portaobjetos. Por último, se llevó la superficie para cultivar en estufa a 35°C por 24 horas.

Al día siguiente, la superficie se lavó con 10 ml de caldo triptéina soja, se realizaron diluciones seriadas y se sembró en medio sólido. La incubación se efectuó por 24 horas a 35°C en estufa de cultivo. La **figura 1** se extrajo de la Norma JIS Z 2801: 2010 (E)-

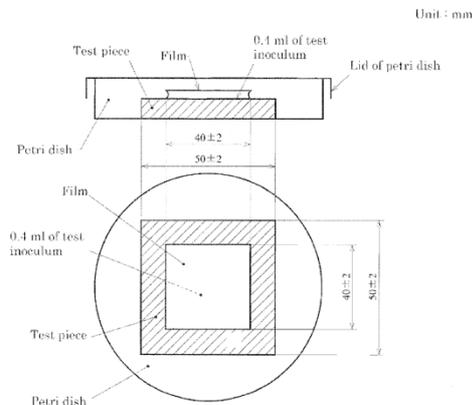


Figura 1: Imagen extraída de la Norma “Antibacterial products-Test for antibacterial activity and efficacy” JIS Z 2801 2010.

Cálculos

El número de bacterias viables se obtienen de:

$$R = \log \left(\frac{B}{C} \right)$$

Siendo:

B: promedio del número de bacterias viables crecidas sobre la superficie sin tratar.

C: promedio del número de bacterias viables crecidas en las superficies tratadas.

R = La superficie es considerada antibacteriana cuando el valor de R es igual o mayor a 2.0

4.3. Ensayo para cuantificar desarrollo de biofilm de PAO1 en el producto final

El ensayo se realizó en placa multipocillos y posterior tinción con cristal violeta (0,1%), de acuerdo al método de (O'Toole, 2011), ver procedimiento en la sección de materiales y métodos del capítulo 5 - página 99-100.

Previo a inocular los microorganismos, se atomizó el producto en los pocillos, se dejó secar por 24 h y al día siguiente se inició el ensayo.

Además del control negativo en donde se siembra medio de cultivo sin el inóculo, también se utilizó como control negativo pocillos en los cuales se aplicó el producto y se sembró con medio de cultivo únicamente, debido a que el producto tiende a retener colorante que debió descontarse de los pocillos tratados.

5. Validación del diseño y desarrollo

Para realizar la validación del diseño, se debe seleccionar una muestra representativa del primer lote de producción.

Los ensayos son efectuados de acuerdo a procedimientos establecidos.

6. Documentación de la fórmula patrón

Durante el proceso de diseño, se debe generar la siguiente documentación que será parte de la fórmula patrón del producto, la cual debe incluir:

Nombre y/o código interno de referencia del producto

Descripción de la forma farmacéutica del producto

Lista de todas las materias primas con las respectivas cantidades porcentuales, de conformidad con la fórmula declarada en el registro / notificación / admisión.

Lista completa con los materiales de envase y empaque, incluyendo cantidades, tamaños y tipos, con el código o número de referencia relativo a las especificaciones para cada material de acondicionamiento.

Los equipamientos de producción a ser utilizados.

Procedimiento de fabricación con las instrucciones detalladas.

Especificación de los controles de proceso de envasado/acondicionado y del producto terminado y cuando sea necesario, condiciones especiales de almacenamiento deben ser definidas.

Cualquier precaución especial a ser observada.

La fórmula patrón debe ser redactada por el responsable del Diseño y Desarrollo del producto, revisada y aprobada por la Dirección Técnica periódicamente. La misma tendrá vigencia hasta 1 año posterior al vencimiento de la última producción del producto.

La documentación debe encontrarse en la Dirección Técnica y estar a disposición del personal involucrado en los procesos productivos.

7. Modificación de la fórmula

Dependiendo del cambio requerido, se analizará si debe ser tratado como un producto nuevo o actualización de la fórmula patrón.

▣ Resultados

1. Evaluación preliminar del diseño

El desarrollo se planteó de acuerdo a la investigación presentada en el capítulo 1, donde se demuestra que las infecciones intrahospitalarias asociadas a la formación de *biofilms* son causas de complicaciones en el estado de salud de pacientes y hasta posibles causas de muerte.

A su vez, la Dirección de la empresa Adox S.A. nos planteó la necesidad de incorporar un producto que cubra ese nicho que no se estaba considerando hasta el momento para prevención de infecciones.

2. Datos de entrada del diseño

Especificaciones técnicas:

Formulación líquida.

Aplicación mediante el uso de un spray.

Secado rápido.

Formación de una película.

De fácil remoción.

Efecto antimicrobiano para ser registrado como domisanitario para hospitales.

Inhibición de *biofilms* de al menos una cepa bacteriana.

3. Diseño e Implementación:

Inicialmente se evaluaron seis formulaciones, de las cuales tres de ellas se descartaron porque no se logró formar una película una vez aplicadas, es decir, la formulación no se logró secar por completo. De las tres restantes, dos de ellas se descartaron por no cumplir con el efecto antimicrobiano frente a *P. aeruginosa* según la norma JIS 2801:2010 (**ítem 4.1**). Finalmente seguimos con una de las formulaciones, la cual se ingresó al programa de estabilidad acelerada para continuar con los ensayos.

Fórmula definitiva del producto

En la **tabla 4** se muestra la formulación con sus materias primas, sus respectivos números de CAS y los porcentajes utilizados.

Tabla 4: Componentes de la formulación con propiedades antimicrobianas e inhibidoras de *biofilms* de *P. aeruginosa* (PAO1).

Número de CAS	Nombre comercial	% p/p
7732-18-5	Agua destilada	40
-----	Emulsión acrílica	30
64-17-5	Alcohol etílico	30
102-71-6	Trietanolamina	2-2,5
-----	Antiespumante	0,05
-----	Partículas <i>Core Shell</i> - Quercetina	0,044

4. Verificación del diseño y desarrollo

Como se mencionó en materiales y métodos, se debió estudiar la normativa vigente para poder clasificar el producto que se estaba diseñando.

Según la **Resolución N° 709/98**, en su artículo 3° define que un domisanitario es:

“Artículo 3° - Se entiende por producto domisanitario a aquellas sustancias o preparaciones destinadas a la limpieza, lavado, odorización, desodorización, higienización, desinfección o desinfección, para su utilización en el hogar, y/o ambientes colectivos públicos y/o privados.”

Por otro lado, en el artículo 6° se debió definir el tipo de riesgo comprende el producto a registrar, siendo:

“RIESGO I: Comprende todos los productos de limpieza y afines en general, exceptuando los cáusticos y corrosivos que para su manipulación no requieran protección personal especial.”

“RIESGO II: Comprende los productos con actividad antimicrobiana, con actividad desinfectante (insecticidas, acaricidas, alguicidas, etc.), los productos cuyo valor de pH sea inferior a dos (2) o mayor que trece (13), productos con alto poder oxidante o reductor y productos biológicos a base de bacterias.”

Debido a que el producto posee actividad antimicrobiana el riesgo por el cual debemos regirnos sería **Riesgo II**. De acuerdo a esta clasificación existen algunos artículos especiales a cumplimentar por la empresa Adox, que no ameritan ser explicados en el capítulo debido a que son administrativos.

A su vez, la clasificación **Riesgo II** posee dos subclasificaciones de grupos:

“**Grupo A:** De menor riesgo debido a: a) Menor toxicidad de activos; b) Menor concentración de activos; e) Envases más seguros; d) Productos listos para usar sin dilución previa; e) Mayor frecuencia de productos similares.”

“Insecticidas líquidos en aerosol o vaporizador formulados a base de piretrinas naturales y/o piretroides sintéticos como principios activos, repelentes de insectos formulados en base a paradiclorobenceno, naftaleno, piretrinas y/o piretroides (antipolillas, espirales, líquidos termoevaporables, etc.), desodorizantes y santizantes de ambientes.”

“**Grupo B:** Mayor riesgo debido a: a) Mayor toxicidad de activos; b) Mayor concentración de activos; e) Productos con dilución previa de uso profesional; d) Evaluación de eficacia.”

“Productos cáusticos y corrosivos (pH > 13 y <2). Insecticidas líquidos en aerosol o vaporizador formulados a base de principios activos fosforados, carbamatos y/o biológicos, insecticidas en polvo, cebos, formulados fumígenos, líquidos oleosos, emulsionables o floables (concentrados para dilución previa o listos para usar), insecticidas destinados a campañas de salud.”

“Productos formulados a base de bacterias para tratamiento de pozos ciegos. Desinfectantes de agua de bebida y de piletas de natación. Filtros de aguas. Floculantes y coagulantes para procesos de potabilización de aguas de bebida. Desinfectantes de superficies. Desinfectantes, floculantes y secuestrantes de aguas de procesos industriales. Raticidas.”

De acuerdo a lo anteriormente mencionado, nuestro producto queda clasificado como **Riesgo II – Grupo B**.

A continuación, debimos dirigirnos a la **Disposición-ANMAT N° 7292/1998**, donde se menciona la información a presentar al momento de registrar el producto (**Tabla 5**).

Tabla 5: Documentación que se debe adjuntar para el registro de un producto en ANMAT como domisanitario.

Documentación adicional a adjuntar
Método de elaboración
Método de control de calidad
Especificaciones fisicoquímicas de los principios activos y materias primas (según corresponda)
Grado de pureza y procedencia de los productos técnico/s, identidad
Concentración y toxicidad de las impurezas presentes
Métodos analíticos para valorar principios activos
Estudios de estabilidad
Estudios de efectividad
Estudios toxicológicos según normas OMS/FAO y/o entidades de reconocida competencia en el tema

A su vez, se debió cumplimentar los requisitos planteados en la **Disposición-ANMAT-3366-2007**, donde se reglamentan las condiciones para el registro de productos con acción antimicrobiana destinados al uso de objetos, sobre superficies inanimadas, y ambientes, en el hogar, en las industrias, en los hospitales, establecimientos relacionados con la atención de la salud y en locales o establecimientos públicos o privados.

De acuerdo a la **Disposición-ANMAT-3366-2007**, a un producto se lo clasifica como desinfectante según la siguiente definición:

“Desinfectante: Es un producto que mata todos los microorganismos patógenos, pero no necesariamente todas las formas microbianas esporuladas en objetos y superficies inanimadas. (Res. GMC N° 26/96).”

A su vez, el producto debió ser clasificado de acuerdo al sector donde se lo iba a aplicar:

“Uso hospitalario: Productos para uso exclusivo en hospitales y establecimientos relacionados con la atención de la salud.”

Estableciéndose su alcance en el capítulo IV de la mencionada disposición como:

“Los productos para uso en ambientes, pisos, paredes, mobiliarios y artículos (objetos, equipamientos y accesorios) utilizados exclusivamente en hospitales y establecimientos relacionados con la atención de la salud.”

En los anexos presentes en la disposición se mencionan los requisitos para el registro del producto. Particularmente vamos a mencionar el ANEXO V donde se hace referencia a los microorganismos a utilizar para poder registrar el producto en los diferentes sectores (**Tabla 6**).

Tabla 6: Listado de microorganismos que se deben evaluar frente al producto a registrar de acuerdo al sector donde quiere ser utilizado.

CLASIFICACIÓN	MICROORGANISMOS
1. Desodorizantes	<i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Salmonella choleraesuis</i>
2. Sanitizante	
2.1 Uso general	<i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Salmonella choleraesuis</i>
2.2 Industria alimenticia y afines	<i>Salmonella choleraesuis</i> , <i>Eschericia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>
3. Desinfectantes	
3.1 Uso general	<i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Salmonella choleraesuis</i>
3.2 Industria alimenticia y afines	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> y <i>Eschericia coli</i>
3.3 Hospitalario para superficie fija y articulo no critico	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3.4 Uso específico	
3.4.1 Desinfectante para lactários	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> y <i>Eschericia coli</i>
3.4.2 Desinfectante para agua de consumo humano	<i>Enterococcus faecium</i> y <i>Eschericia coli</i>
3.4.3 Desinfectante/sanitizante para ropas	<i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Salmonella choleraesuis</i>
3.4.4 Desinfectante/sanitizante para ropas hospitalarias	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3.4.5 Desinfectante para piscinas	<i>Enterococcus faecium</i> y <i>Eschericia Coli</i>
3.4.6 Otros	De acuerdo con la finalidad propuesta, obedeciendo a los microorganismos definidos en las metodologías específicas

4.1. Programa de estabilidad para el producto final

Pre (Tabla 7) y Post (Tabla 8) a iniciar el ensayo de estabilidad se registraron las siguientes propiedades:

Tabla 7: Estudio de propiedades fisicoquímicas de la formulación previo a iniciar prueba de estabilidad acelerada.

Especificaciones	Resultados
Fecha	23/11/21
Nombre del producto	TD ²²
Envase	Polietileno de alta densidad
Aspecto Visual	Líquido/ámbar
Temperatura de almacenamiento (°C)	35
Tiempo de almacenamiento (semanas)	--
Nº Lote	Piloto
pH	7,6
Densidad (gr/cm ³)	0,978

Tabla 8: Estudio de propiedades fisicoquímicas de la formulación puesta en estabilidad por 12 semanas a 35°C según Normas CIPAC 46.3

Especificaciones	Resultados
Fecha	23/02/22
Nombre del producto	TD ²²
Envase	Polietileno de alta densidad
Aspecto Visual	Líquido/ámbar
Temperatura de almacenamiento (°C)	35
Tiempo de almacenamiento (semanas)	12
Nº Lote	Piloto
pH	7,5
Densidad (gr/cm ³)	0,974

4.2. Ensayo que valida efectividad frente a microorganismos del producto aplicado en superficie

Los ensayos para determinar actividad antibacteriana sobre una superficie de un producto que permanece aplicado en el tiempo, ya sea plástico, metal, cerámico, etc, excluyendo textiles, se debieron evaluar según la norma internacional: *Japanese Industrial Standard Antibacterial products- Test for antibacterial activity and efficacy- JIS Z 2801: 2010 (E)*-

La aplicación del producto se realizó mediante spray sobre una superficie no porosa. Luego se dejó secar por 24 horas y transcurrido ese lapso de tiempo se inoculó con los microorganismos especificados en la tabla 6 del presente capítulo.

Lo que observamos fue que el producto dado a llamar TD²², aplicado sobre las superficies, demostró ejercer efecto antimicrobiano, siendo el valor de R mayor a 2 en todos los casos. Este efecto se observó para el producto previo (Tabla 9) y posterior a exponerlo (Tabla 10) al programa de estabilidad acelerada, según norma CIPAC 46.3.

Tabla 9: Efecto antimicrobiano (*Normas JIS 2801:2010*) de la formulación TD²² previo a iniciar prueba de estabilidad acelerada.

Lote Piloto (23/11/2021) – Norma JIS 2801:2010				
Microorganismos	Control (UFC/ml)	Formulación (UFC/ml)	R	Reducción (%)
<i>P. aeruginosa</i>	3,36 x 10 ⁸	1,37 x 10 ⁴	4,4	99,996
<i>S. aureus</i>	1,95 x 10 ⁷	6,06 x 10 ⁴	2,5	99,690

Tabla 10: Efecto antimicrobiano (*Normas JIS 2801:2010*) de la formulación TD²² puesta en estabilidad por 12 semanas a 35°C.

Lote Piloto (23/11/2021) – Norma JIS 2801:2010- Producto vencido-				
Microorganismos	Control (UFC/ml)	Formulación (UFC/ml)	R	Reducción (%)
<i>P. aeruginosa</i>	2,43 x 10 ⁸	3,90 x 10 ⁴	3,8	99,983
<i>S. aureus</i>	3,27 x 10 ⁷	8,95 x 10 ¹	5,6	99,999
<i>S. typhimurium</i>	4,09 x 10 ⁷	7,18 x 10 ¹	5,8	99,999

4.3. Ensayo de cuantificación de *biofilm* de PAO1 expuesta al producto final

Los ensayos para determinar la efectividad del producto frente a la formación de biofilms de PAO1 se realizaron utilizando placas multipocillos y posterior tinción con cristal violeta (0,1%), de acuerdo al método de (O'Toole, 2011), **ver procedimiento en la sección de materiales y métodos del capítulo 5 - página 100.**

Previo a inocular los microorganismos, se atomizó el producto TD²² en el interior de pocillos, luego se dejó secar por 24 horas y al día siguiente se inició el ensayo. El ensayo se realizó con el producto recién formulado y con el producto habiendo pasado por una estabilidad acelerada en estufa a 35°C por 12 semanas (Norma CIPAC 46.3).

Para el producto recién preparado (**Figura 2**), se observó inhibición de la formación de *biofilms* de PAO1, de modo significativo, respecto al control.

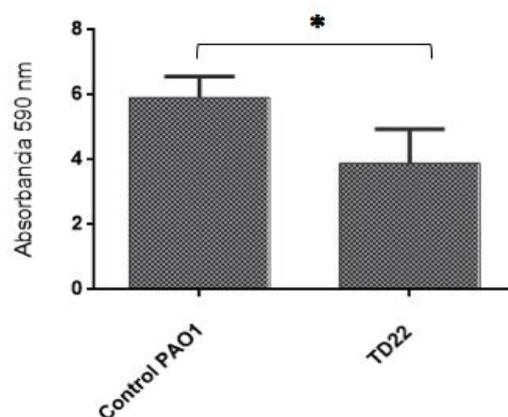


Figura 2: Inhibición de *biofilm* de *P. aeruginosa* (PAO1) en placa multipocillos según método propuesto por O'Toole de la formulación TD²², previo a iniciar prueba de estabilidad acelerada. Test de Student p<0,05.

Cuando el mismo ensayo se realizó para el producto que había pasado la prueba de estabilidad acelerada en estufa a 35 por 12 semanas, se vio que (**Figura 3**) el producto sigue efectuando efecto inhibitorio frente a la formación de los *biofilms* de PAO1.

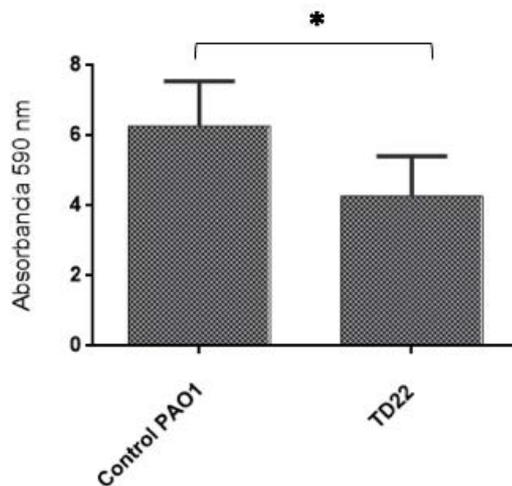


Figura 3: Inhibición de biofilm de *P. aeruginosa* (PAO1) en placa multipocillos según método propuesto por O'Toole de la formulación TD²², puesta en estabilidad por 12 semanas a 35°C.

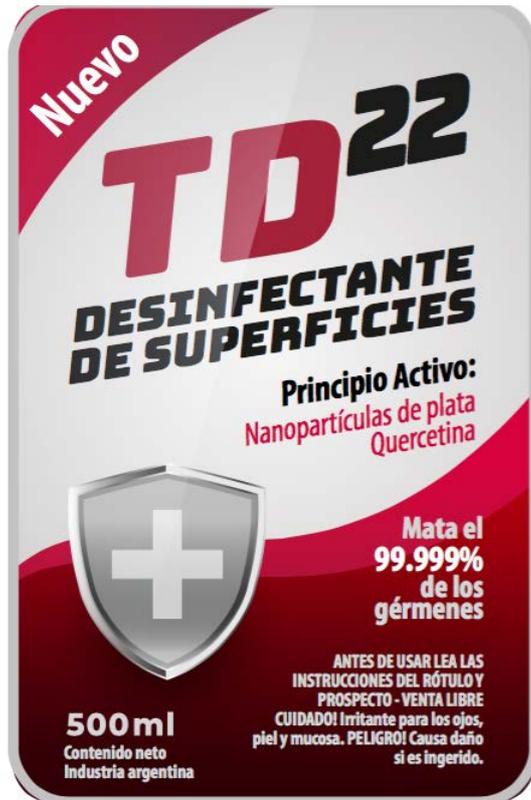
Los **ítems 5, 6 y 7** (ver materiales y métodos páginas 149-151), se evaluarán al momento de elevar el desarrollo a producción.

Proyecto de rótulo

Con el sector de *Marketing* de la empresa Adox, se diseñó un proyecto de rótulo para el producto TD²² (**Figura 4**).



Figura 4: Producto TD²², rótulo panel principal.



▣ Conclusiones del capítulo 7

En esta última etapa de trabajo, se obtuvo un producto que cumplió con las especificaciones requeridas por la empresa adoptante de la tecnología.

Es decir, que se obtuvo un producto de presentación líquida, el cual se aplica por *sprayado* sobre las superficies, dejando una fina película de fácil remoción.

Luego de haber superado el ensayo de estabilidad acelerada, el producto se evaluó frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*, utilizando la Norma JIS 2801:2010, observándose efectividad antimicrobiana.

A su vez, el producto se probó frente a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 para estudiar el efecto de inhibición de *biofilms*, viéndose una disminución en la retención del colorante (CV) por parte de la biomasa presente en los pocillos tratados respecto al control, dando indicios de inhibición de los mismos.

▢ **Bibliografía**

Collaborative International Pesticides Analytical Council CIPAC MT-46.3

Disposición ANMAT 6477/12.

http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/noviembre_2012/dispo_6477-12.pdf

Disposición ANMAT 692/12.

https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anmat_disposicion_0692-2012.pdf

Disposición ANMAT 345/06.

http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Legislacion/cosmeticos/Disposicion_ANMAT_346-2006.pdf

Disposición ANMAT 6391/15.

http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/agosto_2015/Dispo_6391-15.pdf

Disposición-ANMAT N° 7292/1998

<https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/disposición-7334-1999-61761/texto>

Disposición-ANMAT-3366-2007

http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Legislacion/Domisanitarios/Disposicion_ANMAT_3366-2007.pdf

Emergen Research. <https://www.emergenresearch.com/request-sample/587>

Japanese Industria Standard Antibacterial products- Test for antibacterial activity and efficacy- JIS Z 2801: 2010 (E)-

Medina-Pérez, Gabriela, & Fernández-Luqueño, Fabián. (2018). Nanotoxicidad: retos y oportunidades. *Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*, 11(20), 7-16. Epub 02 de mayo de 2020. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2018.20.6410>

Resolución N° 709/98

<http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/5000054999/52859/norma.htm>

O'Toole, G. A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments*, 47. <https://doi.org/10.3791/24>

Capítulo 8
Conclusiones finales

CAPÍTULO 8 – Conclusiones finales –

Este trabajo de tesis se ejecutó en el marco de una beca cofinanciada entre CONICET con la empresa Adox S.A., por lo tanto, nos vimos en el compromiso de realizar un trabajo científico que a la vez presente una utilidad técnica e inmediata para su aplicación en un producto que pueda llegar a la sociedad.

Si bien al final del trabajo se obtuvo un producto que podría ser registrado en el ente regulatorio Nacional, tratamos de que cada etapa de la tesis sea un desarrollo en sí mismo, de este modo, Adox S.A. podría hacer uso de cada uno de los pasos desarrollados (nanopartículas de plata, partículas *Core Shell* y quercetina) de manera independiente.

En el **capítulo 3** se trabajó en la síntesis de nanopartículas de plata por la técnica de *bottom-up*, es decir que a partir de una sal de plata y en medio básico se logró la reducción de los iones Ag^+ a Ag^0 utilizando polivinilpirrolidona como agente reductor y estabilizante. El proceso de síntesis se llevó a cabo a diferentes escalas, pasando por volúmenes de 0,5 L a balón de 3L y finalmente a reactor de 50L. A su vez, las nanopartículas demostraron tener efecto como antimicrobiano, siendo efectivas frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*.

En el **capítulo 4** se sintetizaron nanopartículas del tipo *Core Shell* en medio acuoso basificado, siendo los reactivos 3-(mercaptopropil)-trimetoxisilano (MPTMS) y nanopartículas de plata, obtenidas previamente y detalladas en el capítulo 3. En esta etapa se destaca la importancia de secar y calcinar las partículas para que las mismas puedan liberar iones Ag^+ al dispersarlas en medio acuoso. También pudimos adsorber los polifenoles a la superficie de las partículas, pudiendo tener un sistema formado por un centro de NpsAg, coraza de sílice y “decoradas” con polifenoles. Vimos que los polifenoles se liberaron en su totalidad en medio alcohólico, siendo su liberación incompleta en medio acuoso. Las mismas demostraron tener efecto como antimicrobiano frente a un modelo de bacterias Gram negativo como *Pseudomonas aeruginosa* y uno Gram positivo como *Staphylococcus aureus*.

En el **capítulo 5** trabajamos con *biofilms* de PAO1 formados por diferentes métodos, en placas multipocillos, sobre cupones utilizando reactor de flujo continuo y sobre portaobjetos mediante reactor de flujo por goteo. Observamos que de los tres polifenoles evaluados (quercetina, resveratrol y ácido elágico), el único que demostró tener efecto como inhibidor en la formación de *biofilm* fue quercetina, ya sea en la etapa de adhesión (dosis dependiente), como en la etapa de maduración (independiente de la dosis utilizada). También se observó que el flavonoide tiene efectos inhibitorios sobre los factores de virulencia de PAO1. Este resultado lo convierte en un potencial activo de origen natural a utilizar en futuros productos. Los *biofilms* formados en presencia de las partículas *Core Shell* fueron similares a los observados cuando los mismos se desarrollaron en presencia de quercetina.

En el **capítulo 6** realizamos ensayos de citotoxicidad, observando que las partículas *Core Shell*-quercetina generaron menor efecto citotóxico en relación a las partículas con resveratrol y ácido elágico adsorbido e incluso a las mismas partículas sin polifenol asociado. De este modo, las partículas *Core Shell*-quercetina se convirtieron en las candidatas a utilizar como principio activo en el producto final.

En el **capítulo 7** se trabajó en la obtención de un producto apto para aplicarse en superficies, con propiedad dual, antimicrobiano e inhibidor de la formación de *biofilms*. Según la Resolución 709/98 dispuesta por ANMAT, el producto a registrar se clasifica como Riesgo II (“**RIESGO II:** Comprende los productos con actividad antimicrobiana, con actividad desinfectante (insecticidas, acaricidas, alguicidas, etc.), los productos cuyo valor de pH sea inferior a dos (2) o mayor que trece (13), productos con alto poder oxidante o reductor y productos biológicos a base de bacterias”) y Grupo B (“**Grupo B** Mayor riesgo debido a: a) Mayor toxicidad de activos; b) Mayor concentración de activos; e) Productos con dilución previa de uso profesional; d) Evaluación de eficacia.”).

Luego, según la disposición-ANMAT-3366-2007, el producto se evaluó frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*, para poder clasificarlo como un domisanitario de uso hospitalario.

El mismo se evaluó frente a *biofilms* de PAO1, observándose efectos inhibitorios en su formación para los pocillos tratados.

En definitiva, el producto desarrollado demostró tener efecto dual, siendo antimicrobiano frente a los microorganismos exigidos por la autoridad regulatoria para registrarlo como producto desinfectante para aplicar en hospitales, y retrasa la formación de *biofilms*, más específicamente de *P. aeruginosa*.

ANEXO

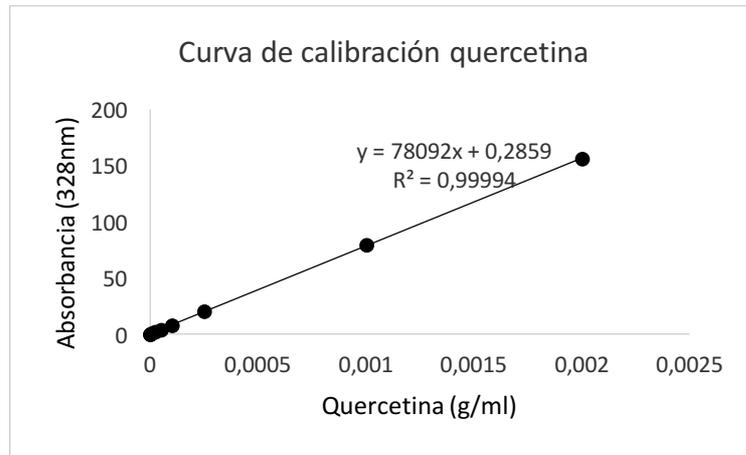


Figura 1: Curva de calibración de quercetina midiendo absorbancia a 328 nm a concentraciones de quercetina conocidas (g/ml).

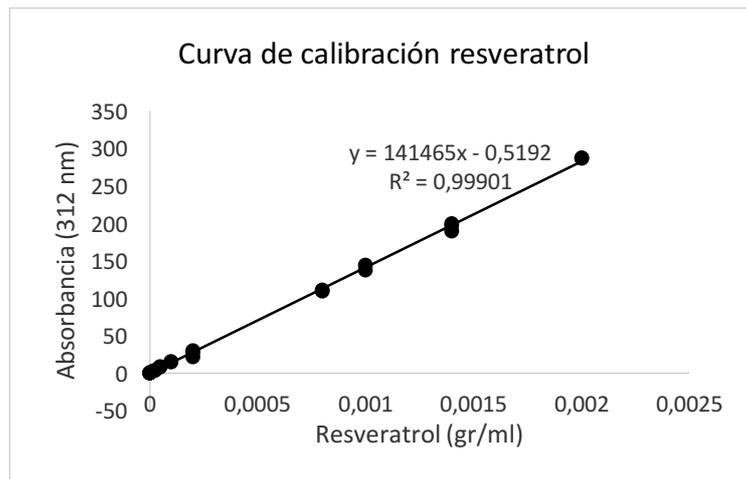


Figura 2: Curva de calibración de resveratrol midiendo absorbancia a 312 nm a concentraciones de resveratrol conocidas (g/ml).

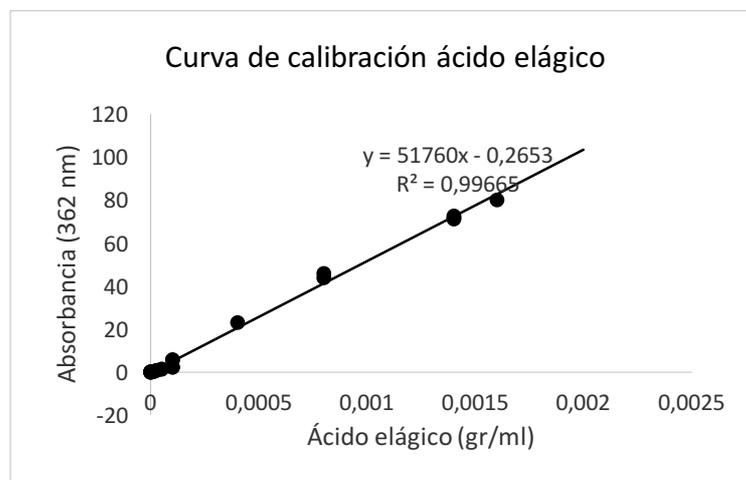


Figura 3: Curva de calibración de ácido elágico midiendo absorbancia a 362 nm a concentraciones de ácido elágico conocidas (g/ml).