

Evaluación del efecto antimicrobiano de diferentes soluciones de nanopartículas de plata (AgNPs) sobre *Salmonella Typhimurium*

Rosales Chavarria, E.R.^{1,2} • Chamorro Ramírez, F.H.² • Peña-González, E.M.²
Hamdan Partida, A.³ • Bustos Martínez J.A.^{3*}

Palabras clave: concentración mínima inhibitoria, polivinilpirrolidona, cinética de crecimiento bacteriano
Key words: minimal inhibitory concentration, polyvinylpyrrolidone, bacterial growth kinetics

Introducción

Los compuestos a base de plata han sido utilizados desde el siglo XVII como agentes antimicrobianos debido a su potencial efecto en la inhibición de microorganismos, entre ellos los Gram negativos como *Salmonella Typhimurium*, la cual es causante de al menos el 15% de las salmonelosis a nivel mundial.

Con la aparición de los antibióticos en el año 1940, el uso de los compuestos de plata disminuyó radicalmente. Actualmente la emergencia de microorganismos resistentes debido al uso desmedido de antibióticos ha alertado a las autoridades sanitarias de todo el mundo [1]. Entre algunos de los microorganismos en

los que se ha reportado resistencia están *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella Typhimurium*, estudios retrospectivos han demostrado una disminución gradual en la sensibilidad de *S. Typhimurium* a los antibióticos tradicionales [2].

A partir de esta problemática las ciencias médicas han buscado alternativas para mejorar la eficacia de los tratamientos. Una de estas estrategias ha sido la combinación de antibióticos y otra la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos, entre los que destacan la plata y sus derivados en escalas nanométricas. En este sentido, las nanopartículas de plata (AgNPs)

1 Maestría en Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

2 Laboratorio Veterinario de Ciencia de la Carne y Salud Pública, Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

3 Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular, Departamento de Atención a la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Calz. del Hueso 1100, Villa Quietud, Coyoacán, 04960, Ciudad de México, CDMX.

* reginagr295@gmail.com



han demostrado poseer una importante actividad antimicrobiana, sin embargo, esta actividad está determinada por diversos factores como: el tamaño y la forma de la nanopartícula, el tipo de bacteria (Gram + o Gram -) e incluso el método y agentes químicos que se utilicen durante su síntesis [3]. Es por esto que, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto antimicrobiano de diferentes soluciones de AgNPs sobre *Salmonella t Typhimurium*.

Metodología

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Se sintetizaron y probaron 12 soluciones de AgNPs a tres concentraciones a las cuales se les adicionó o no polivinilpirrolidona (PVP) como estabilizante y fueron o no sometidas a un proceso de esterilización como se muestra en la Figura 1. Las evaluaciones realizadas en este trabajo se llevaron a cabo por triplicado.

Síntesis de AgNPs

La síntesis de las soluciones de AgNPs se realizó mediante la reducción de sales metálicas con el método de Lee-Meisel utilizando citrato de sodio al 1% como agente reductor, nitrato de plata (AgNO_3) como precursor y PVP al 1% como agente estabilizante [1]. Cada solución fue elaborada de manera individual y almacenada a temperatura ambiente y protegida de la luz en frascos ámbar.

Esterilización de las soluciones

Una vez preparadas las soluciones, se transfirieron 30mL a frascos de vidrio con tapón de rosca, posteriormente fueron esterilizadas con ayuda de un autoclave (CV250, AESA®) ajustada a 15 libras de presión y 119°C durante 15 minutos.

Para mantener las condiciones de esterilidad en las etapas subsecuentes se trabajó en una campana de flujo laminar.

Caracterización de las AgNPs

Para la caracterización de las AgNPs de las soluciones elaboradas se realizaron mediciones de índice de polidispersidad, tamaño de partícula (d.nm) y potencial Z (mV) mediante la técnica de dispersión de luz dinámica con ayuda de un equipo analizador de partículas (ZETASIZER, Nano-ZS, Malvern®).

Activación de la cepa bacteriana

Se activó una cepa de *S. Typhimurium* (ATCC 14028), para esto, se colocaron 200µL de la cepa en un tubo de ensayo con 2mL de medio infusión cerebro-cora-zón estéril y fue incubado a 37°C durante 24 horas.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Para determinar la CMI de las diferentes soluciones probadas se utilizó el método de macrodilución siguiendo las indicaciones del Clinical and Laboratory Standard Institute [4]. Se colocaron 2mL de caldo Müeller- Hinton y 1mL de la solución a evaluar (dilu-

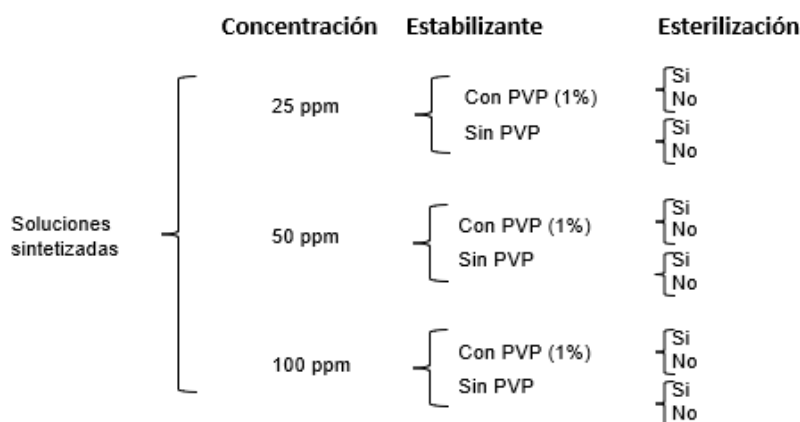


Figura 1. Diseño experimental del trabajo

ción 1:2), se homogeneizó el contenido del tubo con ayuda de un vortex (16715, Thermolyne®) y se realizaron diluciones seriadas. Posteriormente se agregó 1mL de la suspensión bacteriana ajustada a 0.5 McFarland (UMF) a cada una de las diluciones, el contenido de los tubos de ensayo fue homogeneizado nuevamente con ayuda de un vortex e incubados a 37°C y 170 rpm en una estufa microbiológica de agitación (ES 20, BIOSAN®). Los resultados se tomaron a las 20 horas post inoculación.

Cinética de crecimiento bacteriana (CCB)

Para desarrollar la CCB se colocaron 2mL de caldo Müeller- Hinton, 1mL de la solución a evaluar y 0.3mL de la suspensión bacteriana ajustada a 0.5 McFarland en tubos de ensayo los cuales se homogeneizaron con ayuda de un vortex e incubaron en una estufa microbiológica de agitación (ES 20, BIOSAN®) a 37°C y 170 rpm, la turbidez de las soluciones fue medida cada dos horas durante 12 horas y una lectura final a las 24 horas con ayuda de un DENSIMAT (BIOMERIEUX®). Para obtener la turbidez total en UMF se utilizó la siguiente ecuación [5].

$$\text{turbidez total} = \text{UMF de la muestra} - \text{UMF del control}$$

Donde: UMF de la muestra es la turbidez del medio de cultivo con la solución a estudiar más el inóculo y UMF del control es la turbidez del medio de cultivo más la solución a estudiar. Las UMF fueron transformadas a UFC/mL mediante una regla de tres simple.

Análisis estadístico

En este trabajo se utilizó un diseño completamente al azar, en el cual se tuvieron 13 tratamientos (1 tratamiento control y 12 correspondientes a las soluciones probadas). Los datos fueron analizados mediante un ANOVA, para el cual se utilizó el siguiente modelo estadístico.

$$Y_{ijk} = \mu + \beta_i + \gamma_j + \epsilon_{ijk}$$

Donde: Y_{ijk} : crecimiento bacteriano, μ : media general, β_i : el efecto de la i ésima solución, γ_j : el efecto del j oésimo tiempo y ϵ_{ijk} : el efecto del k ésimo error. Los datos obtenidos fueron procesados con el software JMP® versión 8.

Resultados y discusión

Como referente de la formación de nanopartículas se tomó en cuenta la aparición de color [6, 7], el cual fue diferente en cada solución en función de la concentración (Figura 2). La concentración más baja presentó un color amarillo claro a ligeramente oscuro, las soluciones con una concentración de 50 ppm presentaron un color café, mientras que las soluciones con la concentración de 100 ppm presentaron un color café verdoso. Cabe mencionar que se detectaron cambios visibles en la apariencia de algunas de las soluciones, por ejemplo, la solución con 100 ppm sin adición de PVP sin esterilizar fue notoriamente más clara que su homólogo sin esterilizar, esta misma situación se presentó en la solución de 50 ppm con PVP, por otra parte en la solución de 100 ppm con adición de PVP además de un cambio en la coloración (siendo más oscura y coloreada la que no fue esterilizada) se pudo notar una apariencia menos homogénea, ya que se puede distinguir un puntillado de color gris oscuro. Por otra parte, los resultados de la caracterización demostraron que, 11 de las 12 soluciones analizadas contienen AgNPs con tamaños de partícula de entre 48.42 y 98.59 nm, además, todas las soluciones estudiadas presentaron un IPD menor a 6, valor que se encuentra dentro de los valores referidos de buena calidad [7], por último, todas las soluciones presentaron un potencial Z negativo con valores de entre -5.19 a -30.10 mV.

En cuanto a las pruebas de determinación de CMI no se observó inhibición del crecimiento de *S. Typhimurium* en ninguna de las diluciones de las soluciones empleadas (Figura 3) esta falta de actividad antibacteriana de las AgNPs puede atribuirse a diferentes factores, uno de ellos podría ser una baja concentración del agente estabilizante o reductor, Mekawy et al. [8]. mencionan que, a mayor concentración del agente estabilizante existirá una mayor estabilidad de la solución a través del tiempo llegando a ser estables hasta por 12 meses, mientras que las soluciones sin estabilizar comienzan a sedimentarse poco después del primer mes [7]. Otra razón que pudo haber afectado el efecto antibacteriano de las AgNPs sintetizadas pudo ser el tamaño y la carga de estas ya que a mayor tamaño hay un menor efecto antibacteriano, por otro lado, se ha evidenciado que las AgNPs con mejor efec-

to son aquellas con carga positiva, seguidas de las que cuentan con carga neutra y dejando al final las que tienen carga negativa, esto se debe a la interacción de la carga de las AgNPs con la carga de la membrana de las células bacterianas [6]. Se ha reportado que el método de síntesis utilizado en este trabajo produce soluciones polidispersas con nanopartículas esféricas de aproximadamente 30-60 nm, y que las AgNPs estabilizadas con polímeros suelen tener carga negativa [1, 7]. Los resultados obtenidos durante las pruebas de macrodilución fueron similares a los obtenidos en

otro estudio en el que se evaluó la actividad antibacterial de AgNPs sintetizadas a partir de extracto de eucalipto y en el cual tampoco se observó ningún efecto inhibitorio [6].

Por otra parte, en las pruebas de CCB, dos de las 12 soluciones de AgNPs mostraron un efecto bacteriostático estadísticamente significativo ($p < 0.05$) la primera, correspondió a la solución que contenía 25 ppm de AgNPs con estabilizante y sin esterilizar en la cual se observó una menor turbidez con respecto al control (5.1×10^8 UFC a la hora 2 postinoculación), manteniendo

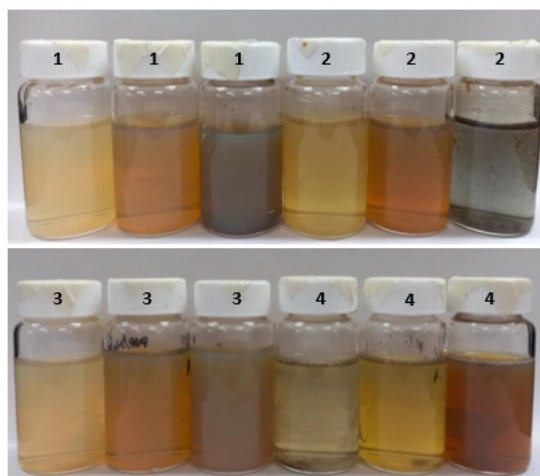


Figura 2. Apariencia de las soluciones de AgNPs sintetizadas y probadas.

1: soluciones sin PVP esterilizadas, 2: soluciones con PVP esterilizadas, 3: soluciones sin PVP no esterilizadas, 4: soluciones con PVP no esterilizadas, de izquierda a derecha: 25, 50 y 100 ppm respectivamente.

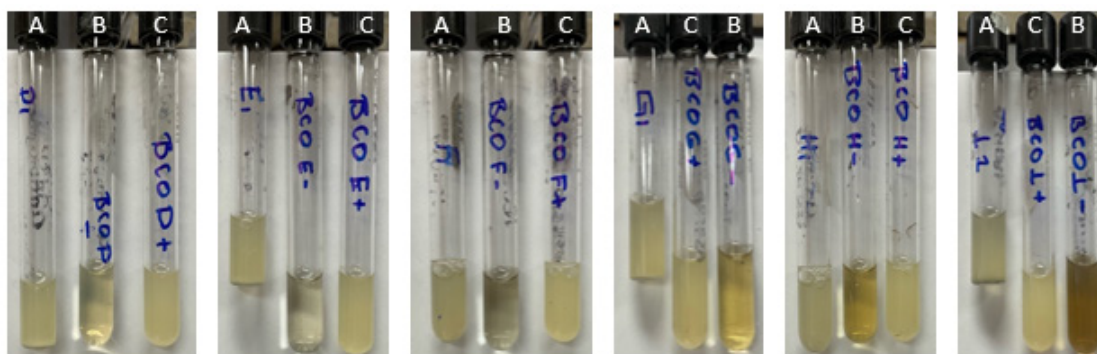


Figura 3. Resultados de las macrodiluciones.

A: Dilución 1:2 correspondiente a la primera dilución del ensayo, B: Control negativo, C: Control positivo. De izquierda a derecha: AgNPs 25 ppm sin PVP esterilizadas, AgNPs 50 ppm sin PVP esterilizadas, AgNPs 100 ppm sin PVP esterilizadas, AgNPs 25 ppm con PVP esterilizadas, AgNPs 50 ppm con PVP esterilizadas, AgNPs 100 ppm con PVP esterilizadas.

do una turbidez baja desde la hora 0 (2.0×10^7 UFC) hasta la 4 (3.0×10^7 UFC), comenzando a subir a partir de la hora 6 (3.8×10^8 UFC) hasta igualar la turbidez de las otras soluciones durante la hora 8 (1.5×10^9 UFC).

Mientras que en la solución de 50 ppm con estabilizante y sin esterilizar la turbidez fue significativamente menor ($p < 0.05$) a la presentada en el resto de las soluciones probadas, este comportamiento se mantuvo a lo largo de las evaluaciones presentando valores menores a 2×10^8 hasta la hora 12, a partir de la cual hay un aumento notable en la turbidez (1.18×10^9 UFC) (Figura 4). El resto de las soluciones resultaron iguales al control y a la solución de 25 ppm estabili-

zada y sin esterilizar. Estos resultados difieren de lo reportado generalmente en la literatura que es que “a mayor concentración, mayor efecto antimicrobiano” [7], sin embargo, Zein et al. [6] tampoco encontraron actividad antibacteriana en función del aumento de la concentración de AgNPs (12.5, 25 y $50 \mu\text{g}/\text{mL}$).

Otro aspecto que pudo afectar la actividad de las AgNPs sintetizadas fue la sedimentación de la plata en los tubos de ensayo (Figura 5), ya que al encontrarse las AgNPs al fondo de estos no pueden interactuar con el resto de la suspensión. La sedimentación de la plata pudo deberse a una falla en la agitación de los tubos de ensayo.

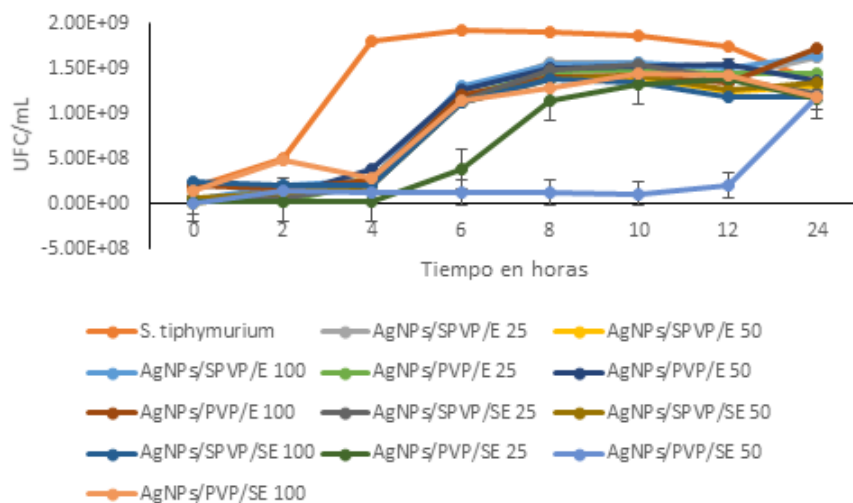


Figura 4. Crecimiento de *S. Tiphymurium* frente a los diferentes tratamientos.

AgNPs: nanopartículas de plata, SPVP: sin PVP, PVP: Con PVP, E: esterilizadas, SE: sin esterilizar, 25, 50 y 100: partes por millón.

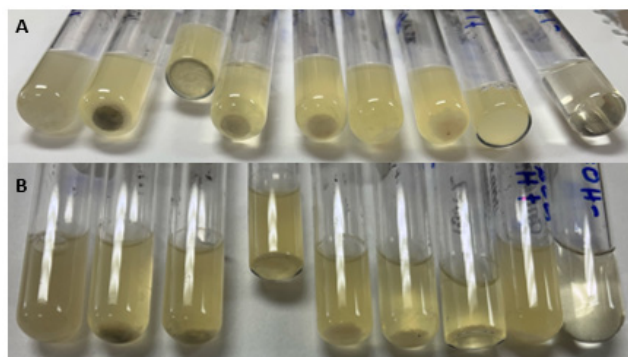


Figura 5. Presencia de sedimentación de la plata en las pruebas correspondientes a las concentraciones de 100 ppm. A: Soluciones sin PVP esterilizadas, B: Soluciones con PVP esterilizadas, De izquierda a derecha dilución 1:2 a 1:128, control positivo y control negativo respectivamente.

Conclusión

El método de síntesis utilizado produjo soluciones con partículas con tamaños y cargas muy variados entre sí, lo cual puede explicar el por qué solo dos de las 12 soluciones fueron efectivas.

La esterilización de las soluciones pudo afectar negativamente en la actividad antibacterial de las AgNPs

debido a la posible coalescencia de las AgNPs.

Las soluciones de AgNPs estabilizadas y no esterilizadas a 25 y 50 ppm de AgNPs tienen un efecto bacteriostático sobre *S. Typhimurium*.

Referencias

1. M MO. Nanopartículas de plata. Métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *Anales de Química*. 2009.105(1): 33-41. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2931286>
2. DiMarzio M, Shariat N, Kariyawasam S, Barrangou R, Dudley Edward G. Antibiotic Resistance in *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* Associates with CRISPR Sequence Type. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013/09/01 2013;57(9):4282-4289. doi:10.1128/AAC.00913-13
3. Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*. 2019/11/01/ 2019;12(7):908-931. doi: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
4. Clinical and Laboratory Standard Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Test for Bacteria Grow Aerobically. 9 ed2012.
5. Serna Cock L, Valencia Hernández L, Campos Gaona R. Cinética de fermentación y acción antimicrobiana de *Weissella confusa* contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* /. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*. 09/01/ 2010;(55):55-65.
6. Zein R, Alghoraibi I, Soukkaieh C, Ismail MT, Alahmad A. Influence of Polyvinylpyrrolidone Concentration on Properties and Anti-Bacterial Activity of Green Synthesized Silver Nanoparticles. *Micromachines*. 2022;13(5):777.
7. Gamboa SM, Rojas ER, Martínez VV, Vega-Baudrit J. Synthesis and characterization of silver nanoparticles and their application as an antibacterial agent. *Int J Biosen Bioelectron*. 2019;5:166-173.
8. Mekkawy AI, El-Mokhtar MA, Nafady NA, et al. In vitro and in vivo evaluation of biologically synthesized silver nanoparticles for topical applications: effect of surface coating and loading into hydrogels. *International journal of nanomedicine*. 2017;12:759-777. doi:10.2147/IJN.S124294