



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

“Efecto bactericida de nanopartículas de plata y desinfectantes sobre
bacterias multirresistentes”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

P R E S E N T A :

BIÓL. MARISA FLORES GONZÁLEZ

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, Junio de 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

“Efecto bactericida de nanopartículas de plata y desinfectantes sobre
bacterias multirresistentes”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

P R E S E N T A :

BIÓL. MARISA FLORES GONZÁLEZ

COMITÉ DE TUTORES

DR. MARTÍN TALAVERA ROJAS

DR. VICENTE RODRÍGUEZ GONZÁLEZ

DR. EDGARDO SORIANO VARGAS

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, Junio de 2017

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo contó con el financiamiento de los proyectos:

**“Estudio antigénico e inmunogénico de *avibacterium paragallinarum* de la serovariedad C-1
prevalente en la avicultura de México” con clave 3784/2014/CID de la Universidad Autónoma
del Estado de México.**

**CONACyT CB-2011/169597 y LINAN-0271911 del Instituto Potosino de Investigación
Científica y Tecnológica A. C.**

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN..... | X |
| ABSTRACT..... | xi |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II. ANTECEDENTES..... | 3 |
| 2.1 Nanociencia y nanotecnología..... | 3 |
| 2.1.1 Síntesis y caracterización de nanomateriales..... | 3 |
| 2.1.2. Aplicaciones de los nanomateriales..... | 12 |
| 2.2. Resistencia bacteriana..... | 15 |
| 2.2.1. Resistencia bacteriana a los antibióticos y a desinfectantes..... | 15 |
| 2.2.2. Mecanismos de acción de biocidas..... | 19 |
| 3. Nanopartículas de plata como desinfectantes..... | 23 |
| III. JUSTIFICACIÓN..... | 27 |
| IV. HIPÓTESIS..... | 28 |
| V. OBJETIVO..... | 29 |
| VI. METODOLOGÍA..... | 30 |
| 6.1. Síntesis y caracterización de nanoestructuras de plata..... | 30 |
| 6.1.1. Síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs)..... | 30 |
| 6.1.2. Síntesis de nanoalambres de plata (AgNWs) a partir de AgNPs y PVP como agente direccionador..... | 31 |
| 6.1.3. Caracterización de nanoestructuras..... | 31 |
| 6.1.3.1. Espectroscopia de UV-Visible (Cary 5000 UV-Vis-NIR, Aligent Technologies)... | 31 |
| 6.1.3.2. Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés) (IRTracer-100, Shimadzu)..... | 32 |
| 6.1.3.3. Microscopia electrónica de barrido (SEM) (FIB DUAL BEAM FEI HELIOS 600 NANOLAB)..... | 32 |
| 6.1.3.4. Microscopia electrónica de transmisión (TEM) (HRTEM FEI TECNAI F30 STWIN G2)..... | 32 |
| 6.2. Evaluación del efecto bactericida de desinfectantes y de nanopartículas de plata..... | 32 |
| 6.2.1. Sensibilidad fenotípica a antibióticos..... | 33 |
| 6.2.2. Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) de desinfectantes..... | 35 |

| | |
|---|----|
| 6.2.3. Efecto bactericida de desinfectantes a 5, 10, 15 y 30 min | 36 |
| 6.2.4. Concentración mínima inhibitoria de nanopartículas de plata | 36 |
| VII. RESULTADOS | 38 |
| 7.1. Síntesis y caracterización de nanoestructuras | 39 |
| 7.1.1. Nanopartículas de plata | 47 |
| 7.1.2. Síntesis de AgNWs a partir de AgNPs con PVP como agente direccionador | 56 |
| 7.2. Efecto bactericida de nanopartículas de plata AgNPs, AgNWs y desinfectantes | 63 |
| VIII. DISCUSIÓN | 75 |
| 8.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas y nanoalambres de plata | 75 |
| 8.2. Efecto bactericida de AgNPs, AgNWs y desinfectantes | 81 |
| IX. CONCLUSIONES | 92 |
| X. SUGERENCIAS | 93 |
| XI. LITERATURA | 94 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|---|-----------|
| Figura 1. | Métodos de síntesis de nanopartículas..... | 4 |
| Figura 2. | Fases de la síntesis de nanopartículas metálicas..... | 8 |
| Figura 3. | Reducción de iones Ag en presencia de epigalocatequina-3-galato..... | 9 |
| Figura 4. | Aplicaciones de nanotecnología en diferentes épocas..... | 13 |
| Figura 5. | Relación entre la introducción de antibióticos y resistencia descrita en <i>Shigella</i> en Japón. MDR: Multidrogas Resistente..... | 15 |
| Figura 6. | Principales mecanismos de resistencia a antibióticos..... | 17 |
| Figura 7. | Caricatura del mecanismo de acción de los QAC, a-d muestra el progresivo daño en la membrana celular, c) muestra la formación de las vesículas y la imagen de insertada en f muestra las vesículas..... | 21 |
| Figura 8. | Mecanismo de acción de las nanopartículas de plata y zinc..... | 24 |
| Figura 9. | Mecanismo de nanopartículas SPIONs (nanopartículas monodispersas de óxido de hierro súper magnéticas) recubiertas con nanopartículas de oro y plata sobre los biofilm..... | 25 |
| Figura 10. | Esquema representativo de estriado para prueba de sensibilidad, (A) las flechas señalan las direcciones en las que estrió el inóculo y los círculos azules muestran la distribución de los antibióticos. (B) se muestra el crecimiento bacteriano en una placa después de ser incubada señalando el halo de inhibición..... | 34 |
| Figura 11. | Espectros de espectroscopia UV-Visible de AgNPs. A) Síntesis con el té verde-L a ~98 °C y B) a 60 °C de extracción, C) Síntesis con té verde-I a ~98 °C y D) 60 °C de extracción..... | 48 |
| Figura 12. | Espectros de espectroscopia UV-Visible de síntesis de AgNPs con diferentes pH. A) 2.68, B) 5.96, C) 10.42 y D) 10.39 del extracto del té verde-L..... | 49 |
| Figura 13. | Imágenes de SEM de nanopartículas de plata después de (A) 1 h, (B) 23 h, (C) 42 h, (D) 3 d, (E) 10 d y (F) 53 d de síntesis con extracto de té verde-L. Las imágenes tienen una magnificación de 120000x, 120000x, 150000x, 200000x, 250000x y 150000x, respectivamente. Las flechas rojas señalan los hexágonos, flechas amarillas refieren a los triángulos, las flechas verdes indican las barras y el cuadro azul muestra una partícula con pequeñas partículas aparentemente en la superficie..... | 52 |
| Figura 14. | Imágenes de SEM de nanopartículas de plata después de (A) 0 h, (B) 2 h, (C) 4 h y (D) 20 h, de síntesis con extracto de té verde-I. Las magnificaciones de las imágenes son de 200000x, 150000x, 120000x y 150000x, respectivamente. Las flechas rojas señalan los hexágonos, flechas amarillas refieren a los triángulos, las flechas verdes indican barras y los recuadros azules muestran ensamblaje de dos partículas..... | 53 |
| Figura 15. | Imágenes de STEM y TEM donde se observan las nanopartículas de plata sintetizadas con té verde-L soportadas por una capa de materia orgánica (A), acercamiento de una sección de la micrografía A (B) la línea roja señala el área donde se realizó el análisis elemental (C) que confirma la presencia de plata, (D) se observa varias partículas después de ser limpiadas con | |

| | | |
|-------------------|--|----|
| | un plasma <i>cleaner</i> en atmosfera de oxígeno. A y B son imágenes obtenidas por STEM y D fue realizada en campo claro. | 54 |
| Figura 16. | Imágenes TEM de nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de té verde-L. A) muestra varias partículas sobre la película de carbón de la rejilla de cobre. B) imagen HRTEM y la distancia interplanar de los átomos de plata. | 55 |
| Figura 17. | Espectro de FTIR del té verde-L antes (A) y después (B) y té verde-I antes (C) y después (D) de la síntesis, (E) AgNPs después de 4 h y (F) AgNWs de 24 h, ambos sintetizadas con té verde-L..... | 56 |
| Figura 18. | Espectros de espectroscopia UV-Visible que muestra la síntesis de nanoalambres de plata con dos formas de adición del PVP a la mezcla de AgNO ₃ y extracto de té verde. A (té verde-C) y B (té verde-L) cuando el PVP fue diluido previamente, C (té verde-C) y D (té verde-L) cuando se adicionó sin diluir. La temperatura del extracto de té verde se mantuvo ~ 45 °C..... | 58 |
| Figura 19. | Imágenes de SEM donde se observan nanoalambres de plata. Sintetizados con extracto de té verde-L con 0.003 g de PVP a 24 h a 20000x (A) y 30 d a 12000x (B), 0.006 g de PVP a 24 h con una magnificación de 50000x (C) de síntesis, y con té verde-C con 0.003 g y 79994x (D), 0.006 g a 80000x (E) y 0.012 g con 150000x (F) de PVP después de 24 h de síntesis..... | 60 |
| Figura 20. | Imágenes de TEM de nanoalambres con extracto de té verde-C y 0.003 g de PVP. (A) Se observa que a los AgNWs acompañados de partículas. (B) es una ampliación del área seleccionada de A, se distingue la envoltura alrededor de AgNPs y AgNWs (flechas amarillas)..... | 61 |
| Figura 21. | Imágenes de TEM de nanoalambres de plata sintetizados con extracto de té verde-L con 0.003 g de PVP. A) tres nanoalambres entrelazados y acompañados de nanopartículas de plata. B) Imagen de HRTEM de una punta de nanoalambre. C) unión de dos nanoestructuras. D) imagen de alta resolución de la sección donde se unen las nanoestructuras. | 62 |
| Figura 22. | Sensibilidad antimicrobiana de <i>Escherichia coli</i> . A) Grupo con 16 aislamientos altamente identificados y B) grupo con 15 aislamientos. | 63 |
| Figura 23. | Sensibilidad fenotípica a antibióticos de <i>Salmonella</i> spp..... | 64 |
| Figura 24. | Sensibilidad fenotípica a antibióticos de <i>Staphylococcus aureus</i> | 65 |
| Figura 25. | Comparación del promedio de inhibición del crecimiento (%) de los aislamientos de <i>S. aureus</i> (n=12), <i>E. coli</i> (n=31) y <i>Salmonella</i> spp. (n=29) después de 24 de exposición a AgNPs-C (A) y AgNPs-TV (B). (AgNPs-C= 1: 0 mg/L, 2: 0.99 mg/L, 3: 1.99 mg/L, 4: 3.96 mg/L, 5: 7.93 mg/L y 6: 15.83 mg/L, y AgNPs-TV= 1: 0 mg/L, 2: 1.61 mg/L, 3: 3.23 mg/L, 4: 6.45 mg/L, 5: 12.9 mg/L y 6: 25.8 mg/L)..... | 73 |
| Figura 26. | Inhibición del crecimiento en las cepas ATCC 25922 (<i>E. coli</i>) barras grises y azules lisas, ATCC 25923 (<i>S. aureus</i>) barras grises y azules moteadas, nanoalambres de plata (barras azules) y nanopartículas de plata (barras grises). | 74 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|------------------|--|-----------|
| Tabla 1. | Diferentes métodos y técnicas Top-Down para la síntesis de nanoestructuras. | 5 |
| Tabla 2. | Métodos y técnicas para la síntesis de estructuras manométricas por la vía Botton-up..... | 7 |
| Tabla 3. | Técnicas para la caracterización de nanomateriales. | 10 |
| Tabla 4. | Tipos de nanopartículas metálicas y aplicaciones..... | 14 |
| Tabla 5. | Sitio blanco de desinfectantes y antibióticos..... | 18 |
| Tabla 6. | Biocidas y época en la que se descubrieron y se les dio una aplicación. | 19 |
| Tabla 7. | Introducción de antibióticos a la práctica clínica. | 20 |
| Tabla 8. | Mecanismos de acción de biocidas comunes. | 22 |
| Tabla 9. | Antibióticos usados e interpretación (S, I y R) con base en los diámetros de los halos de inhibición..... | 34 |
| Tabla 10. | Diámetro de nanopartículas (nm) de plata sintetizadas con dos diferentes extractos de té verde (L: Lagg´s e I: Inficiónate). | 51 |
| Tabla 11. | Concentración mínima inhibitoria (CMI) de tres especies bacteriana con 24 h de exposición a compuestos amino cuaternarios (QACs). | 66 |
| Tabla 12. | Concentración mínima inhibitoria (CMI) de tres especies bacteriana con 24 h de exposición a Iodopavidona. | 67 |
| Tabla 13. | Número de aislamientos con crecimiento bacteriano después de 5, 10, 15 y 30 min de exposición a I ₂ PVP-C. | 69 |
| Tabla 14. | Número de aislamientos con crecimiento bacteriano después de 5, 10, 15 y 30 min de exposición a I ₂ PVP-P. | 70 |
| Tabla 15. | Número de aislamientos con crecimiento bacteriano después de 5, 10, 15 y 30 min de exposición a QACs-P. | 71 |
| Tabla 16. | Número de aislamientos con crecimiento bacteriano después de 5, 10, 15 y 30 min de exposición a QACs-C. | 72 |

ABREVIATURAS

| | |
|----------------------|--|
| Ag ⁰ | Plata reducida |
| Ag ⁺ | Ion de plata |
| AgNO ₃ | Nitrato de plata |
| AgNPs | Nanopartículas de plata |
| AgNRs | Nanobarras de plata |
| AgNWs | Nanoalambres de plata |
| ATR | Reflexión total atenuada (Attenuated Total Reflection) |
| CB | Cloruro de benzalconio |
| CFT | Compuestos fenólicos totales |
| CMI | Concentración mínima inhibitoria |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| EGCG | Epigallocatequina-3-galato |
| EROs | Especies reactivas de oxígeno |
| ETAs | Enfermedades transmitidas por alimentos |
| E-TV | Extracto de té verde |
| EUA | Estados Unidos de América |
| FAO | Organización para la alimentación y la agricultura (Food and Agriculture Organization) |
| FTIR | Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier |
| HRTEM | Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución |
| I ₂ PVP-C | Iodopovidona comercial |
| I ₂ PVP-P | Iodopovidona puro |
| ICP-MS | Espectroscopia de masas con plasma acoplado inductivamente |
| NPs | Nanopartículas |
| ONU | Organización de las Naciones Unidas |
| QACs | Compuestos amonio cuaternarios |
| QAC-C | Compuesto amonio cuaternario comercial |
| QAC-P | Compuesto amonio cuaternario puro |
| SEM | Microscopia electrónica de barrido |
| STEM | Scanning transmission electron microscopy |
| TEM | Microscopia electrónica de transmisión |
| UFC | Unidades formadoras de colonias |

RESUMEN

La creciente problemática de resistencia bacteriana y el aumento en el costo de los tratamientos causados por infecciones bacterianas han favorecido el desarrollo de nuevas alternativas como las nanopartículas de plata. En este trabajo se evaluó la eficacia de las nanopartículas de plata (comerciales y sintetizadas con té verde) comparándola con dos desinfectantes comerciales cuyos principios activos son el cloruro de benzalconio y iodopavidona. Las imágenes de microscopia electrónica de barrido de las nanopartículas de plata mostraron que la morfología de éstas es cuasi-esférica y el tamaño de la partícula está en función del tiempo. Las imágenes de microscopia electrónica de transmisión y las espectroscopias infrarrojas transformada de Fourier evidenciaron que las nanopartículas de plata son estabilizadas por los compuestos orgánicos de té verde. Estas partículas fueron usadas para la comparación del efecto bactericida entre ellas y los desinfectantes comunes, donde se encontró que la concentración mínima inhibitoria máxima para el cloruro de benzalconio fue de 128 mg/L y de hasta 4025 mg/L para la iodopavidona en *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*. Mientras que con las nanopartículas de plata sintetizadas con una concentración de 25.8 mg/L se obtuvo una inhibición del crecimiento bacteriano hasta el 90%, para *E. coli*, y de 65 y 63 % para *Salmonella* y *S. aureus*, respectivamente, a diferencia de las nanopartículas de plata comerciales con las que se inhibió el 100 % de crecimiento bacteriano de *E. coli* y *S. aureus*, pero para *Salmonella* spp. se inhibió el 91 % de crecimiento bacteriano con una concentración de 7.93 mg/L. Aunque las nanopartículas de plata no tienen un efecto inhibitorio inmediato como en el caso de los desinfectantes, pueden ser usadas a largo plazo y disminuir la cantidad excesiva de desinfectantes empleada para la inhibición bacteriana a corto plazo. Un hallazgo importante de este trabajo fue la obtención de nanoalambres de plata a partir de nanopartículas de plata y polivinilpirrolidona como agente direccionador. Las nanoestructuras observadas por microscopia electrónica de barrido y de transmisión mostraron que los nanoalambres se forman a partir de la unión de dos nanoestructuras resultando en alambres en zig-zag, el número de uniones es variable. Estas nanoestructuras también mostraron actividad bactericida, la exposición a 25.8 mg/L de nanoalambres de plata y 25.8 mg/L nanopartículas de plata con *E. coli* redujo el crecimiento hasta 9 Log₁₀ unidades formadoras de colonias/mL mientras que el control alcanzó 11 Log₁₀ unidades formadoras de colonias/mL, pero con *S. aureus* a iguales concentraciones de nanomateriales solo los nanoalambres disminuyeron el crecimiento de la bacteria de 9 Log₁₀ unidades formadoras de colonias/mL (control) a 8 Log₁₀ unidades formadoras de colonias/mL (tratamiento).

Palabras clave: nanopartículas de plata, resistencia bacteriana, QACs, iodopavidona, biosíntesis

ABSTRACT

The increase of the bacterial resistance and expensive treatments of the infections by multidrug resistant bacteria have been reason for development research new alternative for treatment and control these bacteria. The aim in this investigation was to evaluate the effect of silver nanoparticles (synthesized by green tea and a commercial product), efficacy was compared with two disinfectant both within benzalkonium chloride and iodopavidone, as active compounds. The scanning electron microscopes images showed silver nanoparticles with quasi-spherical shapes and we could observe that size is time-dependent. Transmission electron microscopy analysis showed silver nanoparticles coated by a membrane of organic matter provided from green tea polyphenols, functional groups were confirmed by Fourier transform infrared spectroscopy analysis. The minimum inhibitory concentration of benzalkonium chloride found in *E. coli* was 128 mg/L, with iodopovidone all bacteria requiring 4025 mg/L to inhibit their growth. However, silver nanoparticles synthesized with green tea showed diminution of bacterial growth from 90 % to 65 % and 63 % in *E. coli*, *Salmonella* and *S. aureus*, respectively at concentration of 25.8 mg/L, while commercial silver nanoparticles did decrease the growth in *E. coli*, *Salmonella* and *S.aureus* more than 90 % with a concentration of 7.93 mg/L. In this survey results shows that the silver nanoparticles have not bactericidal effect at short time, whereas that disinfectants show bactericidal effect at short time. Nevertheless concentration is higher than minimum inhibitory concentration at 24 h. Another nanostructure obtained with green tea and polyvinylpyrrolidone as agent directionator was the silver nanowires, these nanomaterials were given by the junction between two or more nanorods, thereby the nanowires were seen in zigzag. Silver nanowires showed bactericidal effect, in *E. coli* with 25.8 mg/L growth decreased from 11 Log₁₀ CFU/mL (control) to 9 Log₁₀ CFU/mL (treatment), the result was similar with silver nanoparticles. However *S. aureus* at similar concentration of silver nanoparticles and nanowires, only nanowires decreased growth from 9 Log₁₀ CFU/mL to 8 Log₁₀ CFU/mL.

Keywords: silver nanoparticles, resistance bacteria, quaternary ammonium compounds, iodopavidone, biosynthesis

I. INTRODUCCIÓN

El creciente aumento de bacterias que desarrollan mecanismos de resistencia a los antibióticos, es uno de los principales problemas que preocupan a la medicina humana, medicina veterinaria, a investigadores y a las industrias farmacéuticas debido a la dificultad en los tratamientos de infecciones causadas por estos microorganismos y los costos millonarios para los gobiernos. Los problemas económicos se acrecientan cuando las infecciones se presentan en la población de países no desarrollados; principalmente por la poca atención y educación en el sistema de salud, la reducida investigación en resistencia bacteriana, las malas prácticas de higiene, poca difusión de conocimiento y contaminación ambiental por parte de las grandes empresas (Mathewson *et al.*, 1987, Zhang *et al.*, 2016a).

En países latinoamericanos, las infecciones nosocomiales son una de las principales causas de muerte y generan importantes pérdidas económicas (Cabrera *et al.*, 2007). No obstante, en países desarrollados como Estados Unidos de América, también se han observado infecciones por *Escherichia coli* O157:H7 en 15% de la población infantil (Wong *et al.*, 2000), las pérdidas económicas son significativas alcanzando de 170 a 350 millones de dólares por año, los gastos dependen de la severidad de la infección y del desarrollo del síndrome hemolítico urémico (Russo y Johnson, 2003). Estas infecciones son causadas por bacterias resistentes que han aumentado por el uso indiscriminado de los antibióticos y desinfectantes, además la presión ambiental favorece la adquisición de material genético extraño que contiene información para codificar las bombas de expulsión, proteínas de inactivación o modificación de la molécula, los cuales son mecanismos de resistencia bacteriana (Russell, 2002).

Generalmente, las investigaciones se desarrollan en bacterias de importancia en salud humana y las adquiridas en hospitales por ser ambientes con un contacto frecuente de diversidad de bacterias con múltiples características; no obstante, en la industria alimentaria también se han observado bacterias con multirresistencia que afectan a la salud humana y a animales de producción, por lo que estas industrias tienen que aplicar protocolos de desinfección y control de microorganismos patógenos, estos compuestos son aprobados por la organización de agricultura y alimentos (FAO, por sus siglas en inglés) de la Organización de las Naciones Unidas (ONU); sin embargo, esta misma organización establece que los desinfectantes son tóxicos y algunos corrosivos por lo que su uso debe ser controlado (FAO, 2015).

En la actualidad se buscan nuevas alternativas, que sean seguras para el usuario y eficientes para el control de las bacterias multirresistentes, algunas de las alternativas que se han propuesto es el uso de extractos de plantas con actividad bactericida o emplear organismos para el mismo fin, otra es el uso de los nanomateriales, principalmente las nanopartículas de metales que exhiben propiedades biocidas, como la plata que se ha usado desde los egipcios en forma de vasijas o de platos para la purificación de agua y conservación de los alimentos (Chamakura *et al.*, 2011). El desarrollo de estas alternativas ha sido posible por los avances en las técnicas y equipos actualmente empleados para la caracterización de las moléculas y los átomos de estas (Initiative, 2002).

Hasta hoy, la potente actividad bactericida de las nanopartículas de plata ha sido ampliamente reportada; sin embargo, la eficacia de los nanomateriales frente a los agentes desinfectantes ha sido poco estudiada, de ahí la importancia de evaluar el efecto de las nanopartículas de plata y desinfectantes sobre aislamientos bacterianos de alimentos.

II. ANTECEDENTES

2.1 Nanociencia y nanotecnología

Debido a las propiedades específicas de los materiales nanométricos son de gran importancia en la actualidad. La nanociencia se ha encargado del estudio de los átomos para que la nanotecnología tome el conocimiento, sintetice, diseñe y estructure materiales o partículas a escala nanométrica con aplicaciones en las diversas áreas de la ciencia, en ingeniería y en la tecnología (Hornyak *et al.*, 2009, Initiative, 2002). Dos características valiosas para la nanotecnología son el tamaño y la forma del nanomaterial, así como la composición química original, ya que de estas características dependen su aplicación en medicina, electrónica, biología y computación por mencionar algunas (Hornyak *et al.*, 2009).

Existe una extensa variedad de nanomateriales, por ejemplo las capas que se utilizan como recubrimiento, las nanopartículas a partir de las cuales se forman tiras, chips, polímeros, celdas de cerámica, los nanotubos de carbón, los ferro fluidos, zeolitas y estructuras inorgánicas de DNA (Hornyak *et al.*, 2009). Cada nanomaterial tiene diferentes áreas de aplicación; sin embargo, las propiedades de cada uno de estos dependen directamente del tamaño y la forma. En el caso de las nanopartículas (NPs) se definen como partículas de uno a 100 nanómetros de diámetro (Chaloupka *et al.*, 2010, Gaillet y Rouanet, 2014), acopladas a matrices o a otros compuestos y/o suspendidas, circulares o prismáticas, con nula toxicidad (Lara *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2001). El tamaño es el factor que recibe mayor atención, por la relación con la estabilidad y homogeneidad de la partícula, si bien se ha observado que las propiedades de las NPs de 1-10 nm son excelentes, también se ha visto que son las que requieren de un agente estabilizador para disminuir la agregación entre ellas (Lara *et al.*, 2011, Lara *et al.*, 2010b).

2.1.1 Síntesis y caracterización de nanomateriales

En la actualidad se han desarrollado varios métodos para las síntesis de nanomateriales y se pueden dividir en dos grandes grupos: las síntesis por Bottom-Up donde los nanomateriales se construyen a partir de la unión o del establecimiento de enlaces entre entidades (átomos, moléculas o partículas) pequeñas para formar estructuras prismáticas, cilíndricas o algunas otras, los métodos que se usan son químicos y recientemente biológicos; y las síntesis por Top-Down en la que los métodos físicos y químicos reducen el tamaño del material y dependen en gran medida de la superficie del material, los nanomateriales son en su mayoría imperfectos (Figura 1) (Mittal *et al.*, 2013).

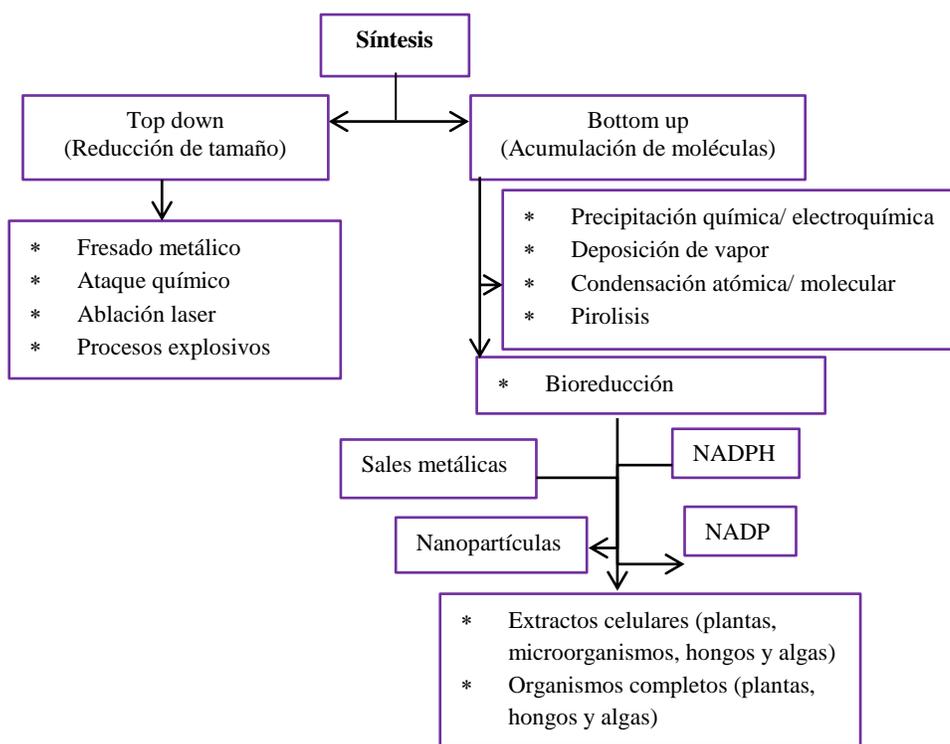


Figura 1. Métodos de síntesis de nanopartículas. Tomado de Mittal *et al.*, 2013.

Por la vía Top-Down hay varios métodos como *el método con energía mecánica*, donde se emplean procesos físicos que no involucran cambios en la estructura química; *los métodos de alta energía y partículas* que usan altas temperaturas, *métodos termales* donde el calor no se obtienen de una reacción química y *métodos químicos* donde hay un cambio en la estructura química del material, una descripción más detallada de los métodos se muestra en el tabla 1 (Hornyak *et al.*, 2009).

Tabla 1. Diferentes métodos y técnicas Top-Down para la síntesis de nanoestructuras. Tomado de Hornyak *et al.*, 2009.

| Método | Técnica | Descripción |
|----------------------|--|--|
| Por energía mecánica | Ball milling (molino de bolas) | Obtención de nanopartículas mayores a 5 nm por fricción mecánica. Se usan bolas de acero para transmitir energía cinética por impacto a la muestra. Productos muy poli dispersos que contaminan. |
| | Laminación/Paliza | Método tradicional para reducir el material. El oro se reduce hasta 50 nm. |
| | Extrusión | Emplea alta presión usando una fase plástica. Puede considerarse un proceso mecánico-termal. |
| | Maceramiento mecánico, pulido, molienda y ultramicrotomo | El tamaño mínimo obtenido es de 5 μm . Con ultramicrotomo son mayores a 100 nm. |
| | Compactación y consolidación | Es material en polvo que se compacta. |
| | Atomización | Conversión de partículas en un líquido dentro de un aerosol por fuerza a y alta presión. |
| Térmicos | Recocido | Parte de material a granel para formar nanocristales o de la transformación de un nanomaterial dentro de otra fase física. Separación de micro-fases para formar estructuras nanoscópicas presentes en el material a granel bajo la aplicación de un recorrido térmico por transición de temperatura por un vidrio. |
| | Chill block melt spinning | El metal es derretido para formar la nanoestructura. |
| | Atomización electrodinámica | Producción de gotitas monodispersas. |
| | Electrospinning | Un alto voltaje es aplicado a polímeros en una solución fusionada para inducir carga. Soluciones poliméricas a temperatura ambiente. |
| | Compactación dinámica líquida | Una corriente fundida de metal es atomizada con pulsos a alta velocidad en un gas inerte, las gotas semi-solidificadas son colectadas y enfriadas. |
| | Evaporación | Evaporación de un metal solido o de otro material para formar una película con alto vacío. El calor es generado por una resistencia eléctrica. Si los nanoclusters son formados durante la evaporación, es top down, pero si los átomos o moléculas son formados durante el proceso de evaporación que se recombina para formar una capa sin una reacción química, es una técnica crossover. |
| | Extrusión | Hay una fusión de bismuto por la alta presión que pasa a través de poros del material templado. Se obtienen nanocables de ~13 nm. |
| | Sublimación | Implica un cambio de fase sólida a gaseosa sin pasar por una fase líquida. |
| | Termólisis, pirólisis | Descomposición de la masa sólida a altas temperaturas. Aquí si hay un cambio químico, por lo que se considera una técnica crossover. |
| Combustión | Hay un cambio químico e involucra oxígeno. | |

| | | |
|---------------------|--------------------------------------|--|
| | Carbonización de polímeros | Requiere de polímeros muy específicos y de temperaturas de hasta 900 °C. |
| De alta energía | Ablación laser | La alta intensidad del rayo láser directamente en un grafito marcado más la catálisis producen nanotubos de carbón. |
| | Vaporización por energía solar | La energía solar es dirigida a un grafito más la catálisis. |
| | Fresado de iones | Un plasma de ion de argón es usado para sustraer el material para formar la superficie. |
| | Evaporación por un haz de electrones | El haz se dirige a un material caliente. Se requiere de un alto vacío. |
| | Ion reactivo por agua fuerte | El material sensible es grabado. Hay un cambio químico. |
| | Sonicación por alta energía | Se emplean ondas para obtener nanomateriales a partir de material a granel. También se emplea para separar nanotubos en un solvente. |
| Fabricación química | Aguafuerte | Soluciones de ácidos y bases estándares. Los materiales con poros en canal son los obtenidos por esta técnica. |
| | Electropolishing | Reduce la rugosidad de la superficie del metal a la nanoescala. Son ácidos concentrados o bases, con temperatura y corrientes elevadas. |
| | Anodizado | El crecimiento de una película es favorecido por una solución, a bajas temperaturas y corrientes, diluido en ácidos polipróticos. |
| | Combustión | Es irreversible y dinámico catalizado por altas temperaturas. |
| Litografía | Litografía ultravioleta extrema | Ondas de luz cortas cercanas a los 13.5 nm, tiene una resolución de ~30 nm. Se requiere de alto vacío. Toda la materia se impregna de luz ultravioleta y daña al sustrato. |
| | Litografía de rayos X | Los rayos X se generan de un sincrotrón. Se producen estructuras de hasta 10 nm. Daña el sustrato. |
| | Litografía por un haz de electrones | Un haz de electrones es generado y dirigido al material para generar patrones. |
| | Litografía por nanoimpresión | Se crea un negativo de un patrón, la película es curtida después de que se retira el negativo. Se obtienen estructuras de hasta 5 nm. |
| | Litografía por nanoesferas | Los materiales son colocados entre espacios de esferas. Se obtienen materiales de 20-1000 nm. Es económico. |

En la vía Bottom-up los métodos se dividen en cuatro grupos: a) *método por fase gaseosa* donde las moléculas y átomos están muy dispersos, la formación del material termina en una fase líquida, b) *fase líquida* en la que se requieren líquidos aniónicos, catiónicos, hidrofílicos, hidrófobos o heterogéneos, c) *fase sólida* y d) *métodos biológicos* (Hornyak *et al.*, 2009), estos últimos se

realizan en una fase líquida para que las coenzimas, grupos funcionales o cofactores intervengan en la síntesis (Tabla 2) (Hornyak *et al.*, 2009, Vilchis-Nestor *et al.*, 2008).

Tabla 2. Métodos y técnicas para la síntesis de estructuras manométricas por la vía Botton-up. Tomado de Hornyak *et al.*, 2009.

| Método | Técnica | Descripción |
|----------------------------|--|--|
| Síntesis por fase de gases | Deposición de vapor químico | Elevadas temperaturas sobre un sustrato sólido o catálisis. Los nanotubos de carbón son formados por una descomposición catalítica carbón en gas como materia prima. |
| | Deposición de una capa atómica | Es una técnica precisa y uniforme para formar conductores, aisladores y cerámicas. |
| | Epitaxia | Requiere de una sustancia y una fase cristalina del sustrato. El crecimiento se va dando por la unión de átomos y moléculas. En la homo-epitaxia: la capa y el sustrato son iguales, y en la hetero-epitaxia: los materiales son diferentes. |
| | Implantación de iones | Los iones de un material son insertados a un sustrato sólido. |
| Síntesis en fase líquida | Combustión | Una técnica comúnmente usada. Se requieren bajos niveles de oxígeno. |
| | Descomposición térmica | No hay oxígeno presente. Las nanopartículas de hierro son las sintetizadas por esta técnica. |
| | Auto ensamblaje molecular | Las estructuras se pueden formar en masa. Se emplea con material blando. Depende de la temperatura, el pH y la presión. |
| | Química supramolecular | Se basa en la hipótesis de cerradura y llave (lock and key). Involucra las interacciones por fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, atracción hidrofóbicas, e interacciones bipolares, así como enlaces estables como los covalentes. |
| Síntesis por sol-gel | Síntesis por sol-gel | Hay una suspensión coloidal de partículas sólidas en un líquido, en un <i>sol</i> ; mientras que en un gel se forma un sólido que contiene líquido en estructura porosa. Tienden a la agregación |
| | Deposición electrolytica y electroless | Se relaciona con la constante de Faraday y es auto catalítico. Se requiere de una sal metálica y un agente reductor. |

La síntesis de nanopartículas por métodos biológicos se puede realizar con organismos completos como procariontes (bacterias) y eucariotas como hongos y plantas (Baker *et al.*, 2013, Mittal *et al.*, 2013), en el caso de las plantas se pueden emplear los extractos de hojas, tallos y raíces, los cuales contienen diferentes moléculas que favorecen la forma y el tamaño de la nanopartícula (Baker *et al.*, 2013).

El mecanismo de síntesis de nanopartículas se puede dividir en tres fases: la reducción, donde se ha determinado que proteínas, aminoácidos, vitaminas, polisacáridos, polifenoles, terpenoides, y ácidos orgánicos como ácido cítrico, el geraniol, el ácido gálico, cofactores como NAD^+ , y pigmentos como la clorofila (Baker *et al.*, 2013, Mittal *et al.*, 2013, Vilchis-Nestor *et al.*, 2008) participan en la reducción de iones metálicos, la segunda etapa es el crecimiento, donde los iones tienen cargas neutras y comienzan a agregarse, formando cúmulos o clusters, y finalmente la estabilización donde nuevamente participan moléculas que intervinieron en la etapa de reducción para terminar con la formación de la partícula (Figura 2) (Mittal *et al.*, 2013).

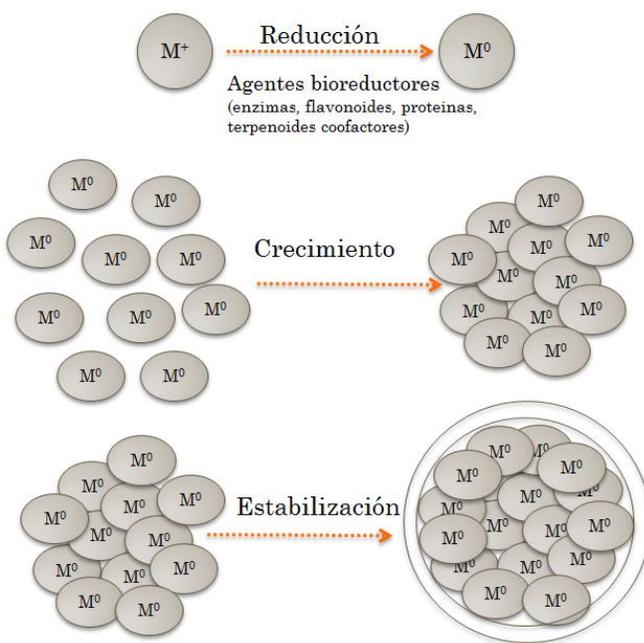


Figura 2. Fases de síntesis de nanopartículas metálicas. Tomado de Mittal *et al.*, 2013.

La participación de moléculas específicas en la formación de nanopartículas de plata ha sido establecida por varios trabajos; por ejemplo, Hussain y Khan (2014) reportan que la alta reactividad de la epigalocatequina-3-galato (EGCG) es por presencia de los grupos $-\text{OH}$, los cuales transfieren sus electrones a los iones Ag^+ , por una reacción oxido-reducción en un solo paso, esta es la primera etapa y termina en la obtención de Ag^0 y un radical de EGCG. En una segunda reacción, el radical se estabiliza formando una quinona y la reacción de complejación entre el átomo (Ag^0) y el ion (Ag^+) forma Ag_2^+ , los cuales forman dímeros dando lugar a Ag_4^{2+} . La reacción termina con el complejo Ag_4^{2+} -EGCG, que es responsable del color amarillo de la solución durante la formación de

AgNPs (Figura 3). Los complejos formados son agregados dinámicos y anfifílicos que forman dos regiones altamente polares y no polares con características fisicoquímicas totalmente diferentes (Hussain y Khan, 2014).

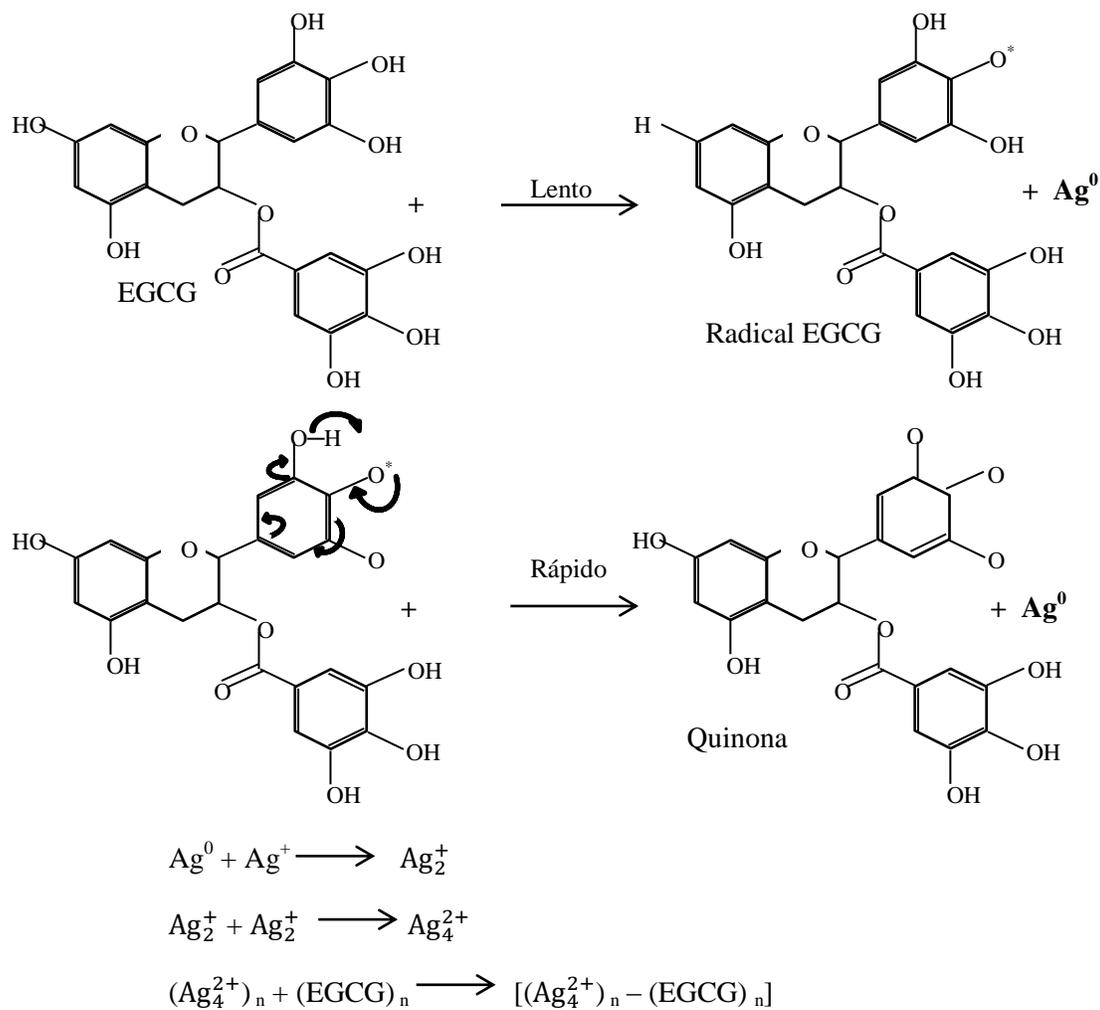


Figura 3. Reducción de iones Ag en presencia de epigalocatequina-3-galato. Tomado de Hussain y Khan 2014.

Además de los compuestos presentes en el extracto, en la síntesis de nanopartículas también influye el pH, la temperatura, concentración de iones y de agente reductor; en conjunto estos factores determinan el tamaño y la forma, la velocidad de reacción y estabilidad de las partículas (Amaladhas *et al.*, 2012, Baker *et al.*, 2013, Bhaumik *et al.*, 2015).

Muchos de los métodos existentes para la síntesis son empleados en relación a las características deseadas para la nanoestructura y su aplicación. Con el desarrollo de diferentes métodos de caracterización, las características de las nanoestructuras obtenidas por diferentes métodos pueden ser conocidas. En el tabla 3 se mencionan algunas de las técnicas de caracterización empleadas comúnmente (Hornyak *et al.*, 2009).

Tabla 3. Técnicas para la caracterización de nanomateriales. Tomado de Hornyak *et al.*, 2009.

| Caracterización por sondas ópticas | | Caracterización por sondas de barrido | |
|---|---|---|--|
| Técnica | Información | Técnica | Información |
| Microscopia confocal de láser y barrido (CLSM) | Imágenes/morfología ultrafina | Microscopia de fuerza atómica (AFM) | Topología/imágenes/ estructura de superficie |
| Microscopia óptica de barrido de campo cercano (SNOM) | Imágenes tramadas | Microscopia de fuerza lateral (LFM) | Superficie/ análisis de fricción |
| Microscopia de fluorescencia de 2 fotones (2PFM) | Fluoroforos/muestras biológicas | Microscopia de fuerza química (CFM) | Análisis químico y de superficie |
| Espectroscopia de correlación de fotones (PCS) | Tamaño de partícula | Microscopia de fuerza magnética (MFM) | Análisis magnético |
| Microscopia de ángulo de Brewster (BAM) | Imagen de interface gas-liquido | Microscopia de efecto túnel de barrido (STM) | Topología/ estructura de superficie/ imagen |
| Caracterización por sondas de electrones | | Espectroscopia de efecto túnel de barrido (STS) | Densidad electrónica de estado |
| Microscopia electrónica de barrido (MEB) | Imágenes raster/ morfología topológica | Microscopia de sonda atómica (APM) | Imágenes tridimensionales |
| Microanálisis por sonda electrónica (EPMA) | Tamaño de partícula/ análisis químico local | Microscopia de campo iónico (FIM) | Perfiles químicos/ espaciamento atómico |
| Microscopia electrónica de transmisión (TEM) | Imagen/ tamaño y forma de partícula | Caracterización por sonda de partículas de iones | |
| Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) | Imagen con análisis de estructura química | Espectrometría de masas (MS) | Composición de material |
| Microscopia electrónica de transmisión y barrido (STEM) | Muestras biológicas | Espectrometría de masas de ion secundario (SIMS) | Composición de superficies solidas |
| Microscopia de emisión de campo (FEM) | Estructura de superficie/ propiedades moleculares | Espectroscopia de dispersión de neutrones (NSS) | Estructura química por unión de absorbato |
| Difracción electrónica | Estructura cristalina | Análisis de reacción nuclear | Perfiles de profundidad de |

| | | | |
|--|--|--|--|
| Espectroscopia de pérdida de energía de electrones (EELS) | Interacciones electrónicas no elásticas | (NRA) Emisión de rayos X inducidos por partículas | la películas delgadas Análisis elemental no destructivo |
| Difracción de electrones reflejados de alta energía (RHEED) | Estructura de superficie | Caracterización termodinámica | |
| Difracción de electrones de baja energía (LEED) | Superficie/ unión absorbato | Análisis gravimétrico térmico (TGA) | Pérdida de masa contra temperatura |
| Difracción de electrones de retro-dispersión para SEM | Información cristalográfica | Análisis térmico diferencial (DTA) | Capacidad de reacción calorífica |
| Espectroscopia de electrones Auger (AES) | Análisis química de superficie | Calorimetría de barrido diferencial (DSC) | Cambio de reacción calorimétricos |
| Corriente del haz de electrones inducida (EBIC) | Propiedades de transporte en semiconductores | Nanocalorimetría | Calor latente de fusión |
| Caracterización por sondas de fotones | | | |
| Espectroscopia UV-visible | Análisis químico | Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) | Análisis de vibraciones asimétricas |
| Espectroscopia de absorción atómica E. de emisión atómica E. de fluorescencia E. de plasma de acoplamiento inductivo Espectroscopia de resonancia de superficie de plasmón | Análisis elemental | Microscopia de resonancia de microondas térmicas por barrido | Detección térmica |
| Resonancia de plasmón | Superficie/ análisis de absorbato | Difracción de rayos X | Estructura cristalina |
| Resonancia de plasmón | Análisis de tamaño de partícula | Cátodo-luminiscencia | Características de emisión |

Las herramientas más comunes para caracterizar nanopartículas son: *la espectroscopia UV-visible* que emplea ondas de luz de 300 a 800 nm para detectar la resonancia superficial del plasmón, que depende de la morfología y de la naturaleza metálica de la nanoestructura; *dispersión de luz dinámica (DLS)* caracteriza la superficie, distribución, carga y tamaño de la partícula suspendida en líquido, *la microscopia electrónica de barrido y de transmisión (SEM y TEM, respectivamente)* se usan para la caracterización morfológica en una escala de nm hasta μm , siendo la TEM la que tiene hasta 1000 veces más resolución que la SEM; cuando se requiere conocer la superficie química, como los grupos funcionales (carbonilos, hidroxilos) u otros se emplea la *Espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)*, *la difracción de rayos X (XRD)* determina la estructura cristalina, los patrones obtenidos son comparados con los ya establecidos, y la *espectroscopia dispersa (EDS)* da información sobre la composición elemental de la partícula, esta última se acopla al microscopio electrónico de transmisión (Hornyak *et al.*, 2009, Mittal *et al.*, 2013).

2.1.2. Aplicaciones de los nanomateriales

Las aplicaciones de la nanotecnología en la actualidad son variadas. Por ejemplo, el polvo en nanoescala de dióxido de titanio y óxido de zinc son empleados en los cosméticos y cremas faciales y en pinturas reflejantes, el de hierro se adiciona a los lápices labiales; en los últimos años las nanoestructuras se han insertado en la tecnología, se elaboran discos duros, se utiliza en servidores de internet e inclusive en computadoras, los discos de almacenamiento masivo serian extremadamente amplios si no se emplearan las nanoestructuras (Initiative, 2002). En la figura 4 se muestran las aplicaciones de los nanomateriales a través de un tiempo corto y como estas aplicaciones van en aumento.

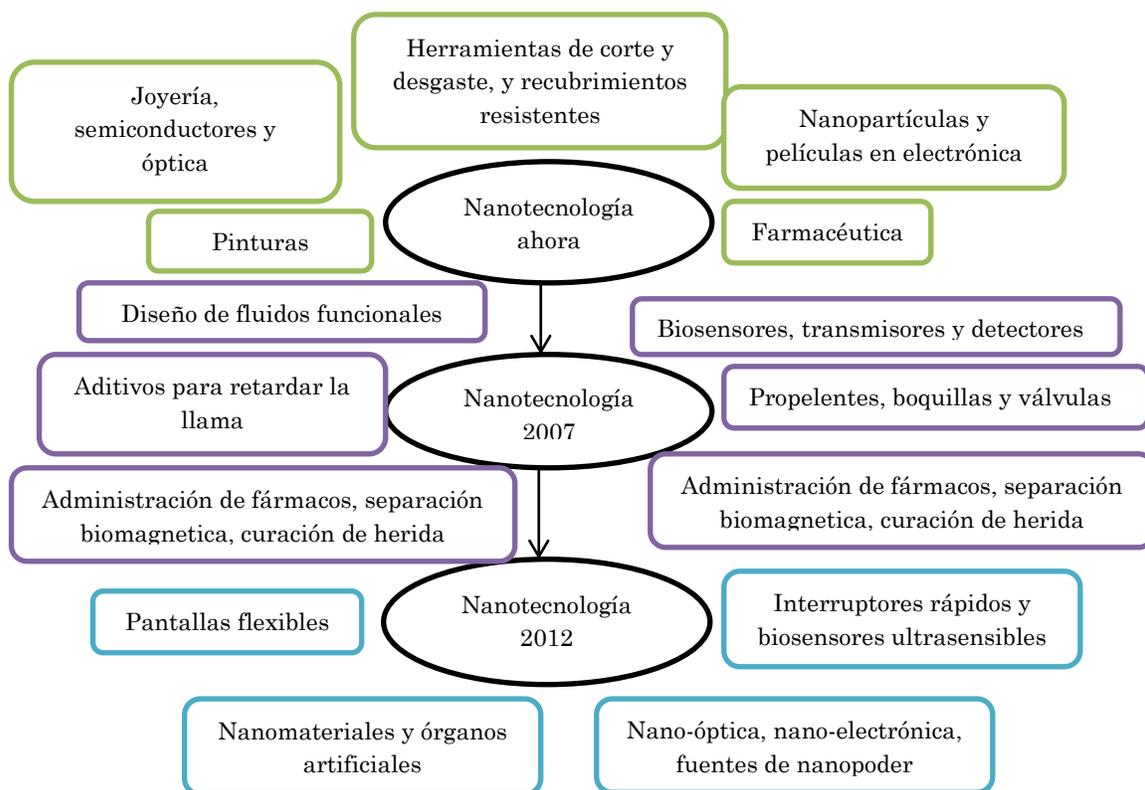


Figura 4. Aplicaciones de nanotecnología en diferentes épocas. Tomado de Initiative *et al.*, 2012.

Una de las áreas que mayor se ha beneficiado con el advenimiento de la nanotecnología, es la computación, principalmente por la necesidad de almacenar y conservar una gran cantidad de información en dispositivos de fácil transporte, en la actualidad siguen construyéndose y mejorando con ayuda de la nanotecnología (Initiative, 2002), en la química y en la física son codiciadas por sus propiedades ópticas, eléctricas y foto-termales (Geethalakshmi y Sarada, 2012). En la biomedicina y biología, los liposomas son frecuentemente usados como transportadores de fármacos en ciertas terapias cancerígenas (Hornyak *et al.*, 2009). Aplicaciones más específicas son las que se le ha dado a las nanopartículas magnéticas recubiertas de plata, estas se adicionan a fluidos biológicos para liberarlos de microorganismos patógenos a la salud (Wang *et al.*, 2011), también son usados para análisis genéticos, infecciosos, y como vehículos para dar especificidad de los medicamentos; el empleo de nanomateriales también está presente en la investigación científica en marcadores y equipos (Initiative, 2002). Otras aplicaciones de las nanopartículas, específicamente las de plata por su potente actividad bactericida prolongada y biocompatibilidad dentro de la medicina, está en los implantes internos y externos, por ejemplo en implantes cardiovasculares, los catéteres venosos y

para neurocirugías, como parte del cemento óseo, apósitos para heridas y algunos documentos refieren la propiedad antiinflamatoria (Chaloupka *et al.*, 2010) también se ha demostrado su potencial antiviral, ya que se ha evaluado la interacción de las nanopartículas de plata con el virus de inmunodeficiencia humana (HIV-I), esta interacción evita la unión del virus con la célula, reduciendo el número de células infectadas (Elechiguerra *et al.*, 2005); además se han empleado para el diagnóstico de enfermedades como cáncer y Alzheimer donde se usan en forma de biosensores y en partes dentales (Ge *et al.*, 2014). Asimismo las nanopartículas de plata se han empleado en el tratamiento de agua potable, subterránea y residual (Hossain *et al.*, 2014, Tran *et al.*, 2013), desinfección de aire, adicionado a pinturas, gel de uso tópico y en paquetes de alimentos, también se han incrustado en la ropa clínica (Tran *et al.*, 2013). Las nanoestructuras pueden ser ampliamente usadas por su reducido tamaño y forma, características que aumentan la superficie de contacto y reducen su toxicidad en comparación con el material del que se partió para la síntesis (Chaloupka *et al.*, 2010); no obstante, su uso está en relación al tipo de metal del que se parte para su síntesis (Tabla 4) (Mittal *et al.*, 2013).

Tabla 4. Tipos de nanopartículas metálicas y aplicaciones. Tomado de Mittal *et al.*, 2013.

| Metal | Aplicación |
|---------------|--------------------------|
| Oro | Marcadores de DNA |
| | Biosensor |
| | Liberador de medicamento |
| | Tratamiento en cáncer |
| Selenio | Antimicrobiano |
| | Anticancerígeno |
| Platino | Antimicrobiano |
| | Anticancerígeno |
| Plata | Terapia para cáncer |
| | Antimicrobiano |
| | Antivírico |
| Oxido de zinc | Cosméticos |
| | Recubrimientos |
| Hierro | Terapia para cáncer |
| Paladio | Bio catálisis |
| Cobre | Antimicrobiano |

Una de las propiedades más valiosas de la nanopartículas de plata es el efecto bactericida y se han evaluado diferentes especies bacterianas con características de resistencia y no resistentes obteniendo resultados prometedores (Elechiguerra *et al.*, 2005, Geethalakshmi y Sarada, 2012, Inbaneson *et al.*, 2011, Lara *et al.*, 2011, Mukha *et al.*, 2013, Prabhu y Poulouse, 2012, Vijayakumar *et al.*, 2013).

2.2. Resistencia bacteriana

2.2.1. Resistencia bacteriana a los antibióticos y a desinfectantes

Los primeros reportes de resistencia bacteriana aparecen en 1970 (Russell, 2002); sin embargo, desde los años 50's se sabe sobre la propagación de plásmidos con genes de resistencia que acentuaron el problema de la resistencia junto con el uso excesivo de antibióticos y desinfectantes, principalmente en los tratamientos de animales de granjas (Martínez y Baquero, 2002, Russell, 2002). Por esto, la resistencia se ha definido como un mecanismo adaptativo para sobrevivir a las condiciones ambientales, y es un manifiesto de cambio genético y fenotípico, donde las comunidades bacterianas con bajos niveles de resistencia son importantes en la transmisión de resistencia (Martínez y Baquero, 2002, Choffnes *et al.*, 2010). Los mecanismos de resistencia se han identificado en bacterias, hongos, parásitos y virus (McDonnell y Russell, 1999); no obstante, los organismos más conocidos con resistencia son las bacterias, en Japón la primera bacteria multiresistente fue *Shigella* spp. (Figura 5) (Choffnes *et al.*, 2010).

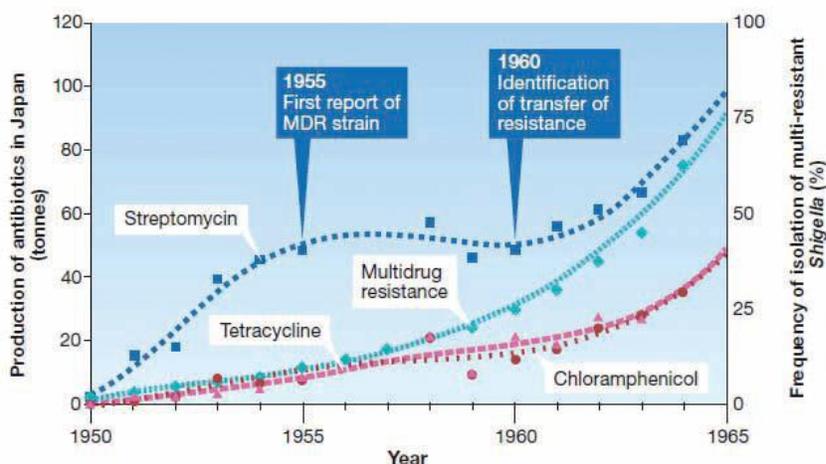


Figura 5. Relación entre la introducción de antibióticos y resistencia descrita en *Shigella* en Japón. MDR: Multidrug Resistente. Tomado de Choffnes *et al.*, 2010.

Los hospitales son los principales lugares donde se ha encontrado cepas multiresistentes (McDonnell y Russell, 1999). Tanto los antibióticos como los desinfectantes se emplean para el control del crecimiento bacteriano, la diferencia entre ellos es la especificidad, es decir, mientras los antibióticos son específicos, reconocen únicamente ciertas moléculas de la bacterias en la pared o membrana celular, o en el metabolismo de la bacteria para realizar su función, los biocidas son inespecíficos y de amplio espectro, dentro de estos compuestos se encuentran los desinfectantes y

los antisépticos, empleados en superficies inanimadas y vivas, respectivamente (McDonnell y Russell, 1999, Russell, 2002).

La resistencia bacteriana se ha dividido en dos grupos: la natural o innata que es controlada cromosómicamente, se ha estudiado más en bacterias Gram negativas que en Gram positivas, y la resistencia adquirida, que se da por la adquisición de genoma externo como plásmidos y trasposones o por mutaciones (McDonnell y Russell, 1999, Russell, 2002). La resistencia innata está influenciada por la estructura fisiológica de cada bacteria, y por el estado metabólico como el crecimiento y los nutrimentos; otra estrategia es la formación de consorcios llamados biofilm con producción de exopolisacáridos que reducen el paso de antibióticos y desinfectantes, además de un constante intercambio genético, el cual permite a las bacterias sobrevivir aún después de que el biofilm se desintegre (McDonnell y Russell, 1999).

En el caso de los mecanismos adquiridos, estos pueden ser específicos como en *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes, los mecanismos se basan principalmente en la síntesis de las enzimas que rompen el compuesto activo del antibiótico, unión a los ribosomas y en la modificación de los precursores de glucopéptidos, cuando se observa esta modificación se dice que es una resistencia de alto nivel (Choffnes *et al.*, 2010). Algunos de los principales mecanismos de resistencia de las bacterias se señalan en la figura 6.

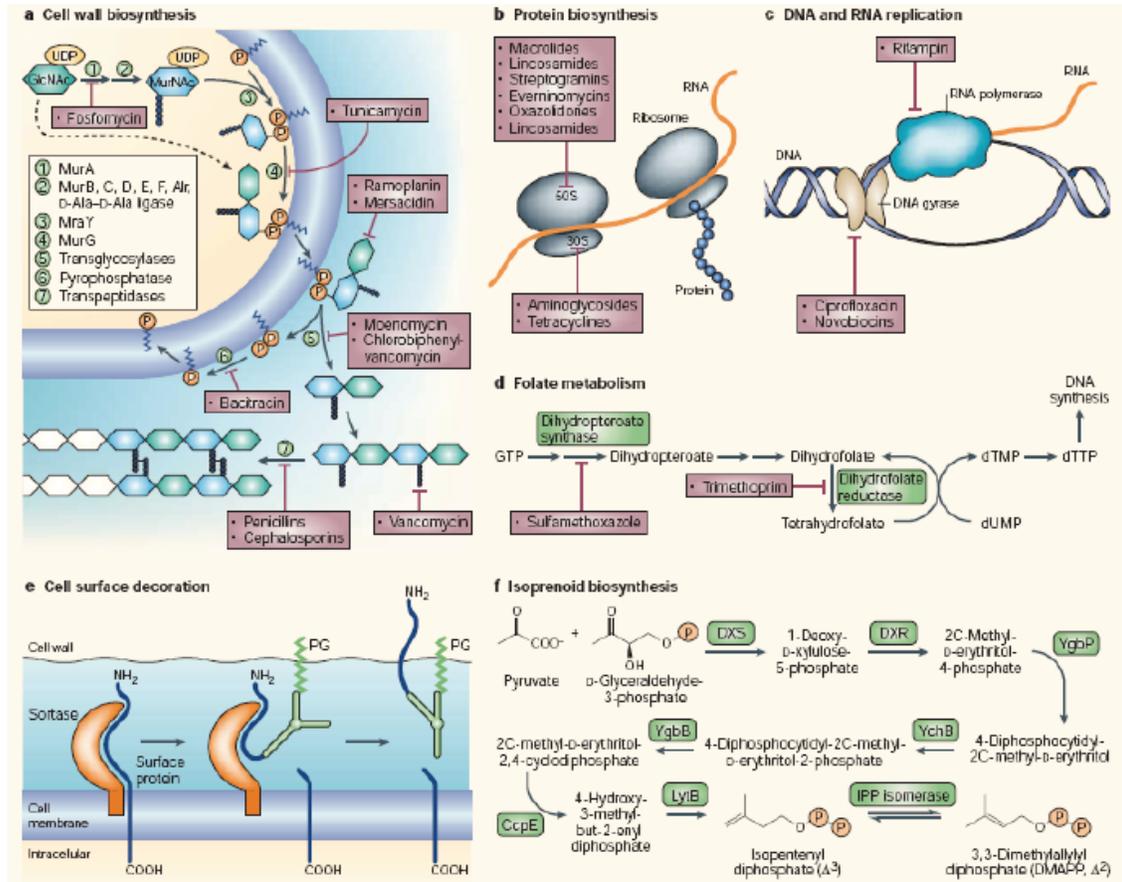


Figura 6. Principales mecanismos de resistencia a antibióticos. A) biosíntesis de la pared celular: la síntesis de mureína es catalizada por las enzimas Mura-F y murg (1-4). El peptidoglicano se transfiere a un vehículo lipídico-bactoprenol-fosfato (círculos de color naranja) que transporta moléculas precursoras a través de la membrana celular, lo que genera lípidos de tipo I y II. Los azúcares y fosfatos son agregados por transglicosilación y pirofosforilación (5-6) y se forma un enlace peptídico (7). Muchos antibióticos tienen como sitio blanco e intervienen en esta ruta de síntesis. B) biosíntesis de proteínas: otros antibióticos van directo a los ribosomas interactuando con la subunidad 30S o 50S. C) replicación de DNA y RNA (ácido desoxirribonucleico y ácido ribonucleico) ciertos antibióticos como la rifampicina se une a la RNA polimerasa y evita la unión de la DNA polimerasa, mientras que la ciprofloxacina y novobiocina se unen a DNA girasa. D) metabolismo de folato: hay antibióticos que afectan la síntesis del folato, requerido en la síntesis de timina, esencial en el DNA. E) decoración de la superficie celular: durante la síntesis de la pared celular de las bacterias Gram-positivas, las proteínas son modificadas. F) biosíntesis de isoprenoides: ciertos antibióticos intervienen en la ruta no clásica que solo está presente en las bacterias. Tomado de Choffnes *et al.*, 2010.

Una hipótesis que se ha establecido y que no ha sido comprobada es que se puede dar una resistencia cruzada entre antibióticos y desinfectantes, debido a la similitud en los sitios de acción y que se comparten los mecanismos de transporte (Tabla 5) (Condell *et al.*, 2012). Por ejemplo, en *Pseudomona aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii* y *Serratia mercescens* se observó resistencia a siete antibióticos, estas bacterias solo habían tenido contacto con los desinfectantes (Russell, 2002). En la actualidad esta hipótesis sigue siendo discutida, por la identificación de *E. coli* con resistencia a cloruro de benzalconio (QACs) y con resistencia a gentamicina y clorhexidina, las bacterias precedían de alimentos cárnicos (Zhang *et al.*, 2016a).

Tabla 5. Sitio blanco de desinfectantes y antibióticos. Tomado de Russell, 2002.

| Propiedad | Biocida | Antibiótico |
|--|---|---|
| | Acridinas | β -lactámicos |
| Inducción de filamento en bacterias gram negativas | Cloracetamida | (PBP 3) |
| | Isotiazolones | Fluoroquinolonas |
| | Feniletanol | Novobicina |
| Inhibición de la enoil reductasa en micobacterias | Triclosan | Isoniacida |
| Fácil transporte en bacterias gram negativas | Biocidas catiónicos: sales de clorexidina y compuestos amino cuaternarios | Antibióticos catiónicos: estreptomina, gentamicina y polixinas. |

Así como se ha observado resistencia en antibióticos, también se ha encontrado resistencia a los biocidas catiónicos, por ejemplo *P. aeruginosa* resiste altas concentraciones de compuestos amino cuaternario (QACs), y es capaz de crecer en soluciones de QACs, cloro de benzalconio o clorexidina al igual que *Burkholderia cepacia*; *P. mirabilis* resiste a la clorexidina, glutaraldehído, fenoxietanol y cloroxietanol, este efecto es observado en aislamientos de hospitales donde las concentraciones mínimas inhibitorias son mayores comparadas con bacterias aisladas de otros orígenes, igualmente los estafilococos tienen resistencia a los QACs, cloroxidina, acridinas y diaminas (Russell, 2002). Otras especies han desarrollado resistencia al triclosan, isotiazolones e iodoformas (Russell, 2002). Así mismo, se ha reportado reducción de sensibilidad a compuestos de mercurio, de plata y a otros cationes y aniones favorecida por la presencia de plásmidos (McDonnell y Russell, 1999).

La resistencia a los QACs es alarmante debido a que son los principales desinfectantes usados en el industria alimentaria por su baja toxicidad, alta eficacia, amplio espectro de acción, no irrita y no son corrosivos (Zhang *et al.*, 2016a).

2.2.2. Mecanismos de acción de biocidas

Desde antes de Cristo, se ha empleado el secado, colocar sal o especias a los alimentos para conservar los alimentos, principalmente carne; así como para el alivio de heridas y el almacenamiento de agua en las vasijas (tablas 6 y 7) (Russell, 2002).

Tabla 6. Biocidas y época en la que se descubrieron y se les dio una aplicación. Tomado de Russell, 2002.

| Biocida | Descubrimiento o descripción por vez primera | Aplicación |
|----------------------------------|--|--------------------|
| Alcoholes | BC | AD |
| Cloro | 1774 | 1847 |
| Hipoclorito de sodio | 1789 | 1827 |
| CRAs | 1915 | 1916 |
| Dióxido de cloro | 1925 | 1946 |
| Iodo | 1812 | 1816 |
| Iodoforos | 1949 | 1956 |
| Formaldehido | 1867 | 1894 |
| Fenoles | | |
| Fenol | 1834 | 1867 |
| Cresol | 1842 | 1890 |
| Clorocresol | 1906 | 1908 |
| Bisfenol | 1906 | 1927 |
| Triclosan | 1906 | Principios de 1970 |
| QACs | 1856/1916 | 1933 |
| Clorexidina | 1946 | 1954 |
| Amfotericos | 1952 | 1954 |
| Tabla 6. Continuación | | |
| Ácido paracético | | 1955 |
| Compuestos de mercurio | Algunos BC | |
| Fenilmercuriales (Preservativos) | | 1928-36 |
| Glutaraldehído | 1904 | 1960 |
| Orto-ftalaldehído | | En 1994 |
| Acridinas | | 1913 |

CRAs: Agentes que Liberan Cloro

QACs: Compuestos amino Cuaternarios

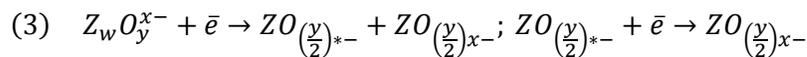
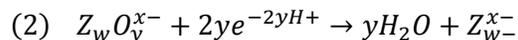
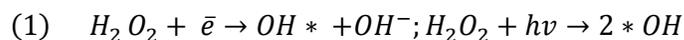
AD: Diferentes Días

BC: Antes de Cristo

Tabla 7. Introducción de antibióticos a la práctica clínica. Tomado de Russell, 2002.

| Año | Antibiótico | Año | Antibiótico |
|-----------|--|-------|-----------------------------------|
| 1930-1940 | Sulfamidas | 1940 | Bencilpenicilina, estreptomicinas |
| 1950 | Fenoximetilpenicilina | 1960 | Antiestafilococcicos |
| | Eritromicina, tetraciclina, isoniazida, cloranfenicol, bancomicina | | Penicilinas de amplio espectro |
| | | | Cefalosporina |
| | | | Ácido nalidixico |
| | | | Gentamicina |
| 1970 | Clindamicina | 1980 | Fluoroquinolonas |
| | Trimetoprim-sulfametoxazol | | β- lactamasas combinadas |
| | Celalosporina 2ª generación | | cefalosporinas 3ª generación |
| | Otros aminoglicósidos | | |
| 1990-2000 | β-lactamasas | 2000- | Evernonimiconas |
| | macrolidos | | Glicilcilinas |
| | fluoroquinolonas | | Cetolidos |
| | cefalosporina 4ª generación | | Quinolonas |
| | derivados de pristamicina | | |
| | oxazolidinonas | | |

Aunque los desinfectantes son ampliamente usados, recientemente se ha visto que el mecanismo por el cual logran el efecto bactericida es por la formación de radicales libres con aceptores de hidrógeno como el peróxido de hidrógeno, o el per-/peroxo- que son oxidantes, los aceptores de hidrógeno también forman hidroxilos, seguido de la formación de agua y aniones, culminando en la formación de otros radicales y especies oxi y la lisis de la bacteria (reacción 1-3) (Chamakura *et al.*, 2011).



Donde Z puede ser un halógeno o un heteroátomo, como sulfuro y azufre. Este mecanismo se ha observado principalmente en los desinfectantes que tienen efecto en la membrana citoplasmática, como los compuestos amino cuaternarios (QACs).

El mecanismo general de los QACs involucra un desordenamiento en los lípidos de la membrana de forma consecutiva, pero la concentración del desinfectante es la que marca los daños en la células, es decir, concentraciones bajas se unen fuertemente a sitios aniónicos de la membrana (unión del N^+ con la cabeza hidrofílica de los fosfolípidos), la asociación de los fosfolípidos con los QACs forma arreglos hexagonales estables provocando pérdida de osmoregularidad y salida de K^+ y protones. Las concentraciones intermedias se relacionan con daños al metabolismo como la respiración, transporte de solutos y biosíntesis de la pared celular, mientras que las concentraciones elevadas (frecuentemente usadas para inactivar en tiempo corto la vida bacteriana) solubilizan los componentes de la membrana liberando completamente el contenido celular (Figura 7). Las concentraciones bajas, intermedias o elevadas están en función de la concentración mínima inhibitoria (Chapman, 2003, Gilbert y Moore, 2005).

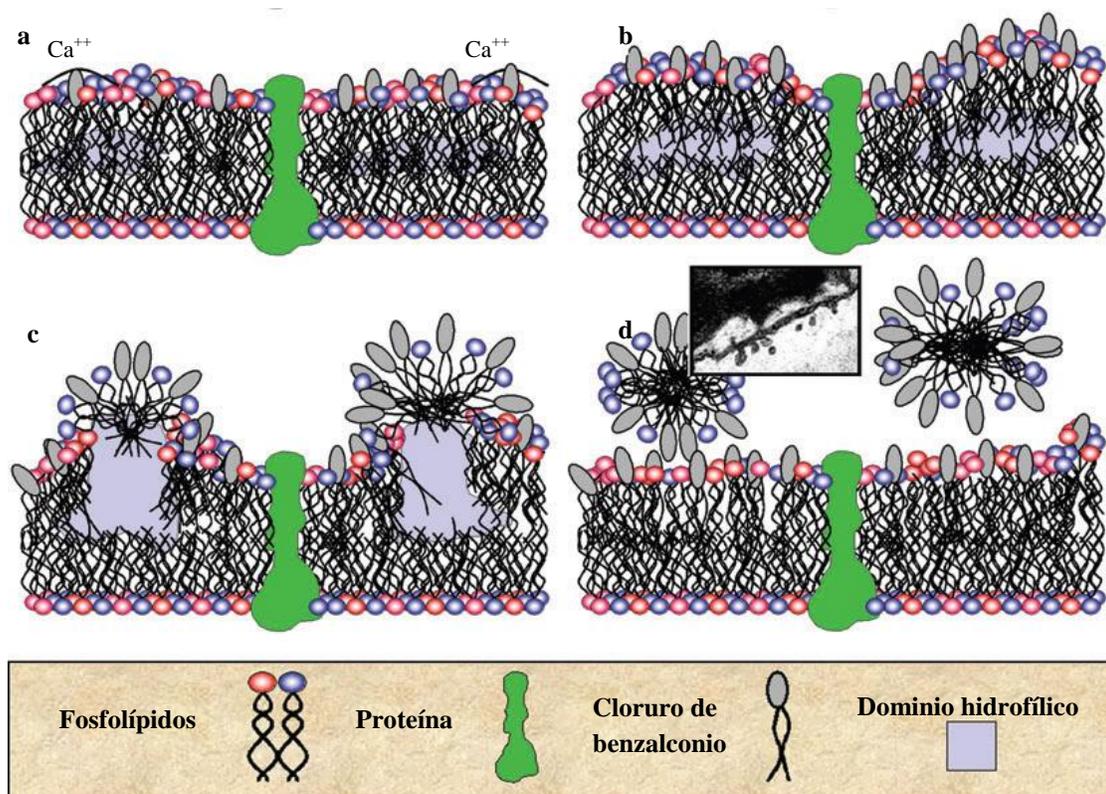


Figura 7. Caricatura del mecanismo de acción de los QAC, a-d muestra el progresivo daño en la membrana celular, c muestra la formación de las vesículas y la imagen de insertada en f muestra las vesículas. Tomado de Gilber y Moore, 2005.

Si bien son varios los desinfectantes empleados en la vida diaria, el mecanismo de acción de ellos es vago. En la tabla 8 se muestran algunos de los desinfectantes más empleados y su sitio de acción.

Tabla 8. Mecanismos de acción de biocidas comunes. Tomado de McDonnell and Russell, 1999.

| Sitio de Acción | Compuesto | Uso | Mecanismo de Acción |
|---------------------------------|--|---|--|
| Pared celular, | Glutaraldehído | Desinfectante | Cross-linking a proteínas |
| Membrana externa | EDTA ¹ , otros permeabilizantes | Desinfectante | En Bacterias Gram negativas elimina el Mg ²⁺ y liberación de lipopolisacáridos (LPS) |
| Membrana citoplasmática | QACs ² | Desinfectantes, Antisépticos y Preservación | Daña los fosfolípidos de la membrana causando un daño generalizado |
| | Clorhexidina | Antiséptico | Las bajas concentraciones afectan la integridad de la membrana, las altas concentraciones provocan una congelación del citoplasma |
| | Diaminas | Antiséptico y Preservación | Inducción de salida de aminoácidos |
| | PHMB ³ , alexinas | Desinfectante y Preservación | Separación de los lípidos y formación de dominios lipídicos |
| | Fenoles | Desinfectante | Desacoplamiento |
| Cross-linking de macromoléculas | Formaldehído | Esterilización y preservación | Cross-linking a proteínas, ADN y ARN |
| | Glutaraldehído | Desinfectante | Unión de proteínas de la Pared celular y Membrana externa, y en otros sitios celulares |
| Intercalación al ADN | Acridinas | Desinfectante | Intercalación entre dos pares de bases de ADN |
| Interacción con grupos Tiol | Compuestos de plata | Preservación y Antiséptico | Unión a los grupos tiol de las enzimas de la membrana externa |
| Efectos en ADN | Halógenos | Desinfectantes y Antisépticos | Inhibición de la síntesis de ADN |
| | Peróxido de Hidrógeno, Ag ⁺ | Desinfectante | Rotura de las cadenas de ADN |
| Agentes oxidantes | Halógenos | Desinfectantes y Antisépticos | Oxidación de los grupos tiol a disulfuros, sulfóxidos o disulfóxidos |
| | Peroxígenos | Desinfectantes y Esterilización | H ₂ O ₂ : forma radicales libres hidroxilo (OH) para oxidar los grupos tioles de enzimas y proteínas; PAA: interfiere con los grupos tiol de proteínas y enzimas |

1: Ácido etilendiaminotetraacético
 2: Compuestos Amino Cuaternarios
 3: Biguadinas de Polihexametileno
 4: Iones de Plata

2.3. Nanopartículas de plata como desinfectantes

Como ya se mencionó, la resistencia bacteriana es uno de los grandes problemas de la actualidad para la salud (Choffnes *et al.*, 2010) y muchos de los antibióticos y biocidas actuales tienen efecto residual mínimo, es decir, el tiempo de acción del compuesto es corto (McDonnell y Russell, 1999, Russell, 2002).

La forma, el tamaño y las propiedades bactericidas de las nanopartículas de plata las han colocado como un excelente agente bactericida, esta propiedad ha sido evaluada en diferentes cepas bacterianas de referencia y aislamientos multirresistentes obtenidos de hospitales y que también se encuentran en alimentos, como *Escherichia coli*, *Vibrio cholera*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhus*, *S. typhi*, *S. typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *S. faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Proteus subtilis*, *P. morgani*, *P. vulgaris*, *Enterococcus faecalis*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus subtilis* y *Klebsiella pneumoniae* (Geethalakshmi y Sarada, 2012, Inbaneson *et al.*, 2011, Irwin *et al.*, 2010, Lara *et al.*, 2010a, Morones *et al.*, 2005, Mukha *et al.*, 2013, Paredes *et al.*, 2014, Vijayakumar *et al.*, 2013) y *Acinetobacter baumannii* (Niakan *et al.*, 2013). A pesar de que es evidente la acción bactericida, el efecto está ligado a las propiedades fisicoquímicas de la nanopartícula, además de la sensibilidad del organismo dada por su conformación estructural y de su estado metabólico (Lara *et al.*, 2011).

Uno de los inconvenientes que se han encontrado para el uso de las nanopartículas es la generación de resistencia después de una exposición por tiempo prolongado, debido a la presencia de reportes de resistencia bacteriana a los metales pesados como el mercurio y la plata (McDonnell y Russell, 1999); sin embargo, dado que las características de las nanopartículas son diferentes con respecto al material de origen, los mecanismos de resistencia observados en los metales pesados no se han presentado en las nanopartículas (Hornyak *et al.*, 2009, Initiative, 2002, Lara *et al.*, 2011, Morones *et al.*, 2005, Sondi y Salopek-Sondi, 2004). Un estudio realizado en bacterias de sedimento de estuario con multirresistencia, señala que las bacterias expuestas por un tiempo prolongado a las nanopartículas no generan resistencia, y no se observó un efecto cruzado entre antibióticos y nanopartículas (Niakan *et al.*, 2013), como se ha observado en los antibióticos y algunos biocidas de uso común (Russell, 2002).

Así como para los antibióticos y desinfectantes se ha explicado el mecanismo de acción, para las nanopartículas de plata han surgido varias hipótesis para entender como inhiben el crecimiento

bacteriano, las cuales no se han comprobado en su totalidad. Los mecanismos de acción van a depender de las características de los microorganismos, especialmente de la membrana celular (Mukha *et al.*, 2013). De manera general se han identificado cuatro mecanismos íntimamente relacionados: a) inactivación por la liberación de iones de plata cuando las NPs se encuentra en un medio acuoso, los cuales interactúan con la membrana celular uniéndose a residuos de cisteína, b) la interacción de los Ag^+ con el ácido desoxiribonucleico (DNA) por enlaces no covalentes, c) la inhibición del transporte de electrones y aumento de especies reactivas de oxígeno (EROs) como OH^\cdot , y d) liberación de iones importantes para el metabolismo de la célula, como el potasio (Figura 8) (Chamakura *et al.*, 2011), estas rutas de inactivación celular se basan principalmente en el aumento de permeabilidad de la membrana, inhibición de replicación y aumento de estrés oxidativo.

La perturbación de la membrana plasmática se ha explicado por una interacción electrostática entre la membrana externa en *E. coli* cargada negativamente y la nanopartícula con carga positiva, de manera que aumenta la permeabilidad de la bacteria (Sondi y Salopek-Sondi, 2004), también se ha observado una atracción entre las misma cargas cuando las NPs tienen carga negativa, pero es más débil la interacción (Chamakura *et al.*, 2011). Además de las características morfológicas, las propiedades físicas también influyen en el efecto bactericida, la resonancia superficial del plasmón que son las ondas electromagnéticas de la nanopartícula, ya que entre más grande sean las ondas menor será el tamaño de la partícula y el efecto bactericida se potencializa (Chamakura *et al.*, 2011).

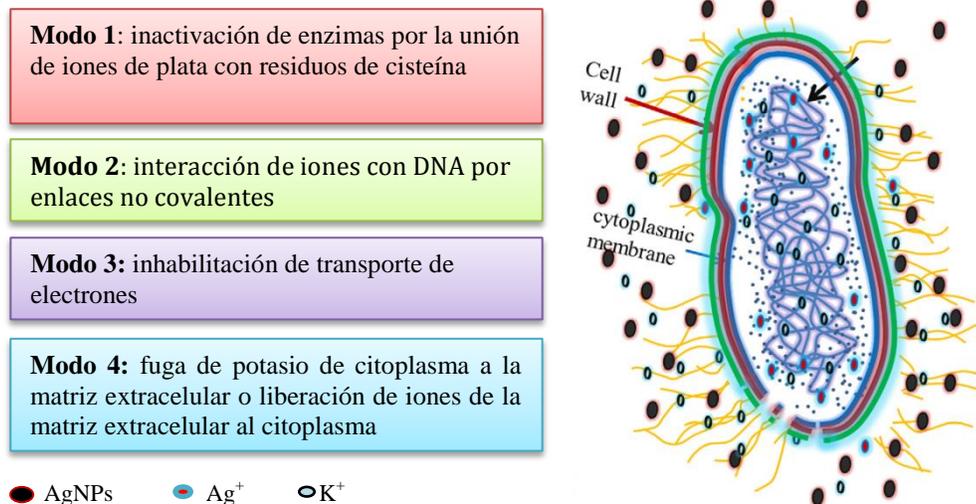


Figura 8. Mecanismo de acción de las nanopartículas de plata y zinc. Tomado de Chamakura *et al.*, 2011.

Como ya se ha mencionado, el efecto y por lo tanto el mecanismo también va a variar conforme al microorganismo, específicamente en un biofilm; en este caso se han empleado principalmente nanopartículas magnéticas recubiertas de plata, oro o ambos las cuales son capaces de penetrar al consorcio, y por la adición de calor con un láser o por reacción de las NPs con los compuestos bacterianos, comienza la desestabilización del biofilm y las nanopartículas pueden seguir con el mecanismo establecido para bacterias que no forman biofilm (Figura 9) (Hajipour *et al.*, 2012).

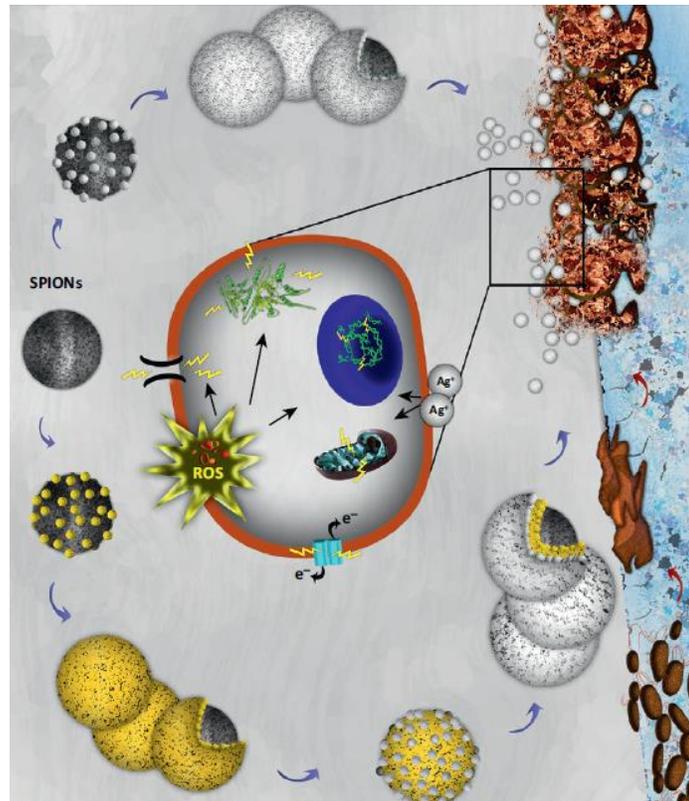


Figura 9. Mecanismo de nanopartículas SPIONs (nanopartículas monodispersas de óxido de hierro súper magnéticas) recubiertas con nanopartículas de oro y plata sobre los biofilm. Tomado de Hajipour *et al.*, 2012.

A pesar de que los resultados de diferentes estudios proponen a las nanopartículas como excelentes desinfectantes, las comparaciones que se hacen con frecuencia es contra los antibióticos y de forma *in vitro*. No obstante, estudios donde se compara a las nanopartículas y los desinfectantes comunes como clorhexidina (Besinis *et al.*, 2014), el fenol y cloro se observa que los desinfectantes tienen un efecto bactericida, sin embargo, los desinfectantes actúan rápidamente (0.2 h) y las nanopartículas tienen un tiempo de acción hasta por 6 h (Chamakura *et al.*, 2011), un estudio *in vivo* donde se aplica

y evalúa el efecto de la nanopartícula en superficies que están en contacto frecuente con bacterias multirresistentes, confirma el efecto biocida de la partícula hasta por 48 h (Ahmadi *et al.*, 2013). Otro importante estudio, es el uso de la nanopartícula en combinación con compuestos amino cuaternarios, donde se observó que estos compuestos favorecen la agregación de las NPs (Zheng *et al.*, 2014) aunque los autores señalan un uso potencial de esta combinación, otros mencionan que la agregación de la partícula disminuye considerablemente su acción bactericida (Lara *et al.*, 2011, Lara *et al.*, 2010b). Sin embargo estos trabajos consideran como modelo a bacterias Gram negativas como *E. coli* de ahí la importancia de seguir con los estudios para evaluar el efecto en una bacteria con características diferentes y proponer un nuevo bactericida.

III. JUSTIFICACIÓN

La contaminación de los alimentos principalmente por bacterias es un problema que afecta a la salud de los consumidores y genera pérdidas económicas de los productores, envasadores y distribuidores de estos. Las industrias como las envasadoras de carne, emplean desinfectantes elaborados a base de cloro, aldehídos, hidróxido de sodio, ácidos orgánicos, compuestos amino cuaternarios y anfotéricos, peróxidos de oxígeno y el ácido per-acético, que son los aprobados por la Organización de Agricultura y Alimentos de las Naciones Unidas (FAO, por sus siglas en inglés) (FAO, 2015); no obstante, la aplicación de estos debe ser cautelosa ya que son tóxicos y algunos también son corrosivos (FAO, 2015, McDonnell and Russell, 1999), además de que su efecto residual es de minutos (Chamakura *et al.*, 2011), aunado a esto, las bacterias ya presentan mecanismos de resistencia a desinfectantes (McDonnell and Russell, 1999, Russell, 2002). Con base a la literatura las nanopartículas de plata pueden ser usadas para el control de bacterias, por sus propiedades biocidas y su prolongado tiempo de acción. La efectividad de estos materiales como agentes bactericidas se ha evaluado con respecto a antibióticos; sin embargo, un estudio de comparación con hipoclorito de sodio y con fenol (Chamakura *et al.*, 2011) y clorhexidina (Besinis *et al.*, 2014) y de nanopartículas de plata impregnadas en superficies que están en constante contacto con estas bacterias (Ahmadi *et al.*, 2013) han demostrando que el tiempo de acción de la nanopartícula es mayor en comparación con estos compuestos, ya que las nanopartículas de plata perduran hasta por 48 h en las superficies (Ahmadi *et al.*, 2013) mientras que los desinfectantes tienen un tiempo de acción de hasta 0.2 h (Chamakura *et al.*, 2011). Estos datos reflejan la necesidad de conseguir más información sobre el conocimiento que soporte que las nanopartículas de plata pueden ser usadas como desinfectante con una eficacia mayor que los desinfectantes actuales y comunes. Así mismo, es necesario conocer el efecto y la interacción de las partículas con las bacterias, ya que de este modo se le da un uso inteligente y se reduce la probabilidad del desarrollo de mecanismos de resistencia a corto plazo.

IV. HIPÓTESIS

El efecto bactericida de las nanopartículas de plata es más eficaz que el efecto bactericida de los desinfectantes sobre bacterias resistentes a antibióticos.

V. OBJETIVO

Evaluar el efecto de las nanopartículas de plata y los desinfectantes comúnmente usados sobre bacterias resistentes a antibióticos.

Objetivos específicos

- Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por espectroscopia UV-visible, microscopia electrónica de transmisión y de barrido (TEM y SEM) y espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FITR).
- Evaluar la respuesta de bacterias multirresistentes a nanopartículas de plata como agente bactericida.
- Evaluar la respuesta de bacterias multirresistentes a desinfectantes amino cuaternarios y a iodo, aprobados por la FAO.

VI. METODOLOGÍA

6.1. Síntesis y caracterización de nanoestructuras de plata

6.1.1. Síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs)

Las nanopartículas de plata se obtuvieron por dos protocolos ya establecidos con modificaciones (Amaladhas *et al.*, 2012, Vilchis-Nestor *et al.*, 2008). Como agente reductor se usaron dos extractos de té verde de diferente marca comercial en México (Infusiónate y Lagg's). Para obtener el extracto de té verde (E-TV) se usaron dos temperaturas del agua desionizada la primera ~ 98 °C (cuando hierve) y la segunda a los 60 °C. A cada frasco con agua desionizada de diferente temperatura se le adicionó un gramo de té verde, se dejó reposar durante 10 min y se filtró con un filtro Whatman No. 1; el té filtrado se guardó en un frasco ámbar. Con ambos extractos se realizó lo siguiente; a un mL de té verde se le adicionaron por goteo 19 mL de una solución de nitrato de plata (AgNO_3) a una concentración de 1 mM para establecer una relación v:v 1:20 (agente reductor: precursor de iones), se dejó en agitación durante los primeros 5 min, posteriormente se dejó en reposo la síntesis. La temperatura del extracto durante la mezcla de los compuestos fue alrededor de los ~ 30 °C. El extracto de té verde fue fresco para cada síntesis.

Los compuestos fenólicos de los extractos de plantas son algunas de las moléculas que participan en la reducción y formación de las AgNPs, por lo que se determinó la concentración de compuestos fenólicos totales. Del extracto se tomó un mL a los que se le añadió 5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu a 0.2 N (2N, Sigma Aldrich) se dejó reposar de 3-8 min, posteriormente se adicionaron 4 mL de Na_2CO_3 al 7.5 % y se dejó incubar a temperatura ambiente en oscuridad durante 60 min, finalmente la solución se leyó en un espectrofotómetro UV-Visible a 765 nm (Cary 5000 UV-Vis-NIR, Aligent Technologies), es importante mencionar que cuando la solución tenía un color muy turbio, se realizó una dilución 1:4 con agua desionizada. La curva patrón se realizó con una solución de ácido gálico de 0-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y los resultados se expresaron como g equivalentes a ácido gálico (EAG)/100 g de materia seca (Anesini *et al.*, 2008). El ácido gálico se usó como referencia porque además de ser parte de los compuestos fenólicos del té verde, tiene una estructura química simple y básica dentro de los compuestos fenólicos, por otra parte con este ácido se estandarizó y disminuye el margen de error en la determinación de compuestos fenólicos totales por el método de Folin-Ciocalteu (Prior *et al.*, 2005).

6.1.2. Síntesis de nanoalambres de plata (AgNWs) a partir de AgNPs y PVP como agente direccionador

El extracto de té verde que se usó para la síntesis de AgNPs, se empleó en la síntesis de los AgNWs. En este caso se usó el té verde Lagg's (Royal Tea, México) y un té verde Coreano (Boseong Green Tea, Corea del Sur). Un mL de E-TV se colocó en un vial de 20 mL en una parrilla de calentamiento con agitación y se mantuvo a una temperatura de ~ 45 °C inmediatamente se adicionaron por goteo 19 mL de una solución de AgNO₃ con una concentración de 1 mM al mismo tiempo que se adicionaba 0.003 g de polivinilpirrolidona (PVP de 40000 PM) la mezcla se mantuvo en agitación hasta la disolución del PVP y después se dejó en reposo en oscuridad. Para evaluar el efecto de la cantidad de PVP, se repitió el procedimiento pero con 0.006 g y 0.012 g de PVP. Este procedimiento también se realizó manteniendo el extracto a ~ 60 °C, para evaluar el efecto de la temperatura.

Otro factor que se contempló fue la forma en la que se adicionaba el PVP. Para lo cual 0.5 mL de extracto se adicionaron en un vial de 20 mL y se colocó en una parrilla de calentamiento con agitación, la temperatura de E-TV se mantuvo a ~ 45 °C e inmediatamente se adicionaron por goteo 5 mL de una solución de AgNO₃ a 2 mM y a la par se agregó 0.003 g de PVP previamente disuelto en 5 mL de agua desionizada, la mezcla se mantuvo en agitación por 5 min, después se dejó en reposo en oscuridad. Igualmente se realizó para 0.006 g y 0.012 g PVP.

6.1.3. Caracterización de nanoestructuras

Los productos de las síntesis se caracterizaron por espectroscopia de UV-Visible, espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR), microscopia electrónica de transmisión (TEM) y de barrido (SEM).

6.1.3.1. Espectroscopia de UV-Visible (Cary 5000 UV-Vis-NIR, Aligent Technologies)

Durante el proceso de síntesis se tomaron alícuotas de un mL a tiempo 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 240 y 1440 min y se leyeron en un rango de 250 hasta 800 nm abarcando el espectro ultravioleta y visible, con una resolución de un nm, para determinar la formación de la AgNPs. Para los AgNWs el rango de lectura fue el mismo.

6.1.3.2. *Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés) (IRTracer-100, Shimadzu)*

Se usó para la determinación de grupos funcionales presentes en el té verde y en las AgNPs y AgNWs. El té verde antes y después de la extracción fue pulverizado con un mortero de ágata hasta obtener un polvo fino. Las AgNPs y AgNWs después de varios lavados con agua desionizada, se dejaron secar. El polvo de los té y las AgNPs y AgNWs se leyeron en un rango de 4000 hasta 400 cm^{-1} con el accesorio ATR (Attenuated Total Reflection, por sus siglas en inglés).

6.1.3.3. *Microscopia electrónica de barrido (SEM) (FIB DUAL BEAM FEI HELIOS 600 NANOLAB)*

Después de la síntesis se tomó un mL de la solución, se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min, se decantó, la pastilla formada en el fondo se resuspendió en un mL de agua desionizada por sonicación durante 20 min, este proceso se llevó a cabo por al menos 10 veces para retirar el exceso de materia orgánica, cabe mencionar que los dos últimos lavados se realizaron con 2-propanol. Una vez terminado el proceso de lavado, el pellet se resuspendió nuevamente en 2-propanol y se sónico durante 20 min, se tomó una gota como una pipeta Pasteur y se colocó sobre un pin de aluminio previamente lavado, la gota se dejó secar hasta su análisis.

6.1.3.4. *Microscopia electrónica de transmisión (TEM) (HRTEM FEI TECNAI F30 STWIN G2)*

Se realizó el mismo procedimiento de lavado que se empleó con SEM, en el último lavado se hizo una dilución de la muestra, se homogenizó y con una pipeta Pasteur se tomó una gota y se depositó en una rejilla de cobre, la cual se dejó bajo una lámpara de luz blanca para favorecer la evaporación del alcohol, cuando la primera gota se evaporo completamente se adicionó una segunda gota manteniendo la rejilla bajo la lámpara cuando el líquido se disipó se guardó en un porta-rejillas, modificado de Chandran *et al.* (2006).

6.2. Evaluación del efecto bactericida de desinfectantes y de nanopartículas de plata

Las bacterias que se usaron para los experimentos fueron *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. como representantes de grupo Gram negativas y *Staphylococcus aureus* para las Gram positivas. Los aislamientos bacterianos usados se encuentran en ultracongelación para su preservación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en caldo Soya-Trypticaseina (TSB, BD Bioxon[®], Becton, Dickinson de México) con 30% de glicerol en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la Universidad

Autónoma del Estado de México (UAEMex). Para obtener una muestra de las bacterias, se tomó una asada con un asa bacteriológica sin dejar que se descongelara el vial y se colocó en un tubo de ensayo que contenía TSB, el tubo se incubó durante 24 h a 37 °C.

En total se obtuvieron 30 aislamientos y una cepa control ATCC 25922 de *E. coli*, 16 de los aislamientos provienen de canales de bovinos de rastros municipales (Reyes-Rodriguez *et al.*, 2013), 9 aislamientos se obtuvieron de plantas procesadoras de alimentos cárnicos Tipo Inspección Federal (TIF) (Fuentes-Arriaga *et al.*, 2013) y 5 de heces de corderos (Enriquez-Gómez, 2016). En el caso de *Salmonella* spp. se trabajó con 28 aislamientos y una cepa de referencia ATCC 14028, 9 aislamientos procedentes productos cárnicos (Aguilar-Montes de Oca *et al.*, 2015) y 19 aislamientos fueron de canales de bovino (Varela-Guerrero *et al.*, 2013). Los 11 aislamientos de *S. aureus* se obtuvieron de infecciones en humanos y una cepa de referencia ATCC 25923 donadas por el Dr. Valente Velázquez Ordoñez del CIESA.

6.2.1. Sensibilidad fenotípica a antibióticos

Previo a la evaluación de sensibilidad fenotípica, se corroboró la pureza de cada una de las bacterias por pruebas fenotípicas, de primera elección se inocularon medios selectivos agar MacConkey (MC, BD Bioxon[®], Becton, Dickinson de México), Verde-brillante (VB, Difco[™], Becton, Dickinson and Company) y Sal y Manitol (SyM, BD Bioxon[®], Becton, Dickinson de México) con *E. coli*, *Salmonella* spp. y *S. aureus* respectivamente, el crecimiento bacteriano se revisó 24 h después de incubarse a 37 °C. A las bacterias Gram negativas cuyas colonias no presentaron las características señaladas por del medio de cultivo y por Wistreich, se les realizaron pruebas bioquímicas TSI (agar Hierro Triple Azúcar), Citrato de Simons, SIM (medio de Sulfuro Indol), LIA (Agar de Lisina-Hierro) y Urea (BD Bioxon[®], Becton, Dickinson de México). La interpretación de los resultados se realizó con base a la literatura (Wistreich, 2007).

La sensibilidad microbiana a antibióticos se realizó por el método Kirby-Bauer (CLSI, 2012). Cada una de las bacterias se incubó en medio de cultivo TSB a 37 °C durante una noche. Del cultivo nocturno se tomó una alícuota y se re-suspendió en caldo Mueller Hinton (MH, BBL[™], Becton, Dickinson and Company) para ajustarse a una concentración de 1 a 2 x10⁸ UFC (unidades formadoras de colonias)/mL. La concentración se determinó por espectrofotometría a una absorbancia de 0.08 a 0.13 a una longitud de onda de 600 nm. Posteriormente un hisopo estéril se humedeció con esta solución y se esparció uniformemente sobre la superficie de una placa de agar

Mueller Hinton (AMH, BD Bioxon[®], Becton, Dickinson de México) figura 10. Se dejó que el inoculo se absorbiera en el agar y antes de 15 min, se colocaron los sensidiscos como se muestra en la figura 9A de los antibióticos seleccionados (Tabla 9). Las placas fueron incubadas a 37 °C y después de 18 - 20 h se midieron los diámetros de los halos de inhibición con una regla (Figura 9B). Con base en los diámetros se clasificaron como Sensibles (S), Intermedios (I) y Resistentes (R) como lo establece el CLSI (Tabla 9).

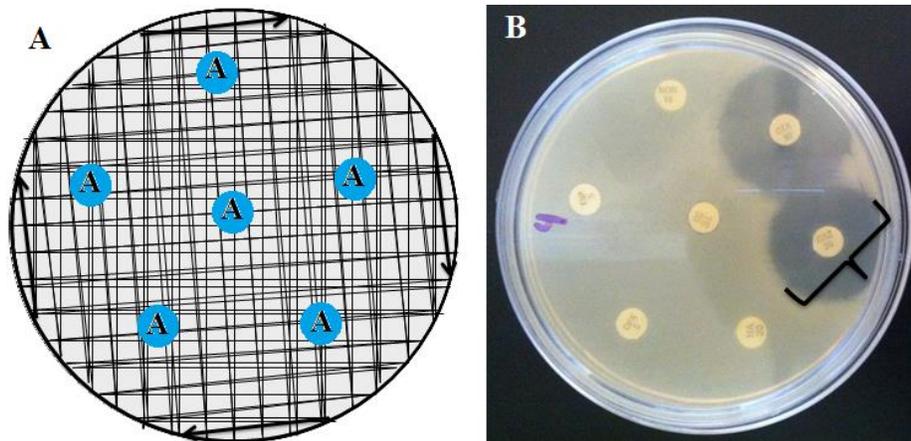


Figura 10. Esquema representativo de estriado para prueba de sensibilidad, (A) las flechas señalan las direcciones en las que estrió el inóculo y los círculos azules muestran la distribución de los antibióticos. (B) Se muestra el crecimiento bacteriano en una placa después de ser incubada 20 h señalando el halo de inhibición. Imágenes originales.

Tabla 9. Antibióticos usados e interpretación (S, I y R) con base en los diámetros de los halos de inhibición. Tomado y modificado de CLSI, 2012.

| Antibiótico | Abreviatura | Concentración (µg) | Interpretación con respecto al diámetro (mm) | | |
|---|-------------|--------------------|--|-------|-----|
| | | | S | I | R |
| Criterios para Familia Enterobacteriaceae (<i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella</i> spp.) | | | | | |
| Cefalotina | CF | 30 | ≥18 | 15-17 | ≤14 |
| Cloranfenicol | CL | 30 | ≥18 | 13-17 | ≤12 |
| Ceftriaxona | CRO | 30 | ≥23 | 20-22 | ≤19 |
| Ampicilina | AM | 10 | ≥17 | 14-16 | ≤13 |
| Amikacina | AK | 30 | ≥17 | 15-16 | ≤14 |
| Trimetroprin/ Sulfametoxazol | SXT | 25 | ≥16 | 11-15 | ≤10 |

| | | | | | |
|--|-----|-------------|-----|-------|-----|
| Cefotaxima | CTX | 30 | ≥26 | 23-25 | ≤22 |
| Gentamicina | GE | 10 | ≥15 | 13-14 | ≤12 |
| Netilmicina | NET | 30 | ≥15 | 13-14 | ≤12 |
| Pefloxacina | PEF | 5 | | | |
| Carbenicilina | CB | 100 | ≥23 | 20-22 | ≤19 |
| Nitrofurantóina | NF | 300 | ≥17 | 15-16 | ≤14 |
| Tetraciclina | TE | 30 | ≥15 | 12-14 | ≤11 |
| Ceftazidima | CAZ | 30 | ≥21 | 18-20 | ≤17 |
| Norfloxacina | NOR | 10 | ≥17 | 13-16 | ≤12 |
| Ácido | NA | | | | |
| Nalidíxico | NA | 30 | ≥19 | 14-18 | ≤13 |
| Ciprofloxacina | CIP | 5 | ≥21 | 16-20 | ≤15 |
| Ofloxacina | OFX | 5 | ≥16 | 13-15 | ≤12 |
| Criterios para <i>Staphylococcus</i> spp. | | | | | |
| Ciprofloxacina | CIP | 5 | ≥21 | 16-20 | ≤15 |
| Trimetroprin/ Sulfametoxazol | SXT | 25 | ≥16 | 11-15 | ≤10 |
| Penicilina G | P | 10 unidades | ≥29 | - | ≤28 |
| Vancomicina | VA | 30 | ≥15 | - | - |
| Tetraciclina | TE | 30 | ≥19 | 15-18 | ≤14 |
| Eritromicina | E | 15 | ≥23 | 14-22 | ≤13 |
| Oxacilina | OX | 1 | ≥13 | 11-12 | ≤10 |
| Nitrofuranos | MAC | 300 | ≥17 | 15-16 | ≤14 |
| Clindamicina | CC | 2 | ≥21 | 15-20 | ≤14 |
| Gentamicina | GE | 10 | ≥15 | 13-14 | ≤12 |
| Cefalotina | CF | 30 | ≥18 | 15-17 | ≤14 |

6.2.2. Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) de desinfectantes

La determinación de CMI se realizó por el método de microdilución en placa (CLSI, 2012). Se emplearon dos desinfectantes de marca comercial, uno a base de compuestos amonio cuaternarios (QAC-C, Solución de cloruro de benzal al 11%, Laboratorios Maver, México) y el segundo cuyo principio activo es el yodo (I₂PVP-C, Iodopavidona al 8%, Laboratorios Jaloma, México); así mismo se evaluó el cloruro de benzalconio (QAC-P, con elementos traza de SO₄²⁻, Al, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Zn, Na y Pb, Sigma-Aldrich, Suiza) por ser el compuesto activo de QAC-C, e iodopavidona (I₂PVP-P, Poly(vinylpyrrolidone) Iodine Complex, Sigma-Aldrich, EEUU) como compuestos puros. Para ambos compuestos amonio cuaternario se preparó una solución a una concentración de

4096 mg/L, mientras que para I₂PVP-C y para I₂PVP-P una concentración de 8050 y 8000 mg/L, respectivamente. Los desinfectantes se colocaron en placas de 96-pozos y se realizaron diluciones seriadas dobles iniciando con una concentración de 4096, 8050 y 8000 mg/L hasta 2, 3.91 y 3.93 mg/L para QAC-C y QAC-P, I₂PVP-C y I₂PVP-P, respectivamente. Las diluciones se realizaron con agua peptonada (AP, Difco™, Becton, Dickinson and Company) y cada pozo se mantuvo a un volumen de 100 µL.

Las bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas se llevaron a una concentración de 1-2x10⁸ UFC/mL, y se realizó una dilución para tener una concentración de ~5x10⁶ UFC/mL (CLSI, 2012). A partir de esta concentración bacteriana se tomaron 100 µL y se inocularon en cada pozo con desinfectante. El control positivo fue el medio de cultivo con bacteria, control negativo fue el medio de cultivo sin inóculo bacteriano y como tratamiento se consideró al inóculo bacteriano expuesto a desinfectantes. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

6.2.3. Efecto bactericida de desinfectantes a 5, 10, 15 y 30 min

Se consideraron las cuatro concentraciones intermedias para QAC-C y QAC-P, mientras que para I₂PVP-C y I₂PVP-P se seleccionaron las cuatro primeras concentraciones, en ambos casos se incluyó la CMI, para la evaluación de inhibición del crecimiento bacteriano después de 5, 10, 15 y 30 min de exposición al desinfectante. Los tratamientos se prepararon como se mencionó anteriormente, y en cada tiempo se tomaba una alícuota de 10 µL de cada concentración, los cuales eran depositados en una placa de agar para conteo en placa (PCA, Difco™, Becton, Dickinson and Company). Los conteos de las UFC de la placa se realizaron 24 h después de la incubación a 37 °C y se aplicó la siguiente ecuación para determinar las UFC/mL por tiempos.

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{No. de colonias * 1000 \mu L}{10 \mu L}$$

Dónde: No. de colonias corresponde al número de UFC contadas después de la incubación, 1000 µL es el volumen final y 10 µL es la cantidad inoculada en la superficie de la placa de conteo.

6.2.4. Concentración mínima inhibitoria de nanopartículas de plata

Después de 24 h de síntesis, las nanopartículas de plata fueron empleadas para la evaluación de su efecto bactericida. Las AgNPs fueron diluidas desde 30 mg/L hasta 1.9 mg/L en una placa de 96-pozos, cada pozo con un volumen final de 100 µL. El inóculo de la bacteria se preparó de la misma

forma que se realizó para la CMI de los desinfectantes y se adicionaron 100 μ L de bacteria en cada pozo con AgNPs. El control positivo fue la bacteria con medio de cultivo, como control negativo el medio de cultivo y AgNPs sin inocular, y bacterias expuestas a AgNPs con diferentes concentraciones fueron los tratamientos. Después de 24 h las placas se leyeron con lector de placas (Epoch, Biotek, Winooski, Vermont, USA) a una longitud de onda de 600 nm, la lectura a simple vista no se realizó por la coloración turbia de las nanopartículas. La inhibición del crecimiento bacteriano (ICB) fue determinada como sigue $ICB\% = 100 - \frac{DO_{600\text{ muestra}} * 100}{DO_{600\text{ control}}}$ (Bondarenko *et al.*, 2013). Este procedimiento también fue realizado para nanopartículas de plata comerciales (AgNP-C).

La concentración de plata de las AgNPs y de AgNP-C que se emplearon en los tratamientos se determinó por Espectroscopia de Emisión Óptica de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES) con un espectrofotómetro Varian Inc 730-ES.

VII. RESULTADOS

ChemNanoMat

Practical biosynthesis of silver nanowires using commercial *Camellia sinensis* extracts and their antibacterial properties --Manuscript Draft--

| | |
|--|--|
| Manuscript Number: | |
| Article Type: | Full Paper |
| Corresponding Author: | Vicente Rodríguez-González, Ph.D. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica San Luis Potosí, MEXICO |
| Corresponding Author E-Mail: | vicente.rdz@ipicyt.edu.mx;vicenrg@hotmail.com |
| Other Authors: | Marisa Flores-González, M Sc. Martin Talavera-Rojas, Ph. D. Edgardo Soriano-Vargas, Ph. D. |
| Order of Authors (with Contributor Roles): | Vicente Rodríguez-González, Ph.D. Marisa Flores-González, M Sc. Martin Talavera-Rojas, Ph. D. Edgardo Soriano-Vargas, Ph. D. |
| Keywords: | Green Tea; zigzag-like AgNWs assembly; <i>Camellia Sinensis</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> |
| Manuscript Classifications: | Biosynthesis; Electron microscopy; Green chemistry; Materials Science: General |
| Suggested Reviewers: | Chantal Guillard chantal.guillard@ircelyon.univ-lyon1.fr The Dr. Guillard is a recognized researcher on the field of the synthesis and photocatalytic inactivation of microorganisms Soo Lee swlee@sunmoon.ac.kr specialist in materials for Environment and Energy, technology for pollution Carolina Belver carolina.belver@uam.es Her specialization and current researches are related to design, processing and evaluation of novel nanocomposites for applications in industrial processes for sustainable chemistry. SiO ₂ , TiO ₂ and layered structures, She has also a book chapter about photocatalysis |
| Opposed Reviewers: | |
| Abstract: | <i>Camellia sinensis</i> is a well-known plant used for health purposes due to its high phenolic compound content and antioxidant properties. For the first time, an infusion of green tea has allowed the growth and stabilization of silver nanowires (AgNWs). Two commercial types of green tea leaves, were used for the practical synthesis of AgNWs at low temperature. The use of low concentrations of polyvinylpyrrolidone (PVP) as directing agent was successful for obtaining nanobar assemblies forming 2-fold to 10-fold nanowires. FESEM, HRTEM and HAADF microscopies helped identify ~50 nm diameters in the large ~1.3-micron nanowires. The antibacterial properties of the AgNWs were investigated against <i>Escherichia coli</i> , and <i>Staphylococcus aureus</i> . The AgNWs morphology may damage the cell wall, accelerating the cellular stress that produce fatal inactivation of the infectious microorganism. This work provides a green approach to the aqueous biosynthesis of AgNWs with promising antibacterial properties. |
| Author Comments: | Please find our paper titled "Practical biosynthesis of silver nanowires using commercial <i>Camellia sinensis</i> extracts and their antibacterial properties by Marisa Flores-González, Martín Talavera-Rojas, Edgardo Soriano-Vargas, and Vicente |

| | |
|--|---|
| | <p>Rodríguez-González</p> <p>In this paper we report, first the study of the biosynthesis of silver nanorods and the practical fold assembly to silver nanowires prepared by using a commercial <i>Camellia sinensis</i> extracts and low concentrations of PVP. Images obtained by HRTEM microscopy show well the wire morphologies of 50 nm by 1.3 microns, from 2-fold to 10-fold nanowires. The use of these AgNPs and AgNWs show operative deactivation of the model microorganism <i>Escherichia coli</i>, and <i>Staphylococcus aureus</i>. The AgNWs morphology may damage the cell wall, accelerating the cellular stress that produce fatal inactivation of the infectious microorganism. This work provides a green approach to the aqueous biosynthesis of AgNWs with promising antibacterial properties.</p> <p>The manuscript has not been previously published, is not currently submitted for review to any other journal, and will not be submitted elsewhere before one decision is made.</p> <p>Sincerely yours</p> <p>Dr. Vicente Rodríguez González (on behalf of all authors)</p> |
| Section/Category: | |
| Additional Information: | |
| Question | Response |
| Dedication | any |
| Submitted solely to this journal? | Yes |
| Has there been a previous version? | No |
| Do you or any of your co-authors have a conflict of interest to declare? | No. The authors declare no conflict of interest. |

Practical biosynthesis of silver nanowires using commercial *Camellia sinensis* extracts and their antibacterial properties

Marisa Flores-González,^[a,b] Martín Talavera-Rojas,^[b] Edgardo Soriano-Vargas,^[b] and Vicente Rodríguez-González,^{*[a]}

Abstract: *Camellia sinensis* is a well-known plant used for health purposes due to its high phenolic compound content and antioxidant properties. For the first time, an infusion of green tea has allowed the growth and stabilization of silver nanowires (AgNWs). Two commercial types of green tea leaves, were used for the practical synthesis of AgNWs at low temperature. The use of low concentrations of polyvinylpyrrolidone (PVP) as directing agent was successful for obtaining nanobar assemblies forming 2-fold to 10-fold nanowires. FESEM, HRTEM and HAADF microscopies helped identify ~50 nm diameters in the large ~1.3-micron nanowires. The antibacterial properties of the AgNWs were investigated against *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. The AgNWs morphology may damage the cell wall, accelerating the cellular stress that produce fatal inactivation of the infectious microorganism. This work provides a green approach to the aqueous biosynthesis of AgNWs with promising antibacterial properties.

Introduction

Silver nanostructures have been important in several scientific fields such as electronics, physics, chemistry, catalysis, photoelectrochemistry, biology and medicine^[1] due to their optical, mechanical, electromagnetic, catalytic and biochemical properties.^[1-3] In electronics, silver nanowires (AgNWs) are desirable materials that present mechanical flexibility, which means that cannot be deformed, foldable and compressed while preserving their optical and electronic characteristics.^[2] In addition to medical and environmental applications, the nanostructure presents low or none toxicity.^[4] Silver nanoparticles display potential antimicrobial effects against infectious microorganisms such as marine algae, pathogenic microorganisms such as fungi and bacteria; they also help semiconductors enhance their catalytic activity.^[2,5-7] Silver has interesting electrical or conductivity properties, so the one-dimensional nanostructures (nanorods or nanowires) are remarkable for study because of the enhanced latter

characteristics.^[8] The main characteristic of nanowires is the relationship between a large surface and the volume ratio, which means that silver nanostructures exhibit size and shape-dependent properties.

The synthesis of silver nanowires has been widely dominated by chemical or physical methods that give well-shaped AgNWs, however, detrimental harmfulness, and expensive reagents or extravagant equipment are required.^[2,9-10] Sun *et al.* obtained AgNWs of 50µm in length and 30-40 nm in diameter using ethylene glycol, polyvinylpyrrolidone (PVP) and PtCl₂ nanoparticles as seeds for growing the AgNWs at 160°C.^[8] Ma and Zhan^[11] reported the polyol synthesis of 1-D microstructures with 3-14 µm in length and 80-323 nm in diameter in the presence of halogens and PVP at ~160 °C. Jiang *et al.*^[12] grew Ag nanowire arrays on a Si wafer with a diameter of 100 nm and 80 µm in length at room temperature, using cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and (3-aminopropyl)triethoxysilane to mediate the growth of the arrays; the surfactants were easy to be removed by washing with ethanol. Other oriented growths of AgNWs need the use of inorganic templates such as polymers, aluminium oxide or/and specialized equipment like e-beam lithography, pulsed electrodeposition, etc.^[13-14] A diversity of synthesis methods has been reported for the synthesis of silver nanoparticles (AgNPs); noteworthy examples include: i) physical methods like laser ablation, gamma irradiation, electron irradiation, etc.;^[15-16] ii) chemical methods such as chemical reduction, photochemical methods, microwave processing;^[17-18] and iii) biological synthesis that is the approach to attain eco-friendly routes.^[19-20] Alternative routes trying to find an eco-friendly method have been focused on the use of organisms. Among these organisms, plants seem to be the best candidates.^[21] Plant extracts have been the most used for the synthesis of silver and gold nanostructures.^[19] This green approach avoids the use of toxic chemicals and is cost-effective because it does not require high temperatures and/or pressures for the AgNW synthesis. Different nanostructure morphologies have been reported using plant extracts like silver-15-nm-sphere-like and gold triangles of 50-350 nm using an *Aloe vera* extract as reducing agent.^[22] The *Cassia angustifolia* extract yielded spherical silver particles of 9-31 nm in diameter by its sennoside components, which served as both reducing and capping agents.^[23] Jeeva *et al.*^[24] obtained triangular AgNPs by boiled *Caesalpinia coriaria* and when the extract was centrifuged, triangular, hexagonal and spherical silver nanoparticles were found. Overall, the most reported natural biomolecule extract for the synthesis of metallic nanoparticles is *Camellia sinensis* from green tea due to its high content of reducing biomolecules such as epigallocatechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), epicatechin and epicatechin-3-gallate.^[25-26] For instance, Vilchis-Nestor *et al.* synthesized

[a] M. Flores-González, V. Rodríguez-González
División de Materiales Avanzados
Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica
Camino a la Presa San José 2055 Col. Lomas 4ª sección. C.P.
78216, San Luis Potosí, S. L. P., México
E-mail: vicente.rdz@ipicyt.edu.mx

[b] M. Flores-González, M. Talavera-Rojas, E. Soriano-Vargas
Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal
Universidad Autónoma del Estado de México
Kilometro 15.5 Carretera Panamericana Toluca-Atzacmulco, C.P.
50200, Toluca, Estado de México

For internal use, please do not delete. Submitted_Manuscript

1 gold and silver nanoparticles, after Loo *et al.*, Bhaumik *et al.* and
 2 Jia *et al.* reported mainly spherical silver nanoparticles with 4,
 3 33-86 and 100 nm in diameter, respectively.^[27-30] The specific
 4 role played by EGCG was reported by Hussain and Khan who
 5 established that the -OH groups present in the molecule are
 6 responsible for the AgNP stabilization. The AgNPs were coated
 7 with an organic skim of about 4 nm. The capping agents could
 8 possibly be originated from leaf extracts of tea, hydroxyflavones
 9 and catechins.^[31]

10 Few reports dealing with the growth of silver nanowires and
 11 nanorods by green synthesis have been reported. Lin *et al.*
 12 obtained nanowires by using a *Cassia fistula* extract with 50-60
 13 nm in diameter and ~10 μm in length in 48 h; so, the studies
 14 show the possible formation mechanisms of AgNWs from linear
 15 aggregation of spherical nanoparticles, where with longer
 16 exposure times, the nanowires are longer.^[32] Packia *et al.*
 17 reported silver nanorods synthesized through a *Coscinium*
 18 *fenestratum* extract at room temperature, AgNWs of 28-68 nm
 19 in diameter on average; the AgNWs presented good cytotoxic
 20 activity in Hep-2 cells.^[33] Insights regarding that *Camellia*
 21 *sinensis* can produce nanostructures different from quasi-
 22 spheres such as a few hexagonal shapes and nanorods were
 23 reported by Jia *et al.*^[30]

24 The present research work reports on well-characterized
 25 AgNWs by using two green tea commercial extracts (Mexican
 26 and Korean) that act as reducing and capping agents. A
 27 possible growth mechanism underlying the eco-friendly
 28 synthesis of the nanowires was proposed based on the
 29 information given by the images obtained by means of the
 30 HRTEM, HAADF, FESEM and UV-vis spectroscopy techniques;
 31 the evaluation of their growth inhibitory effects on gram-positive
 32 and gram-negative bacteria is reported.

33 Results and Discussion

34 Insights from the UV-vis spectra

35 Figure 1a-b shows the UV-vis spectra of the AgNWs synthesized
 36 with Mexican (M), and Korean (K) green tea infusions as a
 37 function of time, Figure 1a-b. The spectra show two bands, at
 38 ~351 nm and at ~462 nm, which indicate the reduction of the
 39 silver nitrate colloids to AgNPs nanostructures. The presence of
 40 the bands is directly related to the coexistence of AgNWs and
 41 quasi spherical AgNPs.^[2,35] The band at ~462 nm, a band
 42 broadened at higher wavelengths of ~600 nm, denotes the
 43 formation of one-dimensional silver nanostructures, which is
 44 attributed to the surface plasmon oscillation along the long-axis
 45 of the nanowires. The surface plasmon resonance (SPR)
 46 depends indirectly on the nanostructure morphology due to the
 47 resonance plane and symmetry.^[2,35] Notably, the intensity of this
 48 band is increased and broader as a function of the synthesis
 49 time for the AgNWs made using the Mexican tea; the intensity of
 50 the band at 351 nm seems to slowly increase after 30 days due
 51 to the broad band at 462 nm for the M tea. This band is also
 52 attributed to the SPR of spherical AgNPs. After one day, a new
 53 small band appeared at 500 nm due to the length of the grown
 54 nanowires, attributed to the transverse plasmon mode, the band
 55
 56
 57

increase the intensity to centered a 462 nm in 30 days.^[9] In the
 case of the synthesis with K tea, only the band at 450 nm
 increased and slightly became broader in contrast with the M tea
 synthesis; the band at 351 nm remained practically constant
 after one day. Lin *et al.* obtained the presence of a short AgNW
 band after 12 h at 360 nm while Packia *et al.* reported an intense
 band at 620 nm for nanorods; in both cases, the band at ~420
 nm corresponds to nanoparticles; the difference between the
 wavelength and band width is the length of the
 nanostructures.^[32-33] The presence of the plasmon bands at 350,
 380 and 410 nm corresponds to uniform nanowires of 35 nm
 in diameter and 50 micron in length synthesized by the polyol
 process directed by PVP.^[2,9] The M tea extract could reduce the
 colloidal dispersions of silver nitrate in aqueous PVP medium;
 under these conditions, an assortment of mainly long fold silver
 nanowires and nanoparticles were synthesized.

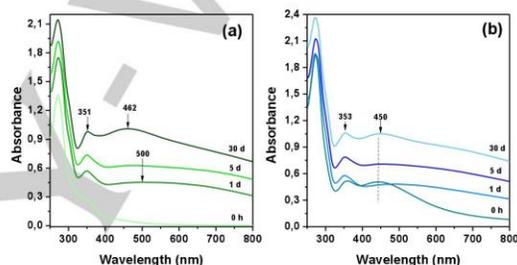


Figure 1. UV-vis spectra of the synthesis of AgNWs with (a) Mexican green tea and (b) Korean green tea.

The FESEM images, Figure 2a-f, show the AgNWs formed by
 both teas. An important characteristic is the presence of small
 nanoparticles on and at the end of the nanowires; triangular and
 hexagonal nanoplates are found alone in the AgNWs, notably in
 the synthesis with the M tea; additionally, some irregular AgNPs
 were found, which some were adsorbed on the AgNW surface,
 Figure 2a-c. If PVP was not used in the synthesis, the
 predominant morphology was that of quasi-spheres together
 with some irregular and triangular AgNPs, Figure 2d. Figure 2c
 shows a long AgNW of around 4 μm , which consists of three
 straight nanorods that are zigzag-like, Figure 2e a 2-fold AgNW
 of ~5 μm and in Figure 2f a large AgNW of ~15 μm as it was
 reported by D. Chen *et al.*^[10] who obtained similar
 nanostructures using ethylene glycol as reducing agent in the
 presence of PVP and nanoscale gold seeds.

The straight, 2-fold NWs and 3-fold NWs have 51 nm in
 diameter and 0.9 μm in length in the case of the AgNWs
 obtained with the Mexican infusion and 61 nm in diameter and 1,
 4 μm in length for the South-Korean infusion, Figure 3a-b, on
 average. The color of the solution varied from transparent at the
 start of the biosynthesis reaction to yellowish-brown, becoming
 gradually dark until getting a lighter brown tone due to the 0.003
 g of PVP incorporated.

For internal use, please do not delete. Submitted_Manuscript

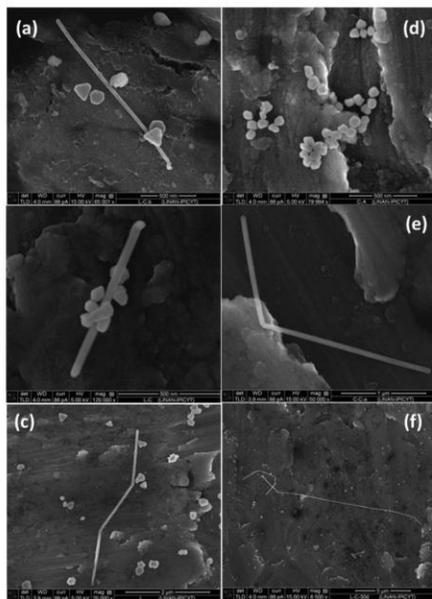


Figure 2. FESEM images for the AgNWs (a-c) using 0.003g of PVP with M tea, (c) silver nanowires without using PVP as nanowire formation directing agent with K tea (e) using 0.003 g of PVP with K tea and (f) a large AgNW using 0.003g of PVP with M tea

The morphology and dimensions of the as-synthesized AgNWs strongly depend on the incorporation of PVP and the nature of the green tea extract. For further understanding of the growth way, TEM characterization was carried out focusing on the synthesis with the Mexican infusion.

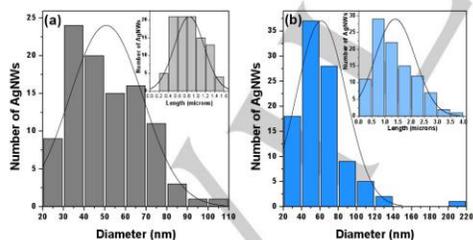


Figure 3. Size histogram of AgNWs (a) using the Mexican tea extract and (b) using the Korean tea extract

The images obtained by TEM are shown in Figure 4, which clearly confirm the nanowire morphology and the straight and 2-fold assembly of the AgNWs. The arrows show the zigzag-like

angles or joints that link two nanorods, Figure 4a. The AgNWs shown in the Figure are 2-fold nanowires with lengths about 4 and 2 μm and with connecting angles above 120° . In Figure 4b, the selected HRTEM image for the end of an AgNW shows the fringe lattices for the (111) of 0.239 nm and (200) planes of 0.196 nm. In previous studies reported in the literature, authors have suggested the growth of AgNWs as bicrystals twinned parallel at {111} planes that support our green synthesis by directed- PVP. It is clearly observed that the well-resolved fringe spacing agrees with the PDF card 00-004-0783 of face-centered-cubic silver phase.

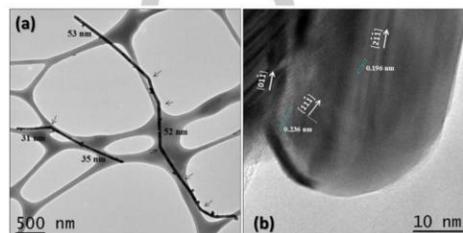


Figure 4. Selected TEM images of the straight morphology of the 2-fold assembly

The HRTEM analysis of the connecting junction of nanowires obtained with the Mexican green tea infusion was performed in order to understand the self-assembly mode, Fig 5a-f. These materials tend to grow as twinned particles at {111} planes due to the PVP protection of [211] and [011] growth directions. Figure 5a-b shows the end-to-end straight assembly of two silver nanorods of ~ 42 nm in diameter and Figure 5b shows a 2-fold nanowire, which has a zigzag angle of $\sim 120^\circ$. The connecting joint clearly shows that either the straight or zigzag array is probably achieved by linking two straight nanorods. In Figure 5c-d, it is inferred that silver nanoparticles of ~ 30 nm are attracted to each other by the Ostwald ripening process, which leads to grow as the well reported multiply twinned nanoparticles (MTPs) with a decahedral shape due to the selective adsorption of PVP on the {100} and {111} facets forming straight-like nanowires. However, when a hexagonal silver particle is involved in the growth process, a zigzag connecting junction is probably generated. Some AgNPs of ~ 30 nm can be observed adsorbed along the wires, which may be segregated during the reduction-nucleation-adsorption-growth-branching-growth process. The growth of a new straight nanorod at the end of a pre-grown silver nanorod seems difficult according to the image shown in Figure 5d, which features oval AgNPs adsorbed next to the end of a pre-grown nanorod, which may be due to the organic tea compounds adsorbed along the wire; if the formation of a new straight nanorod happens, this fact also opens the possibility of a three-way-growth-chain-like-silver- assembly network. Many TEM and HRTEM images were checked without finding this kind of AgNP network, only some irregular AgNPs of ~ 30 nm. It can be supposed that when AgNPs are involved during the formation of a connecting junction, a zigzag connection is favored. Selected HAADF images, Figure 5e-f, show that the nanorods folded as nanowires are growing from smaller AgNPs, where some AgNPs are also clearly appreciated on the surface of the nanowires.

For internal use, please do not delete. Submitted_Manuscript

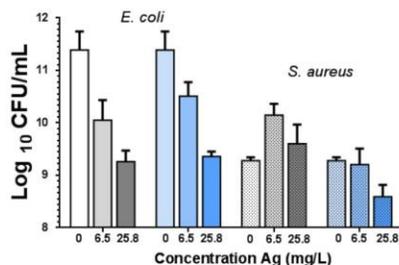


Figure 7. Survival of *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 25923 after 24 h of exposure to AgNWs; Grey (AgNPs) and Blue (AgNWs).

Conclusions

A practical approach to the green synthesis of a zigzag-like AgNWs assembly was demonstrated using green tea extracts and a low concentration of PVP as agent-wire director at 45 °C. The synthesis assisted with only PVP is an approach to the green methodology using two commercial green tea extracts. Mexican tea achieved more homogenous AgNWs and presented important antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus*. The AgNW cytotoxicity seems to be effective mostly to *S. aureus* due to the detrimental effect of the 1-D morphology. Further studies with different concentrations are needed to accomplish the annihilation of bacteria and understand the main mechanism of the AgNW cytotoxicity.

Experimental Section

Reagents and bacterium strain

All the chemical reagents were analytical grade. AgNO₃ (99.5% of purity) was purchased from Merck; two commercial green teas were used: Mexican Tea (Royal Tea, Mexico) and Korean Tea (Baseong green tea). Polyvinylpyrrolidone (PVP) of 40000 MW by Sigma Aldrich and 2-propanol (99.93% of purity, BAKER, ACS) were also used. Trypticasein soy broth (TSB) was purchased from Becton Dickinson, Mexico. The bacterium strains were *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922, which were provided by the "Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal".

Preparation of the extract and synthesis of silver nanowires and nanoparticles

One gram of green tea leaves was added to 100 mL of deionized boiling water (–98 °C). After 10 min boiling, the infusion was filtered with a cellulose Whatman grade 1 filter. A fresh infusion was prepared for each kind of commercial tea. The synthesis of AgNWs was carried out with 1 mL of previously prepared infusion and with a 0.001M solution of AgNO₃. Both solutions were mixed at a volume ratio of 1:20 (infusion: AgNO₃). AgNO₃ was added dropwise to the infusion together with 0.003, 0.006 or 0.012 g of PVP, respectively; then, the resultant solution was stirred magnetically at –45 °C until confirming the complete dissolution. Afterwards, the solution was aged under dark conditions for 30 days at room temperature. The evolution was monitored with aliquots using a UV-vis spectrophotometer Agilent Cary 5000. For the synthesis of the silver nanoparticles (AgNPs), identical conditions were used that for the AgNW synthesis, but without adding PVP.

Characterization

UV-vis spectroscopy (Cary 5000 UV-vis-NIR, Agilent Technologies) was used to monitor the evolution of the eco-friendly synthesis and the surface plasmon resonance. Scanning electron (FIB DUAL BEAM FEI HELIOS 600 NANOLAB) and transmission electron (HRTEM FEI TECNAI F30 STWIN G2) microscopies were used to establish the morphology; the sample was washed several times with centrifugation cycles at 10000 rpm for 10 min and sonication for 20 min. The AgNWs were suspended in 2-propanol and one drop was placed on an aluminium support for SEM and a copper grid for TEM until evaporation.

Antibacterial assays

The AgNWs were evaluated as bactericide agents of *S. aureus* and *E. coli* with the method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC).^[34] A 96-well microplate with 2-fold dilution of AgNWs was used. The growth of *E. coli* and *S. aureus* was carried out in TSB overnight. Aliquots were taken of this culture and adjusted at 5x10⁶ colony formed unit (CFU)/mL.^[34] 100 µL of bacterial solution was added to each well and mixed with the AgNWs, and it was incubated at 37 °C for 24 h. The optical density was measured at a wavelength of 600 nm (Epoch, Biotek, Winooski, Vermont, USA). Finally, the plate was inoculated after 24 h at 37 °C and counted after incubation. The experiment was performed in triplicate. To verify the Ag concentration in the experiments, inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) with a 730-ES spectrometer from Varian Inc. was used. It was determined as 6.5 and 25.8, respectively.

Acknowledgements We gratefully acknowledge Dra. G. J. Labrada-Delgado and Dr. H. Silva-Pereyra from LINAN-IPICYT for the FESEM, and HRTEM material characterizations. This work was supported by CB-2011/169597 and LINAN-0271911 CONACyT projects. M. Flores-González and thanks CONACyT for the granted scholarships.

Keywords: Green Tea • zigzag-like AgNWs assembly • *Camellia Sinensis* • *Escherichia coli* • and *Staphylococcus aureus*

- [1] W. Chen, L. Zheng, M. Wang, Y. Chi, G. Chen, *Anal. Chem.* **2013**, 9655-9663.
- [2] T. Cheng, Y. Z. Zhang, W. Lai, W. Y. Chen, W. J. Zeng, W. Huang, *J. Mater. Chem. C2* **2014**, 10369.
- [3] Y. Zhang, J. Xia, Y. Liu, L. Qiang, L. Zhu, *Environ. Sci. Technol.* **2016**, 50, 13283-13290.
- [4] A. López-Serrano, O. R. Muñoz, L. J. Sanz, C. Cámara, *Anal. Methods.* **2014**, 6, 38.
- [5] F. Martínez-Gutiérrez, E. P. Thi, J. M. Silverman, C. Camargo de Oliveira, S. L. Svensson, H. A. Vanden, E. Morales-Sánchez, N. E. Reiner, E. C. Gaynor, E. L. G. Prydzial, E. M. Conway, E. Orratia, F. Ruiz, Y. Av-Gay, H. Bach, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **2012**, 8, 328-336.
- [6] V. Rodríguez-González, R. B. Domínguez-Espíndola, S. Casas-Flores, O. A. Patrón-Soberano, R. Camposeco-Solis, and S.-W. Lee *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 5, 31625-31637.
- [7] S. Obregón, S. W. Lee, V. Rodríguez-González, *Materials Letters* **2016**, 173, 174-177.
- [8] Y. Sun, B. Gates, B. Mayers, Y. Xia, *Nano Lett.* **2002**, 2,165-168.
- [9] Y. Su, B. Mayers, T. Herricks, Y. Xia, *Nano Lett.* **2003**, 3, 955-960.
- [10] D. Chen, L. Gao, *J. Cryst. Growth* **2004**, 264, 216-222.
- [11] J. Ma, M. Zhan, *RSC Adv.* **2014**, 4, 21060.
- [12] C. Jiang, S. Liu, X. Chen, S. Yu, *Cryst. Eng. Comm.* **2014**, 16, 8646.

For internal use, please do not delete. Submitted_Manuscript

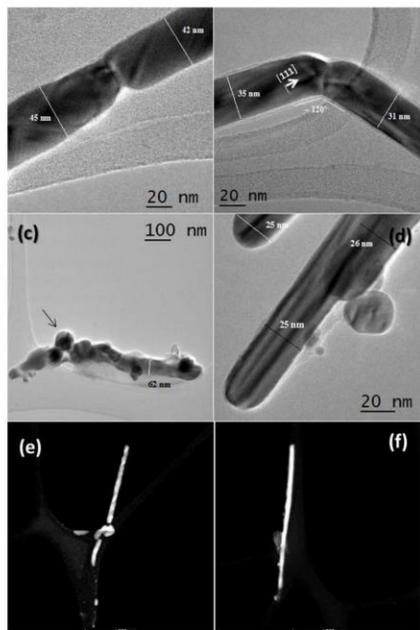
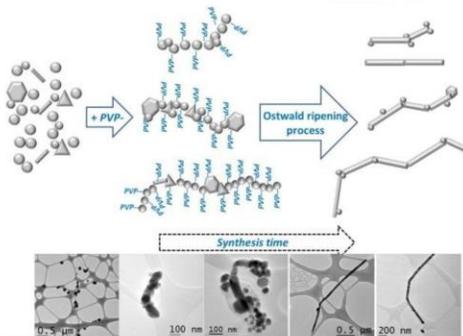


Figure 5. HRTEM images of AgNWs obtained with Mexican tea (a), end-to-end straight silver nanorod assembly, (b) 2-fold AgNW assembly, (c-d) the assemblage ripening process, (e-f) selected HAADF images showing the formation of AgNWs for smaller AgNPs.

Scheme 1 shows a representative scheme of growing folded nanowires. Figure 6 shows histograms of the end-to-end connecting manner of the nanorod distribution. There are structures from simple to 10-fold-nanowire-chain-like-silver-nanorod assembly. Mainly long straight-like and 2-fold nanowires are favored.



For internal use, please do not delete. Submitted_Manuscript

Scheme 1. Representative scheme of the AgNW fold assembly

The addition of PVP to direct the formation of AgNWs was useful to obtain AgNWs. For the first time, it was demonstrated that the *C. sinensis* extract is capable of producing AgNWs similar to those reported with chemical synthesis. The bacteriostatic activity of the green AgNWs was evaluated in the inhibition of *E. coli* and *S. aureus* as infectious microorganisms.

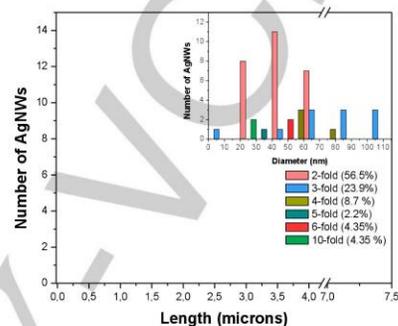


Figure 6. Histograms of the end-to-end manner of connecting the nanorod distribution

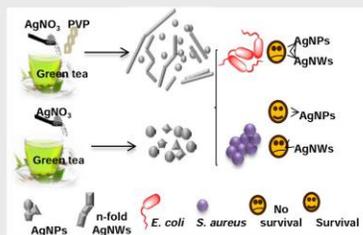
Antibacterial assays

Figure 7 shows the response of gram-negative (*E. coli*) and gram-positive (*S. aureus*) bacteria to the cytotoxic AgNWs and AgNPs after 24 h of exposure. Two concentrations were evaluated for the determination of the minimum inhibitory concentration: 6.25 and 25.8 mg/mL. *E. coli* seems to be more vulnerable to both silver morphologies. The AgNWs achieved more inhibition for *S. aureus* in contrast with the AgNPs notably at 25.8 mg/mL. *E. coli* presented more resistance for the bacteriostatic inhibition; 25.8 mg/mL of AgNWs were necessary to achieve a considerable inhibition. The dissimilar response to the cytotoxic inhibition of gram-negative bacteria contrasted with the gram-positive bacteria was previously reported and attributed to the kind of membrane cell. In gram-positive bacteria, the membrane is composed of polysaccharides that can produce a biofilm that is used as a defense mechanism when bacteria are stressed, while the gram-negative bacteria present inner and outer membranes.^[36] The results show that silver cytotoxicity seems to increase when AgNWs are used, which is maybe due to the sharp morphology that allows more contact with the cell, even damaging the cell-wall rather than an internalized process that was reported for spherical AgNPs.^[37] However, a low concentration of silver nanoparticles seems to be effective for both microorganisms. So, the possible effects of the AgNW cytotoxicity can be oxidative stress induction, protein dysfunction and membrane damage due to the detrimental toxicity of the AgNWs. Even if the total annihilation was not reached, our results are similar to those shown in previous reports, and with a lower concentration than the one reported previously.^[38-39]

- 1 [13] J. Xu, G. Cheng, R. Zheng, *Applied Surface Science*. **2010**, *256*, 5006-
2 5010.
3 [14] S. Liu, J. B. H. Tok, Z. Bao, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1071-1076.
4 [15] F. Mafuné, J. Kohno, Y. Takeda, T. Kondow, *J. Phys. Chem. B* **2000**,
5 9111-9117.
6 [16] K. A. Bogle, S. D. Dhole, V. N. Bhoraskar, *Nanotechnology* **2006**, *17*,
7 3204-3208.
8 [17] M. N. Nadagouda, T. F. Speth, R. S. Varma, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *44*,
9 469-478.
10 [18] B. Tang, L. Sun, J. Li, M. Zhang, X. Wang, *Chem. Eng. J.* **2015**, *260*,
11 99-106.
12 [19] A. K. Mittal, Y. Chisti, U. C. Banerjee, *Biotechnol. Adv.* **2013**, *31*, 346-
13 356.
14 [20] R. Rajan, K. Chandran, S. L. Harper, S. Yun, P. T. Kalaichelvan, *Ind.*
15 *Crops Prod.* **2015**, *70*, 356-373.
16 [21] I. M. Chung, I. Park, K. Seung-Hyun, M. Thiruvengadam, G. Rajakumar,
17 *Nanoscale Res. Lett.* **2016**, *11*, 40.
18 [22] S. P. Chandran, M. Chaudhary, R. Pasricha, A. Ahmad, M. Sastry,
19 *Biotechnol. Prog.* **2006**, *22*, 577-583.
20 [23] T. P. Amaladhas, S. Sivagami, T. A. Devi, A. Ananthi, S. P. Velammal,
21 *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* **2012**, *3*, 045006.
22 [24] K. Jeeva, M. Thiyagarajan, V. Elangovan, N. Geetha, P.
23 Venkatachalam, *Ind. Crops Prod.* **2014**, *52*, 714-720.
24 [25] C. Anesini, G. E. Ferraro, R. Filip, *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*,
25 9225-9229.
26 [26] R. Prior, X. Wu, K. Schaich, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290-4302.
27 [27] A. R. Vilchis-Nestor, V. Sánchez-Mendieta, M. A. Camacho-López, R.
28 M. Gómez-Espinosa, M. A. Camacho-López, J. A. Arenas-Alatorre,
29 *Mater. Lett.* **2008**, *62*, 3103-3105.
30 [28] Y. Y. Loo, B. W. Chieng, M. Nishibuchi, S. Radu, *Int. J. Nanomed.* **2012**,
31 *7*, 4263-4267.
32 [29] J. Bhaumik, N. S. Thakur, P. K. Aili, A. Ghanghoriya, A. K. Mittal, U. C.
33 *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2015**, *1*, 382-392.
34 [30] J. L. Jia, H. H. Xu, D. Q. Li, W. H. Ye, W. J. Liu, *Extract. Synth. React.*
35 *Inorg., Met.-Org., Nano-Met. Chem.* **2014**, *45*, 941-946.
36 [31] S. Hussain, Z. Khan, *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2014**, *37*, 1221-1231.
37 [32] L. Lin, W. Wang, J. Huang, Q. Li, D. Sun, X. Yang, H. Wang, N. He, Y.
38 Wang, *Chem. Eng. J.* **2010**, *162*, 852-858.
39 [33] J. S. J. Packia, H. Mohammed, K. Murali, M. Kamarudeen, *Colloids*
40 *Surf., B* **2012**, *98*, 7-11.
41 [34] CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for
42 Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI
43 document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory
44 Standards Institute **2012**.
45 [35] C. X. Kan, J. J. Zhu, X. G. Zhu, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2008**, *41*,
46 155304.
47 [36] Q. L. Feng, J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim, J. O. Kim, *J.*
48 *Biomed. Mater. Res.* **2000**, *52*, 662-668.
49 [37] I. Sondi, B. Salopek-Sondi, *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *275*, 177-182.
50 [38] J. R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J.
51 Tapia-Ramírez, M. J. Yacaman, *Nanotechnology* **2005**, *16*, 2346-2353.
52 [39] M. Lv, S. Su, Y. He, Q. Huang, W. Hu, D. Li, C. Fan, S. T. Lee, *Adv.*
53 *Mater.* **2010**, *22*, 5463-5467.
54
55
56
57
58
59 For internal use, please do not delete. Submitted_Manuscript
60
61
62
63
64
65

1
2 Layout 2:
3

4 FULL PAPER
5
6



7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Marisa Flores-González, Martín
Talavera-Rojas, Edgardo Soriano-
Vargas, Vicente Rodríguez-González*

Page No. – Page No.
Practical biosynthesis of silver
nanowires using commercial
Camellia sinensis extracts and their
antibacterial properties

7.1. Síntesis y caracterización de nanoestructuras

7.1.1. Nanopartículas de plata

Los extractos con los que se sintetizaron las AgNPs tuvieron una concentración de compuestos fenólicos totales (CFT) de 57.34 g EAG/100 g de materia seca con el té verde-L (té verde, Lagg's Royal tea), con el extracto de té verde-I (Infusiónate, México) se obtuvieron 64.12 g EAG/100 g de materia seca y para el té verde-C (té verde coreano, Boseong Green Tea, Corea del Sur) la concentración fue de 79.13 g EAG/100 g de materia seca. La curva patrón presentó una $r^2=0.9896$.

La espectroscopia UV-Visible es una de las técnicas más usadas para la caracterización de nanopartículas de plata. La formación de las nanopartículas de plata fue evidente por el cambio de coloración en la solución. En la figura 11A se muestra como la banda característica para AgNPs incrementa respecto del tiempo de síntesis, estos cambios están relacionados con la resonancia del plasmón superficial de las AgNPs.

Para evaluar la influencia del extracto, la extracción de compuestos fenólicos del té se realizó bajo dos temperaturas del agua desionizada, ~98 °C y 60 °C. En la figura 11 se observan los espectros de espectroscopia UV-Visible de las AgNPs obtenidos para cada temperatura de extracción, donde se observa que las bandas principales aparecen a 451 y 442 nm para ~98 °C y 60 °C con té verde-L, respectivamente, con el té verde-I se encuentran a 443 nm con ~98 °C y a 445 nm con 60 °C.

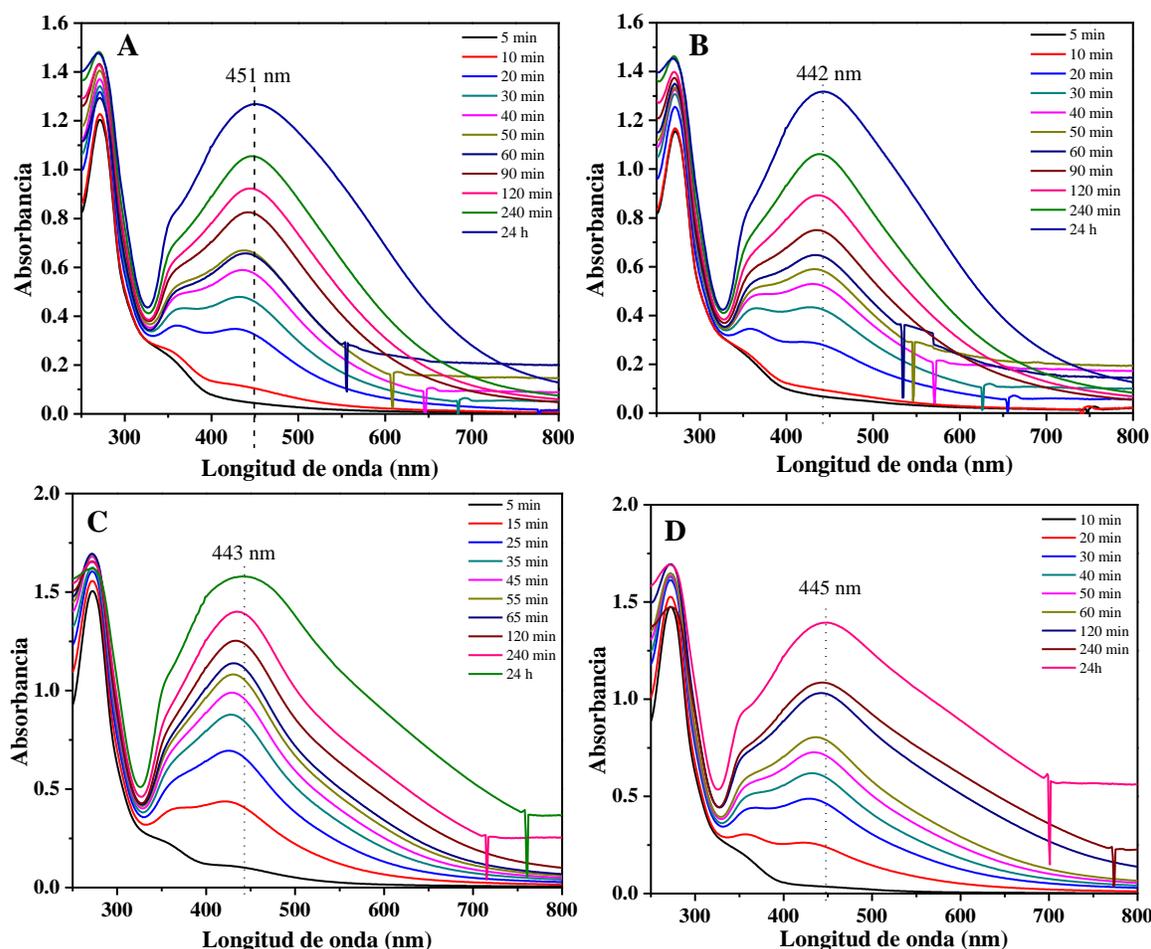


Figura 11. Espectros de espectroscopia UV-Visible de AgNPs. A) Síntesis con el té verde-L a ~ 98 °C y B) a 60 °C de extracción, C) Síntesis con té verde-I a ~ 98 °C y D) 60 °C de extracción.

En la figura 12 se observan los espectros de espectroscopia UV-Visible obtenidos durante la síntesis de AgNPs cuando el pH se modificó hasta 2.68 (Figura 12A), pH normal (5.96, Figura 12B) y alcaliniza (10.42 y 10.39, Figura 12C y 12D). La diferencia más notable está en las bandas características de las AgNPs de $\sim 400 - 450$ nm; a pH ácido (2.68) la banda característica aparece dos días después de haber mezclado el E-TV con la solución de AgNO_3 a diferencia de la síntesis que se realizó sin modificar el pH (5.96) donde la banda a ~ 457 nm aparece desde los primeros 10 min después de mezclar los reactivos y va definiéndose e incrementando con respecto del tiempo, la presencia de esta banda refleja la formación de las AgNPs; sin embargo, se puede distinguir una banda de menor intensidad a 352 nm, es importante mencionar que las bandas se relacionan con las morfologías. Por otra parte aunque a pH básico (10.42 y 10.39) solo se presenta una banda, una

mínima variación en el pH cambia drásticamente la cinética de las bandas (Figura 12C y 12D). El extracto del té verde que se usó para la obtención de las partículas no se le modificó el pH.

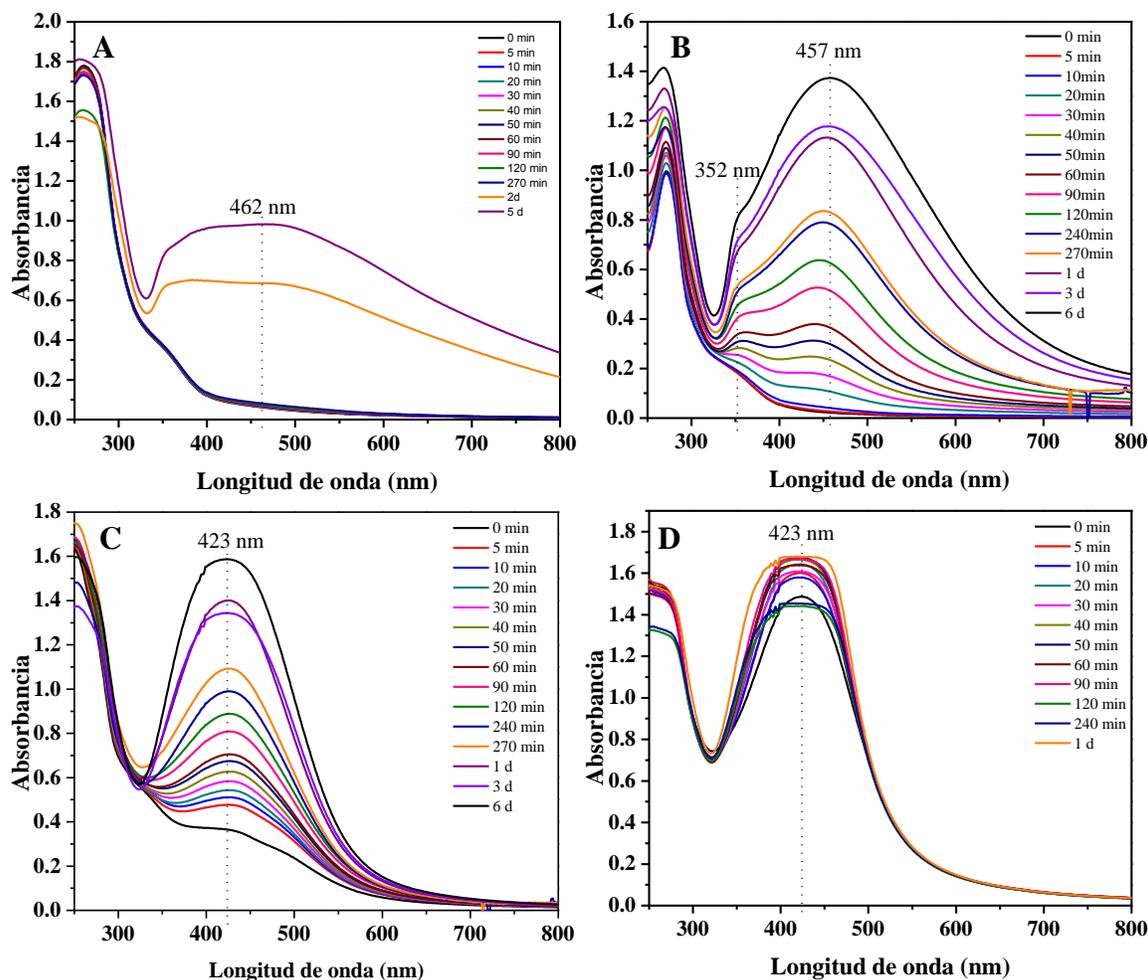


Figura 12. Espectros de espectroscopia UV-Visible de síntesis de AgNPs con diferentes pH. A) 2.68, B) 5.96, C) 10.42 y D) 10.39 del extracto del té verde-L.

La morfología y el tamaño de las nanopartículas fue determinada por imágenes de SEM. La morfología en su mayoría fue cuasi-esféricas (Figura 13A y 13B) al menos durante las primeras horas de síntesis. Cuando el tiempo de síntesis incremento se observaron morfologías como barras (flechas verdes), hexágonos (flechas rojas) y prismas triangulares (flechas amarillas); sin embargo, seguían dominando las formas esféricas (Figura 13C - 13F). Otra característica que se pudo determinar con las imágenes de SEM es el tamaño de las partículas. En la tabla 10 se muestra el

promedio (\bar{x}) \pm la desviación estándar (DE), así como el mínimo y máximo tamaño de diámetro de las AgNPs para ambos extractos usados.

En las síntesis con el extracto de té verde-L el diámetro de menor tamaño fue de 17.69 ± 5.42 nm a 8 h de síntesis, este diámetro fue significativamente diferente con respecto de los demás tiempos evaluados ($p < 0.05$); no obstante la morfología de las partículas a este tiempo de síntesis fue irregular; mientras que el mayor diámetro obtenido fue de 56.79 ± 12.65 y 56.16 ± 20.83 nm después de 10 y 53 d de síntesis, pese a la diferencia de tiempo no se observó diferencia significativa entre estos dos tiempos ($p > 0.05$).

En las imágenes de SEM obtenidas de la síntesis con el té verde-I (Figura 14) se observan que la morfología de las partículas en su mayoría es esférica, en menor cantidad se distinguen las barras y triángulos. Con base a lo que se observa en las micrografías, la morfología de las partículas no varío drásticamente desde las 0 h hasta las 23 h, mismo que fue soportado con el análisis estadístico (Tabla 10) con excepción de las AgNPs obtenidas a 2 h de síntesis donde sí se encontraron diferencias estadísticas con el resto de los tiempos evaluados ($p < 0.005$). Las partículas de menor diámetro se encontraron después de 2 h de síntesis con 25.51 ± 7.30 nm, mientras que después de 8 h se encontraron los diámetros más grandes (37.55 ± 12.8 nm). Cabe mencionar que entre el diámetro de las partículas de 8 h y las de 23 h (35.40 ± 17.28 nm) de síntesis no hay diferencias significativas ($p > 0.05$).

Tabla 10. Diámetro de nanopartículas (nm) de plata sintetizadas con dos diferentes extractos de té verde (L: Lagg's e I: Infusiónate).

| Tratamiento | Diámetro promedio \pm DE | Diámetro Min y Max (nm) |
|--------------------|--|-------------------------|
| L-0h | 26.25 \pm 8.81 ^{**} | 5 – 55 |
| L-1h* | 33.95 \pm 9.82 ^{+, \$} | 11 – 64 |
| L-2h | 23.42 \pm 7.39 ^{**} | 8 – 51 |
| L-4h | 34.18 \pm 9.49 ^{+, &} | 8 – 61 |
| L-8h | 17.69 \pm 5.42 | 8 – 35 |
| L-23h* | 36.19 \pm 10.53 ^{\$, &} | 11 – 76 |
| L-24h | 40.63 \pm 21.71 [#] | 16 – 83 |
| L-42h* | 29.71 \pm 8.81 | 9 – 92 |
| L-3d* | 41.73 \pm 15.41 [#] | 6 – 91 |
| L-10d* | 56.79 \pm 12.65 ⁺ | 34 – 98 |
| L-53d* | 56.16 \pm 20.83 ⁺ | 10 – 98 |
| I-0h [†] | 33.99 \pm 9.11 ^{††, ‡, ♣} | 12 – 56 |
| I-2h [†] | 25.51 \pm 7.31 | 10 – 52 |
| I-4h [†] | 33.06 \pm 10.09 ^{††, ♣} | 11 – 61 |
| I-7h | 34.57 \pm 10.13 ^{††, ♥, ‡, ♣} | 11 – 69 |
| I-8h | 37.55 \pm 12.8 ^{♥, ‡, ♣} | 11 – 86 |
| I-20h [†] | 36.86 \pm 10.17 ^{‡, ♣} | 12 – 61 |
| I-23h | 35.40 \pm 17.28 [♣] | 7 – 71 |

Los * y † representan los valores obtenidos las micrografías de la figura 13 y figura 14, respectivamente.

+, **, + +, \$, & y #: indican que no hay diferencia significativa entre los grupos ($p > 0.05$). Los demás grupos presentan diferencias significativas ($p < 0.05$).

††, ♥, ‡ y ♣: no hay diferencias significativas en el diámetro entre estos grupos ($p > 0.05$). En los grupos que no se señalaron existen diferencias significativas en el diámetro ($p < 0.05$)

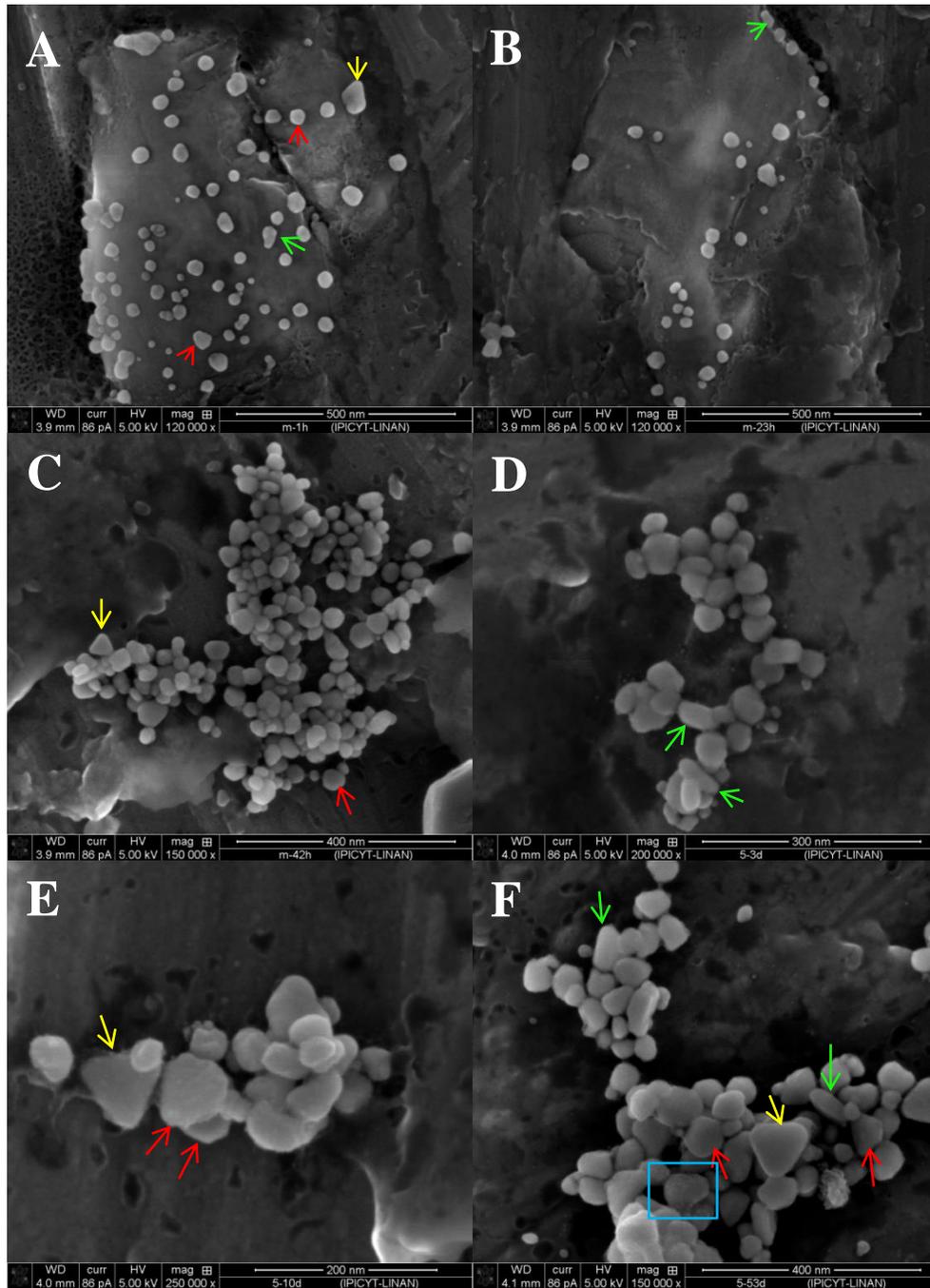


Figura 13. Imágenes de SEM de nanopartículas de plata después de (A) 1 h, (B) 23 h, (C) 42 h, (D) 3 d, (E) 10 d y (F) 53 d de síntesis con extracto de té verde-L. Las imágenes tienen una magnificación de 120000x, 120000x, 150000x, 200000x, 250000x y 150000x, respectivamente. Las flechas rojas señalan los hexágonos, flechas amarillas refieren a los triángulos, las flechas verdes indican las barras y el cuadro azul muestra una partícula con pequeñas partículas aparentemente en la superficie.

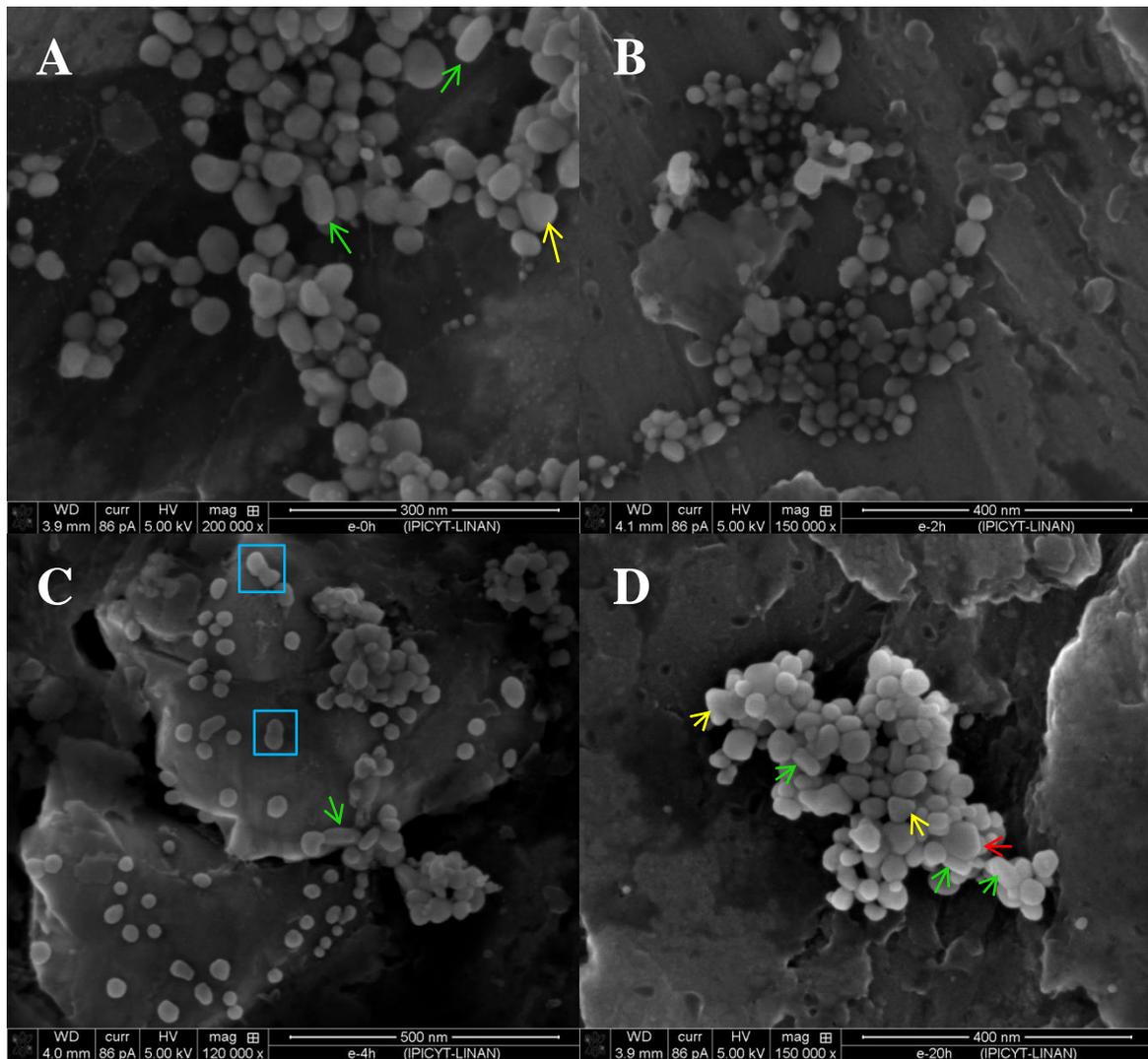


Figura 14. Imágenes de SEM de nanopartículas de plata después de (A) 0 h, (B) 2 h, (C) 4 h y (D) 20 h, de síntesis con extracto de té verde-I. Las magnificaciones de las imágenes son de 200000x, 150000x, 120000x y 150000x, respectivamente. Las flechas rojas señalan los hexágonos, flechas amarillas refieren a los triángulos, las flechas verdes indican barras y los recuadros azules muestran ensamblaje de dos partículas.

En las imágenes de SEM de las AgNPs se observaron partículas pequeñas de 5-10 nm sobre partículas grandes de 83 nm de diámetro (Figura 13F) y la fusión de partículas de similar diámetro (Figura 14C). Respecto a los compuestos orgánicos, se observó que los compuestos fenólicos de los extractos del té (materia orgánica) están unidos a las nanopartículas similar a una capa envolvente (Figura 15A y 15B). Estas imágenes fueron obtenidas en modo STEM (Scanning Transmission Electron Microscopy) en la operación del TEM, que permite observar el contraste presente en la

muestra, lo que facilita distinguir cómo las AgNPs están delimitadas por materia orgánica. Mientras que el análisis elemental (EDS) solo muestra la presencia de plata (Figura 15B y 15C). Es importante mencionar que estas partículas fueron observadas por STEM después de pasar por una serie de lavados con agua destilada. Sin embargo, cuando las AgNPs fueron sometidas a un mayor tratamiento de limpieza con plasma en una atmósfera de oxígeno, aparentemente la materia orgánica fue removida y las partículas se apreciaron con más definición (Figura 15D).

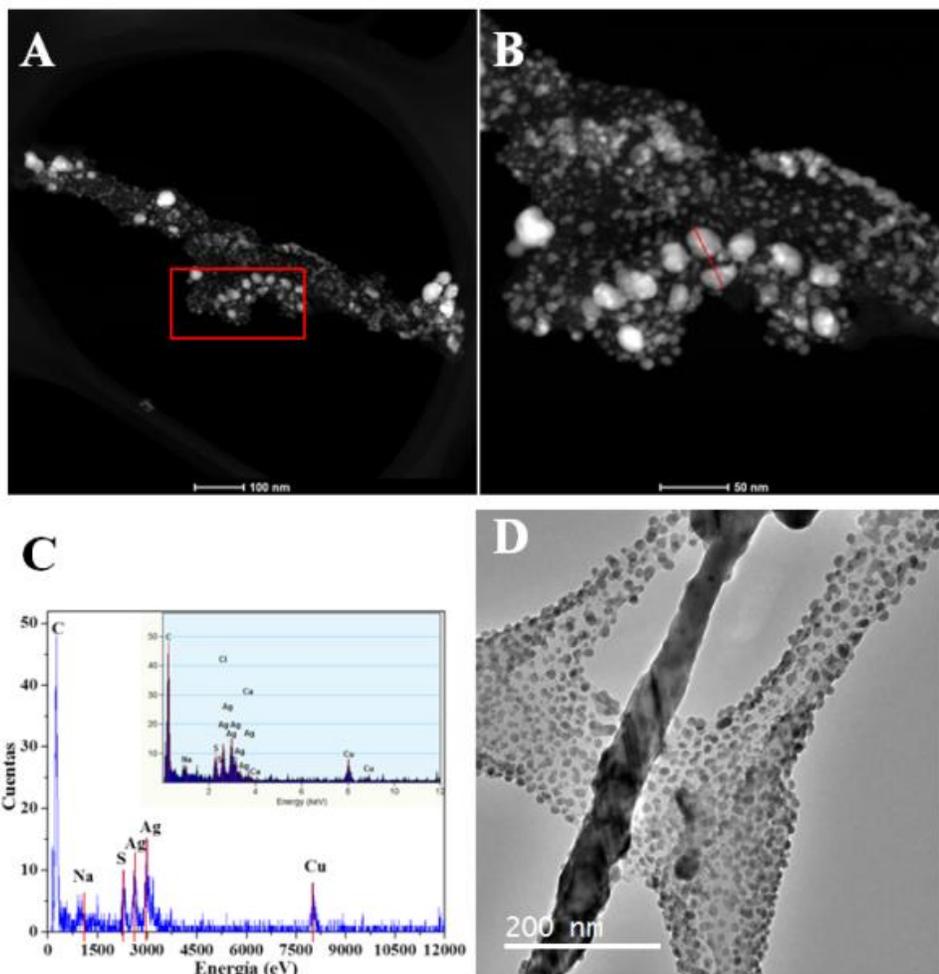


Figura 15. Imágenes de STEM y TEM donde se observan las nanopartículas de plata sintetizadas con té verde-L delimitadas por una capa de materia orgánica (A), acercamiento de una sección de la micrografía A (B) la línea roja señala el área donde se realizó el análisis elemental (C) que confirma la presencia de plata, (D) se observa varias partículas después de ser limpiadas con un plasma *cleaner* con atmósfera de oxígeno. A y B son imágenes obtenidas por STEM y D fue tomada en campo claro.

Además del análisis elemental, con las imágenes de alta resolución de TEM (HRTEM, por sus siglas en inglés) se determinó que la distancia interplanar entre los átomos de las partículas es de 2.4-2.6 Å, distancia reconocida para los nanomateriales de plata (Figura 16).

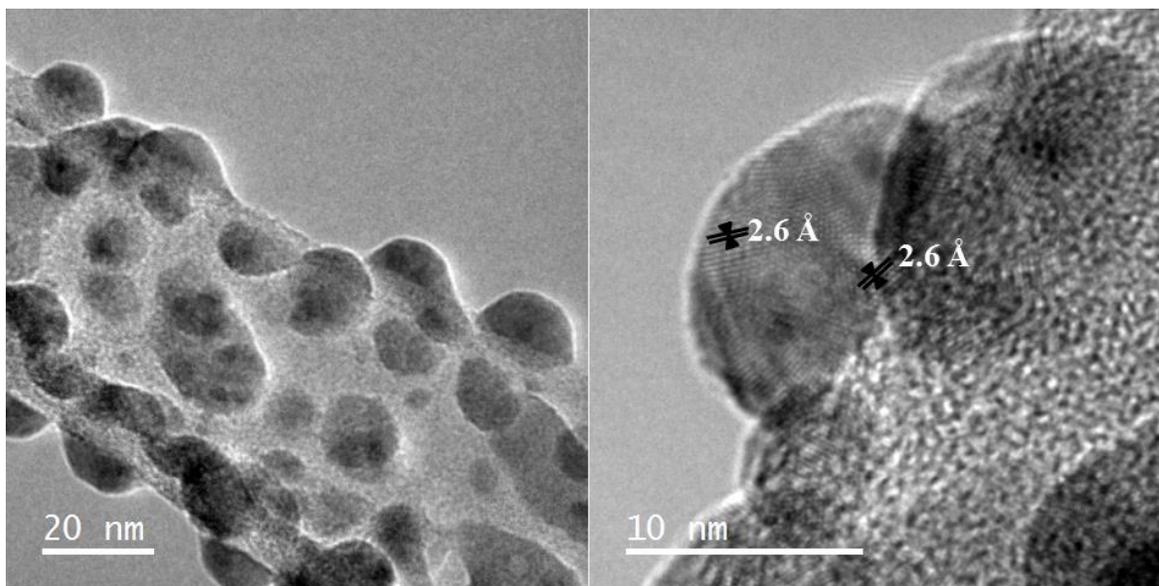


Figura 16. Imágenes TEM de nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de té verde-L. A) muestra varias partículas sobre la película de carbón de la rejilla de cobre. B) imagen HRTEM y la distancia interplanar de los átomos de plata.

La presencia de las moléculas orgánicas en las AgNPs también fueron detectadas por FTIR, donde se encontró que las bandas presentes en el té verde, también están en las partículas aún después de someterse al proceso de lavado (Figura 17). Las bandas están relacionadas con las vibraciones de los grupos funcionales de las moléculas orgánicas y cada grupo vibra a cierto número de onda (cm^{-1}). En la figura 16 los grupos funcionales que se distinguieron fueron C-O-C que se encuentra entre los 800 y 900 cm^{-1} (a y b), C-O desde 1300-1000 cm^{-1} (c-f), 1375 (g), 1468 (h) puede corresponder a O-H, C=O entre 1650-1830 cm^{-1} (i), C=C entre 2050-2300 cm^{-1} (j), C-H desde 2850-3000 cm^{-1} (k-m) y C-H de 3000-3100 cm^{-1} se relaciona con vibraciones de C-H cuando son en forma de anillos aromáticos.

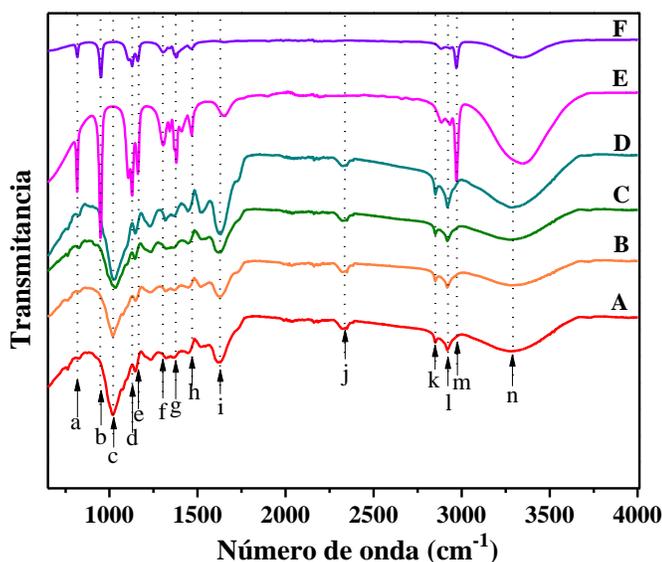


Figura 17. Espectro de FTIR del té verde-L antes (A) y después (B) y té verde-I antes (C) y después (D) de la síntesis, (E) AgNPs después de 4 h y (F) AgNWs de 24 h, ambos sintetizadas con té verde-L.

Con base a las técnicas de caracterización se consiguieron AgNPs por la reducción de los iones de Ag^+ en presencia de los compuestos fenólicos del extracto de té verde. La morfología de las AgNPs determinada por imágenes de SEM fue heterogénea, es decir, se encuentran formas cuasi-esféricas, prismas triangulares, hexágonos y barras. En las imágenes de SEM se observaron partículas que se auto ensamblan, así como la atracción que hay entre partículas de mayor y menor diámetro. La variedad de morfologías se pudo predecir por la presencia de más de una banda observada con el análisis de espectroscopia UV-Visible. Con esta última técnica se observó que la absorbancia de la síntesis de AgNPs aumenta con respecto del tiempo. Dado que las imágenes de SEM se obtuvieron en diferente tiempo de síntesis se encontró que el tamaño de las partículas está en función del tiempo. Otro aspecto importante que se determinó fue la influencia de los compuestos fenólicos de té verde, los cuales cubren a las AgNPs como se apreció en las imágenes de STEM. El análisis de FTIR también evidenció que los grupos funcionales encontradas en el té verde están en las muestras de AgNPs.

7.1.2. Síntesis de AgNWs a partir de AgNPs con PVP como agente direccionador

La influencia del PVP como agente direccionador se evaluó en la forma en la que se adicionaba a la solución. En la figura 18A y 18B se muestra los espectros de espectroscopia UV-Visible para la síntesis con el extracto del té verde-C y té verde-L, respectivamente, cuando el PVP es previamente

diluido. Donde se observó que con ambos té hay dos bandas, la primera en 355 nm y la segunda entre 465 y 468 nm, las cuales se relacionan con la morfología. La banda a 355 nm se relaciona con presencia de nanoalambres, mientras que la banda ~465 nm se vincula con nanopartículas; esta última banda en ambas figuras 18A y 18B tiene una mayor intensidad. En la figura 17C y 17D se observan dos bandas en ambas síntesis realizadas sin dilución previa del PVP. En este caso, la síntesis con el té verde-C (Figura 18C) la banda con mayor intensidad es la de las nanopartículas ~467 nm, a diferencia de la síntesis con té verde-L (Figura 18D) donde la banda a 351 nm tiene más definición. Las siguientes síntesis se realizaron sin diluir el PVP previo a la síntesis.

Con respecto a las diferentes cantidades de PVP empleadas, los espectros obtenidos de la síntesis realizada con té verde-C sin dilución previa del PVP, se observa que el cambio más notable está cuando se emplea una cantidad de 0.006g de PVP (Figura 18C, b-27h) y conforme el tiempo transcurre hasta 33 días la banda de los AgNWs es menor comparada con las de las AgNPs. En el caso de la síntesis realizada con el té verde-L, las síntesis con diferente cantidad de PVP mostraron una banda a 351 nm correspondientes a nanoalambres (Figura 18D), no obstante la banda a 480 nm tiene mayor intensidad después de varios días de síntesis. Cuando se emplea 0.012g de PVP la formación de los AgNWs se da hasta las 57 h y aunque a 33 d no hay un aumento importante en la banda de 480 nm se puede ver que hay un aumento con respecto de la banda obtenida a 74 h (Figura 18D, c-74 h y c-33d). Es importante mencionar que estas síntesis se realizaron cuando el E-TV tenía una temperatura de ~ 45 °C, cuando la temperatura se aumentó hasta ~ 60 °C los espectros de espectroscopia UV-Vis para ambos extractos de té fueron similares a los de la figura 18A.

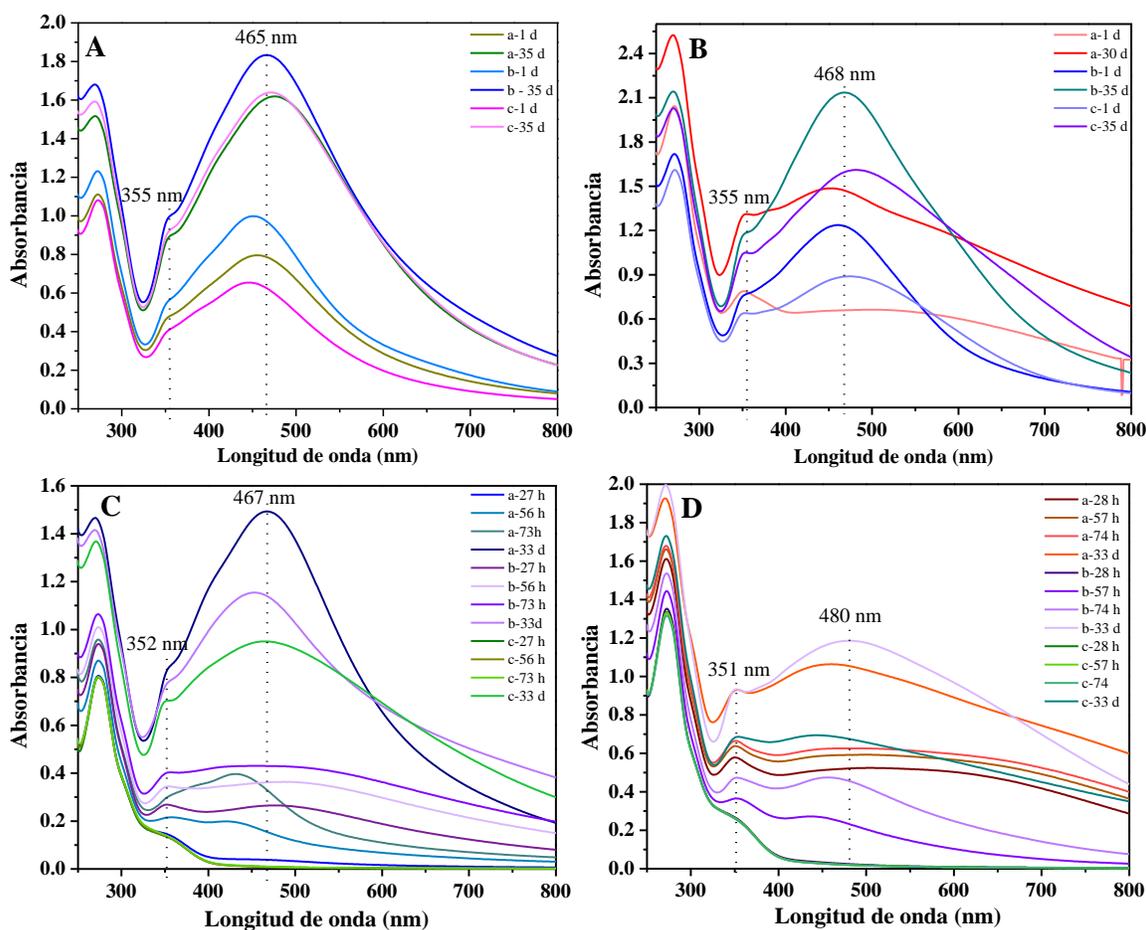


Figura 18. Espectros de espectroscopia UV-Visible que muestra la síntesis de nanoalambres de plata con dos formas de adición del PVP a la mezcla de AgNO_3 y extracto de té verde. A (té verde-C) y B (té verde-L) cuando el PVP fue diluido previamente, C (té verde-C) y D (té verde-L) cuando se adicionó sin diluir. La temperatura del extracto de té verde se mantuvo $\sim 45^\circ\text{C}$.

La influencia de la cantidad del PVP se reflejo en la cantidad de nanoalambres, esto se determinó las imágenes de SEM, es decir, el aumento de PVP en la síntesis disminuye la cantidad de nanoalambres observados y viceversa, esto mismo se observó con el aumento de la temperatura. De esta forma el mayor número de AgNWs se encontró con 0.003 g de PVP cuando no se diluye y se pone en contacto con el té verde-L y la temperatura del extracto esta $\sim 45^\circ\text{C}$. En la figura 19A y 19B se muestran diferentes imágenes de los AgNWs, es importante mencionar que los AgNWs en su mayoría se encontraban cercanos a AgNPs (Figura 19F), las cuales aumentaban proporcionalmente con respecto de la cantidad del PVP.

La presencia de los compuestos fenólicos del extracto se observaron como una capa sobre las nanoestructuras (Figura 19C). La presencia de los compuestos fenólicos y la capa sobre las AgNWs pueden estar contribuyendo con la formación de los AgNWs por la capacidad de agrupar las nanopartículas y proporcionar una dirección con el PVP como se observa en la figura 19C, flecha roja y 19D. Al igual que en las AgNPs, se observaron partículas de menor diámetro en partículas de mayor tamaño (Figura 19E, flecha amarilla). Así mismo se observó que los nanoalambres interactúan entre si formando curvaturas (Figura 19E, flecha verde). Se lograron observar nanoalambres hasta con 10 segmentos. Cabe mencionar que este los ensambles entre los AgNWs se presentó en las síntesis con ambos téis y en las tres cantidades de PVP usadas.

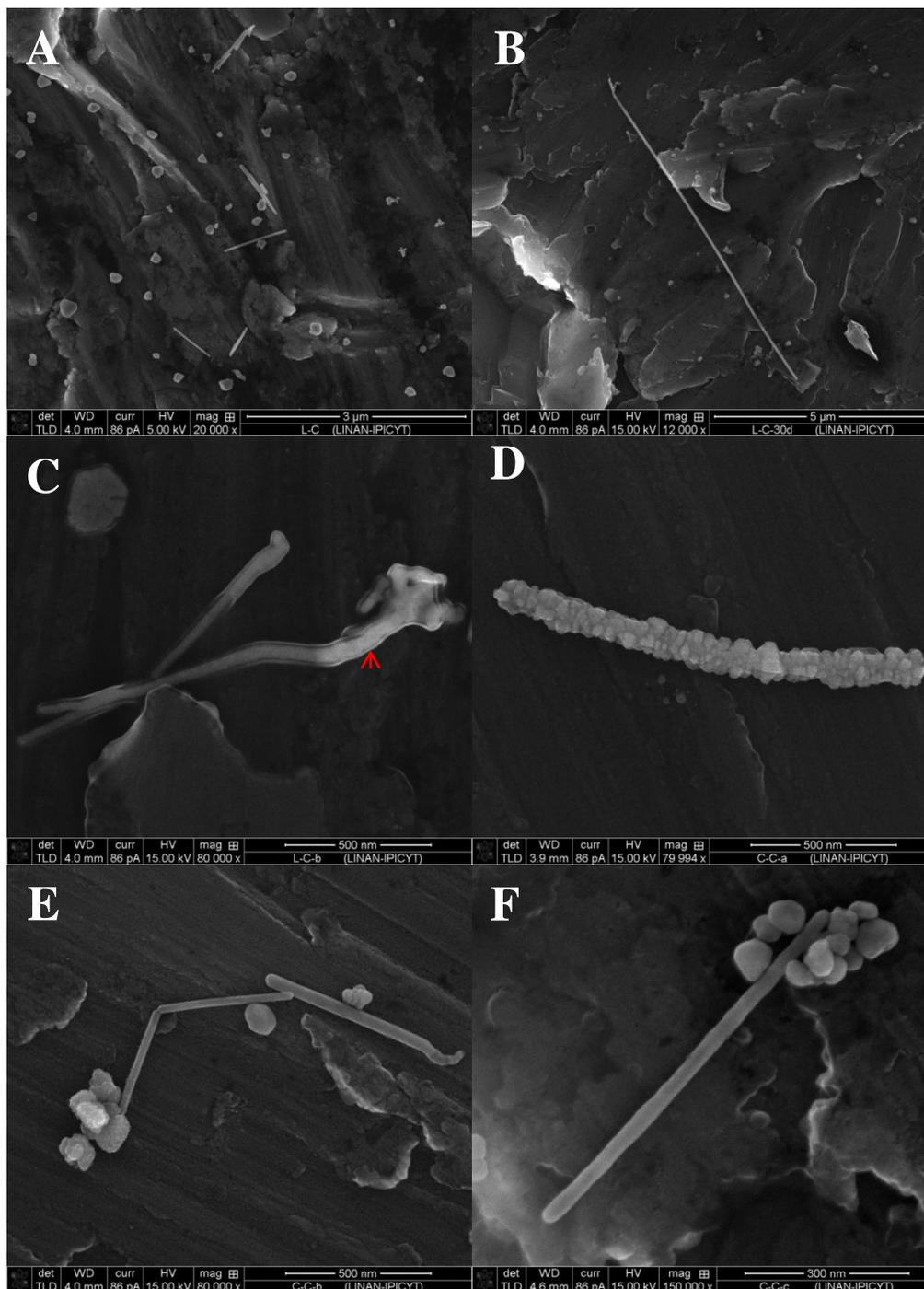


Figura 19. Imágenes de SEM donde se observan nanoalambres de plata. Sintetizados con extracto de té verde-L con 0.003 g de PVP a 24 h a 20000x (A) y 30 d a 12000x (B), 0.006 g de PVP a 24 h con una magnificación de 50000x (C) de síntesis, y con té verde-C con 0.003 g y 79994x (D), 0.006 g a 80000x (E) y 0.012 g con 150000x (F) de PVP después de 24 h de síntesis.

Un análisis con TEM demostró que las partículas pequeñas presentes alrededor en los AgNWs y en las AgNPs son nanopartículas de ~ 5 nm, estas partículas se encuentran limitadas al borde de las de mayor tamaño por la presencia de una capa envolvente tanto en el alambre como en la partícula (Figura 20). La presencia de la capa se puede relacionar con los compuestos fenólicos del té que se detectaron por el análisis de FTIR (Figura 17, banda E).

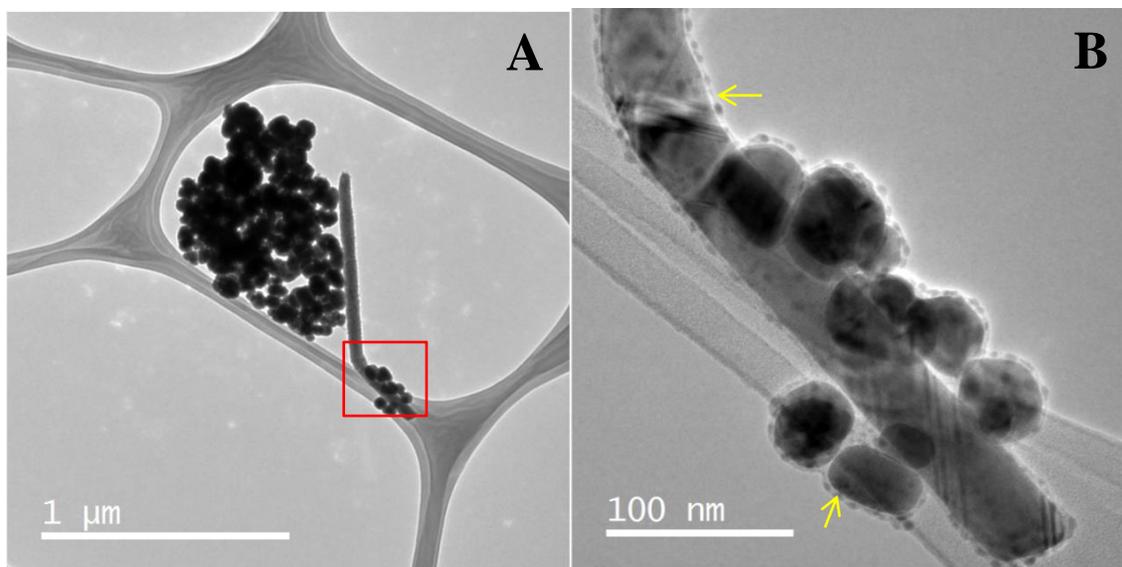


Figura 20. Imágenes de TEM de nanoalambres con extracto de té verde-C y 0.003 g de PVP. (A) Se observa que a los AgNWs acompañados de partículas. (B) es una ampliación del área seleccionada de A, se distingue la envoltura alrededor de AgNPs y AgNWs (flechas amarillas).

Con las imágenes de microscopía electrónica de transmisión también se corrobora que los nanoalambres no presentan huecos, además los extremos terminan en curvatura como se observa en la figura 21. En la figura 21A es notorio como las AgNPs están en extremos o donde se presentan los dobleces de los AgNWs, mientras que en la figura 21B de HRTEM muestra que la distancia interplanaria es de 2.6 \AA , correspondiente con la de la plata y se aprecia con claridad la terminación redonda de los AgNWs. Las interacciones entre los nanoalambres se confirmaron por TEM, donde se observó que hay una fuerte unión y da apariencia de ser un solo cable que tuvo una curvatura durante el crecimiento (Figura 21C y 21D).

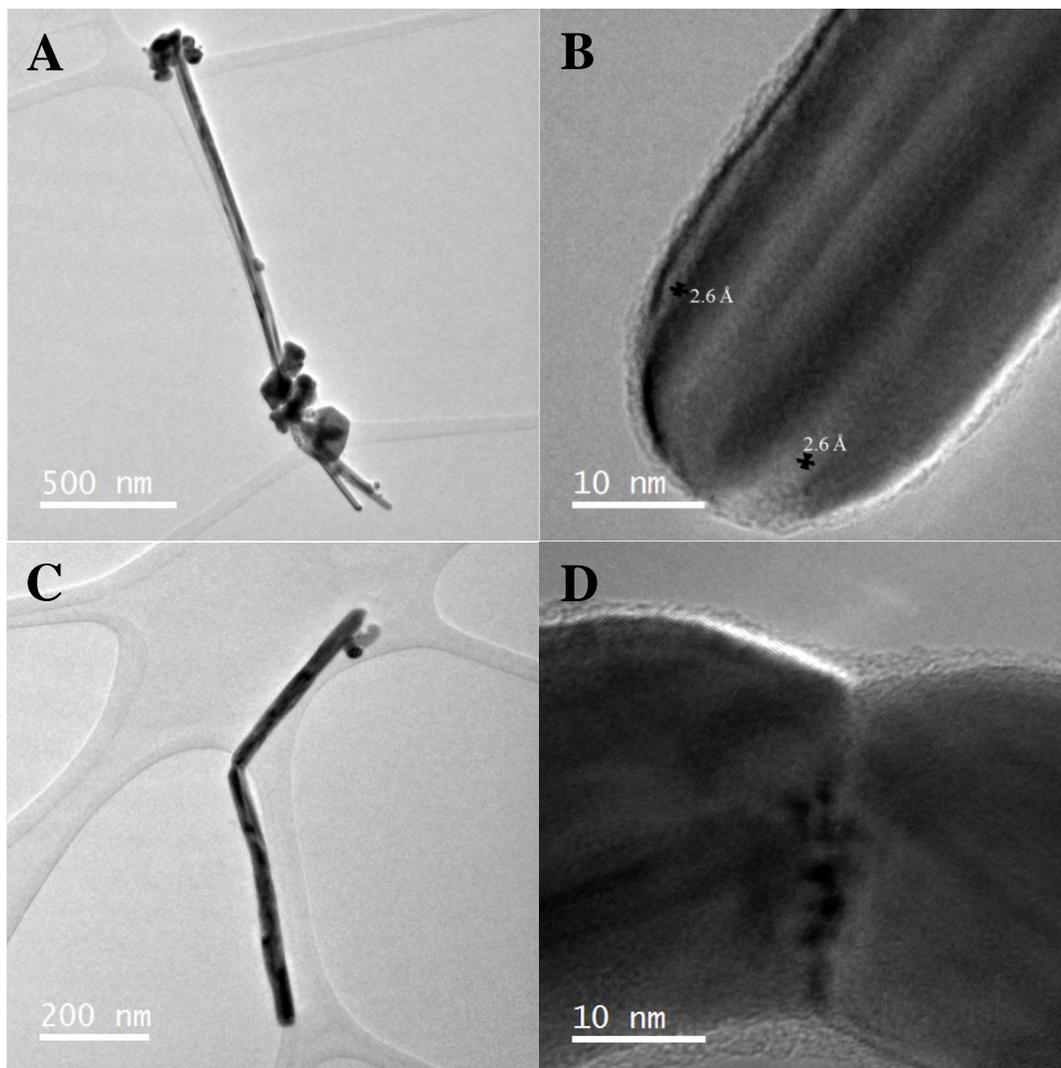


Figura 21. Imágenes de TEM de nanoalambres de plata sintetizados con extracto de té verde-L con 0.003 g de PVP. A) tres nanoalambres entrelazados y acompañados de nanopartículas de plata. B) Imagen de HRTEM de una punta de nanoalambre. C) unión de dos nanoestructuras. D) imagen de alta resolución de la sección donde se unen las nanoestructuras.

La presencia de un agente direccionador como el PVP en la síntesis de AgNPs con extracto de té verde permite la formación de AgNWs. Esta molécula tiene una fuerte influencia en la formación y cantidad de estas nanoestructuras, ya que con base a los resultados obtenidos por la forma y la cantidad que se adiciona, afecta la cantidad de AgNWs observada. La temperatura del extracto es otro factor que influye en la formación de los AgNWs. Las imágenes de SEM mostraron que los AgNWs son atraídos entre sí formando dobleces en la estructura y dando apariencia de unión entre

ellos. Mientras que el análisis de TEM permitió observar pequeñas partículas sobre y en los alrededores tanto de partículas como de los AgNWs. La película formada por los fenoles fue confirmada por análisis de FTIR.

7.2. Efecto bactericida de nanopartículas de plata AgNPs, AgNWs y desinfectantes

Las bacterias empleadas se identificaron fenotípicamente como *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella* spp. con base a las características observadas en los medios selectivos y en la pruebas bioquímicas.

Después de identificar fenotípicamente a los aislamientos de *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella* spp., se les realizó la prueba por difusión en disco para evaluar su sensibilidad. *E. coli* se dividió en dos grupos: el primero con 16 aislamientos (Figura 22A) previamente caracterizados fenotípicamente, genotípicamente y serotipificados (Reyes-Rodriguez *et al.*, 2013); dentro de este grupo se encontró que 43.75, 100, 100, 25, 100, 100, 81.25, 81.25, 100, 100, 37.5 y 81.25 % fueron sensibles para CF, CL, CRO, AM, AK, SXT, CTX, GE, NET, PEF, CB y NF, respectivamente, un patrón intermedio presentó el 25, 62.5, 12.5, 18.75, 43.75 y 18.75 % en CF, AM, CTX, GE, CB y NF y se encontró resistencia a CF, AM, CTX y CB del 31.25, 12.5, 6.25 y 18.75 %, respectivamente. En el segundo grupo de 15 aislamientos se encontró sensibilidad del 20, 100, 73.33, 15, 13.33 y 26.67 % con TE, CAZ, NOR, CTX, CIP y NA, el 13.33, 46.67 y 20 % de los aislamientos fueron intermedios a TE, CIP y NA, mientras que el 66.67, 26.67, 40 y 53.33 % fue resistente a los antibióticos TE, NOR, CIP y NA (Figura 22B).

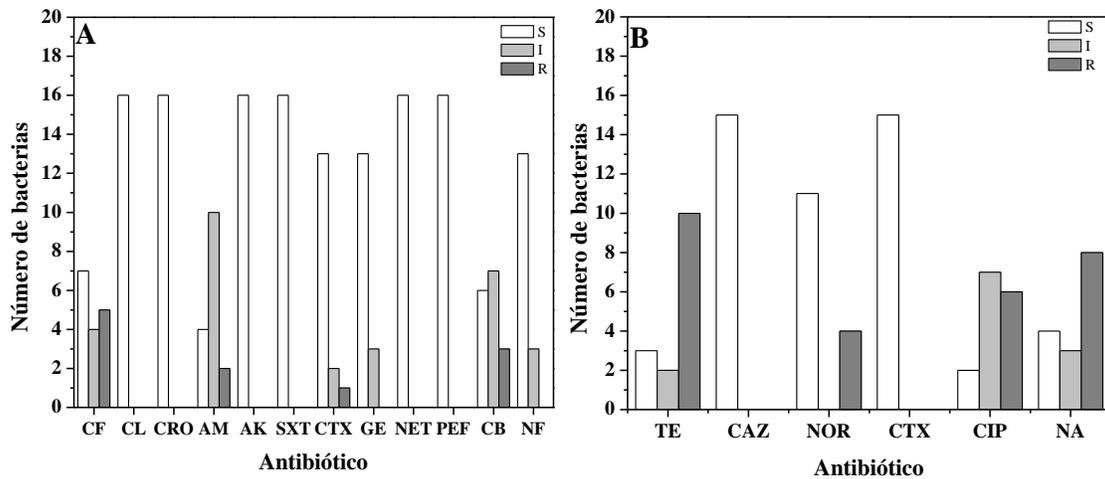


Figura 22. Sensibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli*. A) Grupo con 16 aislamientos altamente identificados y B) grupo con 15 aislamientos.

Los 29 aislamientos de *Salmonella* spp. presentaron una sensibilidad del 51.72 %, 95 %, 62.5 %, 75 %, 12.5 %, 62.07 %, 96.55 % a CIP, OFX, NA, CAZ, TE, CTX y NOR, respectivamente; mientras que el comportamiento intermedio fue del 41.38, 5, 12.5, 6.67 y 3.45% para CIP, OFX, NA, TE y NOR, y una resistencia a CIP, NA, CAZ, TE, CTX y del 6.9, 25, 25, 73.33 y 37.95% respectivamente (Figura 23).

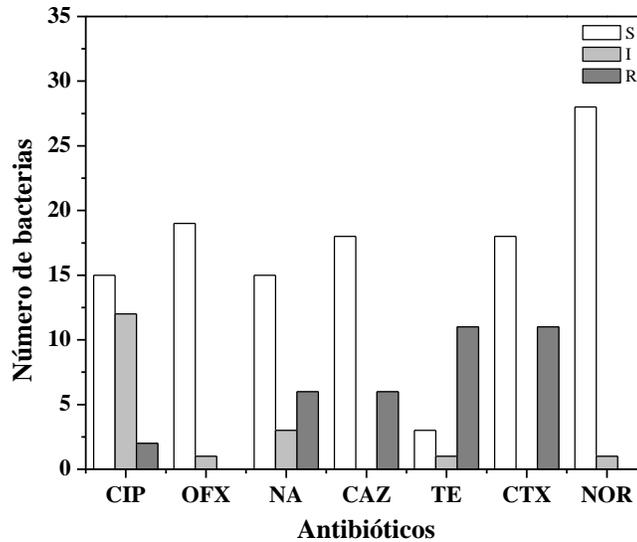


Figura 23. Sensibilidad fenotípica a antibióticos de *Salmonella* spp.

En el caso de los aislamientos de *S. aureus* se encontró una sensibilidad del 66.67, 100, 75, 33.33, 100, 8.33, 100, 91.67, 83.33, 100 y 58.33 % con CIP, SXT, P, VA, TE, E, OX, MACC, CC, GE y CF, intermedio de 8.33, 25 y 8.33 % con CIP, E y CC; y finalmente resistencia del 25, 25, 58.33, 66.67, 8.33, 8.33 y 41.67 % para CIP, P, VA, E, MAC, CC y CF, respectivamente (Figura 24).

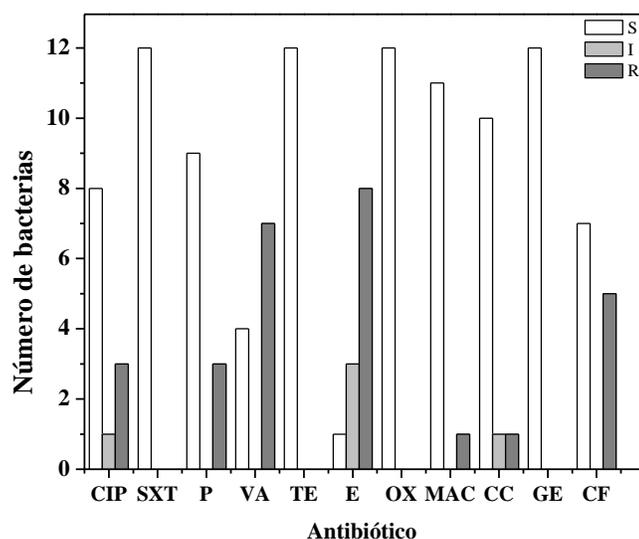


Figura 24. Sensibilidad fenotípica a antibióticos de *Staphylococcus aureus*.

En las tres especies bacterianas evaluadas se encontraron bacterias resistentes; sin embargo, la presencia de bacterias con un patrón intermedio sugiere que la resistencia a los antibióticos va en aumento. De ahí que aislamientos con perfil resistente, intermedio y sensible fueron expuestas a desinfectantes amino cuaternarios y de iodo para evaluar su CMI.

En la tabla 11 se muestra la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las tres bacterias. Se compara el porcentaje, % (n) de aislamientos con crecimiento a determinada concentración de las tres especies bacterianas para los desinfectantes con compuestos amino cuaternarios como principio activo. En la tabla 11 se observa que la bacteria Gram positiva tiene más sensibilidad a los compuestos amino cuaternarios, donde el QAC-C tiene una menor CMI que el QAC-P. Con el QAC-C en *S. aureus* se inhibió el crecimiento en más del 50 % de los aislamientos evaluados con una concentración de 2 mg/L y la inhibición del 100 % de los aislamientos con una CMI de 32 mg/L. En el caso de las dos bacterias Gram negativas la CMI del QAC-C es de 64 mg/L y para el QAC-P fue de 64 mg/L y de 128 mg/L para *Salmonella spp.* y *E. coli*, respectivamente.

Tabla 11. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de tres especies bacteriana con 24 h de exposición a compuestos amino cuaternarios (QACs)

| mg/L | <i>Salmonella spp.</i> | | <i>Staphylococcus aureus</i> | | <i>Escherichia coli</i> | |
|-----------|------------------------|----------------|------------------------------|----------------|-------------------------|----------------|
| | QAC-P % (n) | QAC-C % (n) | QAC-P % (n) | QAC-C % (n) | QAC-P % (n) | QAC-C % (n) |
| 64 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 3.23 (1) | 0 (0) |
| 32 | 17.24 (5) | 10.34 (3) | 8.3 (1) | 0 (0) | 6.45 (2) | 3.23 (1) |
| 16 | 75.86 (22) | 100 (29) | 66.6 (8) | 25 (3) | 32.26 (10) | 35.5 (11) |
| 8 | 86.21(25) | 100 (29) | 66.6 (8) | 33.3 (4) | 100 (31) | 100 (31) |
| 4 | 96.55 (28) | 100 (29) | 66.6 (8) | 41.6 (5) | 100 (31) | 100 (31) |
| 2 | 100 (29) | 100 (29) | 75 (9) | 41.6 (5) | 100 (31) | 100 (31) |

Con respecto a los desinfectantes cuyo principio activo es el iodo, la CMI y el porcentaje % (número) de aislamientos sobrevivientes a las concentraciones evaluadas se presenta en la tabla 12, donde la concentración menor en la que no hay crecimiento bacteriano se representan como 0 (0) y corresponde a la CMI. La CMI de *S. aureus* fue de 503.125 y 500 m/L para el I₂PVP-P y el I₂PVP-C, respectivamente. Estas CMI son menores a las encontradas en *Salmonella spp.* y *E. coli*, que fueron de 4025 mg/L con I₂PVP-P y de 1000 mg/L con I₂PVP-C, para ambas bacterias. Un comportamiento notorio en las tres especies bacterianas es que se requiere más concentración de I₂PVP-P que de I₂PVP-C para inhibir el crecimiento bacteriano.

Tabla 12. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de tres especies bacteriana con 24 h de exposición a Iodopavidona

| | <i>Staphylococcus aureus</i> | | <i>Salmonella spp.</i> | | <i>Escherichia coli</i> | | mg/L (I ₂ PVP-C) |
|----------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | mg/L (I ₂ PVP-P) | I ₂ PVP-P % (n) | I ₂ PVP-C % (n) | I ₂ PVP-P % (n) | I ₂ PVP-C % (n) | I ₂ PVP-P % (n) | |
| 4025 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 4000 |
| 2012.5 | 100 (12) | 0 (0) | 93.10 (27) | 0 (0) | 77.42 (24) | 0 (0) | 2000 |
| 1006.25 | 100 (12) | 0 (0) | 100 (29) | 0 (0) | 100 (31) | 0 (0) | 1000 |
| 503.125 | 100 (12) | 0 (0) | 100 (29) | 55.17 (16) | 100 (31) | 38.71 (12) | 500 |
| 251.56 | 100 (12) | 33.33 (4) | 100 (29) | 96.55 (28) | 100 (31) | 100 (31) | 250 |
| 125.78 | 100 (12) | 100 (12) | 100 (29) | 100 (29) | 100 (31) | 100 (31) | 125 |

En la práctica los desinfectantes son usados por tiempos cortos (minutos). En este trabajo se evaluó la eficacia de cuatro concentraciones de cada desinfectante incluyendo la CMI obtenida a 24 h, la eficacia de los desinfectantes a los 5, 10, 15 y 30 min. En la tabla 13 se muestra el número de aislamientos que presentaron crecimiento después de cierto tiempo de interacción. Los resultados muestran que la CMI de 24 h no es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano del 100 % de los aislamientos evaluados para las tres especies. En el caso de *S. aureus* con una concentración de 1000 mg/L de I₂PVP-C después de 10 min de contacto bacteria-desinfectante hay un efecto bactericida, esta concentración duplica la CMI (Tabla 12). Mientras que a esta misma concentración pero después de 30 min se observó un efecto bactericida en *E. coli*. En *Salmonella spp.* se encontró que aún después de 30 min hay aislamientos que son capaces de desarrollarse a 1000 mg/L de I₂PVP-C, esta concentración es la CMI de para esta bacteria.

En el caso de I₂PVP-P (Tabla 14) las concentraciones evaluadas son superiores a las de su similar. Con este desinfectante las CMI fue similar en las tres especies (4025 mg/L); sin embargo, esta concentración no es suficiente para inhibir el crecimiento de ningún aislamiento de *S. aureus*. En el caso de *Salmonella spp.* expuesta a I₂PVP-P a 4025 mg/L después de 30 min de exposición solo se encontró un efecto bactericida en el 31% (9) de aislamientos, a diferencia de *E. coli*, donde se presentó un 87.1% (27) de inhibición bacteriana después de 30 min.

Las concentraciones disminuyeron drásticamente con el desinfectante QACs-P y QACs-C. Donde los aislamientos de *S. aureus* tanto para QACs-P y QACs-C (Tabla 15 y 16) requirieron de una menor concentración (32 mg/L) para su inhibición después de 15 min de exposición al desinfectante. El 100 % de los aislamientos de *Salmonella* spp. fueron inhibidos con 128 mg/L tanto con QACs-P como con QACs-C después de 5 min de interacción. El 100 % de los aislamientos de *E. coli* también fueron inhibidos con 128 mg/L pero con 15 min de exposición a QACs-C. Sin embargo cuando se aumentó la concentración a 286 mg/L en *E. coli* con QACs-P, se observó que dos aislamientos, fueron capaz de sobrevivir hasta los 10 min.

Tabla 13. Número de aislamientos con crecimiento bacteriano después de 5, 10, 15 y 30 min de exposición a I₂PVP-C

| | | Unidades formadoras de colonias (UFC)/ mL | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|------------------|---|----|----|----------|---|---|-----------|---|---|-----------|---|---|-----------|---|---|-----------|---|---|-----------|---|---|-----------|---|---|-----------|---|---|-------------|----|----|----|----|----|--|
| | | 0 | | | 200-1000 | | | 1200-2000 | | | 2200-3000 | | | 3200-4000 | | | 4200-5000 | | | 5200-6000 | | | 6200-7000 | | | 7200-8000 | | | incontables | | | | | | |
| [mg/L] | t(min)/Bacterias | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | | | | |
| 125 | 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 12 | 29 | 31 | |
| | 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 12 | 29 | 31 | |
| | 15 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 12 | 29 | 31 | |
| | 30 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 12 | 29 | 31 | |
| 250 | 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 12 | 29 | 31 | |
| | 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 12 | 29 | 31 | |
| | 15 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 12 | 29 | 31 | |
| | 30 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 12 | 29 | 31 | |
| 500 | 5 | 4 | 4 | | 2 | 3 | 1 | 1 | 1 | 4 | 2 | | 1 | 1 | | | | | | 1 | | | | | | 2 | | | | | | 20 | 25 | | |
| | 10 | 2 | 3 | | 3 | | | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | | | 3 | 1 | 1 | 1 | 2 | | | 1 | 2 | | 2 | | | | | | 21 | 23 | | |
| | 15 | 4 | 5 | | 1 | | 2 | 1 | | | | | 3 | 1 | 1 | | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | | 1 | 21 | 23 | | | | |
| | 30 | 1 | 2 | | 4 | | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | 1 | 2 | | 1 | 1 | 3 | 1 | | | | | | | 1 | 20 | 25 | | | | |
| 1000 | 5 | 11 | 27 | 29 | 1 | 1 | 1 | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | | | |
| | 10 | 12 | 27 | 30 | | 1 | | | | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 15 | 12 | 27 | 30 | | 1 | | | | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 30 | 12 | 27 | 31 | | 1 | | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

S. aureus (n=12): A
Salmonella spp. (n=29): B
E. coli (n=31): C

Tabla 14. Número de aislamientos con crecimiento bacteriano después de 5, 10, 15 y 30 min de exposición a I₂PVP-P

| | | Unidades formadoras de colonias / mL | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-------------------|--------------------------------------|----|---|----------|---|-----------|---|-----------|---|-----------|---|-----------|---|-----------|---|-----------|---|-----------|---|-------------|---|-------------|----|----|
| | | 0 | | | 200-1000 | | 1200-2000 | | 2200-3000 | | 3200-4000 | | 4200-5000 | | 5200-6000 | | 6200-7000 | | 8200-9000 | | 11200-12000 | | incontables | | |
| [mg/L] | t (min)/Bacterias | A | B | C | B | C | B | C | B | C | B | C | B | C | B | C | B | C | B | C | B | C | A | B | C |
| 503.13 | 5 | | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | 12 | 29 | 30 |
| | 10 | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | 12 | 29 | 30 |
| | 15 | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | 12 | 29 | 30 |
| | 30 | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | 12 | 29 | 30 |
| 1006.3 | 5 | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | 12 | 29 | 30 |
| | 10 | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | 12 | 29 | 30 |
| | 15 | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | 12 | 29 | 30 |
| | 30 | | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | 12 | 29 | 30 |
| 2012.5 | 5 | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | 12 | 29 | 30 |
| | 10 | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | 12 | 29 | 30 |
| | 15 | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | 12 | 29 | 30 |
| | 30 | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | 12 | 29 | 30 |
| 4025 | 5 | 10 | 27 | | 4 | 3 | 1 | | | 1 | 1 | | 1 | | | | | | | | | | 12 | 12 | |
| | 10 | 9 | 28 | | 2 | 1 | 3 | | 2 | 1 | 1 | | 2 | | | 1 | | | | | | | 12 | 10 | |
| | 15 | 9 | 28 | | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 4 | | | | | | | | | 1 | | | 12 | 10 | |
| | 30 | 9 | 27 | | 2 | 3 | 2 | 1 | 2 | | | | 3 | 1 | | | 1 | | | | 1 | | 12 | 9 | |

S. aureus (n=12): A

Salmonella spp. (n=29): B

E. coli (n=31): C

Tabla 15. Número de aislamientos con crecimiento bacteriano después de 5, 10, 15 y 30 min de exposición a QACs-P

| | | Unidades formadoras de colonias / mL | | | | | | | | | | | | incontables | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|------------------|--------------------------------------|----|----|----------|---|---|-----------|---|---|-----------|---|---|-------------|---|---|-----------|---|---|-----------|---|---|-----------|---|---|-----------|---|---|------------|---|---|-------------|----|---|----|----|
| | | 0 | | | 200-1000 | | | 1200-2000 | | | 2200-3000 | | | 3200-4000 | | | 4200-5000 | | | 5200-6000 | | | 6200-7000 | | | 8200-9000 | | | 9200-10000 | | | 10200-11000 | | | | |
| [mg/L] | t(min)/Bacterias | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | | |
| 32 | 5 | 4 | | | 3 | | | | | | | | | 1 | | | 2 | | | 1 | | | 2 | | | 1 | | | | | | | | | 28 | 31 |
| | 10 | 9 | | | 2 | 1 | 1 | | | 1 | | | | | | | 1 | | | 1 | | | | | | | | | | | | 27 | 29 | | | |
| | 15 | 12 | | 1 | | | 1 | | | 1 | | | 1 | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | 27 | 29 | | | |
| | 30 | 12 | 2 | 4 | 3 | | | 1 | 2 | | 2 | | | 1 | | | 1 | | | | | | | | | 1 | | | 1 | | | 17 | 25 | | | |
| 64 | 5 | 12 | 13 | 17 | 5 | 5 | | 1 | 1 | | 1 | 2 | | 2 | | | 2 | | | | | | | | | | | | | | | 5 | 5 | | | |
| | 10 | 12 | 20 | 22 | 3 | 5 | | 2 | 1 | | 1 | 1 | | 1 | | | | 1 | | | | | 1 | | | | | | | | | 1 | | | | |
| | 15 | 12 | 23 | 25 | 2 | 3 | | 2 | 2 | | | | | 1 | 1 | | | | | | | | | | | 1 | | | 1 | | | 1 | | | | |
| | 30 | 12 | 23 | 28 | | | 2 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 128 | 5 | 12 | 29 | 29 | | | 1 | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 10 | 12 | 29 | 31 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 15 | 12 | 29 | 31 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 30 | 12 | 29 | 31 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 286 | 5 | 12 | 29 | 31 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 10 | 12 | 29 | 29 | | | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 15 | 12 | 29 | 31 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 30 | 12 | 29 | 31 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

S. aureus (n=12): A

Salmonella spp. (n=29): B

E. coli (n=31): C

Tabla 16. Número de aislamientos con crecimiento bacteriano después de 5, 10, 15 y 30 min de exposición a QACs-C

| [mg/L] t(min)/Bacterias | | Unidades formadoras de colonias / mL | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|----|--------------------------------------|----|----|----------|---|---|-----------|---|-----------|---|---|-----------|---|-----------|---|---|-----------|---|---|-----------|---|---|-----------|---|---|-----------|---|---|------------|---|---|-------------|---|---|-------------|----|----|--|
| | | 0 | | | 200-1000 | | | 1200-2000 | | 2200-3000 | | | 3200-4000 | | 4200-5000 | | | 5200-6000 | | | 6200-7000 | | | 7200-8000 | | | 8200-9000 | | | 9200-10000 | | | 10200-11000 | | | incontables | | | |
| | | A | B | C | A | B | C | B | C | A | B | C | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | B | C | A | B | C | B | C | B | C | A | B | C | | | | |
| 32 | 5 | 4 | 1 | | 3 | 2 | | 3 | | | | | | 1 | 2 | 1 | 3 | 1 | | 1 | | | 2 | | 1 | | | | | | | | | | | | 27 | 20 | |
| | 10 | 9 | 1 | 3 | 2 | 1 | 3 | 1 | 1 | | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | | | 1 | | | | | | | 2 | | 1 | | | 1 | | | | | | | 21 | 18 | |
| | 15 | 12 | 2 | 2 | | 1 | 6 | 1 | 2 | | | 1 | 1 | 1 | | | | 3 | | | | | | | 1 | 2 | | 1 | | | | | | | | | 19 | 17 | |
| | 30 | 12 | 3 | 6 | | 5 | 5 | 1 | 3 | | | | 2 | 1 | 2 | | | | 1 | | | | | | 2 | | | 1 | 1 | | | | 1 | | | | 17 | 8 | |
| 64 | 5 | 12 | 17 | 17 | | 5 | 6 | 1 | 1 | | | 1 | 2 | 3 | | | | | | | | | | | 1 | | | 1 | | | | | | | | | 4 | 1 | |
| | 10 | 12 | 21 | 23 | | 4 | 5 | 1 | 1 | | | 2 | 1 | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | 1 | 1 | |
| | 15 | 12 | 23 | 27 | | 3 | 3 | 1 | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | 1 | | |
| | 30 | 12 | 25 | 30 | | 3 | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | | |
| 128 | 5 | 12 | 29 | 25 | | | 4 | | 1 | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 10 | 12 | 29 | 30 | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 15 | 12 | 29 | 31 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 30 | 12 | 29 | 31 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 286 | 5 | 12 | 29 | 31 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 10 | 12 | 29 | 31 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 15 | 12 | 29 | 31 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 30 | 12 | 29 | 31 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

S. aureus (n=12): A

Salmonella spp. (n=29): B

E. coli (n=31): C

Respecto a las AgNPs, la actividad bactericida se determinó por absorbancia, la cual se relacionó con el crecimiento bacteriano comparado con el control. En la figura 25 se muestra el promedio de inhibición del crecimiento (%) de las tres bacterias con cada una de las AgNPs empleadas, donde se observa que tanto con AgNPs-C como con AgNPs-TV hay una disminución de crecimiento con respecto al aumento de la concentración de partículas. Con las AgNPs-C se obtuvo inhibición de crecimiento del 100 % en *E. coli* y *S. aureus*, y del 91 % en *Salmonella* spp. con una concentración de 7.93 mg/L (Figura 25A). Una desventaja encontrada en el uso del espectrofotómetro es que a elevadas concentraciones de AgNPs la tonalidad de la solución es muy oscura causando interferencia con la lectura, esto se presentó en el producto comercial. Respecto a las AgNPs-TV la inhibición máxima fue de 97 % en *E. coli* con una concentración de 25.8 mg/L, mientras que a esta misma concentración solo se logró inhibir el 65 % y 63 % del crecimiento de *Salmonella* spp. y *S. aureus* respectivamente (Figura 25B). Es importante mencionar que el efecto bactericida de las partículas difiere aunque ambas sean de plata. Para las tres bacterias hubo mayor inhibición con AgNPs-C a menor concentración en comparación con AgNPs-TV.

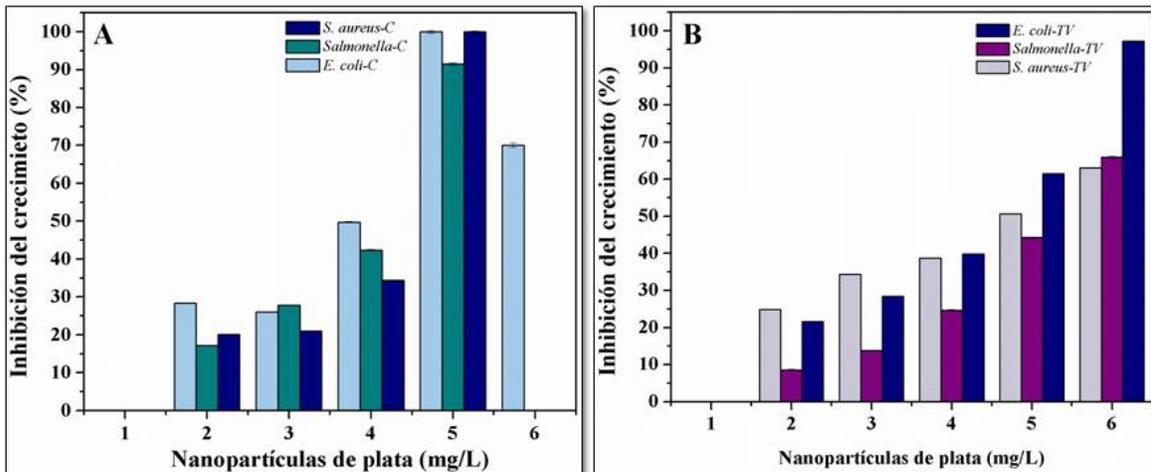


Figura 25. Comparación del promedio de inhibición del crecimiento (%) de los aislamientos de *S. aureus* (n=12), *E. coli* (n=31) y *Salmonella* spp. (n=29) después de 24 de exposición a AgNPs-C (A) y AgNPs-TV (B). (AgNPs-C= 1: 0 mg/L, 2: 0.99 mg/L, 3: 1.99 mg/L, 4: 3.96 mg/L, 5: 7.93 mg/L y 6: 15.83 mg/L, y AgNPs-TV= 1: 0 mg/L, 2: 1.61 mg/L, 3: 3.23 mg/L, 4: 6.45 mg/L, 5: 12.9 mg/L y 6: 25.8 mg/L).

El efecto bactericida de los AgNWs se evaluó de igual forma que las AgNPs en las cepas ATCC 25922 (*E. coli*) y ATCC 25923 (*S. aureus*). En la figura 26 se observa como el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano es directamente proporcional a la concentración de

nanoalambres de plata. El efecto inhibitorio es evidente en ambas bacterias en la mayor concentración de AgNWs (25.8 mg/L). En el caso de *S. aureus* la inhibición de la bacteria es más notable con los AgNWs que con las AgNPs.

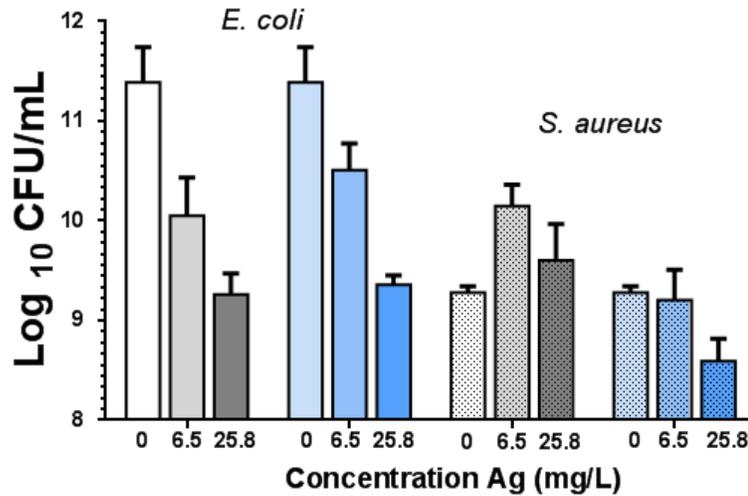


Figura 26. Inhibición del crecimiento en las cepas ATCC 25922 (*E. coli*) barras grises y azules lisas, ATCC 25923 (*S. aureus*) barras grises y azules moteadas, nanoalambres de plata (barras azules) y nanopartículas de plata (barras grises).

La evaluación del efecto bactericida de las AgNPs-C y AgNP-TV hasta los 30 min, mostró que hay crecimiento bacteriano incontable para las tres bacterias en la máxima concentración evaluada.

Los desinfectantes a base de QACs en comparación con los de I₂PVP tienen una CMI menor. Mientras que con una menor concentración las AgNPs son capaces de inhibir o disminuir el crecimiento bacteriano; no obstante, los desinfectantes siguen siendo la opción para el control del crecimiento bacteriano a corto tiempo, ya que el efecto de las partículas de observo hasta las 24 h.

VIII. DISCUSIÓN

8.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas y nanoalambres de plata

La participación de los compuestos orgánicos de los extractos usados en la síntesis está ampliamente reportada en la literatura (Amaladhas *et al.*, 2012, Bhaumik *et al.*, 2015, Geethalakshmi y Sarada, 2012, Hussain y Khan, 2014, Mittal *et al.*, 2013). En este trabajo se determinó la concentración de compuestos fenólicos totales (CFT) que se encontraban en los extractos empleados en la síntesis de AgNPs y AgNWs, donde el té verde-C con 79.13 g EAG/100 g de materia seca es el que mayor cantidad de CFT presenta, mientras que el té verde-L con 57.34 g EAG/100 g de materia seca es el que menor concentración de CFT tiene, en estudios previos se ha determinado que la CFT es de 58.8 mg de ácido clorogénico/g de peso seco (Rababah *et al.*, 2004), en otro trabajo empleando también ácido gálico para la curva patrón se ha encontrado una concentración de CFT de 14.32 a 21.02 g de EAG/100 g de materia seca en el té verde, esta concentración está por debajo de los valores reportados en el presente trabajo (Anesini *et al.*, 2008). La diferencia en la CFT entre los téis usados en este estudio y con la literatura a pesar de ser la misma planta (*Camellia sinensis*), se atribuye a factores como el lugar de cultivo, al estado de la planta cuando se cosechó y el proceso que recibió para su comercialización, y a factores relacionados con el método de extracción y determinación de los compuestos como la concentración de los reactivos, y las condiciones de incubación (luz y tiempo), así como el compuesto fenólico usado para la curva patrón (Prior *et al.*, 2005).

No importando la concentración de CFT de cada extracto, se observó un cambio de tonalidad en la solución cuando se puso en contacto el extracto con la solución de AgNO₃. Una evidencia de la formación de las AgNPs es el cambio de coloración de una solución transparente a amarillo-marrón. El cambio de tonalidad no solo se ha observado en síntesis con extracto de té verde (Bhaumik *et al.*, 2015, Loo *et al.*, 2012, Vilchis-Nestor *et al.*, 2008), también se ha reportado en síntesis con diferentes extractos y cuando son sometidas a irradiación solar (Amaladhas *et al.*, 2012, Tang *et al.*, 2015). Los cambios de coloración se relacionaron con el aumento de absorbancia y aparición de la banda de resonancia de plasmón superficial de la plata entre 400-450 nm. La aparición de esta banda se observó a partir de los 20 min de la síntesis y se ha relacionado con la formación y estabilidad de la AgNPs. Vilchis-Nestor *et al.* (2008) y Jia *et al.* (2015) mencionan que las AgNPs obtenidas con extracto de *C. sinensis* son estables y la síntesis se ha completado después de 4 h, en este caso empleando el mismo agente reductor la absorbancia sigue aumentando por lo menos hasta

las 24 h después de haber iniciado la síntesis. Ya que el tiempo de síntesis es uno de los factores importantes en la obtención de AgNPs, Bhaumik *et al.* (2015) monitorearon el cambio de la absorbancia hasta por poco más de 40 h, y encontró que no hay cambios significativos entre 5 y 30 h. Sin embargo, Amaladhas *et al.* (2012) reportan que hasta los 42 días hay un aumento en la absorbancia cuando la síntesis de AgNPs se realiza con extracto de *Cassia angustifolia*, en este trabajo también se observó que hay un aumento en la absorbancia hasta los 60 días. Con el aumento en la absorbancia también se presentaba un desplazamiento de la banda característica hacia el espectro infrarrojo, este cambio en la longitud de onda máxima se atribuye principalmente a cambios en el tamaño y forma de las partículas (Sun *et al.*, 2002). La variación de los espectros con respecto de la temperatura de extracción del té verde no influye drásticamente en la apariencia del espectro UV-Visible, es importante mencionar que las síntesis se realizaron a ~30 °C, cercana a esta temperatura otras síntesis se han realizado obteniendo resultados favorables (Amaladhas *et al.*, 2012). Sin embargo, Bhaumik *et al.* (2015) reporta que la temperatura ideal de síntesis es de 45 °C con extracto de té verde.

Con respecto a el pH, Amaladhas *et al.* (2012) y Bhaumik *et al.* (2015) con extracto de *C. angustifolia* y *C. sinensis* respectivamente, reportan que a pH básico se favorece la formación de las AgNPs. En el trabajo de Amaladhas *et al.* (2012) se muestran picos estrechos similares a los de las figuras 12C y 12D cuando la síntesis de AgNPs se realiza entre un pH de 10 y 11; sin embargo, en este trabajo se observó que la cinética de las bandas varía drásticamente cuando el pH va de 10.42 a 10.39. De acuerdo con Amaladhas *et al.* (2012) y Bhaumik *et al.* (2015) las síntesis de AgNPs no es beneficiada a pH ácidos, debido a que no hay cambio de color en la solución y como muestra la figura 12A, la señal de la resonancia superficial del plasmón de las AgNPs aparece dos días de síntesis. La usencia de color se puede relacionar con que no se forma el complejo Ag_4^{2+} -EGCG que es responsable de la cambios de coloración, la EGCG es parte de los compuestos fenólicos del té verde (Hussain y Khan, 2014).

Las morfologías de las AgNPs sintetizadas fueron cuasi-esféricas, prismas triangulares, barras y hexágonos, estas morfologías ya han sido previamente reportadas en síntesis con *C. sinensis* (Figura 13 y 14) (Bhaumik *et al.*, 2015, Jia *et al.*, 2015, Loo *et al.*, 2012). A diferencia del tamaño donde se observó como las AgNPs incrementan en relación del tiempo de síntesis, la morfología no cambia a través del tiempo. El aumento del tamaño se relacionó con el incremento de absorbancia encontrado en los espectros de espectroscopia UV-Visible y el desplazamiento de la banda hacia el espectro

infrarrojo. La influencia del tiempo sobre el tamaño de la partícula se ha reportado en trabajos como el de Li *et al.* (2007), donde se encontró que el diámetro de las AgNPs con extracto de *Capsicum annuum* a 5 h es de 10 nm mientras que a las 13 h alcanzaron un diámetro de 40 nm (Li *et al.*, 2007). Con base a los diámetros promedio reportados en la tabla 10, el tamaño de las partículas obtenidas con extracto de té verde-L después de los diez días ya no presenta variación. Con respecto a las partículas obtenidas con el té verde-I el tamaño de las partículas tiene menos variación hasta las 23 h que se evaluaron.

Además del tiempo, Moulton *et al.* (2010) encontró que el rango del tamaño de las partículas es proporcional a la cantidad del extracto del té, por ejemplo en una relación de 1:1 (ion metálico:té Red label) las partículas van de 6.7 ± 2.9 nm hasta 91.3 ± 20.9 nm y para una relación 20:1 el tamaño de las partículas es de 3.8 ± 0.88 nm hasta los 25.9 ± 6.8 nm de diámetro (Moulton *et al.*, 2010). En este trabajo la relación que se mantuvo fue de 20:1 (AgNO₃: té verde) pero el tamaño de las partículas difiere con lo reportado por Moulton *et al.* (2010) en este caso van de 5 – 98 nm con té verde-L y de 7 -86 nm con el té verde-I, la diferencia se atribuye a la tipo de extracto usado.

Como se mencionó previamente el extracto de *C. sinensis* es uno de los más usados para la síntesis de AgNPs y los diámetros promedio reportados van desde los ~ 100 nm (Bhaumik *et al.*, 2015) hasta los 4 nm (Loo *et al.*, 2012), un diámetro intermedio entre los anteriores tamaños es de 53.2 ± 7.1 nm con té verde (Jia *et al.*, 2015); los diámetros promedio de las partículas en los diferentes tiempos de síntesis (Tabla 10) obtenidas en este trabajo está cercano al que reporta Jia y colaboradores (2015). No obstante, el tamaño de las nanopartículas de plata de este trabajo son más cercanas a los reportados por Dubey *et al.* (2013) donde los diámetros de las partículas son de 25, 28, 31, 34 y 42 nm usando extracto de *Vaccinium vitis*, *Taraxacum officinale*, *Alchemilla* spp., *Urtica dioica* y *Tanacetum vulgare*, respectivamente (Dubey *et al.*, 2013). En una revisión de Rajan *et al.* se encontró que las morfologías de las AgNPs son en su mayoría esféricas y los tamaños van desde los 5 hasta los 90 nm; mostrando que las partículas obtenidas en este trabajo tienen características similares a las de la literatura (Rajan *et al.*, 2015). Es importante mencionar que entre estos trabajos las condiciones de síntesis son diferentes.

Si bien es cierto que la biosíntesis de nanomateriales tiene gran relevancia, la comparación particularmente de las AgNPs obtenidas en este trabajo con las de la literatura representa una desventaja; debido a que cada autor refiere condiciones de síntesis (temperatura de extracto, tiempo

de síntesis, concentración del ion metálico y del agente reductor, y tipo de precursor metálico, así como tipo de agente reductor) con base al objetivo particular del trabajo.

Las imágenes de SEM (Figura 13 y 19) mostraron que partículas de diámetro ~ 83 nm tienen adheridas partículas de ~5-10 nm, además se observaron que partículas de similar tamaño se autoensamblan (Figura 14), esto se pueden explicar con la teoría de madurez de Ostwald (Ostwald ripening). La teoría dice que los electrones de las partículas pequeñas (≤ 10 nm) al ser más inestables, buscan estabilidad y la encuentran uniéndose a partículas de mayor tamaño (≥ 10 nm), las cuales comienzan a crecer aumentando su estabilidad (Thanh *et al.*, 2014). La teoría de madurez de Ostwald es el proceso que explica el crecimiento de las partículas e involucra dos tipos de crecimiento: de forma ordenada por un proceso orientado que se ajusta al auto ensamblaje de partículas (Figura 14) o de forma desordenada por un proceso de coalescencia como se observa en las figuras 13 y 19 (Thanh *et al.*, 2014). Es importante mencionar que tanto las partículas de menor tamaño adheridas a las de mayor diámetro como el auto ensamblaje de partículas no se ha reportado en AgNPs por biosíntesis.

La importancia de los compuestos orgánicos de los extractos se ha demostrado en varios reportes. En este caso, las imágenes de TEM (Figura 15) muestran que las partículas tienen una capa que puede estar formada por la materia orgánica del té verde. De acuerdo con las imágenes de TEM reportadas por Amalahas *et al.* (2012) y Bhaumik *et al.* (2015) las imágenes de este trabajo soportan la hipótesis de la participación de los compuestos fenólicos en la estabilidad de las AgNPs. Particularmente con el té verde se ha reportado que una de las principales moléculas que intervienen en la estabilización de las NPs es la epigallocatequina-3-galato; debido a la presencia de grupos -OH en la molécula, los cuales por reacciones oxido-reducción forman grupos O^- que atrapan a las AgNPs (Figura 3) dando apariencia de una “red” de compuestos orgánicos (Hussain y Khan, 2014). Por su parte Bhaumik *et al.* (2015) mencionan que este mecanismo sucede en todos los compuestos que tengan expuestos grupos O^- .

La presencia de los compuestos orgánicos en las AgNPs también fueron confirmados por FTIR. Entre los grupos funcionales encontrados tanto en las muestras de té como en las de AgNPs están CH, C-O-C-, C=O, -CO, C=C y -OH, los cuales forman parte de las epicatequinas, moléculas principales del té verde y a las que se les atribuye principalmente la capacidad reductora del té (Vilchis-Nestor *et al.*, 2008), la EGCG es parte de las epicatequinas. Los tres últimos grupos

funcionales fueron reportadas en AgNPs sintetizadas con *C. angustifolia* (Amaladhas *et al.*, 2012) y con *Caesalpinia coriaria* (Jeeva *et al.*, 2014), mientras que CH y OH también se identificaron en AgNPs sintetizadas con *C. sinensis* (Jia *et al.*, 2015). La presencia de estas moléculas en los diferentes extractos evidencia la importancia que tienen en la formación y estabilización de las AgNPs (Bhaumik *et al.*, 2015, Hussain y Khan, 2014).

Otra de las morfologías que se lograron obtener con extracto de té verde son los AgNWs. Los picos máximos de los espectros de espectroscopia UV-Vis se encontraron entre 352-355 nm, estos supusieron la formación de los AgNWs debido a que las bandas cercanas a ~350 nm son características de estas nanoestructuras (Cheng *et al.*, 2014, Ma y Zhan, 2014, Sun *et al.*, 2002); sin embargo, con el paso del tiempo esta banda tiende a reducir la intensidad y aumentar la banda de las nanopartículas (~400-450 nm). De acuerdo con Ma y Zhan (2014) las bandas hasta 460 nm también reflejan la presencia de AgNWs, pero el diámetro de estos aumenta considerablemente con respecto de los encontrados cuando los picos máximos de las bandas de espectroscopia UV-Visible se están a una longitud de onda de ~350 nm.

Los AgNWs se consiguieron a ~45 °C, con adición directa del PVP y con extracto de té verde, estas condiciones de síntesis son contrastantes con lo reportado. La síntesis de los AgNWs se ha reportado a temperaturas de hasta 150 °C por el método de poliol (Cheng *et al.*, 2014, Ma y Zhan, 2014, Patarroyo *et al.*, 2016); sin embargo, en síntesis de AgNWs con extractos de *Cassia fistula* y *Coscinuim fenestratum* la temperatura reportada está alrededor de 30 °C la cual es más cercana a la encontrada en este trabajo (Jacob *et al.*, 2012, Lin *et al.*, 2010). Con respecto al orden de los reactantes, tiene un efecto determinante en la formación de los AgNWs; la adición del PVP a la solución favoreció la presencia de AgNWs, contrario a lo que menciona Cheng *et al.* (2014) y Ma y Zhan (2014), quienes reportan que la dilución del PVP previa a la adición del ion precursor permite la formación de los AgNWs (Cheng *et al.*, 2014, Ma y Zhan, 2014).

Otro factor determinante es el peso molecular del PVP, de acuerdo a Patarroyo *et al.* (2016) la longitud influye drásticamente en las estructuras 1D, de tal forma que a mayor peso molecular (1 300 000) se obtienen NWs y a menor peso molecular (360 000) se formarían nanobarras (NRs); en este caso con una molécula de PM 40 000 se consiguieron nanoestructuras desde barras hasta alambres. De acuerdo con Ma y Zhan (2014), el efecto del agente direccionador está en función de la concentración y no del peso molecular, esto por el método de poliol. Los autores reportan que

0.45M de PVP 40 000 es idóneo para obtener alambres de 80-323 nm de diámetro y de 3.7 a 14.3 μm de longitud, estas dimensiones son menores para la longitud (0.84 a 1.38 μm) y mayores a los diámetros determinados (50 a 61 nm) con una concentración de 0.003 g de PVP 40 000 por biosíntesis. El aumento del PVP en la síntesis de los AgNWs por biosíntesis disminuye la cantidad de las nanoestructuras a diferencia del método de poliol. La importancia del PVP es porque esta molécula proporciona dirección en el crecimiento de los NWs o NRs por su capacidad de establecer enlaces de coordinación con el plano cristalográfico (100) permitiendo el crecimiento en dirección del plano (111) (Ma y Zhan, 2014, Patarroyo *et al.*, 2016).

Una característica de los alambres fue la unión entre ellos; la presencia de uniones entre dos o más barras fue descrita por primera vez por Chen y Gao (2004), con base a lo reportado por los autores y a las imágenes de TEM (Figura 21) se puede asumir que primero hay una formación de NRs y cuando dos o más están muy próximos, los átomos de Ag cercanos a la zona favorecen la unión de los NRs, la unión de los NRs forma AgNWs en zig-zag (Figura 21C) (Chen y Gao, 2004). Esta forma de estructura se atribuye al proceso de maduración Ostwald, es decir, las partículas pequeñas son atraídas permitiendo el continuo crecimiento de los alambres en zig-zag. Más tarde, Ma y Zhan (2014) reportan que la presencia de AgNWs en zig-zag se da después de un tiempo prolongado de síntesis, lo autores soportan que estos AgNWs se forman por la unión de dos NRs inmediatos. En este trabajo el tiempo de síntesis de los AgNWs fue de 24 h, sin embargo, Jacob *et al.* (2012) con extracto de *C. fenestratum* después de 24 h no reporta uniones entre los NRs de plata. Otro argumento para explicar la presencia de los AgNWs en zig-zag, es el daño que sufren las estructuras por el proceso de lavado (Kan *et al.*, 2008); en este caso esto no es aceptado porque las imágenes de SEM y TEM descartan la posibilidad de que los AgNWs en zigzag se formen durante la preparación de las muestras para TEM como lo propone Kan *et al.* (2008).

La formación de los AgNWs se ha reportado por la presencia de partículas pentagonales, una forma de confirmar el tipo de partículas involucradas en el crecimiento de las nanoestructuras es por la terminación de los AgNWs. Como se muestra en la figura 21B, los AgNWs tiene una terminación redondeada, diferente a la que muestra Ma y Zhan (2014), pero similar a los encontrado por Sun *et al.* (2003), aunque los autores obtienen partículas pentagonales durante la síntesis (Sun *et al.*, 2003). La formación de las partículas cuasi-esféricas propone que los AgNWs sintetizados con extracto de té verde se formaron a partir de este tipo de morfología de la partícula, aunque no se descarta la influencia de las partículas pentagonales debido a que también se identificaron.

8.2. Efecto bactericida de AgNPs, AgNWs y desinfectantes

Los porcentajes de resistencia en *E. coli* encontrados en este trabajo para los antibióticos NA (53.33%), CIP (40%) y CTX (6.25%) son mayores que los reportados en 2015 por Aguilar-Montes de Oca y colaboradores (2015). Los autores reportan aislamientos de *E. coli* obtenidos de canales de carne de bovinos con los siguientes porcentajes de resistencia de 30, 10, 32, 1.3% para NA, CIP, AM y CTX, respectivamente; sin embargo, con AM los valores se mantienen similares en ambos trabajos. La TE fue el antibiótico al que mayor número de aislamientos presentaron resistencia (66.67%), el porcentaje de resistencia aumento considerablemente con respecto al 14 % reportado para la misma bacteria procedente de ganado vacuno (Guerra *et al.*, 2003). En aves de corral la resistencia a este antibiótico también es elevado ya que más de la mitad de los aislamientos (104 de 197) de *E. coli* tienen resistencia (Diarra *et al.*, 2007). Los resultados aunados a los previos reportes muestran que la TE es uno de los antibióticos más usados en el tratamiento de infecciones por Enterobacterias, y se suma a los de uso común como los β -lactámicos y las quinolonas (Aguilar-Montes de Oca *et al.*, 2015).

Salmonella spp. es uno de los principales agentes involucrados en las ETAs. En este estudio los aislamientos provenientes de canales de carne bovina presentaron resistencia a CIP, NA, CAZ, TE y CTX. Siendo TE (73.33%) el antibiótico donde se encontró mayor número de aislamientos resistentes, seguido de CTX (37.95%) y de NA y CAZ ambos con el 25 %. Los altos porcentajes de resistencia a TE han sido previamente reportados por Chen *et al.* (2004). Ellos mencionan que el 68% de los aislamientos de *Salmonella* spp. aisladas de carne de origen estadounidense son resistentes a TE, mientras que el 43% de los aislamientos obtenidos de carne de origen chino presentó resistencia a este antibiótico, este trabajo se realizó en Estados Unidos de América (EUA). Mientras que para México se ha reportado un 33.33% de aislamientos de *Salmonella* spp. resistentes a TE (Varela-Guerrero *et al.*, 2013). A diferencia de TE, en NA los resultados de este estudio son inferiores a los de la literatura, es decir, en aislamientos procedentes de la carne oriunda de China se encontró un 32% de resistencia (Chen *et al.*, 2004), mientras que Varela-Guerrero *et al.* (2013) reportan un 43% de resistencia. De igual forma, en un estudio realizado en Yucatán se encontró resistencia del 58% a NA en aislamientos obtenidos de carne de puerco y de muestras humanas (Zaidi *et al.*, 2007).

La resistencia de las bacterias a antibióticos está ligada al uso frecuente de estos, ya que en el caso de infecciones con *Salmonella* spp. los antibióticos frecuentes para el tratamiento son la ampicilina,

estreptomicina, cloranfenicol, sulfonamidas, ceftriaxona y ciprofloxacina (Chen *et al.*, 2004, Varela-Guerrero *et al.*, 2013). Con base en los reportes de las zonas donde se han realizado los estudios (EUA, México zona centro y Yucatán) se puede decir que en la zona centro de México y en EUA se está haciendo un uso irracional de la TE y en el sur del país (Yucatán) se recurre al NA, una quinolona para el tratamiento de infecciones en los animales. Además, se encontró que hay antibióticos como las CIP que aunque pueden usarse en el tratamiento, son poco o no usados debido a que no se reporta resistencia, como en los trabajos realizados en EUA y en Yucatán (Chen *et al.*, 2004, Zaidi *et al.*, 2007), mientras que en el centro de México se encontró un 6.9% de resistencia a este antibiótico.

Con respecto a la sensibilidad de *S. aureus*, bacteria que se involucra con las ETAs y con las infecciones intrahospitalarias, se encontró resistencia a la CIP (25%), P (25%), VA (58.33%), E (66.67%), MAC (8.33%), CC (8.33%) y CF (41.67%). El porcentaje de resistencia a CIP de este estudio es mayor en comparación con el reportado en aislamientos obtenidos de dos hospitales de la ciudad de México (11.7%), en este mismo trabajo se encontró que las bacterias son sensibles a VA, mientras que en este estudio se encontró un 58.33% de resistencia (Calderón-Jaimes *et al.*, 2002). cuando las bacterias son resistentes a la CIP, CC y CF son usados como alternativas en el tratamiento; sin embargo, en este trabajo las bacterias aisladas fueron resistentes a estos antibióticos por lo que su uso en el tratamiento de infecciones por *S. aureus* puede ser estéril. En Portugal los porcentajes de resistencia de *S. aureus* también son alarmantes, ya que presentan resistencia a GE (82.5%), E (82.5%), CC (16.4%), TE (14.6%) y SXT (12.8%), estos porcentajes son muy similares a lo que se reporta en este trabajo para E y CC, pero no para SXT y GE los resultados difieren ya que los aislamientos evaluados aquí son sensibles a estos antibióticos (Amorim *et al.*, 2007). Particularmente con esta bacteria los resultados de este trabajo con respecto a los de la literatura muestran como ha ido en aumento la resistencia, así como la gama de antibióticos a los que las bacterias son resistentes. Los resultados específicamente comparados con los de Calderón-Jaimes *et al.* (2002) señalan que en México existe un pobre seguimiento sobre la sensibilidad bacteriana, pese a que son bacterias involucradas en la salud humana.

Los resultados de este trabajo contrastados con los descritos en la literatura, señalan que la resistencia bacteriana a los antibióticos sigue incrementando (Zaidi *et al.*, 2007) y concordando con lo que reporta la WHO sobre el aumento de resistencia a antibióticos en las bacterias, principalmente las de importancia en la salud pública como son *E. coli*, *Salmonella* spp. y *S. aureus*

(WHO, 2017). En el caso de *E. coli*, en México desde 1987 se reportó como un agente de importancia en infecciones bacterianas para la población infantil en Guadalajara (Mathewson *et al.*, 1987). No obstante, estas especies bacterianas también tienen importancia en producción cárnica del país por provocar ETAs. Pese a la importancia de estas bacterias en las ETAs, hay muy pocos estudios que reflejan el estado de sensibilidad antimicrobiana de bacterias procedentes de alimentos.

En la actualidad el incremento de la resistencia bacteriana está ligada al uso indiscriminado de los antibióticos y al uso irracional de los desinfectantes, que además puede relacionarse con la resistencia cruzada entre estos compuestos principalmente con QACs, como se ha mencionado en la literatura.

Siendo los QAC algunos de los compuestos más estudiados, se evaluó el cloruro de benzalconio (CB), compuesto encontrado en la formulación comercial de QAC también usada en este trabajo. Las CMI en *E. coli* fueron de 64 mg/L con QAC-C y de 128 mg/L con QAC-P en el caso de *E. coli*. Las CMI aquí encontradas para *E. coli* son superiores a las reportadas por Soumet *et al.* (2012), los autores hallaron una CMI de 16-32 mg/L en *E. coli* de aves y de puercos, con la misma especie bacteriana pero aislada de muestras fecales de pandas gigantes se encontró una CMI de 32 -64 mg/L (Guo *et al.*, 2015); no obstante, la CMI de *E. coli* de este trabajo comparadas con las obtenidas en aislamientos de bacteriemias (4-8 mg/L) son 4 veces mayores (Buffet-Bataillon *et al.*, 2012). Con respecto a *Salmonella* spp. se encontró una CMI de 64 mg/L con QAC-C y con QAC-P, que es superior a la CMI (15 mg/L) de *Salmonella* Hvittingfoss S41 (Condell *et al.*, 2012); mientras que para *S. aureus* ATCC 25923 se ha reportado una CMI de 2 mg/L, concentración similar a la encontrada en este trabajo (CMI 2 mg/L) (Furi *et al.*, 2013). De acuerdo con los reportes de Zhang *et al.* (2016) y Sidhu *et al.* (2002) las bacterias que presentan CMI de ≥ 31 mg/L son resistentes y ≤ 30 mg/L son sensibles a CB; estas concentraciones fueron establecidas para varias especies bacterianas que se obtuvieron de monitoreos de granjas y carne para consumo (Sidhu *et al.*, 2002, Zhang *et al.*, 2016a) Considerando los rangos establecidos por los autores, las tres especies bacterianas evaluadas en el trabajo son resistentes a CB. Zhang y colaboradores (2016) hacen la aclaración de que CMI ≥ 50 mg/L tienen elevado nivel de resistencia, esto es soportado para *Salmonella* debido a que cuando la bacteria es sometida constantemente a CB alcanza una CMI de 50 mg/L categorizando a la bacteria como resistente al desinfectante (Condell *et al.*, 2012). Es importante resaltar que *S. aureus* requiere de una CMI menor de CB que *Salmonella* spp. y que *E.*

coli, este comportamiento entre las bacterias fue reportado previamente entre *S. aureus* y *E. coli* obtenidas de rastros de cabras y corderos (Lavilla-Lerma *et al.*, 2013).

Con esto último y con los resultados encontrados cabe la posibilidad de aceptar la hipótesis que menciona que uno de los factores causantes de aumento en CMI de las bacterias es el uso de concentraciones sub-letales de los desinfectantes; así como la amplia distribución de los antibióticos en los alimentos para ganado (Condell *et al.*, 2012, Li *et al.*, 2016, Zhang *et al.*, 2016a). Esta hipótesis es favorecida por resultados como el de Guo *et al.* (2015) quienes reportaron un aumento de 32 a 64 mg/L cuando las bacterias son resistentes a antibióticos, inclusive el aumento de las CMI de los desinfectantes se ha relacionado con la resistencia a determinados antibióticos, por ejemplo, en aislamientos de *E. coli* resistentes a amoxicilina, cefotaxima, trimetoprim/sulfametoxazol y ciprofloxacina la CMI de CB es de 64 mg/L mientras que bacterias sensibles a estos es de 4-8 mg/L (Buffet-Bataillon *et al.*, 2012). Sin embargo, esto no es completamente aceptado porque existen estudios que muestra que la CMI de CB no se relaciona con la resistencia a antibióticos, de tal forma que bacterias resistentes a TE, estreptomycin y sulfametoxazol tienen una CMI de 16 mg/L mientras que bacterias sensibles tienen una CMI de 32 mg/L. Considerando esto, la CMI es indiferente a la sensibilidad de la bacteria, lo que refleja que la comparación entre la CMI y sensibilidad de las bacterias a antibióticos no se puede establecer como un criterio para aceptar la hipótesis de resistencia cruzada (Rutala *et al.*, 1997, Soumet *et al.*, 2012).

No obstante, Rutala *et al.* hace referencia a que las CMI no son válidas, dado que en la práctica las concentraciones empleadas al menos de QACs alcanzan los 500 mg/L y son usadas por tiempos cortos (Rutala *et al.*, 1997). Con base a lo anterior, reportes de la evaluación de los QACs en un periodo corto son pocos y este trabajo aporta información sobre las concentraciones mínimas usadas para inhibir el crecimiento hasta los 30 min de exposición. En este caso las tres bacterias evaluadas requirieron de una concentración mínima de 128 mg/L para inhibir el 100% después de 10 min con QAC-P a diferencia del QAC-C que requirió de hasta 15 min de exposición con la misma concentración para *E. coli* y *Salmonella* spp.; mientras que *S. aureus* con 64 mg/L después de 5 min se inhibió el crecimiento del 100% de los aislamientos con ambos QACs probados. Para estos compuestos solo se encontró un documento que reporta que *Salmonella* requiere de una concentración mínima de 100 mg/L a los 5 min y conforme aumenta el tiempo la concentración disminuye hasta 6.25 mg/L a los 30 min (Condell *et al.*, 2012), es importante mencionar que la

concentración mínima de un periodo corto duplica la CMI encontrada a 24 h, esto concuerda con que las CMI de 24 h no tienen efecto en la práctica (Penna *et al.*, 2001, Rutala *et al.*, 1997).

A diferencia de los QACs, los estudios con iodopavidona son pocos. En este trabajo se encontró que las CMI de *S. aureus* son menores cuando el I₂-PVP es comercial y aumenta cuando el I₂-PVP es puro. Los resultados de Azizoglu *et al.* (2013) donde 29/37 aislamientos de *S. aureus* presentaron una CMI 1500 mg/L y 3/37 requirieron 500 mg/L y solo un aislamiento tuvo una CMI de 2000 mg/L, están dentro de las concentraciones encontradas para I₂PVP-C, pero son inferiores cuando se trata de I₂PVP-P que se requiere de hasta una CMI de 4025 mg/L para las bacterias evaluadas (Azizoglu *et al.*, 2013). La elevada CMI (6250 mg/L) de iodopavidona para *S. aureus* ya había sido reportada (Penna *et al.*, 2001). En el caso de *E. coli* y *Salmonella* spp. las concentraciones de iodopavidona encontradas fueron de 1000 y de 4025 mg/L para I₂PVP-C y I₂PVP-C, respectivamente. Estas concentraciones son mayores a las reportadas previamente para *E. coli* (600 µM) y *Salmonella* spp. (500 µM) (Zubko y Zubko, 2013); no obstante, Penna *et al.* (2001) reporta una CMI para *E. coli* es de 1250 mg/L. Aunque las CMI aquí reportadas son soportadas por las encontradas en la literatura, las concentraciones altas con este desinfectante no eran esperadas, ya que la acción de iodopavidona se debe a la disponibilidad de iodo libre en la solución, entonces los iones se encuentran más disponibles a bajas concentraciones por el debilitamiento de enlace que hay entre el polímero y el iodo, mientras que cuando la solución está saturada esta unión es fuerte y la cantidad libre de iodo es menor (Berkelman *et al.*, 1982). Sin embargo, la explicación de este mecanismo de acción no considera la resistencia de las bacterias y la constante interacción entre el iodopavidona y la bacteria a través de los años.

De acuerdo con Rutala *et al.* (1997) y con Penna *et al.* (2001) las concentraciones de los desinfectantes en la práctica clínica son superiores a las CMI, esto principalmente porque el tiempo de exposición tanto de superficies vivas como inertes es de minutos y no de horas. En el presente estudio se encontró que la concentración mínima para inhibir el crecimiento de *S. aureus*, *Salmonella* y *E. coli* supera los 1000 mg/L de I₂PVP-C aun después de 30 min de exposición. A diferencia de I₂PVP-P que requiere de más de 4025 mg/L para inhibir el crecimiento del 90 % de los aislamientos de *E. coli*, menos de la mitad de los de *Salmonella* spp. y ninguno de *S. aureus*. Estos resultados no concuerdan con la literatura, donde se reporta que desde los 15 s hasta los 4 min la concentración ideal va desde 100-1000 mg/L para inhibir el crecimiento de *S. aureus* (Berkelman *et al.*, 1982). En años recientes, 100 mg/L siguen teniendo actividad desde los 5-30 min de

exposición sobre *E. coli* (Heiner *et al.*, 2010). Las diferencias entre los resultados, se pueden explicar con la diferencia de tiempo entre los reportes, debido a que el uso del desinfectante se ha mantenido constante principalmente en hospitales (*S. aureus*) e industrias alimentarias (*Salmonella* spp. y *E. coli*), aunado a la presión selectiva del ambiente que favorecen la disminución de sensibilidad a los desinfectantes, esto porque son aislamientos de carnes y heridas (McDonnell y Russell, 1999). Por otra parte, la diferencia de concentraciones entre el I₂PVP-C y I₂PVP-P se atribuye a la presencia de compuestos adicionales al yodo en la solución comercial para mejorar la actividad bactericida del producto.

Particularmente, *S. aureus* fue la bacteria que mayor concentración requiere para su inhibición cuando se expone a iodopavidona, mientras que cuando es tratada con QACs la concentración requerida es la menor en comparación con las otras bacterias, mientras que con los desinfectantes QACs la concentración de las bacterias Gram negativas aumenta respecto a *S. aureus* y las concentraciones disminuyen cuando son tratadas con I₂PVP. Esto se explica por el uso e interacción bacteria-desinfectantes, ya que los QACs son ampliamente usados sobre superficies inertes donde es frecuente encontrar a *E. coli* y *Salmonella* spp. y el I₂PVP se usa sobre heridas y tejidos vivos, sitios de donde se obtuvieron los aislamientos usados en el presente trabajo.

En la actualidad los nanomateriales han tomado importancia para las áreas de salud. En el presente trabajo se evaluaron dos tipos de AgNPs, una comercial y la otra corresponde a partículas obtenidas por síntesis verde. Es importante mencionar que las soluciones de AgNPs se prepararon con una concentración de 30 mg/L; sin embargo, cuando se determinó la concentración real por ICP-MS de cada solución se encontró que para AgNPs-C es de 15.83 mg/L y para AgNPs-TV es de 25.8 mg/L, la variación en las concentraciones se atribuye a los lavados que se realizan para retirar materia orgánica en el caso de las AgNPs-TV, mientras que en las partículas comerciales se observa una pérdida mayor aunque en ellas no se realizó ningún lavado pero se puede relacionar con el método de preparación de muestra. La determinación de Ag presente en la solución por ICP-MS es ampliamente usada y también se han reportado importantes diferencias entre las concentraciones iniciales con respecto de las finales obtenidas por este método (Guzman *et al.*, 2012).

La evaluación de la actividad biocida de las partículas mostró que para la inhibición de *S. aureus* se requiere una mayor concentración de AgNPs-TV (25.8 mg/L) la cuales tienen un diámetro de 40.63 ± 21.71 nm; pero con AgNPs-C (diámetro ≤ 100 nm) a una concentración de 7.93 mg/L se logró

disminuir el crecimiento de la bacteria. Estos resultados no concuerdan con la literatura porque aquí se obtuvieron las menores CMI con partículas ~ 100 nm y se ha reportado que cuando el diámetro de la partícula aumenta la CMI también, de tal forma que partículas con diámetro de 7 nm tienen una CMI de 7.5 mg/L para *S. aureus* (Martinez-Castañón *et al.*, 2008), otro es el caso de AgNPs estabilizadas con PVP (similares a las AgNPs-C de este trabajo) de 8-11 nm de diámetro con una concentración de 16.1 mg/L se inhibió el crecimiento de *S. aureus* (Bondarenko *et al.*, 2013). Esto concuerda con lo reportado anteriormente donde las partículas con diámetro de 1-10 nm son excelentes como inhibidoras de crecimiento bacteriano (Morones *et al.*, 2005). En el caso de *E. coli* se encontró una CMI de 7.93 mg/L con AgNPs-C y con AgNPs-TV se inhibió el crecimiento en un 97% con 25.8 mg/L, la concentración encontrada para AgNPs-C es similar a la reportada previamente con AgNPs-PVP (8.9 mg/L) (Bondarenko *et al.*, 2013). Para el caso de *Salmonella* spp. se encontró el 91% de inhibición en el crecimiento bacteriano con 7.93 mg/L de AgNPs-C y del 65% con 25.8 mg/L de AgNPs-TV. De las tres bacterias evaluadas, *Salmonella* spp. fue la que menor inhibición de crecimiento bacteriano presentó, este comportamiento de la bacteria ya se había reportado en un estudio donde usó el método de difusión y se observó que las partículas obtenidas por extracto de *Annona squamosa* no tienen ningún efecto sobre *Salmonella* spp. y *Proteus vulgaris*, a diferencia de *S. aureus* que sí se logró la inhibición de crecimiento (Jagtap y Bapat, 2013).

Considerando los resultados conseguidos, las CMI de las bacterias incrementan cuando se exponen a AgNPs-TV, esta característica fue también reportada por Bondarenko *et al.* (2013) quienes reportan que las AgNPs sin molécula estabilizante (sin PVP) no logran inhibir el crecimiento bacteriano a las concentraciones evaluadas (0.01-100 mg Ag/L) por los autores. La importancia de las moléculas estabilizadoras de AgNPs que a su vez están relacionadas con la dispersión de las partículas también se observó con la hidracina-AgNPs y el citrato de sodio-AgNPs, las cuales disminuyen e incrementan la CMI, respectivamente (Guzman *et al.*, 2012). Con base a lo mencionado anteriormente y con las diferentes concentraciones de AgNPs encontradas en este trabajo, es posible decir que la molécula estabilizante, como el PVP en las AgNPs-C y moléculas orgánicas del té verde en AgNPs-TV están jugando un papel importante en la dispersión y por lo tanto en la actividad bactericida de las nanopartículas de plata. Además los resultados aquí mostrados como los encontrados en la literatura muestran que la dispersión de las partículas tiene mayor importancia que el tamaño de la partícula en el efecto bactericida (Bondarenko *et al.*, 2013).

Esto se debe a que la acción bactericida de la partícula se encuentra relacionada con la interacción directa ente AgNPs-bacteria y con la formación de agregados (AgNPs sin molécula que facilite la dispersión) la interacción entre célula-NPs disminuye.

Otro tipo de nanoestructura que se empleó son los AgNWs, aunque en estas estructuras se evalúan principalmente sus propiedades de conductividad, también se ha observado su capacidad biocida. La concentración máxima de este trabajo fue de 25.8 mg/L para *E. coli* y *S. aureus* con la que se logró reducir el crecimiento bacteriano con respecto del control. Algunos de los estudios que evalúan la actividad biocida de los AgNWs lo hacen sobre superficies encontrando que con 1 mg/L AgNWs hay menor crecimiento de *E. coli* (Kholmanov *et al.*, 2012), esta misma concentración fue suficiente para inhibir el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus* sobre superficies manteniendo la actividad durante 30 días (Jiang y Teng, 2016). En ambos estudios la concentración usada es inferior a la evaluada en este trabajo, lo que se explica por la forma de evaluación de la actividad biocida, por otra parte los AgNWs que se evaluaron en este trabajo están acompañados de AgNPs lo que sugiere que están interviniendo con la actividad de los AgNWs. Otro de los factores a considerar es la relación volumen superficie el cual disminuye conforme aumenta el tamaño de las nanoestructuras (Zhang *et al.*, 2016b).

De forma general para las nanoestructuras, existe una amplia gama de reportes que muestran el efecto bactericida de las nanopartículas de plata con diferentes métodos de evaluación como difusión en disco, microdilución en placa o en agar, placas de agar suplementadas y evaluación en superficies (Abbaszadegan *et al.*, 2014, Bondarenko *et al.*, 2013, Inbaneson *et al.*, 2011, Morones *et al.*, 2005, Sondi y Salopek-Sondi, 2004). La diferencia entre los métodos de evaluación genera resultados diferentes, por ejemplo, para *E. coli*, *Vibrio cholera*, *P. aeruginosa* y *S. typhus* son requeridas concentraciones de 75 µg/mL para cuando las placas de cultivo son suplementadas con nanopartículas (Morones *et al.*, 2005), con un método similar muestran que para *E. coli* se requiere una concentración de 50-60 mg/L de AgNPs (Sondi y Salopek-Sondi, 2004). Pero cuando se valora la actividad de las nanopartículas por el método de difusión en disco las concentraciones disminuyen drásticamente hasta de 10 mg/L para diferentes bacterias incluyendo las evaluadas aquí (Geethalakshmi y Sarada, 2012, Jeeva *et al.*, 2014). Además del método de evaluación, la obtención de las AgNPs también influye en el efecto, en este trabajo se encontró que se requiere de una menor concentración de AgNPs-C con respecto a las AgNPs obtenidas a partir de té verde para disminuir el crecimiento bacteriano. No obstante, en otros trabajos se ha reportado que se requiere de una

menor concentración cuando las AgNPs son sintetizadas mediante microorganismos como *Lactobacillus fermentum* (Sintubin *et al.*, 2011), así como con extractos como lo menciona Abbaszadegan *et al.* (2014) quienes obtienen nanopartículas de plata con extracto de arroz y lograron disminuir el crecimiento de *Enterococcus faecalis* con concentraciones muy pequeñas (4×10^{-9} mol/L) (Abbaszadegan *et al.*, 2014). Cabe mencionar que en estos estudios la evaluación biocida se realizó por el método de microdilución, como en este trabajo. Considerando esto, es posible decir que la ausencia de un método estándar para evaluar la actividad bactericida de las nanoestructuras evita que se concluya sobre la concentración idónea para usarla como control de la proliferación bacteriana.

Además de las diferencias encontradas entre el tipo de AgNPs usada, los resultados muestran que la respuesta de las bacterias es única para cada especie. Esto se explica por la diferencia en la estructura (membrana interna, membrana externa, y presencia o ausencia de pared celular), en los mecanismos de resistencia y adaptaciones (formación de biofilm) de las bacterias (Martínez y Baquero, 2002), aunado al estado fisiológico (en fase de adaptación, exponencial, estacionaria, o de latencia) de la célula (Lara *et al.*, 2011), así como el número de células expuestas a las AgNPs (Sondi y Salopek-Sondi, 2004).

Con base a los resultados obtenidos con las nanopartículas de plata y con los desinfectantes se observa que las AgNPs son una buena alternativa para el control de bacterias con perfiles fenotípicos de resistencia, intermedio y sensibles; ya que con los QAC-C y QAC-P se encontró una CMI de 64 mg/L para *Salmonella* spp. y *S. aureus* y de 128 mg/L para *E. coli*, y con I₂PVP las concentraciones fueron desde los 500 hasta los 4025 mg/L del compuesto, con el uso de AgNPs-C a una concentración de 7.93 mg/L se inhibió al 100 % el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus* y el 91 % de *Salmonella* spp.. Esto concuerda con Chamakura *et al.* (2011), quienes reportan que las AgNPs tienen un efecto más eficiente en el control de *E. coli* y *S. aureus* que el cloro, un desinfectante ampliamente usado, este mismo efecto fue observado por Brady *et al.* (2003) con diferentes desinfectantes incluyendo QACs e hipoclorito de sodio (NaOCl), de igual forma Abbaszadegan *et al.* (2014) que muestran que AgNPs (4.0×10^{-9} mol/L) requieren de una menor concentración que la clorhexidina (2.4×10^{-5} mol/L) y el NaOCl (3.7×10^{-7} mol/L) para inhibir un porcentaje similar de bacterias pero no para inhibir completamente el crecimiento bacteriano. Los resultados sobre el prolongado tiempo de acción de las AgNPs también concuerdan con lo reportado por Besinis *et al.* (2014), quienes reportan que las AgNPs tienen una mejor efecto en *Streptococcus mutans* que el

desinfectante, para ambos (clorhexidina y AgNPs) se empleó una concentración de 100 mg/L. Con base a los resultados obtenidos y pese a la buena actividad de las AgNPs, los desinfectantes siguen siendo la mejor opción hasta el momento por la eficiencia de los compuestos a corto tiempo; mientras que las partículas evaluadas muestran un efecto bactericida hasta después de horas de contacto, concordando con otros reportes donde se observa un efecto bactericida por parte de las AgNPs hasta después de horas de interacción bacteria-AgNPs (Abbaszadegan *et al.*, 2014, Brady *et al.*, 2003, Chamakura *et al.*, 2011). No obstante, recientemente se ha reportado que otras nanoestructuras como los nanotubos de titanio funcionalizados con AgNPs inhiben el crecimiento de un *Botrytis cinerea* en 20 min, lo que muestra que las AgNPs pueden ser usadas en combinación con otras nanoestructuras para potencializar su actividad biocida (Rodríguez-González *et al.*, 2016)

Con estos resultados se puede observar que con el paso de los años la concentración necesaria para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas ha incrementado. Sin embargo, para la introducción y aplicación de nuevos compuestos tanto desinfectantes como antibióticos, estos deben poseer tres características: i) los nuevos productos deben ser mejores que los desinfectantes anteriores, ii) ser más seguros que los predecesores (Besinis *et al.*, 2014) y iii) no tóxicos al ambiente, de ahí la importancia de evaluar y comparar la eficacia de las nuevas propuestas con respecto a los compuestos existentes. Pero para las nanopartículas no hay una metodología establecida y estandarizada para evaluar su eficacia marcándose como una desventaja, a diferencia de los desinfectantes donde el método más empleado para evaluar la actividad bactericida es por micro dilución y existe una institución dedicada a regular estas metodologías (CLSI, 2012), motivo por el que se empleó este método para evaluar las diferentes respuestas de los compuestos existentes y los nanomateriales.

Uno de los criterios de la introducción de alternativas como desinfectantes es la seguridad. De acuerdo con Mukha *et al.* (2013) una concentración de 0.05 mg/L de plata es segura para el ser humano, con base en este parámetro las concentraciones de plata empleadas en este trabajo y en otros con los que se obtuvieron inhibición del crecimiento bacteriano superan esta concentración lo que evita que las AgNPs sean una alternativa en el control bacteriano. Sin embargo, para proponer contundentemente a las AgNPs como una alternativa, la efectividad de las nanopartículas tendrían que ser evaluadas con base a las normas que establecen las concentraciones seguras para su aplicación (EPA, 1980, ATSDR, 2016) y de igual manera establecer criterios permitidos en México, dado que no existen normas que regulen las concentraciones permitidas en seres vivos y los niveles

que se encuentran en las normas para suelos, agua y biosólidos están por encima de las concentraciones establecidas en normas internacionales (ATSDR, 2016). Así mismo, establecer una metodología para la evaluación de los daños a organismos y evitar la controversia en cuanto a seguridad que actualmente existe.

IX. CONCLUSIONES

La actividad bactericida de las AgNPs se observó con 25.8 mg/L, mientras que con los desinfectantes I₂PVP fue de 4025 mg/L y de 128 mg/L para QACs. Las AgNPs-C inhibieron el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*, mientras que con las AgNPs-TV solo disminuyó el crecimiento de *E. coli*.

El efecto bactericida de las AgNPs requiere de mayor tiempo (h) de exposición. De tal forma que los desinfectantes siguen siendo la primera opción para el control de las bacterias ya que tienen un efecto bactericida en un periodo de exposición corto (min).

Además de la síntesis de nanopartículas, por primera vez con el extracto del té verde se consiguió sintetizar nanoalambres de plata en presencia de PVP como agente direccionador, los cuales tienen una buena actividad bactericida en comparación con las AgNPs-TV.

Una característica resaltable es que las nanobarras son capaces de ensamblarse y formar nanoalambres de plata.

X. SUGERENCIAS

- I. Evaluar el efecto bactericida de las AgNPs en una colección de bacterias, ya que cada bacteria tiene un comportamiento diferente.
- II. Evaluar a las AgNPs con bacterias que forman biofilm
- III. Evaluar a las AgNPs en diferentes alimentos considerando los límites permitidos en las normas internacionales
- IV. Evaluar los niveles de AgNPs del suelo y su acumulación en plantas de interés para la industria agroalimentaria.

XI. LITERATURA

- Abbaszadegan, A., Nabavizadeh, M., Gholami, A., Aleyasin, Z., Dorostkar, S., Saliminasab, M., Ghasemi, Y., Hemmateenejad, B. y Sharghi, H. 2014. Positively charged imidazolium-based ionic liquid-protected silver nanoparticles: a promising disinfectant in root canal treatment. *International Endodontic Journal*, 48, 790-800.
- Aguilar-Montes de Oca, S., Talavera-Rojas, M., Soriano-Vargas, E., Barba-León, J. y Vazquez-Navarrete, J. 2015. Determination of extended spectrum β -lactamases/AmpC β -lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from bovine carcasses in Mexico. *Tropical Animal Health and Production*, 47, 975-981.
- Ahmadi, F., Abolghasemi, S., Parhizgari, N. y Moradpour, F. 2013. Effect of silver nanoparticles on common bacteria in hospital surfaces. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6, 209-214.
- Amaladhas, T. P., Sivagami, S., Devi, T. A., Ananthi, N. y Velammal, S. P. 2012. Biogenic synthesis of silver nanoparticles by leaf extract of *Cassia angustifolia*. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 3, 045006.
- Amorim, M., Faria, N., Oliveira, D., Vasconcelos, C., Cabeda, J., Mendes, A., Calado, E., Castro, A., Ramos, M., Amorim, J. y de Lencastre, H. 2007. Changes in the clonal nature and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with spread of the EMRSA-15 clone in a tertiary care Portuguese hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 2881-2888.
- Anesini, C., Ferraro, G. E. y Filip, R. 2008. Total polyphenol content and antioxidant capacity of commercially available tea (*Camellia sinensis*) in Argentina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9225-9229.
- ATSDR, Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. 2016. Plata [Online]. USA. Available: https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts146.html [Accessed 27 de Febrero 2017].
- Azizoglu, R. O., Lyman, R. y Anderson, K. L. 2013. Bovine *Staphylococcus aureus*: Dose response to iodine and chlorhexidine and effect of iodine challenge on antibiotic susceptibility. *Journal of Dairy Science*, 96, 993-999.
- Baker, S., Rakshith, D., Kavitha, K. S., Santosh, P., Kavitha, H. U., Rao, Y. y Satish, S. 2013. Plants: emerging as nanofactories towards facile route in synthesis of nanoparticles. *BioImpacts*, 3, 111.
- Berkelman, R. L., Holland, B. y Anderson, R. 1982. Increased bactericidal activity of dilute preparations of povidone-iodine solutions. *Journal of Clinical Microbiology*, 15, 635-639.
- Besinis, A., De Peralta, T. y Handy, R. D. 2014. The antibacterial effects of silver, titanium dioxide and silica dioxide nanoparticles compared to the dental disinfectant chlorhexidine on *Streptococcus mutans* using a suite of bioassays. *Nanotoxicology*, 8, 1-16.
- Bhaumik, J., Thakur, N. S., Aili, P. K., Ghanghoriya, A., Mittal, A. K. y Banerjee, U. C. 2015. Bioinspired nanotheranostic agents: synthesis, surface functionalization, and antioxidant potential. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 1, 382-392.
- Bondarenko, O., Ivask, A., Käkinen, A., Kurvet, I. y Kahru, A. 2013. Particle-cell contact enhances antibacterial activity of silver nanoparticles. *PLoS One*, 8, e64060.
- Brady, M. J., Lisay, C. M., Yurkovetskiy, A. V. y Sawan, S. P. 2003. Persistent silver disinfectant for the environmental control of pathogenic bacteria. *American Journal of Infection Control*, 31, 208-214.
- Buffet-Bataillon, S., Le Jeune, A., Le Gall-David, S., Bonnaure-Mallet, M. y Jolivet-Gougeon, A. 2012. Molecular mechanisms of higher MICs of antibiotics and quaternary ammonium

- compounds for *Escherichia coli* isolated from bacteraemia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 2837-2842.
- Cabrera, C. E., Gómez, R. F. y Zúñiga, A. E. 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*, 38, 149-158.
- Calderón-Jaimes, E., Espinosa de los Monteros, L. E. y Avila-Beltrán, R. 2002. Epidemiology of drug resistance: The case of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci infections. *Salud Pública de México*, 44, 108-112.
- Chaloupka, K., Malam, Y. y Seifalian, A. M. 2010. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, 28, 580-588.
- Chamakura, K., Perez-Ballesteros, R., Luo, Z., Bashir, S. y Liu, J. 2011. Comparison of bactericidal activities of silver nanoparticles with common chemical disinfectants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84, 88-96.
- Chapman, J. S. 2003. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 271-276.
- Chen, D. y Gao, L. 2004. Large-scale growth and end-to-end assembly of silver nanorods by PVP-directed polyol process. *Journal of Crystal Growth*, 264, 216-222.
- Chen, S., Zhao, S., White, D. G., Schroeder, C. M., Lu, R., Yang, H., McDermott, P. F., Ayers, S. y Meng, J. 2004. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1-7.
- Cheng, T., Zhang, Y.-Z., Lai, W.-Y., Chen, Y., Zeng, W.-J. y Huang, W. 2014. High-performance stretchable transparent electrodes based on silver nanowires synthesized via an eco-friendly halogen-free method. *Journal of Materials Chemistry C*, 2, 10369-10376.
- Choffnes, E. R., Relman, D. A. y Mack, A. 2010. Antibiotic resistance: implications for global health and novel intervention strategies: workshop summary. USA: The National Academies Press.
- Condell, O., Iversen, C., Cooney, S., Power, K. A., Walsh, C., Burgess, C. y Fanning, S. 2012. Efficacy of biocides used in the modern food industry to control *Salmonella*-links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 3087-3097.
- Diarra, M. S., Silversides, F. G., Diarrassouba, F., Pritchard, J., Masson, L., Brousseau, R., Bonnet, C., Delaquis, P., Bach, S., Skura, B. J. y Topp, E. 2007. Impact of feed supplementation with antimicrobial agents on growth performance of broiler chickens, *Clostridium perfringens* and *Enterococcus counts*, and antibiotic resistance phenotypes and distribution of antimicrobial resistance determinants in *Escherichia coli* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6566-6576.
- Dubey, S. P., Dwivedi, A. D., Lahtinen, M., Lee, C., Kwon, Y.-N. y Sillanpaa, M. 2013. Protocol for development of various plants leaves extract in single-pot synthesis of metal nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 103, 134-142.
- Elechiguerra, J. L., Burt, J. L., Morones, J. R., Camacho-Bragado, A., Gao, X., Lara, H. H. y Yacaman, M. J. 2005. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology*, 3, 1-10.
- Enriquez-Gómez, E. 2016. *Determinación de la sensibilidad antimicrobiana y producción de factores de patogenicidad de Escherichia coli aislada de corderos en el Estado de México*. M. en C., Universidad Autónoma del Estado de México.
- EPA, United States Environmental Protection Agency. 1980. *Ambient Water Quality Criteria For Silver* [Online]. USA. Available:

- <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/2000M4AD.txt?ZyActionD=ZyDocument&Client=EP&Index=1976%20Thru%201980&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&UseQField=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5CZYFILES%5CINDEX%20DATA%5C76THRU80%5CTXT%5C00000003%5C2000M4AD.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=9> [Accessed 27 de Febrero 2017].
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2015. *Cleaning and sanitation in meat plants* [Online]. Asia. Available: <http://www.fao.org/docrep/010/ai407e/ai407e26.htm> [Accessed 21 april of 2015].
- Fuentes-Arriaga, R., Talavera-Rojas, M., Vázquez-Navarrete, J., Soriano-Vargas, E. y Gutiérrez-Castillo, A. d. C. 2013. Presencia de integrones clase I en *Escherichia coli* aislada de productos cárnicos en plantas Tipo Inspección Federal (TIF) en el Estado de México. *Veterinaria México*, 44, 23-30.
- Furi, L., Ciusa, M. L., Knight, D., Di Lorenzo, V., Tocci, N., Cirasola, D., Aragones, L., Coelho, J. R., Freitas, A. T., Marchi, E., Moce, L., Visa, P., Northwood, B. J., Viti, C., Borghi, E., Orefici, G., Biohypo, C., Morrissey, I. y Oggioni, R. M. 2013. Evaluation of reduced susceptibility to quaternary ammonium compounds and bisbiguanides in clinical isolates and laboratory-generated mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57, 3488-3497.
- Gaillet, S. y Rouanet, J.-M. 2014. Silver nanoparticles: their potential toxic effects after oral exposure and underlying mechanisms—a review. *Food and Chemical Toxicology*.
- Ge, L., Li, Q., Wang, M., Ouyang, J., Li, X. y Xing, M. M. 2014. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 2399.
- Geethalakshmi, R. y Sarada, D. V. L. 2012. Gold and silver nanoparticles from *Trianthema decandra*: synthesis, characterization, and antimicrobial properties. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5375-5384.
- Gilbert, P. y Moore, L. 2005. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 703-715.
- Guerra, B., Junker, E., Schroeter, A., Malorny, B., Lehmann, S. y Helmuth, R. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 489-492.
- Guo, L., Long, M., Huang, Y., Wu, G., Deng, W., Yang, X., Li, B., Meng, Y., Cheng, L., Fan, L., Zhang, H. y Zou, L. 2015. Antimicrobial and disinfectant resistance of *Escherichia coli* isolated from giant pandas. *Journal of Applied Microbiology*, 119, 55-64.
- Guzman, M., Dille, J. y Godet, S. 2012. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8, 37-45.
- Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Ashkarran, A. A., de Aberasturi, D. J., de Larramendi, I. R., Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W. J. y Mahmoudi, M. 2012. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 30, 499-511.
- Heiner, J. D., Hile, D. C., Demons, S. T. y Wedmore, I. S. 2010. 10% Povidone-Iodine may be a practical field water disinfectant. *Wilderness & Environmental Medicine*, 21, 332-336.

- Hornýak, G. L., Tibbals, H. F., Dutta, J. y Moore, J. J. 2009. *Introduction to Nanoscience & Nanotechnology*, USA, Taylor & Francis Group.
- Hossain, F., Perales-Perez, O. J., Hwang, S. y Román, F. 2014. Antimicrobial nanomaterials as water disinfectant: Applications, limitations and future perspectives. *Science of The Total Environment*, 466–467, 1047-1059.
- Hussain, S. y Khan, Z. 2014. Epigallocatechin-3-gallate-capped Ag nanoparticles: preparation and characterization. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37, 1221-1231.
- Inbaneson, S. J., Ravikumar, S. y Manikandan, N. 2011. Antibacterial potential of silver nanoparticles against isolated urinary tract infectious bacterial pathogens. *Applied Nanoscience*, 1, 231-236.
- Initiative, R. o. t. N. N. 2002. *Small wonders, endless frontiers: a review of the national nanotechnology initiative*, National Academies Press (US).
- Irwin, P., Martin, J., Nguyen, L.-H., He, Y., Gehring, A. y Chen, C.-Y. 2010. Antimicrobial activity of spherical silver nanoparticles prepared using a biocompatible macromolecular capping agent: evidence for induction of a greatly prolonged bacterial lag phase. *Journal of Nanobiotechnology*, 8, 1-12.
- Jacob, S. J. P., Mohammed, H., Murali, K. y Kamarudeen, M. 2012. Synthesis of silver nanorods using *Coscinium fenestratum* extracts and its cytotoxic activity against Hep-2 cell line. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 98, 7-11.
- Jagtap, U. y Bapat, V. 2013. Biosynthesis, characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles by aqueous *Annona squamosa* L. leaf extract at room temperature. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22, 434-440.
- Jeeva, K., Thiagarajan, M., Elangovan, V., Geetha, N. y Venkatachalam, P. 2014. *Caesalpinia coriaria* leaf extracts mediated biosynthesis of metallic silver nanoparticles and their antibacterial activity against clinically isolated pathogens. *Industrial Crops and Products*, 52, 714-720.
- Jia, J.-L., Xu, H.-H., Li, D.-Q., Ye, W.-H. y Liu, W.-J. 2015. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using Huangdan (*Camellia sinensis*) leaf extract. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*, 45, 941-946.
- Jiang, S. y Teng, C. P. 2016. Fabrication of silver nanowires-loaded polydimethylsiloxane film with antimicrobial activities and cell compatibility. *Materials Science and Engineering: C*, 70, Part 2, 1011-1017.
- Kan, C.-X., Zhu, J.-J. y Zhu, X.-G. 2008. Silver nanostructures with well-controlled shapes: synthesis, characterization and growth mechanisms. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 41, 155304.
- Kholmanov, I. N., Stoller, M. D., Edgeworth, J., Lee, W. H., Li, H., Lee, J., Barnhart, C., Potts, J. R., Piner, R., Akinwande, D., Barrick, J. E. y Ruoff, R. S. 2012. Nanostructured hybrid transparent conductive films with antibacterial properties. *ACS Nano*, 6, 5157-5163.
- Lara, H., Ayala-Núñez, N., Ixtapan-Turrent, L. d. C. y Rodríguez-Padilla, C. 2010a. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 615-621.
- Lara, H. H., Garza-Treviño, E. N., Ixtapan-Turrent, L. y Singh, D. K. 2011. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *Journal of Nanobiotechnology*, 9, 30.
- Lara, H. H., Ixtapan-Turrent, L., Garza-Treviño, E. N. y Rodríguez-Padilla, C. 2010b. Research PVP-coated silver nanoparticles block the transmission of cell-free and cell-associated HIV-1 in human cervical culture. *Journal of Nanobiotechnology*, 13, 8.

- Lavilla-Lerma, L., Benomar, N., Gálvez, A. y Abriouel, H. 2013. Prevalence of bacteria resistant to antibiotics and/or biocides on meat processing plant surfaces throughout meat chain production. *International Journal of Food Microbiology*, 161, 97-106.
- Li, L., Ye, L., Kromann, S. y Meng, H. 2016. Occurrence of extended-spectrum β -lactamases, plasmid-mediated quinolone resistance, and disinfectant resistance genes in *Escherichia coli* isolated from ready-to-eat meat products. *Foodborne Pathogens and Disease*.
- Li, S., Shen, Y., Xie, A., Yu, X., Qiu, L., Zhang, L. y Zhang, Q. 2007. Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annuum* L. extract. *Green Chemistry*, 9, 852-858.
- Lin, L., Wang, W., Huang, J., Li, Q., Sun, D., Yang, X., Wang, H., He, N. y Wang, Y. 2010. Nature factory of silver nanowires: Plant-mediated synthesis using broth of *Cassia fistula* leaf. *Chemical Engineering Journal*, 162, 852-858.
- Loo, Y. Y., Chieng, B. W., Nishibuchi, M. y Radu, S. 2012. Synthesis of silver nanoparticles by using tea leaf extract from *Camellia sinensis*. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 4263.
- Ma, J. y Zhan, M. 2014. Rapid production of silver nanowires based on high concentration of AgNO₃ precursor and use of FeCl₃ as reaction promoter. *RSC Advances*, 4, 21060-21071.
- Martinez-Castañón, G., Niño-Martínez, N., Martínez-Gutierrez, F., Martínez-Mendoza, J. y Ruiz, F. 2008. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *Journal of Nanoparticle Research*, 10, 1343-1348.
- Martínez, J. L. y Baquero, F. 2002. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 647-679.
- Mathewson, J., Oberhelman, R., Dupont, H., de la Cabada, F. J. y Garibay, E. V. 1987. Enteroadherent *Escherichia coli* as a cause of diarrhea among children in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*, 25, 1917-1919.
- McDonnell, G. y Russell, A. D. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 147-179.
- Mittal, A. K., Chisti, Y. y Banerjee, U. C. 2013. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*, 31, 346-356.
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T. y Yacaman, M. J. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16, 2346.
- Moulton, M. C., Braydich-Stolle, L. K., Nadagouda, M. N., Kunzelman, S., Hussain, S. M. y Varma, R. S. 2010. Synthesis, characterization and biocompatibility of "green" synthesized silver nanoparticles using tea polyphenols. *Nanoscale*, 2, 763-770.
- Mukha, I. P., Eremenko, A., Smirnova, N., Mikhienkova, A., Korchak, G., Gorchev, V. y Chunikhin, A. Y. 2013. Antimicrobial activity of stable silver nanoparticles of a certain size. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49, 199-206.
- Niakan, S., Niakan, M., Hesaraki, S., Nejadmoghaddam, M. R., Moradi, M., Hanafiabdar, M., Allamezadeh, R. y Sabouri, M. 2013. Comparison of the antibacterial effects of nanosilver with 18 antibiotics on multidrug resistance clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Jundishapur Journal Microbiology*, 6, e8341.
- Paredes, D., Ortiz, C. y Torres, R. 2014. Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial effect of ag nanoparticles against *Escherichia coli* O157: H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *International Journal of Nanomedicine*, 9, 1717.
- Patarroyo, J., Genc, A., Arbiol, J., Bastús, N. G. y Puntès, V. 2016. One-pot polyol synthesis of highly monodisperse short green silver nanorods. *Chemical Communications*, 52, 10960-10963.

- Penna, T. C. V., Mazzola, P. G. y Silva-Martins, A. M. 2001. The efficacy of chemical agents in cleaning and disinfection programs. *BMC Infectious Diseases*, 1, 16.
- Prabhu, S. y Poulouse, E. 2012. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*, 2, 1-10.
- Prior, R. L., Wu, X. y Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Rababah, T. M., Hettiarachchy, N. S. y Horax, R. 2004. Total phenolics and antioxidant activities of fenugreek, green tea, black tea, grape seed, ginger, rosemary, gotu kola, and ginkgo extracts, vitamin E, and tert-butylhydroquinone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5183-5186.
- Rajan, R., Chandran, K., Harper, S. L., Yun, S.-I. y Kalaichelvan, P. T. 2015. Plant extract synthesized silver nanoparticles: An ongoing source of novel biocompatible materials. *Industrial Crops and Products*, 70, 356-373.
- Reyes-Rodríguez, N., Talavera-Rojas, M., Varela-Guerrero, J., Barba-León, J., Alonso-Fresan, U. y Gutiérrez-Castillo, A. d. C. 2013. Prevalence and antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157: H7 isolated from bovine carcasses at slaughterhouses of the central Mexican Plateau [Prevalencia y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* O157: H7 aislada de canales de bovinos sacrificados en rastros del altiplano central Mexicano].
- Rodríguez-González, V., Domínguez-Espíndola, R. B., Casas-Flores, S., Patrón-Soberano, O. A., Camposeco-Solis, R. y Lee, S.-W. 2016. Antifungal nanocomposites inspired by titanate nanotubes for complete inactivation of *Botrytis cinerea* isolated from tomato infection. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8, 31625-31637.
- Russell, A. D. 2002. Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 121S-135S.
- Russo, T. A. y Johnson, J. R. 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and Infection*, 5, 449-456.
- Rutala, W. A., Stiegel, M. M., Sarubbi, F. A. y Weber, D. J. 1997. Susceptibility of antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant hospital bacteria to disinfectants. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 417-421.
- Sidhu, M. S., Sørum, H. y Holck, A. 2002. Resistance to quaternary ammonium compounds in food-related bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 8, 393-399.
- Sintubin, L., De Gussemé, B., Van der Meer, P., Pycke, B. F., Verstraete, W. y Boon, N. 2011. The antibacterial activity of biogenic silver and its mode of action. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, 153-162.
- Sondi, I. y 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, 177-182.
- Soumet, C., Fourreau, E., Legrandois, P. y Maris, P. 2012. Resistance to phenicol compounds following adaptation to quaternary ammonium compounds in *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 158, 147-152.
- Sun, Y., Gates, B., Mayers, B. y Xia, Y. 2002. Crystalline silver nanowires by soft solution processing. *Nano Letters*, 2, 165-168.
- Sun, Y., Mayers, B., Herricks, T. y Xia, Y. 2003. Polyol synthesis of uniform silver nanowires: A plausible growth mechanism and the supporting evidence. *Nano Letters*, 3, 955-960.
- Tang, B., Sun, L., Li, J., Zhang, M. y Wang, X. 2015. Sunlight-driven synthesis of anisotropic silver nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*, 260, 99-106.

- Thanh, N. T., Maclean, N. y Mahiddine, S. 2014. Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution. *Chemical Reviews*, 114, 7610-7630.
- Tran, Q. H., Nguyen, V. Q. y Le, A.-T. 2013. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 4, 20.
- Varela-Guerrero, J. A., Talavera-Rojas, M., Gutiérrez-Castillo, A. d. C., Reyes-Rodríguez, N. E. y Vázquez-Guadarrama, J. 2013. Phenotypic–genotypic resistance in *Salmonella* spp. isolated from cattle carcasses from the north central zone of the State of Mexico. *Tropical Animal Health and Production*, 45, 995-1000.
- Vijayakumar, M., Priya, K., Nancy, F. T., Noorlidah, A. y Ahmed, A. B. A. 2013. Biosynthesis, characterisation and anti-bacterial effect of plant-mediated silver nanoparticles using *Artemisia nilagirica*. *Industrial Crops and Products*, 41, 235-240.
- Vilchis-Nestor, A. R., Sánchez-Mendieta, V., Camacho-López, M. A., Gómez-Espinosa, R. M., Camacho-López, M. A. y Arenas-Alatorre, J. A. 2008. Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using *Camellia sinensis* extract. *Materials Letters*, 62, 3103-3105.
- Wang, L., Luo, J., Shan, S., Crew, E., Yin, J., Zhong, C.-J., Wallek, B. y Wong, S. S. S. 2011. Bacterial inactivation using silver-coated magnetic nanoparticles as functional antimicrobial agents. *Analytical Chemistry*, 83, 8688-8695.
- WHO. 2017. *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed* [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/> [Accessed 27 de Febrero 2017].
- Wistreich, G. 2007. *Microbiology perspective. A photographic survey of the microbial world, USA*, Pearson Prentice Hall.
- Wong, C. S., Jelacic, S., Habeeb, R. L., Watkins, S. L. y Tarr, P. I. 2000. The risk of the hemolytic–uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157: H7 infections. *The New England Journal of Medicine*, 342, 1930-1936.
- Zaidi, M. B., Leon, V., Canche, C., Perez, C., Zhao, S., Hubert, S. K., Abbott, J., Blickenstaff, K. y McDermott, P. F. 2007. Rapid and widespread dissemination of multidrug-resistant blaCMY-2 *Salmonella* Typhimurium in Mexico. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, 398-401.
- Zhang, A., He, X., Meng, Y., Guo, L., Long, M., Yu, H., Li, B., Fan, L., Liu, S., Wang, H. y Zou, L. 2016a. Antibiotic and disinfectant resistance of *Escherichia coli* isolated from retail meats in Sichuan, China. *Microbial Drug Resistance*, 22, 80-87.
- Zhang, G., Niu, A., Peng, S., Jiang, M., Tu, Y., Li, M. y Wu, C. 2001. Formation of novel polymeric nanoparticles. *Accounts of Chemical Research*, 34, 249-256.
- Zhang, Y., Xia, J., Liu, Y., Qiang, L. y Zhu, L. 2016b. Impacts of morphology, natural organic matter, cations, and ionic strength on sulfidation of silver nanowires. *Environmental Science & Technology*, 50, 13283-13290.
- Zheng, L.-Q., Yu, X.-D., Xu, J.-J. y Chen, H.-Y. 2014. Rapid visual detection of quaternary ammonium surfactants using citrate-capped silver nanoparticles (Ag NPs) based on hydrophobic effect. *Talanta*, 118, 90-95.
- Zubko, E. I. y Zubko, M. K. 2013. Co-operative inhibitory effects of hydrogen peroxide and iodine against bacterial and yeast species. *BMC Research Notes*, 6, 272.