BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA: CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL ANTIMICROBIANO

B.C. María Belén Estevez Vidal

Tesis de Doctorado en Química

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Doctora en Química

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química, Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Febrero 2024

Biosíntesis de nanopartículas de plata: caracterización y evaluación de su potencial antimicrobiano

Tribunal:

Dra. Carolina Mendoza

Dra. María Inés Siri

Dra. Nicole Lecot

Dra. Silvana Alborés, Directora

Dr. Ricardo Faccio, Director

Lo que hoy está comprobado, una vez solo pudo ser imaginado

WILLIAM BLAKE

PRÓLOGO.

Desde muy chica siento fascinación por los libros. No puedo decir que es algo que haya surgido de mí misma. Esta pasión por la lectura tengo que agradecérsela a mis padres quienes me regalaron libros prácticamente desde el día de mi nacimiento. Tuve la fortuna de que, próxima a cumplir los cinco años, nos mudásemos al barrio en el que se encuentra la biblioteca privada más grande de Uruguay (al menos hasta dónde es de mi conocimiento). Ir los viernes por la tarde a pedir prestado algún libro sin fijarme en su género o antigüedad se había convertido en una especie de peregrinación. Fue así como desde muy chica me sumergí en la obra de autores como Julio Verne, Arthur Conan Doyle, Stephen King, Edgard Allan Poe, Isabel Allende, Frank Herbert o Isaac Asimov. Ellos y muchísimos otros autores marcaron mi infancia y adolescencia y dejaron en mí un gusto por la escritura y la lectura que perdura hasta hoy.

Es justamente la obra de uno de ellos la que viene a mis pensamientos mientras redacto esta tesis. Se trata de "Un viaje alucinante" de Isaac Asimov. En esta obra Asimov narra la historia de un científico que queda en coma tras un intento de asesinato. Con el fin de salvarle la vida, un grupo de médicos miniaturizados ingresa al cuerpo del científico para llegar al cerebro y destruir el trombo que está por causarle la muerte. Este libro me cautivó por diversos motivos. El primero de ellos es que todos los libros de ciencia ficción que había leído hasta la fecha trataban sobre viajes al espacio, viajes en el tiempo o sociedades distópicas, pero esta fue la primera historia que leí de un viaje al interior del cuerpo humano. Pero lo que más atrajo mi atención fue su argumento: la miniaturización de algo, dirigido de manera precisa hacia el lugar del problema, para salvar la vida de una persona.

Aquella adolescente, que aún no tenía claro el rumbo que tomaría en su vida, nunca hubiera imaginado que su futuro estaría tan entrelazado con las visiones de Asimov. Aunque es cierto que mi tesis no implica la miniaturización insertada en el torrente sanguíneo de una persona, dirigida específicamente a atacar las amenazas que ponen en riesgo la vida de otra, sí aborda el campo de la

nanotecnología con el propósito de combatir enfermedades infecciosas. Para mí, el argumento de mi tesis ya me acerca mucho a la ciencia ficción que autores como Asimov y otros tantos plantearon para el futuro, sin saber (o quizás sí) que sería la ciencia real de nuestro presente.

Recibí las bases de mi educación en la escuela, pero eso no fue suficiente. Mi verdadera educación salió de la biblioteca.

ISAAC ASIMOV

AGRADECIMIENTOS.

El desarrollo de esta tesis fue posible gracias a la financiación de la CAP por las becas de maestría y doctorado, PEDECIBA-Química por las alícuotas de estudiante y la ANII y CSIC por las becas de movilidad que me permitieron realizar pasantías en Córdoba (Argentina) y Zaragoza (España).

Gracias a las Dras. Carolina Mendoza, María Inés Siri y Nicole Lecot por aceptar ser parte del tribunal de esta tesis.

Desde que comencé a escribir la tesis imaginaba que los agradecimientos serían la parte que más me iba a costar desarrollar. No me equivocaba. Plasmar en pocas palabras los momentos vividos y compartidos con tantas personas a lo largo de estos años no fue una tarea sencilla. Intenté ser concisa pero aun así me quedan muchas cosas por expresar.

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutores por acompañarme y enseñarme en este proceso de tesis:
Ricardo, mil gracias por tu humildad, por tu paciencia para explicarme veinte veces lo mismo cuando no entendía, principalmente en tu rol de tutor, pero también en el de docente de los cursos de física y nanotecnología.
Silvana, gracias por invitarme a hacer un posgrado contigo y por todas las actividades extra posgrado que hicimos.
Gracias a ambos por las enseñanzas, por ser los tutores más presentes, comprensivos y divertidos que pude tener, por permitirme formar parte de este trabajo tan lindo y en el que pude aprender sobre tantas áreas diferentes. Y sobre todo gracias por esos viajes al Polo tan pero tan divertidos (aunque a veces me dormía en el auto porque me hacían madrugar mucho).

Quiero agradecerles también a mis compañeros del Área de Física, en especial a **Fernando** por pasarme la mayor parte de los programas que usé durante la tesis

y por enseñarme a usarlos (especialmente el Origin y el MatLab), y a **Dominique** por toda la buena onda de siempre.

A los compañeros del Área de Microbiología que hicieron que la realización de esta tesis fuera una experiencia gratificante:

Pauli, gracias por enseñarme a sintetizar nanopartículas y esperar conmigo en tantas filtraciones, y **Sofi**, gracias por esa "pasantía" para aprender a trabajar con biofilms. Pero principalmente gracias a ambas por ser unas compañeras maravillosas, por su calidez, por su contención y por su apoyo cuando las cosas iban mal. Creo que es egoísta decir que esta tesis es mía. Sin su ayuda, sin sus conocimientos y sin su cariño, no hubiera sido lo mismo.

Feli, Sole, Ada, Ari, Elo, César, **Milly, Flor G.**, muchas gracias por ser los mejores compañeros que se pueda pedir. Gracias por su cariño, por las risas, por las charlas, por estar en las malas y por celebrar las buenas.

Pía, Sonia y **María Inés,** gracias por su cercanía, su afecto, por sus historias y anécdotas, y por ofrecerme tantas palabras valiosas en los momentos justos.

A la mejor compañera de extensión que puede alguien tener, **Marianita**. Gracias por entusiasmarte conmigo en cada idea y por impulsar mi creatividad. Hicimos juntas muchas cosas lindas de las que estoy profundamente orgullosa. Pero el mayor agradecimiento es por tu valiosa amistad.

Un agradecimiento muy especial a quien me enseñó microbiología por primera vez: **Gianna**. A lo largo de estos años te convertiste en una amiga invaluable. Gracias por estar siempre presente con un cariño inmenso, siempre con los mejores consejos, apoyándome y motivándome a seguir adelante.

Al área de Bioquímica por ser los mejores vecinos de laboratorio y por prestarme los equipos, que no fueron pocos. En especial quiero agradecerle a **Agustín** por enseñarme a usar el espectrofluorímetro.

Muchísimas gracias a las personas que me recibieron y me hicieron sentir parte de sus grupos de investigación cuando fui a sus laboratorios.

A las chicas de Córdoba, especialmente a **Paulina** y a **Meli**. Además de agradecerles la capacitación, quiero darles un gracias enorme por recibirme con tanta hospitalidad, por los paseos y por hacer de esa una estancia inolvidable, llena de risas y buenos momentos.

A la gente de Zaragoza, en especial a Valeria y Scott. **Valeria**, muchas gracias por la oportunidad que me diste en poder ir a trabajar con ustedes. **Scott**, gracias por ser un supervisor tan presente y con tanta disposición a enseñarme. **Isabel**, aunque no pudimos trabajar juntas te convertiste en una gran amiga. Gracias por los consejos de diseño siempre tan certeros, por los stickers de Whatsapp (fundamentales siempre), por enseñarme el significado de la palabra "tabardillo" y por tantas, tantas charlas divertidas.

A los integrantes del laboratorio de Inmunología. A **Gustavo** por recibirme en su grupo con mucha hospitalidad. A **Paula** que me dio una mano gigantesca en los ensayos, siempre dispuesta a ayudarme cuando tenía algún problema. En especial agradecerle a **Claudio** quien me enseñó a trabajar en cultivo celular con toda la buena disposición, no solo en la parte de manipulación sino en los tratamientos de datos y los análisis. Sobre todo, muchas gracias por hacer que cada día fuera tan divertido. Quizás las células no cooperaban demasiado pero seguro que las risas no faltaron.

A mis amigas que transitaron este camino junto conmigo.

Maia, Isa, Romi, muchas gracias por tantos buenos momentos compartidos (las comidas dulces suman). Por las risas y los llantos, por el aguante que nos hicimos mientras escribíamos la tesis, por las tonterías y las seriedades, y por tantas, tantas charlas valiosas.

A **Anita, Ale, Yami, Tania, Lu** y **Pau** quienes son mis amigas desde hace ¡muchísimos años! Muchas gracias por estar presentes en cada momento, tanto en los buenos como en los malos. Gracias por compartir risas, consuelo, momentos inolvidables y por ser mi fuente de alegría. Sabemos que una amistad es buena cuando el paso del tiempo no la mantiene idéntica, sino que la vuelve cada día mejor.

Por último, pero no por ello menos importante, quiero agradecer a mi familia, en especial **a mis padres**, por haber creído siempre en mí y por inculcarme tantos buenos valores que hicieron de mí la persona que soy hoy.

Y a **Aquiles**, el orejón más lindo y bueno del universo.

Crees que sabes todas tus posibilidades. Entonces, otras personas llegan a tu vida y de repente hay muchas más.

DAVID LEVITHAN, *El reino de la posibilidad*.

Biosíntesis de nanopartículas de plata: caracterización y evaluación de su potencial antimicrobiano.

B.C. María Belén Estevez Vidal
Programa de Posgrado en Química, Facultad de Química
Universidad de la República
2024

Directores
Dra. Silvana Alborés
Área de Microbiología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química,
Universidad de la República
Dr. Ricardo Faccio
Área de Física, Departamento de Experimentación y Teoría de la Estructura de la Materia y sus Aplicaciones, Facultad de Química,
Universidad de la República

Resumen.
En los últimos años, la síntesis biológica de nanopartículas ha ganado prominencia, destacándose sobre métodos químicos y físicos. Este enfoque implica la producción de nanopartículas dentro o fuera de las células por microorganismos. La biosíntesis extracelular destaca al simplificar el procesamiento, permitiendo la separación y purificación eficientes de las nanopartículas en menos pasos.

Especialmente, las nanopartículas de plata han captado considerable interés debido a sus propiedades antimicrobianas. Los mecanismos de acción son complejos, dependiendo de factores como propiedades fisicoquímicas, composición del estabilizante biológico y el tipo de microorganismo.

Esta tesis, compuesta por siete capítulos, se centra en la síntesis de nanopartículas de plata por hongos, su caracterización y evaluación de su potencial antimicrobiano. Además, busca contribuir al entendimiento de posibles

mecanismos de acción, explorando las interacciones nanopartícula biogénica-célula microbiana.

El **Capítulo I** introduce el tema de estudio de la tesis. El **Capítulo II** aborda la síntesis biológica de nanopartículas de plata a partir de filtrados extracelulares de los hongos *Penicillium expansum* y *Phanerochaete chrysosporium*. Incluye la evaluación de parámetros para mejorar la producción y caracterización detallada de las nanopartículas. Los **Capítulos III**, **IV** y **V** detallan la evaluación de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas frente a bacterias, hongos, microorganismos resistentes y biofilms. Se exploran las interacciones con diversas técnicas, como Microscopía Raman Confocal, Microscopía de Fuerza Atómica, entre otras. El **Capítulo VI** se enfoca en la toxicidad de las nanopartículas de plata en la línea celular humana THP-1. Finalmente, el **Capítulo VII** presenta las conclusiones finales y las perspectivas.

En conjunto, los resultados demuestran el potencial antimicrobiano de las nanopartículas de plata biogénicas, proponiendo mecanismos de acción frente a diversos microorganismos con baja toxicidad para las células humanas. Estas nanopartículas se vislumbran como una herramienta antimicrobiana prometedora en salud humana, animal y agricultura.

Silver nanoparticles biosynthesis: characterization and studies on their antimicrobial potential.

B.C. María Belén Estevez Vidal
Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química
Universidad de la República
2024

Advisors
Dra. Silvana Alborés
Área de Microbiología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química,
Universidad de la República
Dr. Ricardo Faccio
Área de Física, Departamento de Experimentación y Teoría de la Estructura de la Materia y sus Aplicaciones, Facultad de Química,
Universidad de la República

Abstract.
In recent years, biological synthesis of nanoparticles has gained prominence, surpassing chemical and physical methods. This approach involves the production of nanoparticles within or outside cells by microorganisms. Extracellular biosynthesis simplifies processing, allowing efficient separation and purification of nanoparticles in fewer steps.
Particularly, silver nanoparticles have garnered considerable interest due to their antimicrobial properties. The mechanisms of action are complex, depending on factors such as physicochemical properties, composition of the biological stabilizer, and the type of microorganism.
This thesis, comprising seven chapters, focuses on the synthesis of silver nanoparticles by fungi, their characterization, and evaluation of their antimicrobial potential. Additionally, it seeks to contribute to the understanding

of possible mechanisms of action by exploring biogenic nanoparticle and microbial cell interactions.

Chapter I introduces the thesis's research topic. **Chapter II** addresses the biological synthesis of silver nanoparticles from extracellular filtrates of the fungi *Penicillium expansum* and *Phanerochaete chrysosporium*. It includes the evaluation of parameters to enhance production and detailed characterization of the nanoparticles. **Chapters III, IV, and V** detail the assessment of the antimicrobial activity of the nanoparticles against bacteria, fungi, resistant microorganisms, and biofilms. Interactions are explored using various techniques such as Confocal Raman Microscopy, Atomic Force Microscopy, among others. **Chapter VI** focuses on the toxicity of silver nanoparticles in the human THP-1 cell line. Finally, **Chapter VII** presents the finals conclusions and perspectives.

Together, the results demonstrate the antimicrobial potential of biogenic silver nanoparticles, proposing mechanisms of action against various microorganisms with low toxicity to human cells. These nanoparticles are envisioned as a promising antimicrobial tool in human health, animal health, and agriculture.

ÍNDICE

Prólogo iv

Agradecimientos vi

Resumen. x

Abstract. xii

Listado de tablas xviiii

Listado de figuras xix

Listado de abreviaturas xxiiii

Capítulo I - Introducción 1

La ciencia de los nanomateriales. 2

Nanopartículas de plata. 3

Síntesis de AgNP. 5

Una guerra que no acaba: las enfermedades infecciosas. 11

Biofilm: la unión hace a la fuerza. 13

Actividad antimicrobiana de las AgNP. 16

Mecanismos de acción antimicrobiano de las AgNP. 18

Antecedentes en Uruguay 23

Hipótesis. 24

Objetivos de la tesis 24

Publicaciones 25

Capítulo II – Biosíntesis y caracterización 26

Introducción. 27

Objetivos. 31

Estrategia 31

Resumen gráfico 30
Metodología 33
Resultados 39
Discusión 52
Conclusiones 59
Capítulo III – Actividad antimicrobiana 60
Introducción 61
Objetivos 65
Estrategia 65
Resumen gráfico 66
Metodología 67
Resultados 78
Discusión 105
Conclusiones 116
Capítulo IV – AgNP *vs Salmonella enterica* multirresistentes 118
Introducción 119
Objetivos 122
Estrategia 122
Resumen gráfico 123
Metodología 124
Resultados 128
Discusión 132
Conclusiones 134
Capítulo V - Biofilms 135
Introducción 136
Objetivos 139

Estrategia 139
Resumen gráfico 140
Metodología 141
Resultados 147
Discusión 165
Conclusiones 172
Capítulo VI - Toxicidad 173
Introducción 174
Objetivos 178
Estrategia 178
Resumen gráfico 179
Metodología 180
Resultados 184
Discusión 187
Conclusiones 192
Capítulo VII – Conclusiones y perspectivas 193
Conclusiones finales 194
Perspectivas 196
Bibliografía 198
Anexo I - Medios de cultivo 227
Anexo II – Publicaciones 230
Anexo III – Historias finales 265

LISTADO DE TABLAS.

Capítulo I: INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1: Microorganismos usados en la síntesis de AgNP 9

Tabla 1.2: Condiciones evaluadas durante la síntesis biológica de AgNP 11

Tabla 1.3: Productos comerciales que contienen plata coloidal 17

Capítulo II: BIOSÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

Tabla 2.1: Resultados de caracterización de las AgNP 48

Tabla 2.2: Asignación de bandas en los espectros Raman de las PeNP 50

Tabla 2.3: Asignación de bandas en los espectros Raman de las PchNP 50

Capítulo III: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Tabla 3.1: Microorganismos utilizados 67

Tabla 3.2: Concentración Inhibitoria Mínima frente a bacterias 79

Tabla 3.3: Asignaciones de las bandas Raman para *E. coli* 83

Tabla 3.4: Asignaciones de las bandas Raman para *S. aureus*. 85

Tabla 3.5: Asignaciones de las bandas Raman para *P. aeruginosa* 86

Tabla 3.6: Asignaciones de las bandas Raman para *B. subtilis*. 87

Tabla 3.7: Concentración Inhibitoria Mínima frente a hongos 94

Tabla 3.8: Asignaciones de las bandas Raman para *C. albicans* 98

Tabla 3.9: Asignaciones de las bandas Raman para *P. oryzae* 99

Capítulo IV: NANOPARTÍCULAS DE PLATA *vs Salmonella enterica* MULTIRRESISTENTES

Tabla 4.1: Perfil de resistencia a antibióticos 125

Tabla 4.2: Concentración Inhibitoria y Bactericida Mínima 128

Tabla 4.3: Asignación de bandas de espectros Raman 192

Capítulo V: BIOFILMS

Tabla 5.1: Asignaciones de las bandas Raman para *E. coli* 150

Tabla 5.2: Asignaciones de las bandas Raman para *C. albicans* 152

Tabla 5.3: Asignaciones de las bandas Raman para*S. Aureus* 154

LISTADO DE FIGURAS

Capítulo I: INTRODUCCIÓN

Figura 1.1: Búsqueda bibliográfica en Scopus 3
Figura 1.2: Esquema de una nanopartícula metálica 4
Figura 1.3: Mecanismos de síntesis de AgNP 6
Figura 1.4: Etapas en la formación de un biofilm 14
Figura 1.5: Esquema de la estructura de bacterias 19
Figura 1.6: Mecanismos antibacterianos de las AgNP 22

Capítulo II: BIOSÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

Figura 2.1: Metodología de síntesis biológica de AgNP 34
Figura 2.2: Caracterizaciones realizadas sobre las BNP 38
Figura 2.3: Cambio de color asociado a la síntesis de BNP 39
Figura 2.4: Espectro de absorción UV-visible (síntesis) 40
Figura 2.5: Espectro de absorción UV-visible (centrifugación) 41
Figura 2.6: Evaluación de las condiciones de reacción 43
Figura 2.7: Caracterización de tamaño para PeNP 45
Figura 2.8: Caracterización de tamaño para PchNP 46
Figura 2.9: Medidas de Potencial Z 47
Figura 2.10: Espectro Raman de las PeNP 49
Figura 2.11: Espectro Raman de las PchNP 49
Figura 2.12: Resumen de caracterizaciones 50
Figura 2.13: Estabilidad coloidal 51

Capítulo III: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Figura 3.1: Metodología de síntesis química de AgNP 69
Figura 3.2: Metodología de Concentración Inhibitoria Mínima 70
Figura 3.3: Preparación de muestras para Microscopía Raman Confocal y Microscopía de Fuerza Atómica 73
Figura 3.4: Preparación de muestras para ESEM, TEM y Cryo-EM 75

Figura 3.5: Determinación del estrés oxidativo 77
Figura 3.6: Espectro de absorción UV-visible (síntesis química) 78
Figura 3.7: Espectros Raman de células bacterianas 81
Figura 3.8: Imágenes de Microscopía Raman Confocal 82
Figura 3.9: Imágenes de Microscopía de Fuerza atómica 89
Figura 3.10: Imágenes de ESEM para células de *E. coli* 90
Figura 3.11: Imágenes de ESEM para células de *B. subtilis* 90
Figura 3.12: Imágenes de TEM para células de *E. coli* 91
Figura 3.13: Generación de ERO en bacterias 92
Figura 3.14: Generación de ERN en bacterias 93
Figura 3.15: Espectros Raman de células de *C. albicans* 96
Figura 3.16: Espectros Raman de células de *P. oryzae* 97
Figura 3.17: Microscopía Raman Confocal de células de *C. albicans* 97
Figura 3.18: Imágenes de Cryo-EM para células de *C. albicans* 100
Figura 3.19: Imágenes de Cryo-EM para células de *P. expansum* 101
Figura 3.20: Imágenes de Cryo-EM para células de *A. niger* 102
Figura 3.21: Generación de ERO en *C. albicans* 103
Figura 3.22: Generación de ERN en *C. albicans* 104
Figura 3.23: Mecanismos de acción antimicrobianos propuestos 111
Figura 3.24: Mecanismos de acción antifúngicos propuestos 115

Capítulo IV: NANOPARTÍCULAS DE PLATA *vs* *Salmonella enterica* MULTIRRESISTENTES

Figura 4.1: Determinación de la Concentración Bactericida Mínima 126
Figura 4.2: Espectros Raman de células tratadas y sin tratar con BNP 130
Figura 4.3: Imágenes de Microscopía Raman Confocal 131
Figura 4.4: Imágenes de Microscopía de Fuerza Atómica 131

Capítulo V: BIOFILMS

Figura 5.1: Metodología de erradicación de biofilms 142

Figura 5.2: Metodología de inhibición de biofilms 144

Figura 5.3: Preparación de muestras para Microscopía Raman Confocal y Microscopía de Fuerza Atómica 145

Figura 5.4: Resultados de erradicación de biofilms 148

Figura 5.5: Espectros Raman de biofilms de *E. coli* 155

Figura 5.6: Espectros Raman de biofilms de *C. albicans* 156

Figura 5.7: Espectros Raman de biofilms de *S. aureus* 156

Figura 5.8: Microscopía Raman Confocal de biofilms de *E. coli* 157

Figura 5.9: Microscopía Raman Confocal de biofilms de *C. albicans* 158

Figura 5.10: Microscopía de Fuerza Atómica de bioflms de *E. coli* 159

Figura 5.11: Microscopía de Fuerza Atómica de bioflms de *S. aureus* 160

Figura 5.12: Resultados de inhibición de biofilms de bacterias 161

Figura 5.13: Resultados de inhibición de biofilms de levaduras 162

Figura 5.14: Microscopía Láser Confocal para la inhibición de biofilms de *C. albicans* 163

Figura 5.15: Microscopía Láser Confocal para la inhibición de biofilms de *C. tropicalis* 164

Figura 5.16: Mecanismo propuesto de erradicación de biofilms 170

Capítulo VI: TOXICIDAD

Figura 6.1: Búsqueda bibliográfica en Scopus 175

Figura 6.2: Puesta a punto del ensayo del MTT 181

Figura 6.3: Toxicidad dosis-dependiente 182

Figura 6.4: Resultado de puesta a punto del ensayo del MTT 184

Figura 6.5: Resultado de la toxicidad dosis-dependiente 185

Figura 6.6: Resultado de la toxicidad tiempo-dependiente 186

Algunas de las ilustraciones presentes en este manuscrito fueron realizadas utilizando como modelo diseños de Biorender.com

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxiribonucleico

AFM: Microscopía de Fuerza Atómica

AgNP: Nanopartículas de plata

ARN: Ácido ribonucleico

bio-AgNP: AgNP de síntesis biológica

BNP: AgNP biogénicas sintetizadas en esta tesis

CBM: Concentración Bactericida Mínima

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima

CMIB: Concentración Mínima Inhibitoria de Biofilm

Cryo-EM: Criomicroscopía Electrónica de Transmisión

DHF: 2′,7′ diclorofluoresceína

DLS: Dispersión Dinámica de la Luz

DMSO: Dimetilsulfóxido

dTHP-1: Células de THP-1 diferenciadas a macrófagos

eADN: ADN extracelular

EPS: Exopolisacárido

ERN: Especies Reactivas del Nitrógeno

ERO: Especies Reactivas del Oxígeno

ESEM: Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental

FBS: Suero Fetal Bovino

ICP-AES: Espectroscopía de Emisión Atómica Acoplada Inductivamente con Plasma

MRC: Microscopía Raman Confocal

MTT: Metil Tiazol Tetrazolio

PCA: Análisis de Componentes Principales

PchNP: AgNP sintetizadas a partir del filtrado extracelular del hongo *Phanerochaete crysosporium*

PDI: Índice de polidispersidad

PeNP: AgNP sintetizadas a partir del filtrado extracelular del hongo *Penicillium expansum*

PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato

QNP: AgNP de síntesis química

QS: Quorum sensing

RAM: Resistencia antimicrobiana

Rpm: Revoluciones por minuto

RPS: Resonancia del Plasmón de Superficie

SAXS: Difracción de Rayos X a bajo ángulo

SEM: Microscopía Electrónica de Barrido

SERS: Dispersión Raman Intensificada en Superficie

TEM: Microscopía Electrónica de Transmisión

THP-1: Línea celular de leucemia monocítica humana

Capítulo I

Lo pequeño se halla en un punto donde convergen la química, la física y la biología, una intersección que recibe el nombre de nanotecnología.

ROBIN COOK, ***Nano***

INTRODUCCIÓN

La ciencia de los nanomateriales.

Según define la Iniciativa Nacional de Nanotecnología (NNI) de los Estados Unidos, la nanotecnología es la comprensión y el control de la materia a escala nanométrica, en dimensiones que oscilan aproximadamente entre 1 y 100 nanómetros (NNI, 2024). La primera persona en introducir el concepto de nanotecnología fue el físico y ganador de Premio Nobel Richard Feynman. Durante la reunión anual de la Sociedad Americana de Física de 1959, Feynman presentó su charla titulada "Hay mucho espacio en el fondo" en el Instituto de Tecnología de California (Caltech) donde planteó su hipótesis "¿por qué no podemos escribir los 24 volúmenes completos de la Enciclopedia Británica en la cabeza de un alfiler?", discutiendo las posibilidades de la miniaturización y la manipulación a nivel molecular (Bayda et al., 2020).

La charla de Feynman no fue el primer contacto del ser humano con los nanomateriales. Vestigios de nanotecnología pueden ser rastreados hasta varios milenios atrás. Un ejemplo lo podemos encontrar en el antiguo Egipto. Los egipcios empleaban un tinte para el cabello basado en plomo que contenía nanocristales (Jeevanandam et al., 2018; Barhoum et al., 2022). El primer colorante artificial, el "azul egipcio", fue creado por los egipcios alrededor del siglo III a.C. a partir de una mezcla de vidrio y cuarzo nanométrico (Jeevanandam et al., 2018). La belleza de numerosos objetos históricos también se atribuye a la nanotecnología. El ejemplo más conocido es el de la copa de Licurgo, una antigua copa de cristal romana del siglo IV d.C. que incorpora nanopartículas de oro y plata, lo que provoca un cambio de color dependiendo de cómo sea iluminada. Los colores vibrantes de los vitrales que adornan muchas iglesias medievales son también el resultado de la presencia de nanomateriales en el interior del vidrio (Barhoum et al., 2022). Por supuesto, la naturaleza fue la primera en utilizar nanomateriales en sus creaciones. Por ejemplo, los colores del plumaje de algunas aves son el resultado de una dispersión de la luz en las nanoestructuras de los componentes de las plumas con lo que se altera el índice de refracción de la luz. Otro ejemplo son los geckos, que pueden adherirse fuertemente a superficies gracias a las estructuras en nano escala de sus patas (Barhoum et al., 2022),

incluso dando la sensación de caminar sobre el agua. Algunos microorganismos, como la bacteria *Magnetospirillum* spp., producen nanopartículas de magnetita que les permiten orientarse en ambientes acuáticos según los campos magnéticos externos de la Tierra y el campo geomagnético (Sancho et al., 2023).

En la actualidad, existen diversos ejemplos de nanomateriales manufacturados, tales como nanotubos de carbono, *quantum dots*, nanopartículas, grafeno o fullerenos (Bayda et al., 2020). Las investigaciones vinculadas a la nanotecnología han experimentado un notorio crecimiento en las últimas décadas, como se ilustra en la **Figura 1.1**, con proyecciones significativas al futuro.

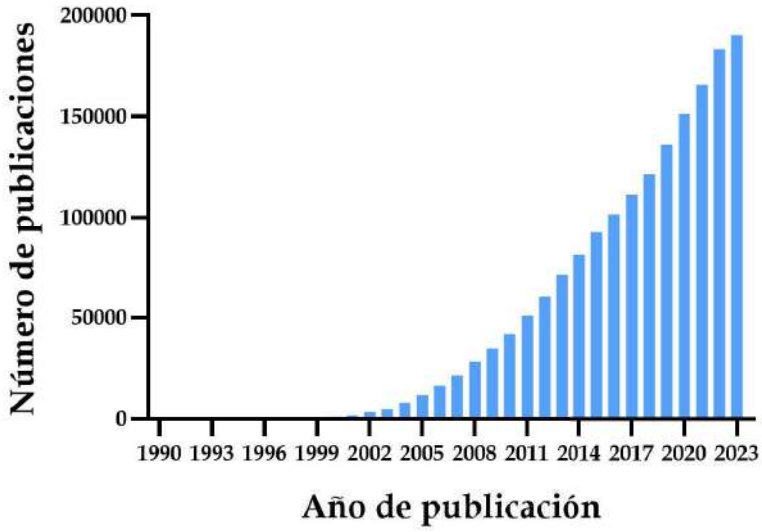


Figura 1.1. Resultados de la búsqueda de trabajos en la web Scopus usando las palabras claves "nanotecnología", "nanociencia" y "nanomaterial". Fecha de búsqueda: 16 de enero de 2024.

Nanopartículas de plata.

Las nanopartículas metálicas se caracterizan por su tamaño en el rango de 1 a 100 nanómetros. La estructura de estos nanomateriales es, en términos generales, siempre la misma. Están compuestas del núcleo que contiene el metal, generalmente recubierto de una capa externa o *capping* cuya composición depende del método de síntesis (Johnston, 2012; Barhoum et al., 2022). En la **Figura 1.2** se ilustra la estructura básica de una nanopartícula metálica.

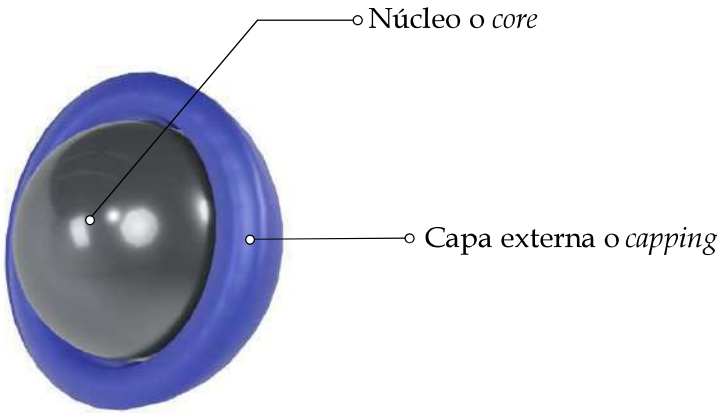


Figura 1.2. Esquema ilustrativo de la estructura básica de las nanopartículas metálicas.

Cuando un material alcanza la escala nanométrica la relación superficie/volumen se incrementa notablemente lo cual se traduce en nuevas propiedades mecánicas, químicas, eléctricas y ópticas, que les otorgan una amplia gama de aplicaciones en diversos campos (Khan et al., 2019; Magdy et al., 2024). Entre las más destacadas se encuentran aquellas en medicina (administración de fármacos, antimicrobianos, biosensores, diagnóstico y tratamiento del cáncer, desarrollo de vacunas), medio ambiente (sensores de condiciones ambientales, remediación de contaminantes y tóxicos), electrónica (sensores, dispositivos informáticos, miniaturización de chips), energía (fotoelectroquímica, electrólisis del agua), industria alimentaria (aditivos, empaques) y agricultura (promoción del crecimiento vegetal, control de fitopatógenos), entre otras (Marques et al., 2018; Khan et al., 2019; Yaqoob et al., 2020; Nagaprasad et al., 2022; Sowmya et al., 2023).

Dentro de las nanopartículas metálicas se encuentran las nanopartículas de plata (AgNP). Estas nanopartículas son agregados de átomos de plata (Ag^0) que exhiben una alta eficiencia absorbiendo y dispersando la luz debido a un fenómeno denominado Resonancia del Plasmón de Superficie (RPS). Este fenómeno varía considerablemente con su tamaño y forma (Cao et al., 2011) por lo que una completa caracterización de las mismas es fundamental dado que influye notablemente en sus aplicaciones.

La caracterización de las AgNP puede ser abarcada por diferentes metodologías que permiten determinar el tamaño, la distribución de tamaños, la forma, la carga superficial, los agentes que conforman el *capping* y el contenido de plata. Una de las técnicas más simples y rápidas para la caracterización de las AgNP es la espectroscopía UV-visible gracias a la aparición del pico correspondiente a la RPS en el rango de 400 a 450 nm (Raj et al., 2021). La posición del pico en el espectro da indicios del tamaño y la forma de las AgNP. Además, esta técnica permite evaluar la estabilidad coloidal de las AgNP ya que una pérdida de dicha estabilidad implicaría tanto un corrimiento en la posición del pico como una disminución de la absorbancia. La determinación de la forma y el tamaño de las AgNP se realiza comúnmente mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) (Kumar et al., 2023). La Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) se utiliza para determinar tanto el tamaño como la distribución de tamaños y el potencial Z para determinar la carga superficial (Kumar et al., 2023). Para el análisis de los agentes superficiales, se utilizan comúnmente la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y la Espectroscopía Raman (Magdy et al., 2024). En particular, gracias a la RPS, las AgNP presentan un fenómeno denominado Dispersión Raman Intensificada en Superficie (SERS). Este fenómeno lleva a una mejora significativa de las señales Raman de moléculas próximas a la superficie de las nanopartículas lo cual resulta de gran importancia para identificar la naturaleza del agente estabilizante (Joshi et al., 2018; Sowmya et al., 2023)

Síntesis de AgNP.

En la actualidad, la producción mundial de AgNP oscila entre 360 y 450 toneladas anuales, con perspectivas de alcanzar las 800 toneladas anuales para el año 2025. Los principales actores en la producción de AgNP son Estados Unidos, China, Japón y Europa (Skiba et al., 2020). Este aumento en la producción responde a la creciente demanda impulsada por las diversas propiedades multifuncionales que presentan estas nanoestructuras.

La síntesis de AgNP (y de las nanopartículas en general) se puede realizar por dos enfoques: el método *top down* y el método *bottom up* (**Figura 1.3**). La diferencia

entre ambos métodos radica en que el *top down* es una técnica que implica la destrucción del material de partida hasta unidades más pequeñas que son luego convertidas en AgNP en tanto que el *bottom up* es un método constructivo a partir de átomos o moléculas hasta formar las AgNP (Hasan et al., 2022; Magdy et al., 2024). Además, la síntesis de AgNP se clasifica como síntesis física, química o biológica. Los métodos de síntesis física se categorizan como *top down* y generalmente involucran una descomposición y molienda del material original para obtener las AgNP. Si bien generalmente no hay contaminación de solventes, la síntesis física de AgNP tiene algunas desventajas como el elevado consumo energético (Nie et al., 2023). Los métodos *bottom up* incluyen a la síntesis química y la síntesis biológica. La síntesis química es uno de los métodos más utilizados en la síntesis de AgNP. Requiere un agente reductor que transforme Ag^{+} en Ag^{0}, formando así el núcleo de la nanopartícula (Nie et al., 2023) y un estabilizante que garantice la estabilidad de las mismas. Algunos ejemplos de agentes reductores son el citrato, el ascorbato o el borohidruro de sodio (Banne et al., 2017; Hasan et al., 2022). Este método de síntesis tiene como ventajas el control del tamaño y la gran cantidad de producción de las AgNP, sin embargo, puede tener algunas desventajas como el uso de solventes tóxicos (Nie et al., 2023).

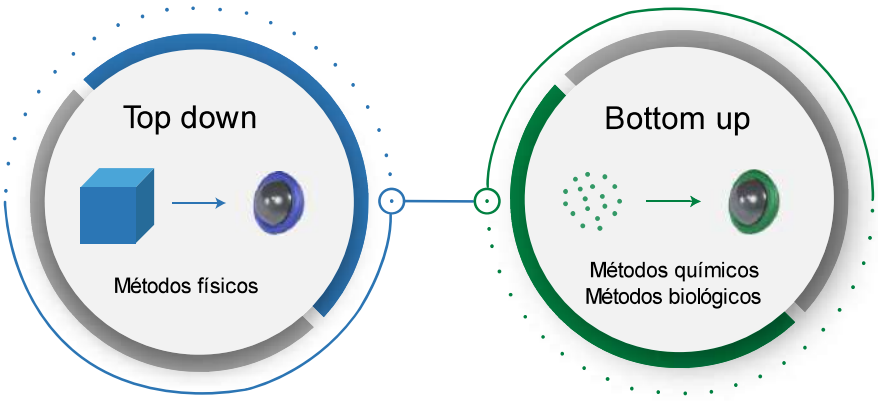


Figura 1.3. Mecanismos de síntesis de AgNP. En los métodos *bottom up* se parte de átomos o moléculas para dar lugar a las nanopartículas mientras que en los métodos *top down* se parte de un material de mayor tamaño y se lo reduce hasta alcanzar el tamaño nanométrico.

Como se mencionó previamente, dada la destacada utilidad de las AgNP, sus procesos de síntesis han suscitado considerable interés. En sintonía con la corriente actual de reducir el impacto ambiental y preservar la salud humana, la selección cuidadosa del método de síntesis se vuelve extremadamente relevante (Vishwanath and Negi, 2021). Por tal razón, la síntesis biológica ha ganado considerable interés (Nie et al., 2023). Este tipo de síntesis presenta múltiples beneficios, incluyendo un alto rendimiento, estabilidad, forma definida y tamaño uniforme de las nanopartículas (Vishwanath and Negi, 2021). Para la síntesis biológica de AgNP (bio-AgNP) se emplean diversos organismos, como microorganismos y plantas.

La cantidad de reactivos empleados en la obtención de bio-AgNP es reducida, ya que los extractos vegetales o microbianos desempeñan roles duales como agentes reductores y estabilizantes. Aunque tanto la síntesis por medio de plantas como de microorganismos puede evocar métodos de síntesis química, es importante destacar que los reactivos utilizados en la síntesis biológica no son tóxicos y tampoco se generan subproductos tóxicos (Vishwanath and Negi, 2021).

En la síntesis por plantas se utiliza generalmente una solución acuosa de nitrato de plata y la reducción ocurre facilitada por las biomoléculas presentes en el extracto de la planta (Vishwanath and Negi, 2021). Los extractos de las plantas contienen una gran diversidad de compuestos tales como proteínas, flavonoides, alcaloides, antioxidantes, ácidos orgánicos, entre otros. Estos metabolitos son los responsables de la reducción de Ag^+ para formar las bio-AgNP (Mustapha et al., 2022; Nadaf et al., 2022). Algunos ejemplos recientemente reportados de plantas utilizadas para obtener bio-AgNP son *Salvia fruticosa* (Ghaith et al., 2020), *Juniperus procera* (Khan et al., 2022) o *Camellia sinensis* (Khalid Mohamed et al., 2021).

La obtención de nanopartículas de plata biogénicas (bio-AgNP) mediante microorganismos se lleva a cabo principalmente a través de bacterias y hongos, facilitada por las enzimas responsables de los mecanismos de defensa de estos microorganismos que reducen los iones de plata (Ag^+) a plata elemental (Ag^0) para eliminar los iones de plata, altamente tóxicos para ellos (Vishwanath and

Negi, 2021). La síntesis de bio-AgNP por microorganismos puede ocurrir de manera intracelular o extracelular. En la síntesis intracelular, los iones de plata se acumulan dentro de la célula, induciendo su nucleación. Por otro lado, en la síntesis extracelular, se obtiene material excretado por los microorganismos que contiene agentes reductores. Este material se separa de la biomasa mediante filtración y se utiliza para la síntesis. La síntesis extracelular presenta la ventaja de que las bio-AgNP pueden obtenerse y purificarse fácilmente (Vishwanath and Negi, 2021; Nie et al., 2023). En cuanto a la síntesis por hongos, se destacan diversas ventajas, como el rendimiento gracias a la abundancia de enzimas, proteínas y otros compuestos excretados al medio extracelular. En la **Tabla 1.1** se presentan, a modo de ejemplo, algunos microorganismos que se han utilizado en la síntesis de bio-AgNP.

Tabla 1.1. Ejemplos de algunos de los microorganismos que se encuentran en bibliografía, utilizados para la síntesis extracelular de bio-AgNP.

Microorganismo		Tamaño (nm)	Aplicación	Referencia
Bacterias	*Oscillatoria limnetica*	40	Antimicrobiano Anticancerígno	Hamouda et al., 2019
	Streptomyces sp.	35-60	Antimicrobiano	Adiguzel et al., 2018
	Staphylococcus aureus *Acinetobacter baumanii* *Escherichia coli*	11.14 (6.59) 12.22 (2.45) 12.87 (2.95)	Antimicrobiano	Peiris et al., 2018
	Pseudomonas aeruginosa	30-40	Antimicrobiano	Quinteros et al., 2016
	Rhodococcus sp.	5-50	Antimicrobiano	Otari et al., 2015
	Lactobacillus spp.	41 y 39	Antimicrobiano	Chaudhari et al., 2012
	Bacillus sp.	9-32	Antimicrobiano	Jaidev and Narasimha, 2010
Hongos	*Trichoderma harzianum*	8 (2)	Antimicrobiano	Sanguiñedo et al., 2023
	Aspergillus niger	21.38	Antimicrobiano Anticancerígeno	Lan Chi et al., 2022
	Punctularia atropurpurascens *Penicillium expansum* *Phanerochaete chrysosporium*	14 (4) 38 (12) 11 (2)	Antimicrobiano	Sanguiñedo et al., 2018
	Grifola frondosa *Botrytis cinerea* *Rhizopus stolonifer* *Gymnopilus spectabilis*	27 (5) 34 (6) 40 (7) 49 (6)	N/D	
	Pleurotus ostreatus	40	Antimicrobiano	Al-Bahrani et al., 2017
	Fusarium oxysporium	20-50	N/D	(Durán et al., 2005)

Si bien los mecanismos de síntesis no han sido del todo elucidados se sabe que las enzimas presentes en el medio extracelular del hongo reducen los iones Ag^{+} a Ag^{0} formando el núcleo en una escala nanométrica (Guilger-Casagrande and Lima, 2019). De entre las enzimas y moléculas involucradas en este proceso, se consideran a las enzimas nitrato reductasas dependientes de NADH/NADPH como las más importantes (Nie et al., 2023). En uno de los primeros estudios sobre los mecanismos de síntesis extracelular por hongos se evaluó la actividad de la enzima nitrato reductasa y la producción de quinonas en *Fusarium oxysporum*, un hongo capaz de sintetizar bio-AgNP (Durán et al., 2005). Según los resultados se propuso la conjugación de la antraquinona como un transportador de electrones para reducir Ag^{+} a Ag^{0} con la actividad de la enzima nitrato reductasa dependiente de NADPH como un posible mecanismo de síntesis.

Tal como se mencionó, la síntesis de bio-AgNP por hongos es una técnica simple. A pesar de esto, existen una serie de parámetros que pueden afectar el producto de síntesis de distintas formas, tanto a nivel del rendimiento como del tamaño, forma y estabilidad de las bio-AgNP. En la **Tabla 1.2** se muestran algunos ejemplos de condiciones evaluadas para diferentes síntesis de bio-AgNP por hongos y la forma de medir la respuesta. Algunos de estos parámetros son la agitación, la temperatura, la luz, la biomasa, el tiempo de síntesis, el pH de la solución y la concentración del metal precursor (Barabadi et al., 2019; Guilger-Casagrande and Lima, 2019). Por ejemplo, la temperatura del proceso de síntesis puede afectar la forma, el tamaño y la monodispersidad de las bio-AgNP, en tanto que la agitación puede afectar el tamaño y la monodispersidad (Beltrán Pineda et al., 2022). La evaluación de estas condiciones es crucial para seleccionar un método de síntesis reproducible y lograr una buena dispersidad y estabilidad de las bio-AgNP sintetizadas.

Tabla 1.2. Algunos ejemplos de condiciones evaluadas en la biosíntesis de bio-AgNP por diferentes hongos y la forma de medir la respuesta.

Microorganismo	Condiciones	Respuesta	Referencia
Penicillium oxalicum	pH, temperatura, [$AgNO_3$], biomasa	RPS en el espectro UV-visible	Rose et al., 2019
Aspergillus fumigatus	pH, temperatura, [$AgNO_3$], [NaCl], biomasa, tiempo de incubación	Tamaño de la nanopartícula	Shahzad et al., 2019
Rhizopus stolonifer	Temperatura, [$AgNO_3$]	Tamaño de la nanopartícula	AbdelRahim et al., 2017
Aspergillus oryzae	pH, temperatura, [$AgNO_3$]	RPS en el espectro UV-visible, tamaño de la nanopartícula	Phanjom et al., 2017
Arthroderma fulvum	pH, [$AgNO_3$], temperatura, tiempo de incubación	RPS en el espectro UV-visible	Xue et al., 2016
Fusarium oxysporum	pH, temperatura, medio de cultivo, intensidad de la luz, biomasa, [$AgNO_3$], volumen filtrado	RPS en el espectro UV-visible, cuantificación de proteínas	Birla et al., 2013

Una guerra que no acaba: las enfermedades infecciosas.

El ser humano ha convivido con las enfermedades infecciosas desde el inicio de su historia. El descubrimiento de la penicilina en 1928 por el Dr. Alexander Flemming fue sin duda un hito que marcó el rumbo de la historia. Sin embargo, el uso indiscriminado e incorrecto de los agentes antimicrobianos, además de la propia naturaleza de los microorganismos han fomentado la aparición de la resistencia contra estos agentes.

Algunos microorganismos de gran relevancia a nivel de la salud son los que constituyen el grupo ESKAPE formado por *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumanii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp. Estos microorganismos presentan una gran capacidad de "escapar" de la acción de los antibióticos debido a sus diversos mecanismos de resistencia tales como cambios de permeabilidad, modificación de los sitios de acción de los fármacos o la inactivación del fármaco, entre otros (Jadimurthy et

al., 2022). Todos los patógenos del grupo ESKAPE entran en las categorías de prioridad crítica y alta de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos (WHO, 2017). Estas bacterias no son las únicas de preocupación para salud. En los últimos tiempos, las infecciones por *Escherichia coli* han ido en aumento, tanto a nivel de la salud humana como animal (Buranasinsup et al., 2023; Ling et al., 2024).

Por otro lado, las infecciones fúngicas representan un preocupante desafío para la salud a nivel global. Más de 300 millones de personas sufren de enfermedades fúngicas graves, y anualmente, más de 2 millones de vidas se pierden debido a micosis, situándola como una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo. Este problema se ve agravado por el aumento de hongos patógenos emergentes, así como por la resistencia en aumento a los escasos medicamentos antifúngicos disponibles, lo que merma significativamente la eficacia de los tratamientos (Mussin and Giusiano, 2022). En el año 2022, la OMS emitió una lista de los patógenos fúngicos prioritarios para investigación y desarrollo en salud pública (WHO, 2022b). La lista se divide en los grupos de crítica, alta y moderada prioridad e incluye tanto levaduras como hongos filamentosos.

Sin lugar a dudas la resistencia antimicrobiana (RAM) es una de las principales amenazas globales para la salud pública. Se estima que la RAM bacteriana fue directamente responsable de 1.27 millones de muertes en todo el mundo en 2019 y contribuyó indirectamente en 4.95 millones de muertes (WHO, 2023).

Las enfermedades infecciosas también son importantes en el sector agrícola, dónde las enfermedades que afectan las etapas pre y post cosecha causan pérdidas enormes en cuanto a la producción total de los cultivos (Gautam et al., 2020). Los principales factores para el surgimiento de las enfermedades en el área agrícola son la aparición de nuevos patógenos, cepas más virulentas y el uso indiscriminado de pesticidas y antimicrobianos que favorece la selección de cepas resistentes, entre otros (Mwangi et al., 2023).

Se estima que la pérdida de alimentos está dentro del 20-30% para los cultivos de trigo, arroz, maíz, papa y soja en el mundo y en términos económicos, las enfermedades en los cultivos causan una pérdida global anual de 220 billones de

dólares (Savary et al., 2019). Las enfermedades en el área agrícola, por tanto, generan una gran inestabilidad de la industria alimentaria además de ser una de las principales causas de la hambruna mundial por lo que la búsqueda de estrategias para combatir a los fitopatógenos se vuelve apremiante.

En el año 2015, la red "Triple alianza" unió los esfuerzos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización Mundial por la Salud Animal (OMSA) y La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) para crear un Plan de Acción Global (GAP) para trabajar sobre la resistencia antimicrobiana (WHO, 2015). Recientemente, el "Plan de Una Salud" (2022-2026) fue implementado para trabajar en conjunto por la salud de humanos, animales, plantas y del ambiente (WHO, 2022a).

La resistencia a los antimicrobianos amenaza con enviarnos a un momento de la historia en que no pudimos tratar fácilmente infecciones tales como la polio, la viruela o la neumonía por lo que la búsqueda de nuevos antimicrobianos se vuelve muy necesaria.

Biofilm: la unión hace a la fuerza.

La primera persona en observar biofilms fue Anton van Leeuwnhoek en el año 1708, cuando observó una muestra de su propia boca. Sin embargo, la primera publicación referida a los biofilms fue en 1975 y hubo que esperar hasta 1996 para que surgieran nuevas investigaciones. Desde entonces, el estudio de los biofilms ha crecido de manera exponencial debido a la importancia que tienen en la salud (Høiby, 2017). Se estima que aproximadamente un 70% de las infecciones bacterianas están asociadas a la formación de biofilms (Jamal et al., 2018; Sharma et al., 2023) y pueden formarse tanto en tejidos como en dispositivos médicos induciendo infecciones crónicas.

Los biofilms son grupos de microorganismos (muchas veces formados por más de una especie) que pueden o no estar adheridos a una superficie y que se encuentran inmersos en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) producida por ellos mismos (Sahoo et al., 2021). Su formación involucra tres etapas principales (Sauer et al., 2022):

i. Agregación y adherencia: las células se agregan entre sí o se adhieren a superficies que pueden ser bióticas o abióticas (**Figura 1.4a**).
ii. Crecimiento y maduración: las colonias microbianas agregadas y adheridas se expanden mediante el crecimiento y la incorporación de células cercanas (**Figura 1.4b**).
iii. Desagregación y desprendimiento: las células pueden abandonar el biofilm como agregados o como células individuales (**Figura 1.4c**).

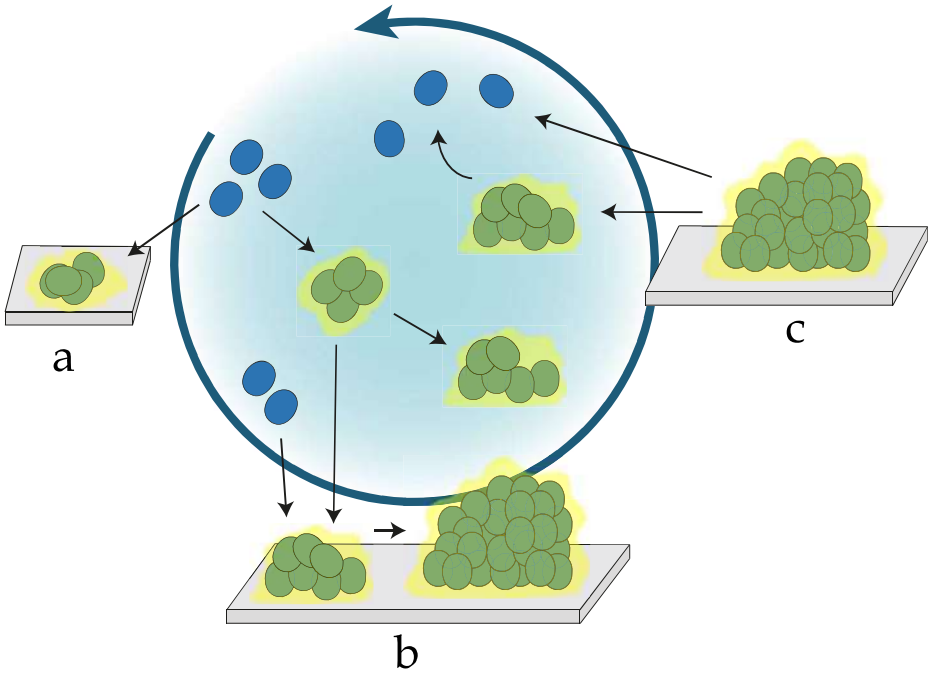


Figura 1.4. Etapas en la formación de un biofilm. a) Agregación y adherencia, b) Maduración, c) Desagregación y desprendimiento. Imagen adaptada de Sauer et al., 2022.

Gracias a la matriz de EPS que actúa como una barrera física dificultando la penetración y la difusión de los antibióticos, la concentración del fármaco que reciben las células microbianas en los biofilms es insuficiente para su eliminación, lo que ha llevado a aumentar las dosis utilizadas (Iemyte et al., 2023).

La matriz de EPS puede variar en sus propiedades físicas y químicas, pero mayormente están compuestas por agua y también por sustancias como proteínas, polisacáridos, lípidos y ADN extracelular (eADN) (Vestby et al., 2020;

Kim and Chin, 2023). En los biofilms los polisacáridos se entrelazan para formar una estructura densa que forma la matriz en tanto que los grupos hidroxilo de estos polisacáridos aumentan la resistencia mecánica (Sharma et al., 2023). Las EPS tienen la capacidad de asociarse con iones metálicos y otras macromoléculas como proteínas, ADN o lípidos (Sahoo et al., 2021; Sharma et al., 2023). Por ejemplo, en las bacterias Gram negativas, la presencia de ácidos como el D-glucurónico, D-galacturónico y manurónico, les confiere su propiedad aniónica, una característica crucial ya que facilita la unión con cationes bivalentes como el calcio y el magnesio, proporcionando una mayor cohesión en los biofilms ya desarrollados (Sharma et al., 2023). Algunas de las bacterias más comúnmente asociadas a biofilms son *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*.

Por otro lado, entre los hongos formadores de biofilms se encuentran las levaduras *Candida* spp. Entre ellas, *C. albicans* ha sido la más estudiada. Se sabe que forma biofilms compuestos por múltiples tipos de células: redondas, ovales con pseudohifas y alargadas, todas inmersas en la matriz de EPS (Gulati and Nobile, 2016). Para el desarrollo del biofilm de *C. albicans* es fundamental la proliferación de las hifas y, por tanto, las proteínas involucradas en su crecimiento son necesarias para una formación adecuada del biofilm. Las hifas dan estabilidad estructural y un soporte para los otros tipos de células (Gulati and Nobile, 2016; de Souza et al., 2023). Algunos estudios han caracterizado la composición de los biofilms de *C. albicans* encontrando que está principalmente formada por glicoproteínas, polisacáridos (como glucosa, manosa, manano-glucanos con enlaces β-1,6-glucano, etc.), carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos (Zarnowski et al., 2014).

Tanto en bacterias como en levaduras, el eADN de la matriz de EPS cumple un rol fundamental al ser uno de los principales componentes en brindar estabilidad al biofilm (Tashi et al., 2016; Atriwal et al., 2021).

Otras moléculas importantes son las involucradas en el *quorum sensing* (QS), un mecanismo de comunicación célula a célula que desempeña un rol fundamental en la formación de los biofilms (Atriwal et al., 2021). En los sistemas QS se

generan internamente unas moléculas señalizadoras gracias a las cuales se coordina la expresión génica en respuesta a la densidad poblacional. Por ejemplo, la piocianina es una molécula de QS en los biofilms de *P. aeruginosa* (Bodelón et al., 2016) en tanto que en los bioflms de *C. albicans* se ha estudiado el farnesol como una de las moléculas involucradas en el QS (Kovács and Majoros, 2020).

Cuando un microorganismo vive como parte de un biofilm muestra características distintas a su contraparte planctónica, como la cooperación colectiva, una mayor supervivencia a condiciones de estrés ambiental, resistencia a antibióticos, evasión de la respuesta inmune del huésped y la alta tasa de intercambio genético gracias a los canales que presenta la estructura (Paraje, 2011b; Raffaelli et al., 2022). Sumado a esto, la tolerancia de la población de crecimiento lento y la presencia de células persistentes también contribuyen a facilitar el desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos en los biofilms (Sharma et al., 2023).

Los biofilms son, por tanto, un grave problema para la salud al generar infecciones crónicas y persistentes (Nadar et al., 2022; Sharma et al., 2023) y la búsqueda de nuevos antimicrobianos que puedan combatir estas estructuras se ha vuelto un objetivo crucial.

Actividad antimicrobiana de las AgNP.

Las bio-AgNP han tomado protagonismo en los últimos años debido a su diversidad de aplicaciones, fundamentalmente por su capacidad antimicrobiana. En la actualidad existen diversos productos que contienen plata coloidal en sus formulaciones (**Tabla 1.3**).

Las propiedades antimicrobianas de la plata se conocen desde la antigüedad. Aristóteles, maestro de Alejandro Magno (335 a.C.), curaba a los soldados con las "flores de plata" que él mismo fabricaba. Alejandro Magno también sabía que, si almacenaba el agua en recipientes de plata, el líquido se conservaba mejor. Las antiguas culturas del Mediterráneo y Asia introducían láminas de plata en las heridas para prevenir enfermedades y los romanos incluyeron la plata en su libro oficial de medicamentos (Barillo and Marx, 2014). En la actualidad la plata sigue

utilizándose, por ejemplo, bajo la forma de sulfadiazina de plata para evitar infecciones en heridas producidas por quemaduras (Vademecum, 2020).

Tabla 1.3: productos comerciales que contienen plata coloidal

Producto	Aplicación	Referencia
MicrosilverBG™	Cuidado de la piel, cuidado bucal	BioGate
PrataSilver	Desodorante orgánico	Aure
Atom Protect N95 PLUS (FFP2)	Barbijos antibacterianos y antivirales	CONICET, 2021
Textiles	Antivirales	Nanox, 2023
Cursotrat	Antimicrobiano	Ucbvet
Bioni Hygienic pro	Pintura antimicrobiana	BIONI
VIDAKÉ	Pintura antimicrobiana	AIKE
OTOPIC	Solución veterinaria ótica	Inovet
MesoSilver	Suplemento	Mesosilver
Nivea Silver Protect	Desodorante	NIVEA

En este contexto, las AgNP ofrecen una buena alternativa para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Diversos estudios han demostrado que las AgNP son efectivas frente a microorganismos resistentes a antibióticos, a una amplia variedad de hongos, tales como *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus*, así como frente a varios tipos de virus como el virus de la hepatitis B (HPV), *Herpes simplex*, virus sincicial respiratorio, virus de la viruela símica (MPXV) *Adenovirus* y *Coxsackie B virus* (Das et al., 2020; Magdy et al., 2024). En un estudio realizado con bio-AgNP sintetizadas a partir de *Streptomyces sp.* se comprobó la efectividad frente a *E. coli* y *S. aureus* (Samuel et al., 2023). En otro trabajo utilizando bio-AgNP a partir de plantas se demostró el potencial antimicrobiano frente a distintas bacterias y levaduras de relevancia clínica (Periyasami et al., 2022).

En el área agrícola, recientemente se ha reportado actividad de las bio-AgNP frente a microorganismos fitopatógenos de manzanas y mandarinas (Aldayel et

al., 2023). En Uruguay, un estudio reciente realizado en nuestro grupo de investigación demostró la capacidad antifúngica de bio-AgNP sintetizadas por el hongo *Trichoderma harzianum* frente a los fitopatógenos de trigo *Fusarium graminearum,* y de arroz *Pyricularia oryzae, Rhizoctonia oryzae-sativae* y *Sclerotium oryzae* (Sanguiñedo et al., 2023).

Las AgNP han demostrado también tener un gran potencial contra los biofilms, por ejemplo, para inhibir tanto la formación del biofilm como la producción de la matriz de EPS por *K. pneumoniae* multirresistente (Siddique et al., 2020), frente a biofilms de *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus* (Mohanta et al., 2020), *A. baumanii* (Hetta et al., 2021) así como para evitar la formación de biofilms de *E. faecalis* en tubos de catéter urinario (Swidan et al., 2022). En un estudio realizado por Anju y Sarada (2022) se demostró la capacidad de bio-AgNP para interferir con la señalización de QS en biofilms de *Chromobacterium violaceum*.

Mecanismos de acción antimicrobiano de las AgNP.

Los mecanismos de acción antimicrobianos de las AgNP están siendo muy estudiados y se han logrado grandes avances. Son muchos los factores que contribuyen a la actividad antimicrobiana de las AgNP. Entre ellas está su pequeño tamaño y la gran área superficial que al entrar en contacto con la célula genera interacciones electrostáticas o hidrofóbicas (Wahab et al., 2023).

Algunos de los mecanismos propuestos y estudiados en cuanto a la acción antibacteriana de las AgNP son la generación de estrés oxidativo, la inhibición enzimática, la degradación proteica y los cambios en la expresión génica (Javed et al., 2021; Wahab et al., 2023).

Se ha propuesto que las AgNP son más eficientes contra bacterias Gram negativas que Gram positivas. Esto se explica por la estructura de la célula bacteriana (**Figura 1.5**). Mientras que las bacterias Gram positivas tienen una gruesa capa de peptidoglicano que reduce la posibilidad de penetración de las AgNP al interior celular, las bacterias Gram negativas tienen una capa de peptidoglicano delgada, una membrana externa con lipopolisacárido que facilita las interacciones electrostáticas con AgNP positivamente cargadas y porinas que

permiten el transporte no específico de moléculas hidrofílicas (Modi et al., 2023; More et al., 2023).

Según la literatura, las AgNP cargadas positivamente mejoran muy eficazmente la actividad antimicrobiana de las mismas al permitir una interacción electrostática más eficiente con las cargas negativas de la superficie celular (Abbaszadegan et al., 2015; Salvioni et al., 2017). Sin embargo, las AgNP cargadas negativamente significan una ventaja importante en términos de seguridad en células y tejidos de mamíferos (Salvioni et al., 2017) .

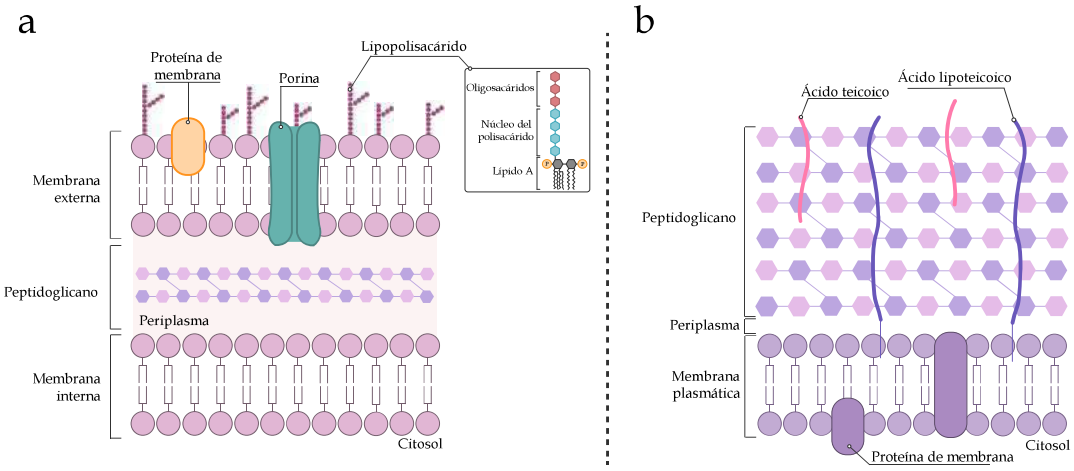


Figura 1.5. Esquema de la estructura de bacterias Gram negativas (a) y positivas (b).

Un probable mecanismo de acción de las AgNP es la obstaculización de la generación de energía (ATP) debido a la interacción con la cadena de transporte de electrones, inhibiendo enzimas con la consecuente generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) que interactúan con otros componentes intracelulares (Pareek et al., 2018).

Uno de los mecanismos sugeridos en la interacción con las células es que las AgNP actúan como un reservorio local de plata, liberando una concentración lo suficientemente alta de iones Ag^+ (Pareek et al., 2018; Ferreyra Maillard et al., 2019; More et al., 2023). Estos iones se adhieren a la pared y membrana celulares, facilitado por la interacción con el azufre de las proteínas. La plata tiene carga positiva y tiende a reaccionar con los grupos funcionales de las biomoléculas cargadas negativamente, como el fósforo y el azufre, que son los principales

componentes de la membrana celular, proteínas y bases del ADN (More et al., 2023; Wahab et al., 2023).

La investigación reciente ha demostrado que la liberación de iones Ag^+ es más retardada cuando las AgNP tienen una cubierta estabilizante. De este modo los iones Ag^+ se liberan lo suficientemente rápido como para eliminar bacterias, pero lo suficientemente lento como para superar el problema de toxicidad, principalmente en células mamíferas (Ferreyra Maillard et al., 2019; More et al., 2023).

La adherencia de las AgNP a las células podría ser una explicación a la capacidad de inhibir la formación de biofilms, ya que la adherencia de las células a una superficie o entre sí es la etapa inicial de este proceso (Sauer et al., 2022).

De entre todos los mecanismos, la generación de estrés oxidativo por ERO es uno de los principales mecanismos que contribuyen a la actividad antibacteriana de las AgNP. En los microorganismos, la generación de ERO se da principalmente mediante respiración aerobia. Los subproductos de la reducción del O_2, como lo son el radical anión superóxido ($O_2^{-\cdot}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($HO^{\cdot}$), se generan continuamente en las células de crecimiento aerobio. Los niveles de estos radicales están balanceados por los mecanismos antioxidantes de la maquinaria celular (Quinteros, 2017). Sin embargo, ante un exceso de ERO se produce la oxidación de biomoléculas incluyendo proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos (Quinteros et al., 2016; Javed et al., 2021; Wahab et al., 2023). Determinar la oxidación de estas moléculas es una estrategia utilizada por algunos autores para comprobar si el estrés oxidativo es responsable de la actividad antimicrobiana de las AgNP (Quinteros et al., 2016).

En un trabajo realizado por Kędziora et al (2021) se estudió el modo de acción antimicrobiano de los iones plata (Ag^+) y dos nanoformulaciones diferentes frente a cepas de *E. coli* sensibles y resistentes a Ag^+. Según los resultados, las proteínas de membrana externa de las bacterias Gram negativas son las responsables de la captación de los iones Ag^+ y de las nanoformulaciones. Las cepas resistentes a los iones plata continuaron siendo altamente sensibles a las nanoformulaciones, sugiriendo que el modo de acción entre los iones plata y las

nanoformulaciones es diferente. Estudiaron también la generación de ERO encontrando que las cepas resistentes a la plata producían niveles más bajos que las sensibles, pero, en general, los iones Ag^+ producían más ERO que las nanoformulaciones lo que los lleva a especular que existe otro modo de acción para las nanoformulaciones independiente de únicamente la generación de ERO. Los mecanismos de acción para diferentes AgNP han sido estudiados frente a diversos microorganismos, tales como *P. aeruginosa*, *E. coli, S. aureus, Klebsiella sp.* y *Bacillus sp.,* siendo los mecanismos propuestos distintos según los resultados obtenidos por cada autor (Salleh et al., 2020). En la **Figura 1.6** se representan los diferentes mecanismos de acción propuestos y estudiados por distintos autores para la actividad antibacteriana de las AgNP.

Es importante destacar que el papel antimicrobiano de las AgNP viene en gran medida dado por su naturaleza nanométrica. Un estudio realizado con distintos tamaños de nanopartículas esféricas de sílice químicamente inertes unidas covalentemente a polímeros hidrofílicos no bactericidas mostró que las nanopartículas tenían actividad antimicrobiana incluso frente a cepas clínicas multirresistentes y que ese poder antimicrobiano aumentaba conforme disminuía el tamaño de las nanopartículas (Jiang et al., 2022). En el estudio se comprobó además que, a tamaños menores de 50 nm, las nanopartículas producían poros en la membrana.

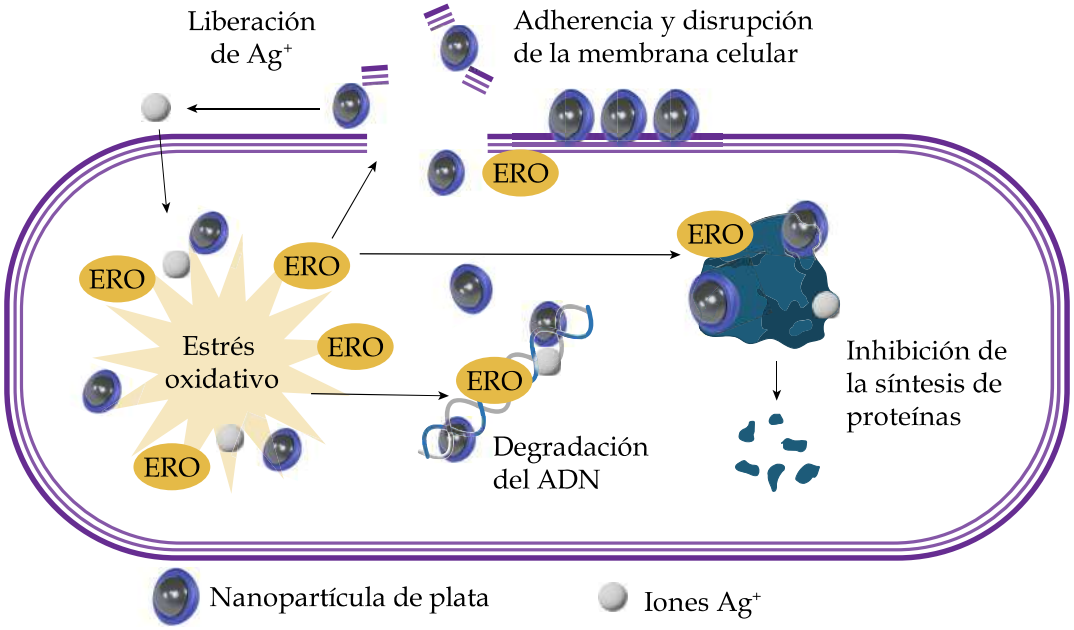


Figura 1.6. Esquema de una célula bacteriana y los posibles mecanismos de acción antibacterianos de las AgNP propuestos por diversos autores.

En cuanto a la actividad antifúngica, el mecanismo de acción se atribuye a la unión de las AgNP a la superficie celular lo que conduce a una liberación de iones Ag^+ que ingresan a la célula por un transportador de cobre de alta afinidad (importador de Ag^+) y provocan la generación de estrés oxidativo con el consecuente daño a nivel de biomoléculas (Mussin and Giusiano, 2022).

Los distintos mecanismos de acción propuestos por diferentes autores ilustran la importancia de considerar que la actividad antimicrobiana y por tanto los mecanismos antimicrobianos dependen no solo del microorganismo sino también de cada AgNP por lo que ambas partes del sistema deben ser consideradas para el estudio de la acción antimicrobiana.

Antecedentes en Uruguay

En Uruguay, la Nanotecnología ha experimentado un extenso desarrollo. Diversas investigaciones en este campo se han orientado hacia tecnologías para celdas solares fotovoltaicas con base en nanomateriales, el desarrollo de biomateriales para la reparación y regeneración tisular en la reposición de material esquelético o dérmico, el encapsulamiento de productos en ámbitos como la nutrición, cosmética o sanidad animal, y la integración de nanomateriales en matrices convencionales de materiales o productos, entre otras áreas de interés (Mombrú, 2013). Estos estudios, liderados por investigadores del Área Física de la Facultad de Química, han contribuido significativamente al avance de la nanotecnología en el país.

En el Área de Microbiología de la Facultad de Química, nuestro grupo ha dedicado esfuerzos al desarrollo de estrategias nanotecnológicas para la purificación de proteínas microbianas (Albores et al., 2016). Además, se llevó a cabo un primer análisis de cepas de hongos aisladas de muestras locales, enfocado en su capacidad para sintetizar bio-AgNP. Los resultados obtenidos en esta evaluación demostraron que extractos extracelulares de ocho cepas fúngicas fueron competentes en la síntesis de nanopartículas de plata bajo las condiciones evaluadas (Sanguiñedo et al., 2018).

La colaboración interdisciplinaria entre ambos grupos de la Facultad de Química fue consolidada en esta tesis, fusionando la nanotecnología y la microbiología. Esto se logró mediante la síntesis de nanopartículas de plata biogénicas a partir de hongos y el estudio de la actividad antimicrobiana, utilizando un enfoque multifacético con el objetivo de profundizar en el conocimiento de estas nanoestructuras y su aplicación antimicrobiana.

HIPÓTESIS

- Las nanopartículas de plata biogénicas sintetizadas por los hongos presentan baja polidispersidad y gran estabilidad coloidal.
- Las nanopartículas de plata biogénicas tienen actividad antimicrobiana frente a bacterias, hongos y biofilms microbianos a muy bajas concentraciones sin mostrar citotoxicidad en líneas celulares humanas a dichas concentraciones.
- Los mecanismos de acción antimicrobianos de las nanopartículas de plata biogénicas son muchos y muy complejos, siendo dependientes de las propiedades de las nanopartículas de plata biogénicas y de su interacción con cada tipo de microorganismo.

OBJETIVOS DE LA TESIS

Objetivos Generales:

Esta tesis tiene como objetivo general la biosíntesis de nanopartículas de plata por hongos, su caracterización y la evaluación de su potencial uso como agentes antimicrobianos tanto en el área de la salud humana y animal como en el área agrícola.

Objetivos específicos:

- Evaluar la incidencia de las condiciones de reacción en la producción de nanopartículas de plata por filtrados extracelulares de dos hongos y caracterizar las nanopartículas biosintetizadas.
- Evaluar la actividad antimicrobiana y antibiofilm de estas nanopartículas frente a microorganismos patógenos humanos, animal y fitopatógenos.
- Avanzar en el estudio de mecanismos de acción de las nanopartículas de plata evaluando la interacción microorganismo-nanopartícula de plata.
- Estudiar la toxicidad de las nanopartículas de plata en una línea celular humana.

PUBLICACIONES

Parte de los resultados que se presentarán a lo largo de esta tesis fueron publicados en los años 2019, 2020 y 2021 bajo los títulos "Biogenic silver nanoparticles: understanding the antimicrobial mechanism using Confocal Raman Microscopy", "Biofilm erradication using biogenic silver nanoparticles" y "Biogenic silver nanoparticles as a Strategy in the fight against multi-resistant *Salmonella* enterica isolated from dairy calves", respectivamente.

Referencias:

- María Belén Estevez, Scott G. Mitchell, Ricardo Faccio, Silvana Alborés (2019). Biogenic silver nanoparticles: understanding the antimicrobial mechanism using Confocal Raman Microscopy. Materials Research Express. **Capítulos II** y **III**.
  DOI: https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab6636
- María Belén Estevez, Sofía Raffaelli, Scott G. Mitchell, Ricardo Faccio and Silvana Alborés (2020). Biofilm Erradication Using Biogenic Silver Nanoparticles. Molecules. **Capítulos II, III** y **V**.
  DOI: https://doi.org/10.3390/molecules25092023
- Estevez MB, Casaux ML, Fraga M, Faccio R and Alborés S (2021) Biogenic Silver Nanoparticles as a Strategy in the Fight Against Multi-Resistant Salmonella enterica Isolated From Dairy Calves. Front. Bioeng. Biotechnol. 9:644014. **Capítulo IV**
  DOI: 10.3389/fbioe.2021.644014

Capítulo II

No es inútil viajar si se quieren ver cosas nuevas.

JULIO VERNE, ***La vuelta al mundo en 80 días***

BIOSÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

INTRODUCCIÓN

La síntesis biológica de nanopartículas de plata, también conocida como síntesis verde, presenta ventajas significativas sobre los métodos físicos y químicos. Además de ofrecer beneficios ecológicos y económicos, como el uso de reactivos no tóxicos, la reducción en la generación de residuos y la eficiencia energética, esta metodología permite la obtención de AgNP más estables durante períodos de tiempo prolongados (Al-khattaf, 2021). Entre los microorganismos utilizados en la producción de bio-AgNP, los hongos destacan por su alta capacidad de producción proteica y la habilidad para obtener nanopartículas con morfologías y tamaños controlados (Alghuthaymi et al., 2015; Khan et al., 2017; Al-khattaf, 2021; Beltrán Pineda et al., 2022; Šebesta et al., 2022; Durán et al., 2023). Tal como se explicó en el **Capítulo I**, la síntesis de bio-AgNP puede realizarse de forma intracelular y extracelular. Los mecanismos de síntesis no son completamente conocidos. Uno de los mecanismos de síntesis es la separación de los microorganismos del medio extracelular luego de que estos liberen grandes cantidades de una enzima reductasa que reduce los iones plata (Ag^{+}) a plata elemental (Ag^{0}) formando las correspondientes bio-AgNP (Verma and Kumar, 2022). Al mismo tiempo que actúan como agentes reductores, las proteínas presentes en el medio pueden desempeñar un papel como estabilizantes de las bio-AgNP (Nie et al., 2023).

Previamente, nuestro grupo de investigación llevó a cabo un relevamiento utilizando diversos hongos filamentosos aislados del territorio uruguayo y depositados en la colección del Área de Microbiología de la Facultad de Química (UdelaR), para determinar su capacidad de sintetizar bio-AgNP (Sanguiñedo et al., 2018). Basándonos en la mayor producción de bio-AgNP estables obtenidas en el relevamiento, para este trabajo de tesis se seleccionaron *Penicillium expansum y Phanerochaete chrysosporium*, incluidos en el trabajo mencionado. Si bien existen reportes previos de la biosíntesis de bio-AgNP con estos hongos, las condiciones de cultivo y la metodología de síntesis difiere, así como el enfoque utilizado.

Para lograr una síntesis rápida, estable y de alta producción de bio-AgNP, es crucial considerar la influencia de varios factores clave, como el tiempo de incubación, la temperatura, el pH, la agitación y la concentración del agente precursor. Investigaciones recientes (Al-khattaf, 2021; Huq et al., 2022; Šebesta et al., 2022) han demostrado que la variación de estos parámetros puede no sólo afectar la producción, sino también la forma y tamaño de las bio-AgNP.

Por ejemplo, la temperatura de síntesis tiene efectos en el tamaño y en la estabilidad de las AgNP. Según se reporta en la literatura, el tamaño de las nanopartículas puede disminuir conforme se incrementa la temperatura de reacción (Liu et al., 2014; Šebesta et al., 2022). El pH también es un factor muy importante en la forma, el tamaño y la estabilidad de las AgNP (Al-khattaf, 2021). Diversos estudios sugieren que la estabilidad de las AgNP en medios básicos es mejor que en medios ácidos, pero si el pH es muy alto se ha visto que se generan aglomerados de las nanopartículas (Almatroudi, 2020).

Las distintas características fisicoquímicas de las AgNP son un factor clave en sus propiedades por lo que tienen implicaciones directas en las aplicaciones (Sharma, 2022). Es por tanto fundamental realizar una caracterización completa empleando técnicas complementarias.

La espectroscopía UV-visible es la técnica de elección para la caracterización inicial de las AgNP ya que es la manera más sencilla de confirmar la formación de las mismas y demostrar su estabilidad (Magdy et al., 2024).

El tamaño de las AgNP es una propiedad muy importante. Diversos estudios demuestran que cuanto más pequeña es la dimensión de la AgNP, mayor será su poder de penetración en la célula. Se sugiere que las AgNP con un tamaño inferior a 10 nm pueden ingresar con facilidad a la célula bacteriana, provocando eventualmente la lisis celular (Verma and Kumar, 2022; More et al., 2023). Además, mientras más pequeña sea la AgNP, mayor será su área superficial con lo que tendrá una mayor interacción con otros sistemas (Nie et al., 2023).

Para determinar el tamaño de las AgNP se utilizan técnicas tales como la microscopía electrónica de transmisión (TEM), la dispersión dinámica de la luz (DLS) o la difracción de rayos X a bajo ángulo (SAXS), entre otras. TEM utiliza

un haz de electrones que atraviesa la muestra (que debe estar en vacío) y se proyecta una imagen que es el resultado de la dispersión de los electrones por la muestra *vs* aquellos que no son dispersados. Proporciona información sobre el tamaño, su distribución y la forma de las AgNP (Sharma, 2022). SAXS se utiliza para obtener datos sobre la forma y el tamaño de las AgNP. Esta técnica implica la dispersión elástica de rayos X de un haz monocromático a través de una muestra y se determina la intensidad del haz dispersado en función del ángulo de dispersión (Li et al., 2016). Tiene como ventaja frente a otras técnicas de caracterización, como TEM, que proporciona datos sobre toda el área de la muestra (Li et al., 2016).

Otra de las técnicas utilizadas para determinar el tamaño y la distribución de tamaños es la Dispersión Dinámica de la Luz (DLS). Esta técnica se caracteriza por realizar la caracterización de la muestra en solución utilizando una fuente de luz monocromática (Magdy et al., 2024).

Mediante el Potencial Z se puede determinar la carga superficial, lo cual da indicios muy importantes sobre la estabilidad de las AgNP (Nie et al., 2023). El pH es un factor clave en la carga superficial y la estabilidad de las AgNP. Cuando cambia el pH, la cantidad de grupos básicos o ácidos de la superficie de las AgNP cambia, provocando un cambio en la carga superficial de la partícula. Cuando las cargas son cercanas a la neutralidad, la repulsión es baja por lo que las AgNP se aglomeran. Cuando la carga superficial es alta (en valor absoluto positivo o negativo), la repulsión es elevada y por lo tanto la suspensión de AgNP es estable (Nie et al., 2023).

La espectroscopía Raman es una técnica de espectroscopía vibracional utilizada para la caracterización de sólidos, líquidos y gases. A diferencia de otras técnicas de espectroscopía vibracional, no requiere una preparación elaborada de la muestra (Israelsen et al., 2015). En la espectroscopía Raman se irradia la muestra con un haz de luz monocromático de frecuencia ν_0. La mayor parte de la luz dispersada tendrá la misma frecuencia que la luz incidente. Esta dispersión, denominada dispersión Rayleigh, no aporta información relevante sobre la muestra. Una pequeña fracción de la luz dispersada tendrá una frecuencia

diferente resultado de la interacción inelástica de la radiación con la materia. Esta es la dispersión Raman. Las nuevas frecuencias proporcionan información muy valiosa sobre la composición molecular de la muestra (Oshima et al., 2023).

La espectroscopía Raman es extraordinariamente útil en el estudio del recubrimiento de las nanopartículas de plata (AgNP). Gracias al fenómeno de la Dispersión Raman Intensificada en Superficie (SERS) inducida por la Resonancia de Plasmón de Superficie (RPS), se genera un estado de resonancia electrónica excitada en la superficie de las AgNP, incrementando tanto la dispersión de luz elástica (Rayleigh) como la dispersión de luz inelástica (Raman) en la muestra. Este fenómeno amplifica significativamente las señales Raman provenientes de moléculas cercanas a la superficie de las nanopartículas, lo que permite su aplicación incluso cuando las cantidades de muestra son muy reducidas (Agressott et al., 2020; Sowmya et al., 2023). El fenómeno de SERS proporciona un espectro único de las vibraciones moleculares, conocido como la huella digital Raman. Esta huella digital resulta fundamental para determinar la información estructural de la molécula y ofrece diferencias cualitativas entre muestras similares (Israelsen et al., 2015; Khristoforova et al., 2023).

OBJETIVOS

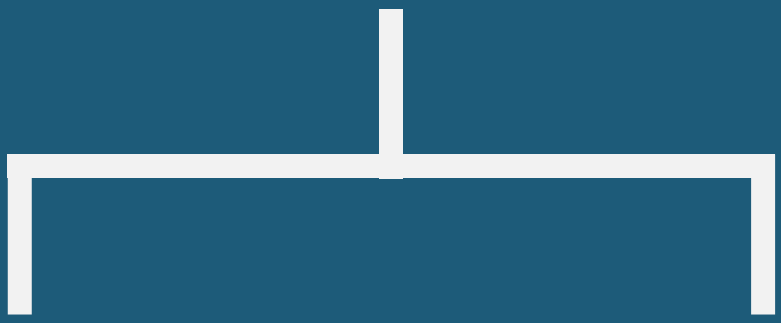
- Sintetizar nanopartículas de plata a partir del medio extracelular de los hongos *Penicillium expansum* y *Phanerochaete chrysosoporium*
- Evaluar la incidencia de las condiciones de reacción, tiempo de incubación del micelio con el agua, la concentración del agente precursor y la temperatura de síntesis, en la biosíntesis de nanopartículas de plata.
- Caracterizar las nanopartículas de plata sintetizadas.
- Evaluar la estabilidad coloidal de las nanopartículas de plata biogénicas.

ESTRATEGIA

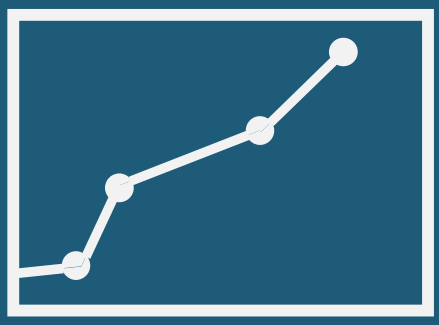
La estrategia para alcanzar los objetivos propuestos consistió en llevar a cabo la síntesis biológica de nanopartículas de plata utilizando los filtrados extracelulares de los hongos *Penicillium expansum* y *Phanerochaete chrysosporium*. Una vez sintetizadas y purificadas ambas nanopartículas, se procedió a evaluar las condiciones de reacción que permitieran obtener una mayor producción de las mismas, estudiando el tiempo de incubación del micelio con el agua, la concentración del agente precursor y la temperatura de síntesis. Luego de identificada una condición que permitía mejorar la producción, se mantuvo constante para evaluar las siguientes condiciones. Las nanopartículas obtenidas bajo las condiciones seleccionadas se caracterizaron utilizando diversas técnicas complementarias para determinar su tamaño, forma, distribución de tamaños, carga neta, contenido de plata y agentes estabilizantes de la superficie. Asimismo, se evaluó la estabilidad coloidal de las nanopartículas de plata sometiéndolas a diferentes condiciones de pH y fuerza iónica.

CAPÍTULO II - Resumen gráfico

Biosíntesis



Caracterización



Evaluación de condiciones

METODOLOGÍA

Material biológico

Los microorganismos utilizados para la biosíntesis de las nanopartículas de plata fueron los hongos *Penicillium expansum* (CCMG14S) y *Phanerochaete chrysosoporium* (CCMG12G), provenientes de la Colección de Cepas del Área de Microbiología (CCMG) de la Facultad de Química (Montevideo, Uruguay).

Cultivo de hongos y obtención del micelio

El micelio de ambos hongos se creció en Agar Papa Dextrosa (PDA, BD Difco, Sparks, MD, EEUU) a 28°C. (**Figura 2.1a**) Pasado el tiempo de incubación, dos discos de 0.9 cm de diámetro fueron transferidos a matraces de 500 mL conteniendo 100 mL de Caldo Papa Dextrosa (PDB, BD Difco, Sparks, MD, EEUU). La incubación se realizó a 28°C con agitación en shaker orbital a 150 rpm (revoluciones por minuto) durante 72 horas (**Figura 2.1b**). La biomasa de los cultivos se obtuvo por filtración, realizando varios lavados previos utilizando agua destilada estéril para remover los componentes del medio (**Figura 2.1c**).

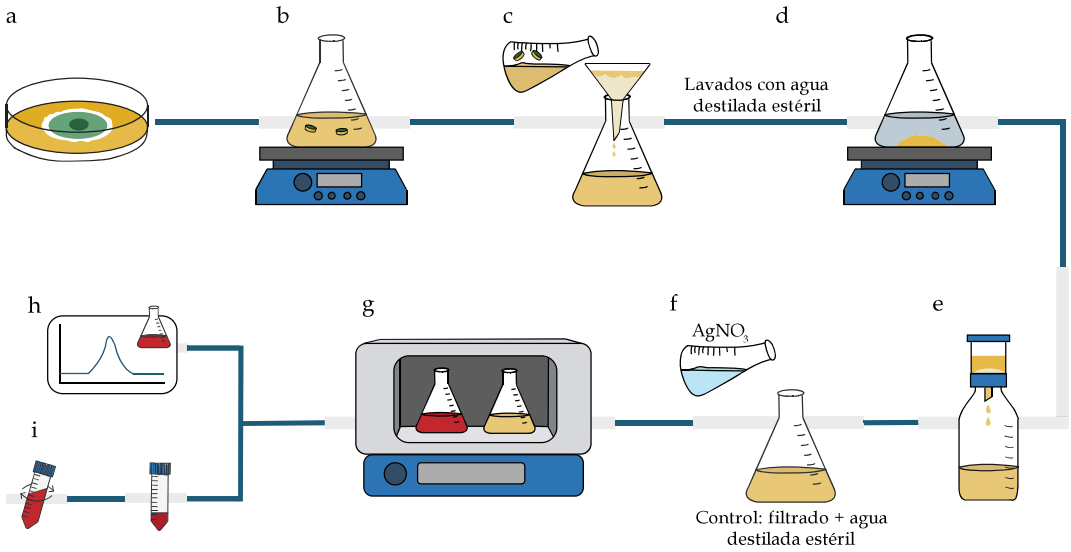


Figura 2.1. Metodología de síntesis y purificación de las nanopartículas de plata biogénicas (BNP). a) micelio crecido en PDA, b) inoculación de discos de micelio en medio PDB e incubación a 28°C y 150 rpm durante siete días, c) filtración de biomasa y lavados con agua destilada estéril, d) incubación de biomasa en agua a 28°C y 150 rpm, e) obtención de filtrado extracelular, f) agregado de $AgNO_3$ (control: filtrado + agua destilada estéril), g) incubación para la reacción de síntesis, h) seguimiento de la reacción de síntesis, i) purificación de las BNP.

Biosíntesis de nanopartículas de plata biogénicas.

Para la biosíntesis de las BNP se siguió la metodología propuesta Sanguiñedo et al. (2018) con modificaciones. El micelio se incubó en agua destilada estéril en una concentración de 0.1 g/mL (**Figura 2.1d**) y se incubó en agitador orbital a 150 rpm. Luego de la incubación, se separó la biomasa por filtración por membrana con un tamaño de poro de 0.45 µm (**Figura 2.1e**). Finalmente, 50 mL del filtrado extracelular fueron agregados a 50 mL de una solución de $AgNO_3$ estéril (**Figura 2.1f**). Como control se utilizó una fracción del medio extracelular con igual cantidad de agua destilada estéril. Ambas fracciones se incubaron en oscuridad a temperatura controlada (**Figura 2.1g**).

El seguimiento de la reacción de síntesis se realizó a lo largo del tiempo, mediante espectros de absorción en el rango de 250-800 nm (Lu et al., 2005), midiendo el incremento de absorción en la banda de longitud de onda máxima que corresponde a la RPS de las BNP sintetizadas (**Figura 2.1h**). La reacción fue

detenida cuando no hubo más incremento en el pico máximo de absorción del espectro de las BNP.

A las BNP sintetizadas a partir de *Penicillium expansum* se las denominó PeNP, en tanto que a las sintetizadas a partir de *Phanerochaete chrysosporium* se las denominó PchNP.

Purificación de las nanopartículas de plata biogénicas.

Una vez finalizada la biosíntesis, las BNP fueron centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue removido y las BNP fueron lavadas dos veces con agua destilada estéril mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos (**Figura 2.1i**). Se determinó la absorbancia del pico correspondiente a la RPS de las BNP purificadas y se estimó la concentración de acuerdo a Paramelle et al., (2014), utilizando la ecuación de Beer-Lambert-Bouger, tomando la absorbancia del pico correspondiente a la RPS y como coeficiente de extinción el valor de $4.18x10^9$ $L.mol^{-1}cm^{-1}$.

Evaluación de la incidencia de las condiciones de reacción en la biosíntesis de las nanopartículas de plata biogénicas.

Para evaluar la incidencia de las variables de la reacción en la biosíntesis de las BNP se modificaron las siguientes condiciones experimentales: tiempo de incubación del micelio con el agua (**Figura 2.1d**), concentración de $AgNO_3$ (**Figura 2.1f**) y temperatura de incubación en la reacción de síntesis (**Figura 2.1g**).

Caracterización.

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

La técnica de TEM se utilizó para determinar el tamaño y la morfología de las BNP. En una rejilla de cobre recubierta de carbono (Electron Microscopy Sciences) se depositaron 10 µL de la solución de BNP y se dejó secar a temperatura ambiente. El análisis se llevó a cabo en el microscopio electrónico

TECNAI T20 (FEI) (Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón, España) a 200 kV y el procesamiento de las imágenes se realizó con el software ImageJ.

Difracción de rayos X a bajo ángulo (SAXS).

Con el fin de determinar la morfología, el tamaño y la distribución de tamaños de las BNP se utilizó SAXS. Se depositó una alícuota de las muestras en un soporte de aluminio y se dejó secar a temperatura ambiente. El análisis se llevó a cabo en el Difractómetro de polvo Rigaku modelo Ultima IV (DETEMA, Facultad de Química).

Dispersión Dinámica de la Luz y Potencial Z.

Se realizó la determinación del diámetro hidrodinámico y del potencial Z utilizando el equipo Malvern Instruments Zetasizer ZS-NANO. Para la determinación de DLS cada muestra fue medida diez veces a 25°C combinando cinco corridas por medida en tanto que para el potencial Z se midió tres veces a 25°C, combinando diez corridas por medida. Los resultados fueron analizados mediante el software Malvern Zetasizer Nano 7.03.

Determinación del contenido de Ag mediante Espectroscopía de Emisión Atómica Acoplada Inductivamente con Plasma (ICP-AES).

Las BNP se centrifugaron a 14500 rpm durante 15 minutos. El pellet se trató con 100 µL de solución piraña (3:1, H_2SO_4 96%:H_2O_2 33%) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 300 µL de agua regia (1:3, HNO_3 65%:HCl 37%). Las muestras se incubaron a 60°C durante 15 minutos y se diluyeron con agua MiliQ hasta un volumen final de 20 mL.

Este experimento se realizó en el marco de una pasantía en el Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón, España, bajo la dirección del Dr. Scott Mitchel.

Microscopía Raman Confocal (MRC).

El estudio del *capping* se realizó mediante MRC. Se depositó una alícuota de las BNP en un soporte de aluminio y se dejó secar la muestra a temperatura ambiente. Las medidas se realizaron en un equipo WITec Raman Microscope modelo Alpha 300 RA (WITec, GmbH, Ulm, Alemania), DETEMA/IPTP, Facultad de Química, UdelaR. Se utilizó un láser de excitación de 532 nm y se colectaron imágenes a través de un objetivo de 50x y 100x.

Ensayos de estabilidad coloidal.

Se estudió la estabilidad de las BNP a diferentes pH, preparando soluciones de las mismas en buffer MES a pH 3, 5, 7 y 10. De forma similar se evaluó la estabilidad de las BNP a diferentes condiciones de fuerza iónica, en soluciones de NaCL 10, 50, 100 y 500 mM. Se realizó en cada caso la medida del espectro de absorción UV- visible en el rango de 200 a 800 nm para determinar la banda de RPS de las BNP.

La **Figura 2.2** es un esquema de los diferentes parámetros que se determinaron para una caracterización lo más completa posible.

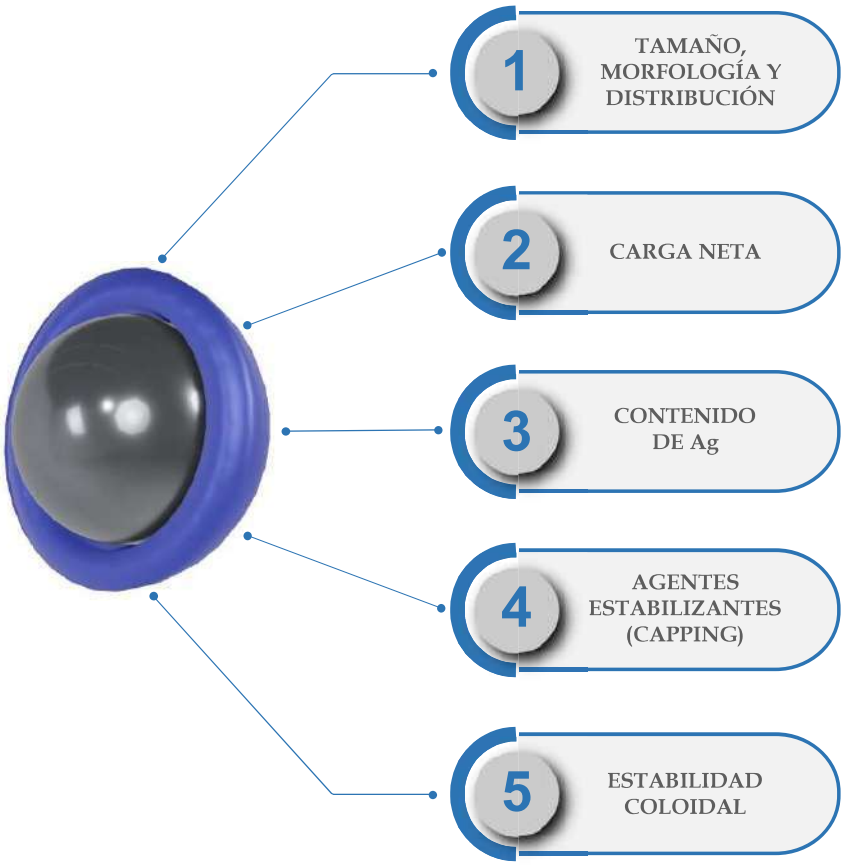


Figura 2.2. Esquema de las diferentes caracterizaciones realizadas sobre las BNP.

RESULTADOS

Biosíntesis de nanopartículas de plata.

Se realizó la biosíntesis de las BNP a partir del medio extracelular de *Penicillium expansum* (PeNP) y *Phanerochaete chrysosporium* (PchNP). Ambas biosíntesis se evidenciaron por el color rojizo en la mezcla de reacción (**Figura 2.3**).

La solución que ofició como control mantuvo su color original. Además del cambio de color, se realizó el seguimiento de la síntesis mediante los espectros de absorción en el rango de 200 a 800 nm, observándose la aparición de una banda en el rango entre 400 y 450 nm debido a la RPS de las nanopartículas de plata (**Figura 2.4**).

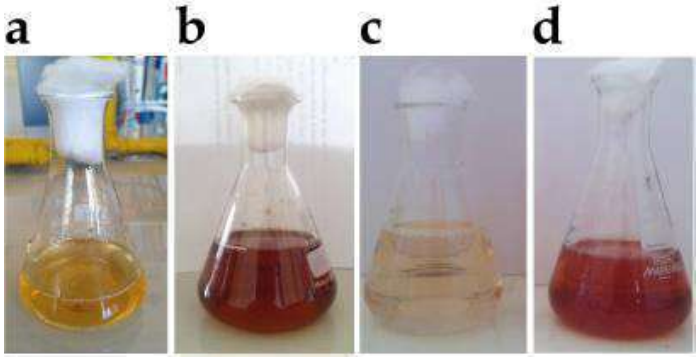


Figura 2.3. Cambio de color asociado a la síntesis de PeNP (a: control, b: mezcla de reacción) y PchNP (c: control, d: mezcla de reacción) luego de 24 horas de reacción.

Purificación de las BNP.

Las muestras obtenidas en el punto anterior se centrifugaron y el pellet se lavó con agua destilada estéril para obtener las BNP aisladas. Luego de la centrifugación se realizó un espectro UV-visible para evaluar la estabilidad de las BNP purificadas. La aparición de la banda de absorción a 439 nm para las PeNP y 442 nm para las PchNP, correspondiente a la RPS, evidenció la estabilidad de ambas nanopartículas luego del proceso de purificación (**Figura 2.5**).

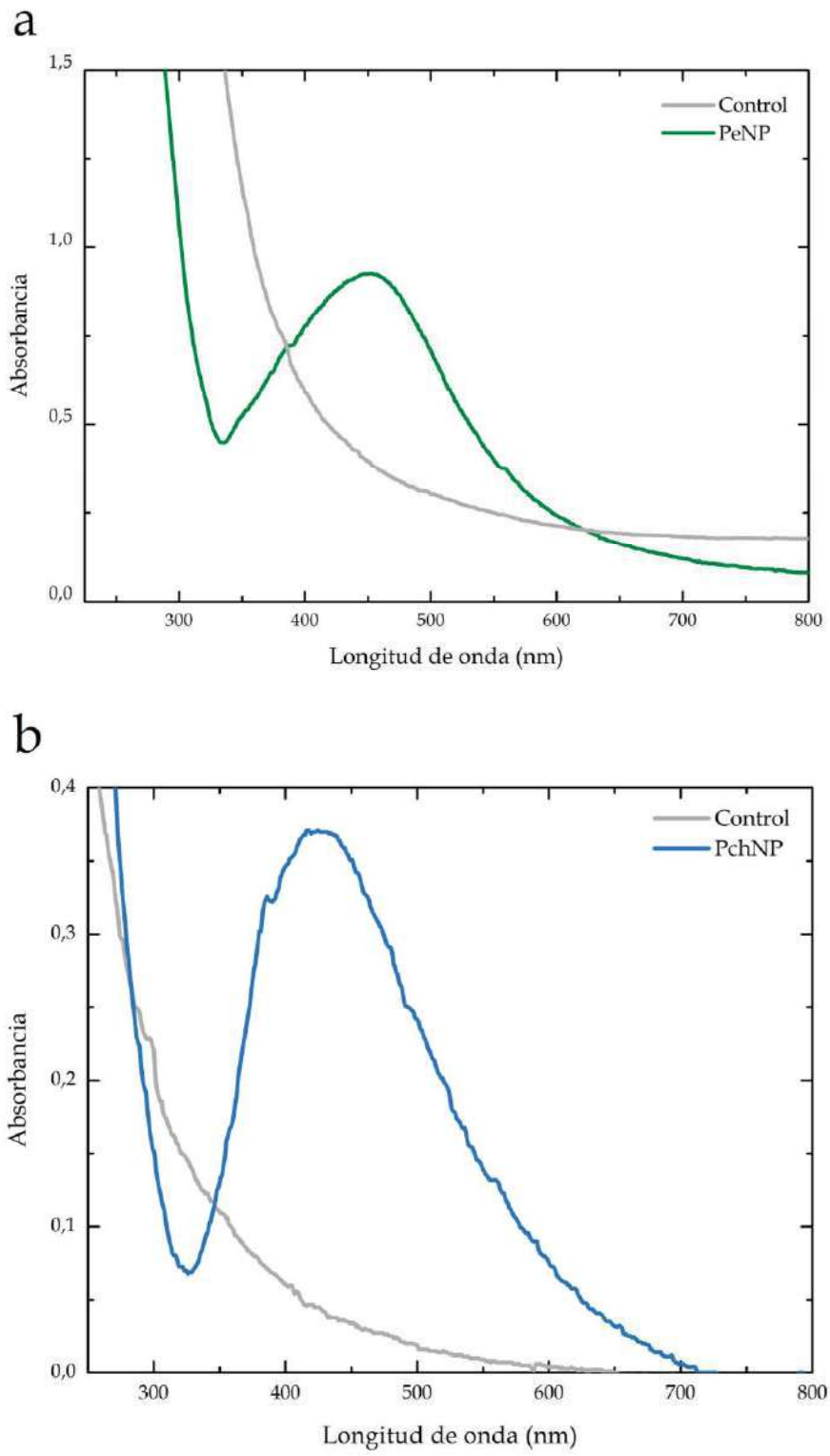


Figura 2.4. Espectro de absorción UV-visible obtenido para las PeNP (a, verde) y las PchNP (b, azul) y para el control de la reacción (gris).

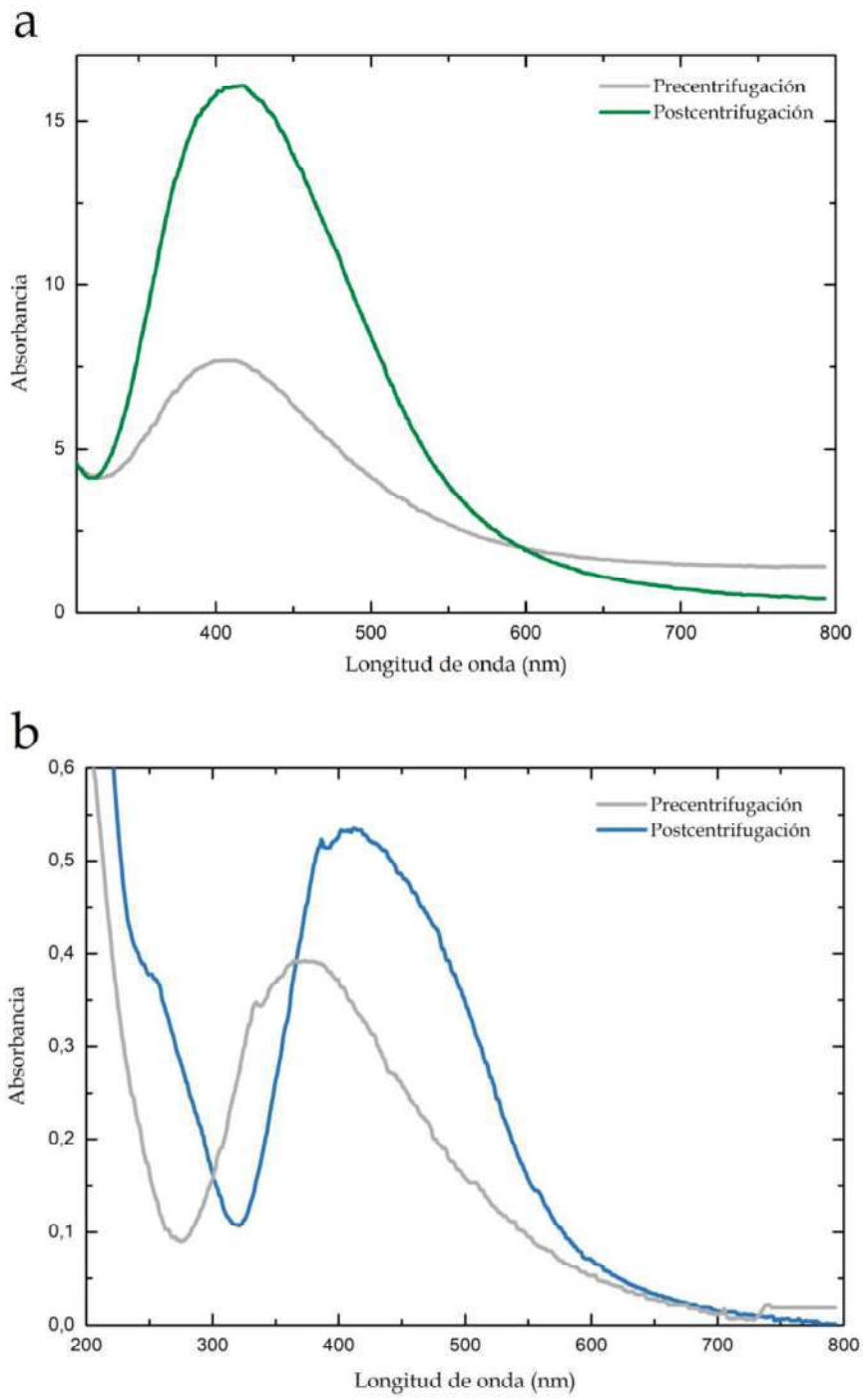


Figura 2.5. espectro de absorción UV-visible correspondiente a la síntesis de PeNP (a) y de PchNP (b), antes de centrifugar (gris) y después de centrifugar (PeNP: verde, PchNP: azul) mostrando el pico asociado a la RPS.

Evaluación de la incidencia de las condiciones de reacción en la biosíntesis de BNP.

Con el objetivo de obtener una mayor producción de BNP en el menor tiempo posible manteniendo la estabilidad se realizó el estudio de los cambios en las condiciones de reacción para ambas biosíntesis. Para ello se evaluaron distintas concentraciones de $AgNO_3$ (1 mM, 5 mM y 10 mM), distintas temperaturas de incubación del matraz de reacción (20°C, 28°C y 37°C) y distintos tiempos de incubación de la biomasa con el agua (24 h, 48 h y 72 h para PeNP y 23 h, 41h y 62 h para PchNP). Según los resultados, la concentración de $AgNO_3$ que permitió obtener una mayor producción de BNP fue [$AgNO_3$]=5mM para ambas nanopartículas (**Figuras 2.6a y b**), T=37°C la temperatura de síntesis que presentó la mayor producción de ambas BNP (**Figuras 2.6c y d**) y el tiempo de incubación del micelio en agua con el que se obtuvo mayor producción fue t=72h para las PeNP (**Figura 2.6e**) y t=41 h para las PchNP (**Figura 2.6f**).

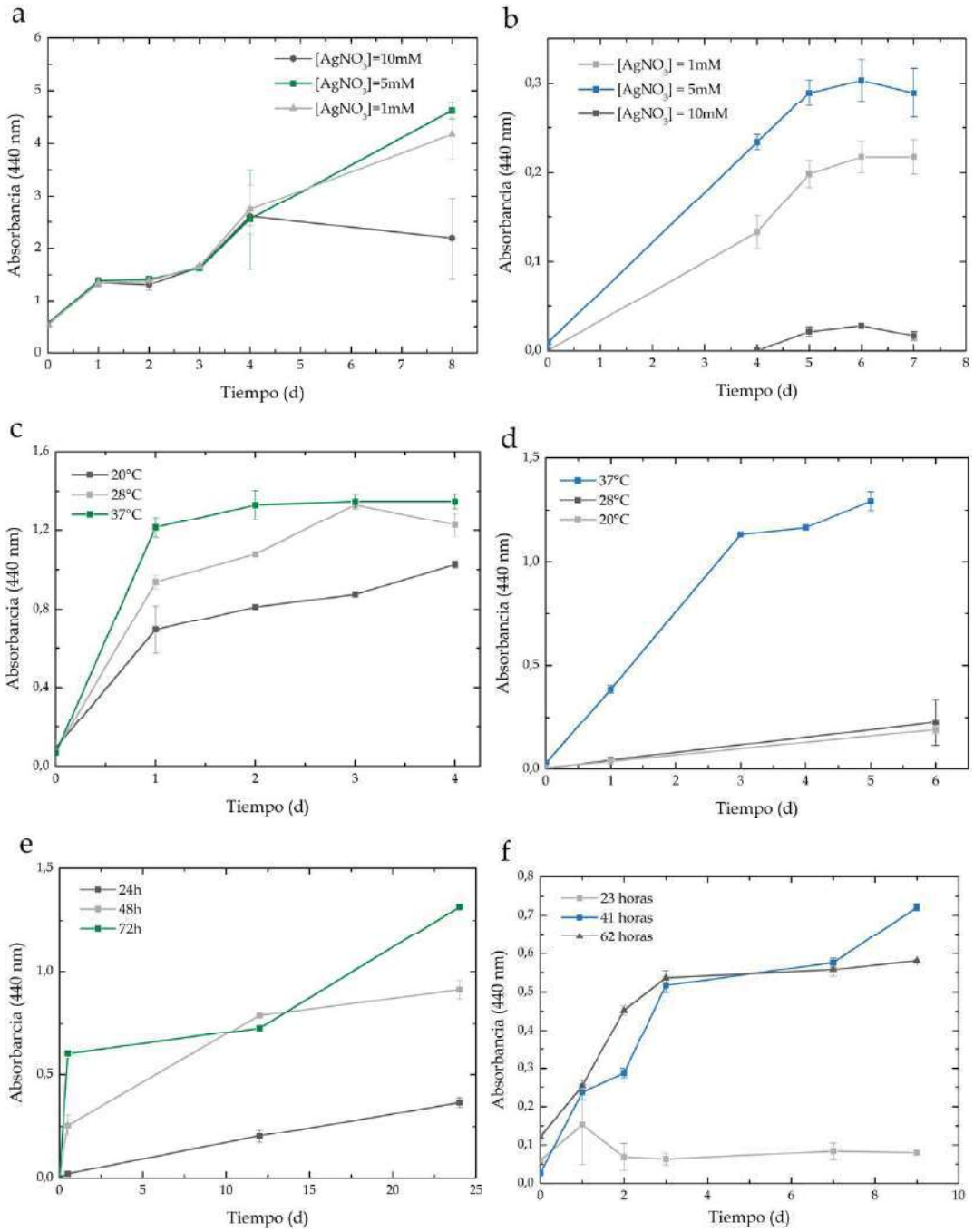


Figura 2.6. Efecto de diferentes condiciones de reacción en la síntesis de BNP (medida por absorbancia a 440nm) en el tiempo (las barras indican la desviación estándar): concentración de $AgNO_3$ (a: PeNP, b: PchNP), temperatura de reacción (c: PeNP, d: PchNP), tiempo de incubación del micelio con el agua (e: PeNP, f: PchNP).

Caracterización.

1. Tamaño, morfología y distribución.

Para estas caracterizaciones se utilizaron las técnicas de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Difracción de Rayos X a Bajo Ángulo (SAXS) y Dispersión Dinámica de la Luz (DLS).

Para las PeNP, el análisis de las micrografías obtenidas por TEM (**Figura 2.9a**) mostró una morfología esférica con un tamaño de 32(11) nm. El tamaño y su distribución fueron también caracterizados mediante DLS y SAXS. Para el caso de las PeNP, el tamaño obtenido por DLS fue de 16(4) nm, con un índice de polidispersidad (PDI) de 0.3 (**Figura 2.7b**) mientras que por SAXS se obtuvieron dos poblaciones, una de 16(1) nm y otra de 40(1) nm (**Figura 2.7c**).

Para el caso de las PchNP, las micrografías TEM también mostraron una distribución homogénea con un tamaño de 17(7) nm y así como una forma esférica (**Figura 2.8a**). El tamaño determinado por DLS, fue de 43(15) nm con un PDI de 0.2 (**Figura 2.8b**) mientras que por SAXS se obtuvo una población de tamaños de 26(1) nm (**Figura 2.8c**).

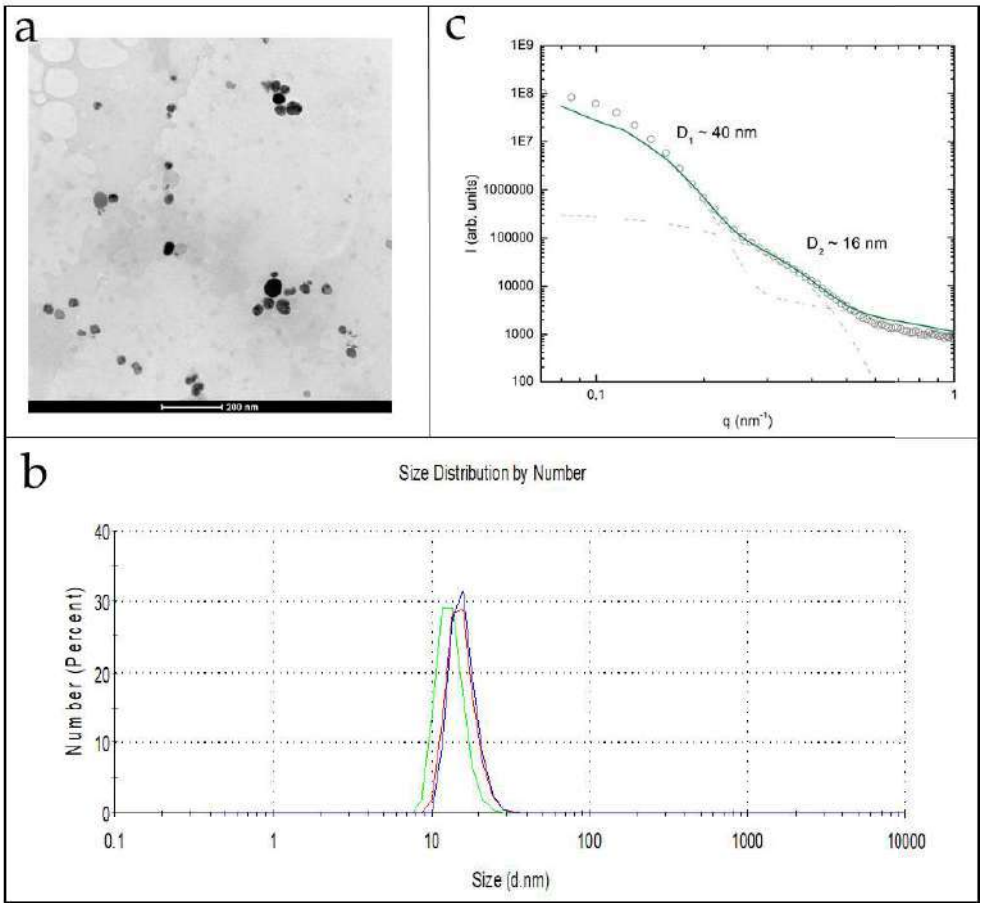


Figura 2.7. Caracterizaciones de tamaño de las PeNP. a) micrografía representativa de TEM, b) Dispersión Dinámica de la Luz (DLS), c) Difracción de Rayos X a Bajo Ángulo (SAXS).

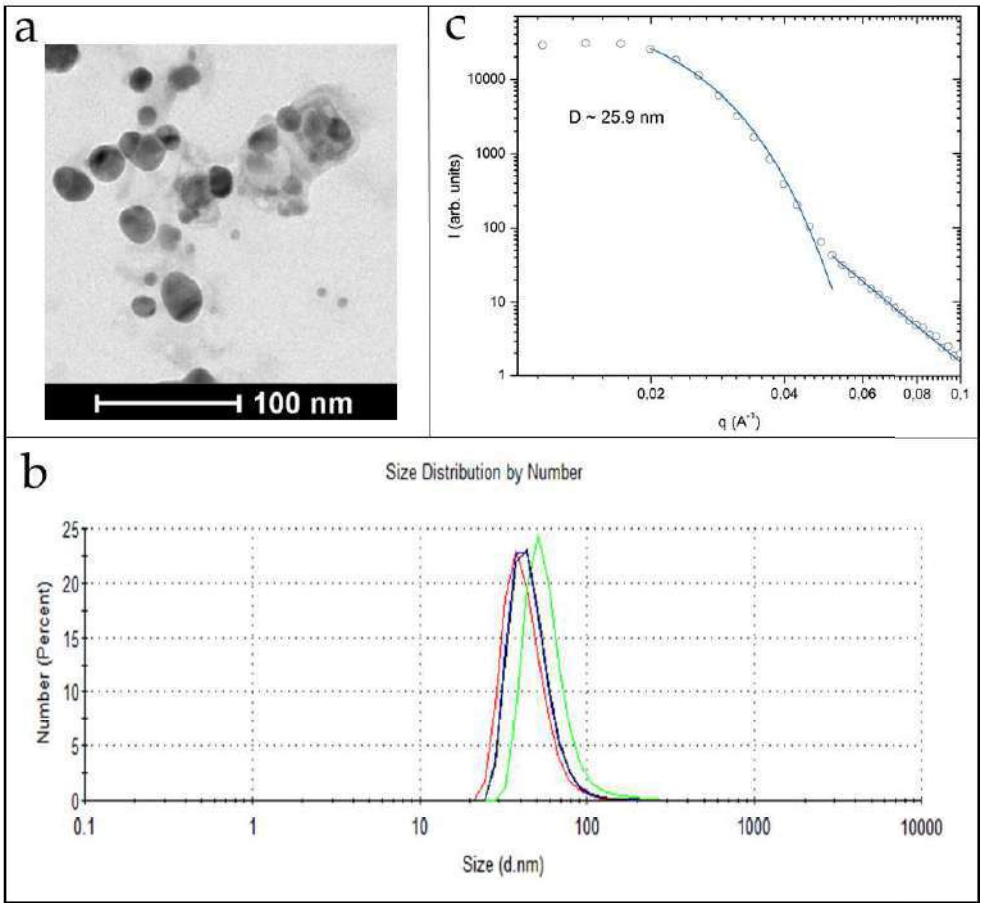


Figura 2.8. Caracterizaciones de tamaño de las PchNP. a) micrografía representativa de TEM, b) Dispersión Dinámica de la Luz (DLS), c) Difracción de Rayos X a Bajo Ángulo (SAXS).

2. Carga neta.

Mediante medidas de Potencial Z se determinó la carga neta de la superficie de las BNP. La carga neta obtenida para las PeNP fue de -18.5 (0.25) mV (**Figura 2.9a**) mientras que para las PchNP fue de -24.8 (1.1) mV (**Figura 2.9b**).

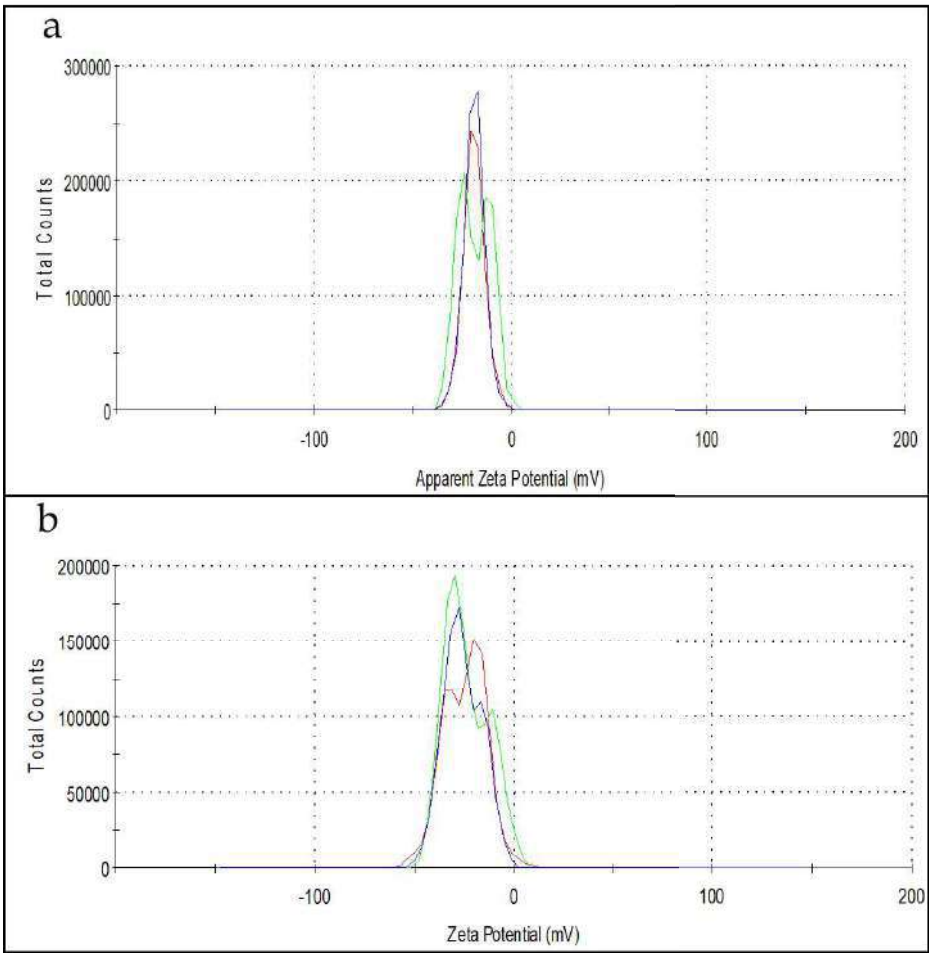


Figura 2.9. Medidas de potencial Z. a) PeNP, b) PchNP.

3. Contenido de Ag.

Las BNP presentaron una concentración de Ag de 0.16 mg/L para las PeNP y 0.15 mg/L para las PchNP. De esta forma se cuenta con una medida cuantitativa de la cantidad de plata presente en las muestras.

En la **Tabla 2.1** se muestran todos los resultados de caracterización de ambas BNP para los puntos 1 a 4.

Tabla 2.1. Resultados obtenidos mediante TEM, DLS, SAXS, Potencial Z e ICP-AES para PeNP y PchNP.

BNP	Tamaño			Carga Neta	Contenido de Ag
	TEM	DLS	SAXS	Potencial Z	ICP-AES
PeNP	32(11) nm Esféricas	16(4) nm PDI: 0.2	16(1) nm 40(1) nm	-18.5 mV DS: 0.26 mV	0.16 mg/L
PchNP	17(7) nm Esféricas	43(15) PDI: 0.3	26(1) nm	-24.8 mV DS: 1.1 mV	0.15 mg/L

4. Agentes estabilizantes (*capping*).

Los agentes estabilizantes de la superficie de las BNP se caracterizaron por Microscopía Raman Confocal. Los espectros obtenidos pueden observarse en la **Figura 2.10** para las PeNP y en la **Figura 2.11** para las PchNP. Las asignaciones de las bandas Raman se encuentran en las **Tablas 2.2** y **2.3** para PeNP y PchNP, respectivamente. Para las PeNP se encontró la banda a 219 cm^{-1} que corresponde al estiramiento de los enlaces Ag-N y/o Ag-O. Los corrimientos presentes a 1320 cm^{-1} y 1586 cm^{-1}, corresponden a las bandas D carbonosa (C-C) y G carbonosa (C-C), respectivamente. Para el caso de las PchNP se encontró la banda a 230 cm^{-1}, correspondiente al estiramiento Ag-N, así como la presencia de L-alanina y L-valina en la región de la huella digital de los aminoácidos (De Gelder et al., 2007).

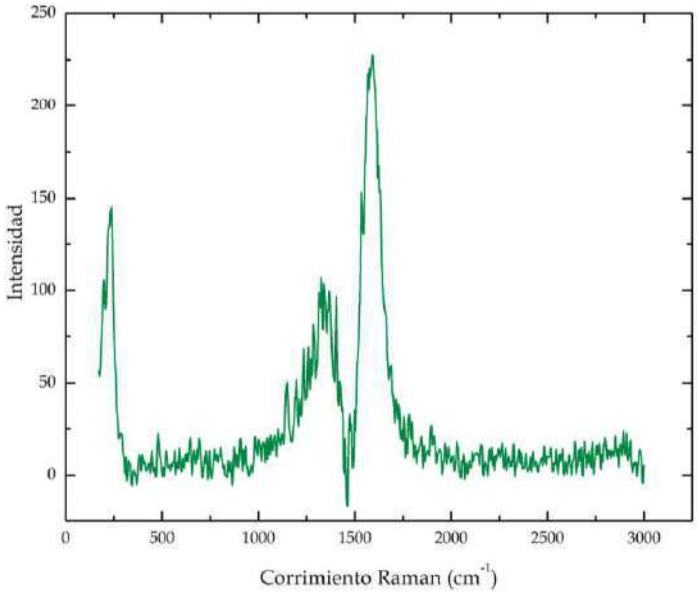


Figura 2.10. Espectro Raman de las PeNP

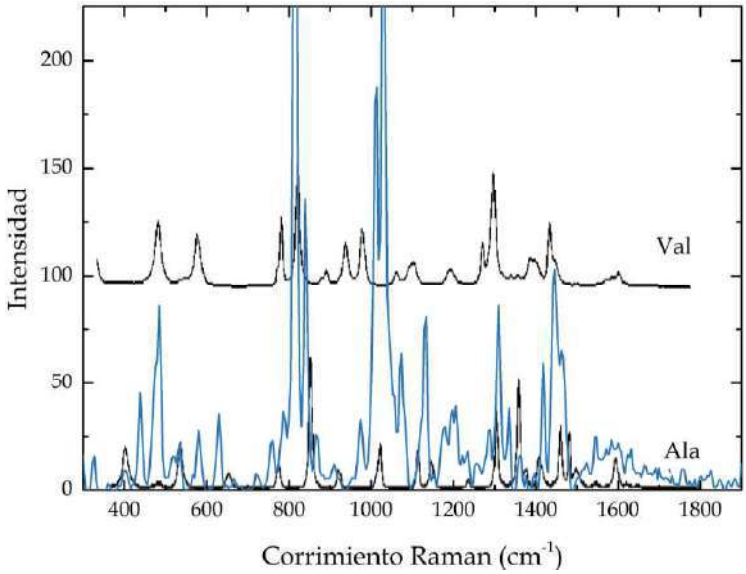


Figura 2.1. Espectro Raman de las PchNP (azul). Comparación con los espectros de L-valina y L-alanina

Tabla 2.2. Asignación de bandas Raman de las PeNP.

Corrimiento Raman	Asignación de bandas
219 cm^{-1}	Estiramiento Ag-N y/o Ag-O
1320 cm^{-1}	Banda D carbonosa (C-C)
1586 cm^{-1}	Banda G carbonosa (C-C)

Tabla 2.3. Asignación de bandas Raman de las PchNP

Corrimiento Raman	Asignación de bandas
230 cm^{-1}	Estiramiento Ag-N
Región de 400 a 1608 cm^{-1} (huella digital)	Presencia de L-alanina y L-valina

En la **Figura 2.12** se presenta un esquema resumiendo los resultados de las diferentes caracterizaciones realizadas a las BNP.

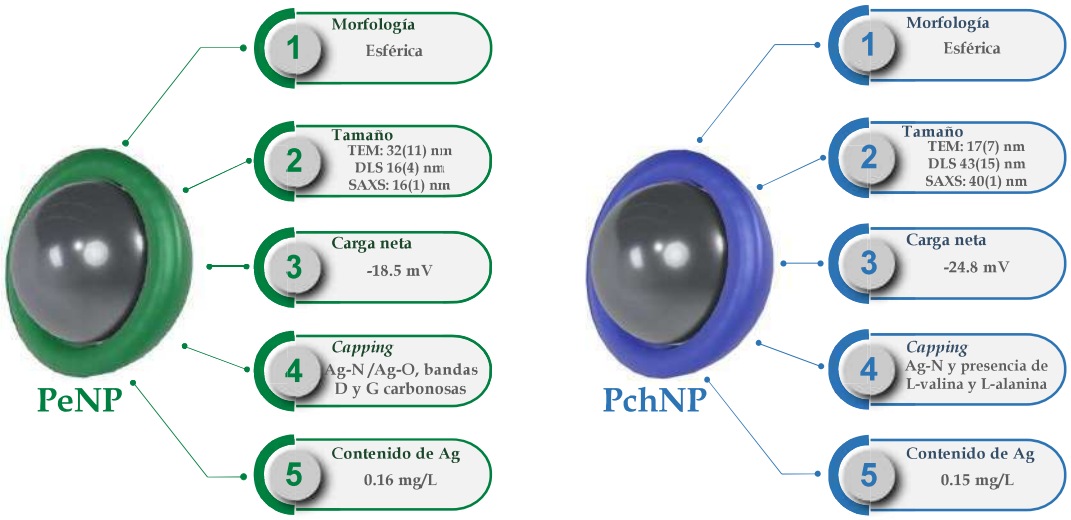


Figura 2.12. Esquema resumiendo las caracterizaciones realizadas para las PeNP (izquierda, verde) y las PchNP (derecha, azul).

5. Estabilidad coloidal de las BNP.

Se estudió la estabilidad coloidal de las BNP luego de someterlas a distintas condiciones de pH (3-9) (**Figura 2.13 a y b**) y fuerza iónica ([NaCl]=10-500mM) (**Figura 2.13 c y d**). Según los resultados, ambas BNP fueron estables en todas las condiciones evaluadas. A pesar de esto se observó una disminución y un ensanchamiento de los espectros correspondientes a pH=3 (**Figuras 2.13 a y b**) así como en los espectros correspondientes a [NaCl]=100 mM y [NaCl]=500 mM (**Figura 2.13d**).

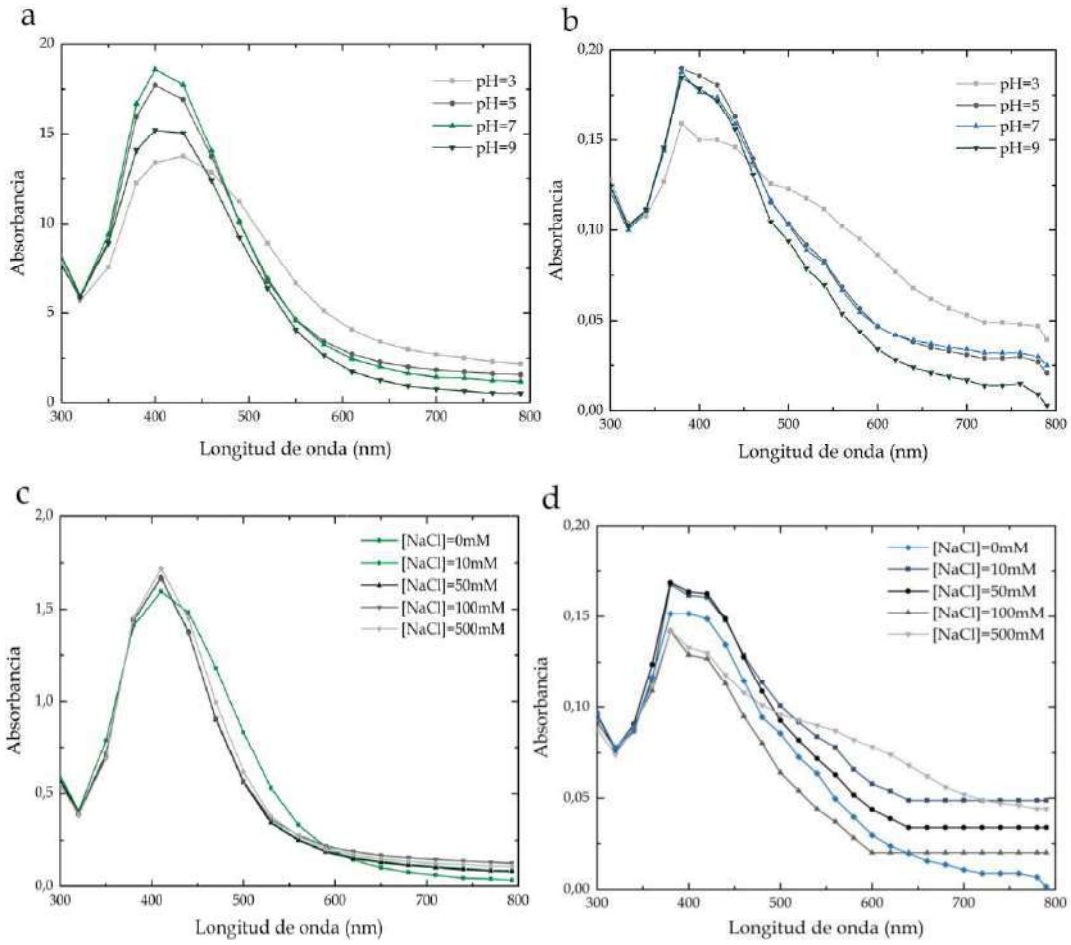


Figura 2.13. Estabilidad a diferentes condiciones de pH (a: PeNP, b: PchNP) y fuerza iónica (c: PeNP, d: PchNP).

DISCUSIÓN

En esta tesis se realizó la síntesis biológica de nanopartículas de plata (BNP) a partir de los medios extracelulares de los hongos *Penicillium expansum* y *Phanerochaete chrysosporium* que habían sido evaluados por su capacidad de síntesis en un trabajo previo realizado por nuestro grupo de investigación (Sanguiñedo et al., 2018). Como se presentó en la sección de **Metodología**, se llevó a cabo la síntesis extracelular de BNP y la misma se monitoreó mediante espectroscopía UV-vis. La RPS es una de las principales características de las AgNP y es dependiente tanto del tamaño como de la forma de las partículas (Hasan et al., 2022). Los resultados mostraron la banda correspondiente a la RPS ubicada a 450 nm para las PeNP y a 424 nm para las PchNP, siendo indicativas de la presencia de BNP en la solución (Lu et al., 2005). Además, asociado también a la RPS, se observó el cambio de color de amarillo pálido a rojo en el matraz de reacción, siendo también evidencia de la presencia de BNP. Por otro lado, los espectros mostraron bandas cercanas a la región entre 250 y 300 nm que podrían corresponder a diferentes componentes del filtrado extracelular del hongo (Raj et al., 2021). La banda cerca de 250 nm podría atribuirse a la excitación de electrónica de residuos de triptófano y tirosina en las proteínas, tal como se reportó previamente para la síntesis biogénica de nanopartículas (Fayaz et al., 2010).

Luego de la síntesis, las BNP se purificaron. En concordancia con lo determinado en el trabajo de Sanguiñedo et al. (2018) las BNP fueron estables luego de la purificación, lo cual se evidencia por las bandas máximas de absorción a 439 nm y 442 nm en los espectros de las PeNP y las PchNP, respectivamente. El corrimiento encontrado en el pico de la RPS correspondiente a las PchNP se atribuye a un aumento de tamaño de las BNP ocasionado por la centrifugación.

Además, se estudió la influencia del tiempo de incubación del micelio con el agua, la concentración de $AgNO_3$ y la temperatura de reacción, considerando los espectros de absorbancia UV-visible con especial énfasis en la banda correspondiente a la RPS. El primer parámetro evaluado fue la concentración de $AgNO_3$. Varios autores han señalado en sus resultados que la concentración de

$AgNO_3$ afecta el tamaño de las AgNP sintetizadas. Algunos autores indican que, a menor concentración, el tamaño de las AgNP disminuye, mientras que otros obtienen un tamaño menor utilizando concentraciones intermedias del precursor (Neethu et al., 2018; Hamouda et al., 2019; Al-khattaf, 2021). En este trabajo no se observaron corrimientos significativos en la banda de RPS con los cambios en las concentraciones de $AgNO_3$. Sin embargo, sí se observaron incrementos en intensidad, indicando que, para ambas BNP, 5 mM de $AgNO_3$ fue la concentración con la que se obtuvo la mayor producción de nanopartículas, evidenciada por la mayor absorbancia obtenida. El siguiente parámetro en ser evaluado fue el tiempo de incubación del micelio con el agua. En el caso de las PchNP se llega a un máximo de producción a las 41 horas de incubación de la biomasa con el agua. Para las PeNP, el mayor tiempo evaluado (72 horas) fue el que permitió obtener una mayor síntesis de nanopartículas. Esto puede atribuirse a una mayor liberación de componentes desde el micelio al medio extracelular, en concordancia con lo obtenido por otros autores (Neethu et al., 2018; Huq et al., 2022). Posteriormente se evaluó la incidencia de la temperatura de reacción. En ambos casos, a mayor temperatura se observó un aumento en la producción de BNP, siendo la temperatura seleccionada 37°C.

En suma, las condiciones de reacción seleccionadas para las biosíntesis fueron:

- $[AgNO_3]$=5mM y $T_{reacción}$=37°C, para ambas BNP
- $t_{incubación}$=72h para PeNP y $t_{incubación}$=41h para PchNP

Es interesante destacar que estas condiciones son diferentes de las utilizadas en las síntesis publicadas por Sanguiñedo et al. (2018) dónde se utilizó una concentración de $AgNO_3$ de 1mM, un tiempo de incubación del micelio con el agua de 72 horas y la reacción de síntesis fue realizada a temperatura ambiente. El cambio de las condiciones de síntesis es posiblemente la explicación para las diferencias en las caracterizaciones que se discuten a continuación respecto a la mencionada publicación.

La caracterización de las AgNP es fundamental dado que las numerosas aplicaciones que presentan son consecuencia de propiedades como la morfología, el tamaño nanométrico, la alta relación superficie-volumen y la carga neta, entre otras (Akabri et al., 2011; Cao et al., 2011; Raj et al., 2021).

Las BNP sintetizadas por ambos hongos se caracterizaron mediante diversas técnicas. Se determinó su tamaño mediante TEM, SAXS y DLS. Tal como se mencionó en la sección de **Resultados**, mediante SAXS se obtuvieron dos poblaciones de tamaños diferentes para las PeNP, una de 16(1) nm y otra de 40(1) nm. La población de mayor tamaño está asociada a las diferencias que surgen en los tratamientos de las muestras utilizadas en las técnicas de DLS y SAXS. Mientras que en DLS se trabaja con las AgNP en suspensión, para SAXS las AgNP deben ser depositadas y secadas sobre un soporte, lo que podría implicar un fenómeno de agregación, obteniendo por efecto de proximidad una población de mayor tamaño a la obtenida por DLS. Esta misma explicación es también válida para la diferencia de tamaños entre TEM y DLS, dado que en TEM se trabaja con la muestra seca, lo que podría ocasionar un efecto de agregación de las partículas. En cuanto a las PchNP, el tamaño obtenido por DLS fue de 43(15) nm, mayor a los valores obtenidos por SAXS y TEM, de 26(1) nm y 17(7) nm respectivamente. Esta diferencia se explica por el fundamento de la técnica de DLS que mide el diámetro hidrodinámico, es decir que las moléculas del solvente quedan asociadas a las AgNP implicando que el tamaño determinado pueda ser mayor que el obtenido para SAXS y TEM, en dónde la muestra debe estar seca. Ha sido reportado que en la técnica de TEM, cuando la muestra es expuesta a alto vacío, el *capping* colapsa en una capa seca que ocasiona que las nanopartículas tengan un tamaño menor al obtenido por DLS (Souza et al., 2016; Wilson and Prud'homme, 2021; Sanguiñedo et al., 2023).

En comparación con otros estudios, los resultados de la biosíntesis realizada en esta tesis son altamente prometedores en términos de la uniformidad de tamaños de las BNP obtenidas. Los resultados fueron concordantes con los obtenidos en un trabajo previo realizado por el grupo (Sanguiñedo et al., 2018), en dónde se obtuvo un tamaño de 38(12) nm para las PeNP y de 11(2) nm para las PchNP.

En una investigación previa utilizando *P. expansum*, se lograron BNP de forma cúbica con dimensiones de 50-200 nm mediante una síntesis extracelular (Mohammadi and Salouti, 2015). Sin embargo, en dicho estudio, la reacción de síntesis se llevó a cabo en contacto con la biomasa fúngica (las nanopartículas se generaron adheridas al micelio). Es importante señalar que el medio de cultivo y la concentración de $AgNO_3$ empleados fueron diferentes a los utilizados en esta tesis. Otro trabajo en el que se utilizó una temperatura de reacción de 30°C, 72 horas de incubación del micelio de *P. expansum* con agua y una concentración de $AgNO_3$ de 2 mM, resultó en la obtención de BNP esféricas con tamaños determinados por TEM de entre 14 y 25 nm (Ammar and El-Desouky, 2016). Aunque similares, estos tamaños difieren de los obtenidos para las BNP en esta tesis, determinados también por TEM y que fueron homogéneos de 32 (11) nm.

En cuanto a otras biosíntesis reportadas en literatura para *P. chrysosporium*, sucede algo similar a lo detallado para *P. expansum*. En trabajos publicados por otros autores utilizando distintas metodologías y condiciones de síntesis se obtuvieron bio-AgNP con tamaños determinados por TEM de entre 50 y 200 nm (Vigneshwaran et al., 2006) o entre 26 y 63 nm (Deniz and Mazmanci, 2020), muy superiores a los determinados en esta tesis que fueron homogéneos de 17 (7) nm. Esto refuerza la necesidad de evaluar las distintas condiciones de síntesis para generar una buena producción de AgNP con formas y tamaños homogéneos, lo cual es clave para futuras aplicaciones.

Además, los hongos fueron cultivados en caldo papa dextrosa (PDB), lo que podría explicar los diferentes picos de absorción de las BNP cuando se compara con lo obtenido por otros autores. En otro trabajo se evaluó *P. chrysosporium* para la producción de bio-AgNP (Vigneshwaran et al., 2006) pero la reacción se realizó con el micelio en lugar de con los filtrados celulares extracelulares (libres de micelio) como se describe en esta tesis.

Es sabido que características tales como el tamaño y la forma dependen del material fúngico utilizado para la biosíntesis, sin embargo, las bio-AgNP esféricas son las más comunes entre diversos autores (Beltrán Pineda et al., 2022). En esta tesis se obtuvieron BNP esféricas y el tamaño determinado fue

concordante con lo obtenido por otros autores (Ammar and El-Desouky, 2016; Deniz and Mazmanci, 2020; Mustapha et al., 2022).

Ambas BNP presentaron una carga neta negativa cercana a -30 mV lo cual es indicativo de una buena estabilidad (Bhattacharjee, 2016). Este parámetro es determinante para futuras aplicaciones, dado que una carga cercana a la neutralidad implicaría la pérdida de las fuerzas de repulsión entre las AgNP, derivando en un mayor tamaño que resultaría también en la pérdida de las propiedades únicas que presentan gracias a su tamaño nanométrico.

El *capping* (agente estabilizante de la superficie) fue estudiado mediante Microscopía Raman Confocal. La naturaleza de las AgNP da lugar al fenómeno local SERS, el cual puede ser evidenciado a la hora de realizar imagenología. Gracias al efecto antena y amplificador, es posible enaltecer la señal Raman de aquellos fragmentos moleculares próximos a la superficie de la nanopartícula que resultan de gran importancia para valorar la naturaleza del *capping* (Joshi et al., 2018). Para las PeNP se observó la presencia de una banda a 219 cm^{-1}, asignada al estiramiento Ag-N y/o Ag-O (Rodrigues et al., 2013) lo cual indica que las nanopartículas se encuentran coordinadas en primera instancia con átomos de nitrógeno u oxígeno. Para las PchNP, se observó una banda a 230 cm^{-1}, asignada al estiramiento Ag-N (Rodrigues et al., 2013), indicando la coordinación de las nanopartículas a átomos de nitrógeno. Estos resultados sugieren que las proteínas provenientes del extracto fúngico estarían formando parte del *capping* que recubre las BNP. Esto es concordante con lo reportado para otras nanopartículas sintetizadas por hongos (Duran 2023). Además, para las PeNP se encontraron bandas a 1320 y 1586 cm^{-1}, asociadas a las denominadas bandas D y G carbonosas de los sistemas grafíticos (reducidos y oxidados) (Rodrigues et al., 2013), que podrían estar presentes en estas muestras como resultado de un proceso de degradación y oxidación. En cuanto a las PchNP, además de la banda asociada a la formación de enlaces tipo Ag-N se identificaron bandas asociadas a la presencia de L-valina y L-alanina en la región de la huella digital, lo cual es también indicativo de que las proteínas presentes en el medio extracelular estarían formando parte del *capping* o ubicándose muy cerca de la superficie

metálica de las PchNP (De Gelder et al., 2007; Durán et al., 2023). Durante la biosíntesis, la formación del *capping* ocurre a la vez que la síntesis de bio-AgNP por lo que no se requiere ningún paso adicional. Además, las moléculas del medio extracelular se unen fuertemente con el metal formando la capa sobre la superficie de las nanopartículas lo cual ayuda a estabilizar las bio-AgNP e inhibir su agregación (Al-Dbass et al., 2022; Lan Chi et al., 2022). Esta corona que se forma por la adsorción de biomoléculas a la superficie de la bio-AgNP es capaz de interactuar con sistemas biológicos aumentando su eficiencia y, además, aumenta en forma considerable la biocompatibilidad de las mismas (Beltrán Pineda et al., 2022).

Las BNP fueron sometidas a diferentes condiciones de pH y fuerza iónica. Al tratarse de AgNP provenientes de síntesis biológica, su estabilidad podría depender de la naturaleza bioquímica del *capping* (por ejemplo, a pH ácido se podría perder estabilidad ya que las proteínas presentes en la superficie se protonan llevando a la agregación). Para las condiciones más extremas de pH, así como para las concentraciones más elevadas de NaCl (para PchNP) se observa una pérdida de estabilidad por disminución y/o ensanchamiento de la banda de la RPS. En particular, para ambas BNP a pH=3 se observó un leve ensanchamiento del pico, atribuible a la neutralización de cargas superficiales de las BNP, las cuales presentan carga negativa a pH=6, dando lugar a un fenómeno de agregación. A pesar de esto, en todos los espectros se observó el pico correspondiente a la RPS, indicativo de una buena estabilidad de ambas BNP en las condiciones evaluadas.

En un trabajo previo realizado por el grupo se determinó la estabilidad en distintas condiciones de pH (5 y 7) y fuerza iónica (10, 50 y 100 mM de buffer MES) de PeNP y PchNP (Sanguiñedo et al., 2018). Los resultados obtenidos mostraron una disminución en la intensidad máxima de absorbancia (RPS) al utilizar 10 mM de MES a pH 5. Los resultados obtenidos en esta tesis no muestran una pérdida de estabilidad cuando las BNP se someten a pH = 5 y a 10 mM de fuerza iónica. Esto puede explicarse por la diferencia en el potencial Z obtenido. En el trabajo previo mencionado, los potenciales Z fueron de -11.5 mV para PeNP

y -14.7 mV para PchNP mientras que, en esta tesis, luego de seleccionar las mejores condiciones de síntesis, los potenciales Z fueron de -18.5 mV para las PeNP y de -24.8 mV para las PchNP lo cual es indicativo de un aumento en la estabilidad de ambas BNP.

CONCLUSIONES

En este capítulo se realizó la síntesis biológica de nanopartículas de plata a partir del medio extracelular de los hongos *Penicillium expansum* (PeNP) y *Phanerochaete chrysosporium* (PchNP). Las BNP resultaron estables luego de la centrifugación realizada para obtenerlas purificadas.

Para ambas biosíntesis se seleccionaron las condiciones que permitieron obtener una mayor producción de BNP, evaluando el incremento en la banda de RPS. Para ello se variaron el tiempo de incubación del micelio con el agua, la temperatura de reacción y la concentración del precursor $AgNO_3$.

Las BNP fueron caracterizadas para determinar el tamaño, morfología, distribución de tamaños, carga neta, contenido de plata y agentes estabilizantes de la superficie (*capping*).

Ambas BNP fueron de forma esférica con una distribución de tamaños con baja polidispersidad. Para ambas BNP se determinó el tamaño por TEM, DLS y SAXS. En todos los casos, los tamaños fueron menores a 50 nm. Además, estos resultados demostraron la importancia de realizar una caracterización complementaria con diferentes técnicas.

La carga neta determinada para las PeNP y PchNP fue cercana a -30 mV indicando que las BNP son estables.

Para las BNP obtenidas en las condiciones seleccionadas se determinó el contenido de Ag mediante ICP-AES.

Por Microscopía Raman Confocal se caracterizó la superficie de las BNP (la naturaleza del agente estabilizante), indicando que la misma podría estar constituida por las proteínas presentes en el filtrado extracelular.

Las BNP presentaron estabilidad frente a la mayoría de las condiciones de pH y concentración de NaCl evaluadas, aunque dicha estabilidad fue menor para las condiciones más extremas de pH.

Capítulo III

Era el mejor de los tiempos, era el peor de los tiempos, la edad de la sabiduría, y también de la locura; la época de las creencias y de la incredulidad; la era de la luz y de las tinieblas; la primavera de la esperanza y el invierno de la desesperación.

CHARLES DICKENS, ***Historia de dos Ciudades***

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas son tan antiguas como lo es la vida en la Tierra. La historia de la humanidad ha estado marcada por los brotes de las epidemias y pandemias ocurridos a lo largo de los siglos.

En la actualidad, estas enfermedades continúan siendo un gran problema debido tanto a las enfermedades emergentes como a la aparición de microorganismos resistentes a los antimicrobianos. Microorganismos como los que constituyen el grupo ESKAPE presentan una gran relevancia a nivel de la salud. Ellos son *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pnemoniae, Acinetobacter baumanii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp, caracterizados por su gran capacidad para "escapar" de la acción de los antibióticos debido a sus diversos mecanismos de resistencia tales como cambios de permeabilidad, modificación de los sitios de acción de los fármacos o la inactivación del fármaco, entre otros (Jadimurthy et al., 2022). Todos los patógenos del grupo ESKAPE entran en las categorías de prioridad crítica y alta de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos (WHO, 2017).

Otros microorganismos incluidos en las categorías de prioridad crítica y alta son los hongos *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Aspergillus fumigatus* y *Fusarium spp.*, entre otros (WHO, 2022b). Los patógenos fúngicos son una preocupación creciente para la salud. Las enfermedades que ocasionan son de especial importancia en las personas con problemas de salud subyacentes o un sistema inmunológico debilitado. Por ejemplo, la pandemia por el coronavirus SARS-CoV-2 (COVID-19) está asociada con un aumento de las infecciones fúngicas, siendo las más frecuentes la aspergilosis, mucormicosis y candidiasis (WHO, 2022b). Actualmente se utilizan únicamente cuatro clases de antifúngicos (azoles, equinocandinas, pirimidinas y polienos) y solo unos pocos más están en desarrollo. Siendo las células fúngicas y humanas eucariotas, los antifúngicos tienen diversos efectos adversos por lo que estos medicamentos están diseñados para atacar los componentes que diferencian células fúngicas de células mamíferas, tales como la presencia de ergosterol en la membrana de la célula fúngica y el glucano de la pared celular (WHO, 2022b; Wu et al., 2023). Por

ejemplo, el fármaco más recientemente aprobado por la FDA (Ibrexafungrep) contra las candidiasis es específico contra el β-D-glucano de la pared celular, un mecanismo de acción similar al de las equinocandinas (Phillips et al., 2023).

Las enfermedades infecciosas no son únicamente motivo de preocupación en el ámbito de la salud humana. En el área agrícola los fitopatógenos provocan considerables pérdidas económicas y afectan de manera significativa los cultivos (Dixit and Kumari, 2023). Entre algunos ejemplos de microorganismos que perjudican los cultivos en Uruguay se encuentran aquellos pertenecientes a los géneros *Fusarium* (Brancatti et al., 2022), *Xanthomonas* (Clavijo et al., 2022) y *Penicillium* (Arrarte et al., 2023).

La búsqueda de nuevos antimicrobianos para afrontar el tratamiento de las enfermedades infecciosas provocadas tanto por bacterias como por hongos ha sido abordada por diversos autores (Clavijo, 2018; Alqahtani et al., 2022; Dehbanipour and Ghalavand, 2022; Raffaelli et al., 2022; Wu et al., 2023). En este contexto, las nanopartículas de plata ofrecen una buena alternativa por su actividad antimicrobiana (Thambirajoo et al., 2021; Luceri et al., 2023; Magdy et al., 2024). Diversos estudios demuestran el potencial de las AgNP para combatir microorganismos patógenos tales como *Fusarium* spp. (Win et al., 2020), *Alternaria* sp. (Win et al., 2020; Dashora et al., 2022) o las bacterias del grupo ESKAPE (Neethu et al., 2018; Preda et al., 2020; Huq et al., 2022; Yassin et al., 2022; Raza et al., 2023), entre muchos otros.

En la actualidad, se han logrado significativos avances en la comprensión de los mecanismos de acción antimicrobiana de las AgNP. No obstante, a diferencia de los antimicrobianos convencionales, se ha observado que las AgNP no siguen una ruta de acción específica (Singh and Mijakovic, 2022). Además, su efectividad parece depender tanto de la propia AgNP como de la célula microbiana involucrada (Javed et al., 2021). Es por tanto fundamental estudiar la interacción célula-AgNP para cada caso en particular.

Uno de los principales mecanismos de acción ampliamente propuestos y estudiados en relación con las AgNP es su capacidad para inducir estrés oxidativo y, por tanto, la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y

nitrógeno (ERN). Estas moléculas desempeñan un papel crucial como mediadores en la muerte celular. Varios estudios han investigado específicamente la producción de estas especies en células de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli* tras la exposición a las AgNP (Quinteros et al., 2016; Ali et al., 2023). La literatura disponible indica que la actividad antimicrobiana de las AgNP está relacionada con su capacidad para adherirse directamente a los microorganismos. Esta capacidad puede generar un efecto biocida directo o bien modificar las funciones del ADN y las proteínas. Además, se ha señalado que los iones plata (Ag^+) que pueden ser liberados por las AgNP interactúan con las proteínas debido a su afinidad por los átomos de azufre y fósforo (Luceri et al., 2023).

Con el fin de estudiar la interacción entre las AgNP y las células microbianas, la espectroscopía Raman ofrece la posibilidad de monitorear diversas moléculas biológicas además de ser una técnica de aplicación rápida, simple, que no requiere marcadores, no es necesariamente destructiva con la muestra y requiere menos muestra y tratamiento previo (Perumal et al., 2021). El fundamento de esta técnica se basa en la dispersión inelástica de la luz cuando una muestra es irradiada por una fuente de luz monocromática. Una vez que la luz interactúa con la muestra, una parte de la misma cambia su frecuencia. Este fenómeno se origina debido a la vibración de las moléculas y, por ende, puede ser explicado a través de los niveles de energía (Wang et al., 2021).

La espectroscopía Raman permite tener datos sobre la composición química de microorganismos a nivel de una única célula y ha sido utilizada tanto para identificar microorganismos como para analizar las acciones de diferentes antibióticos sobre los mismos (Gonzalez Moreno et al., 2019; de Siqueira e Oliveira et al., 2021; Cui et al., 2022; Novikov et al., 2022).

La técnica de espectroscopía Raman ha sido empleada para monitorear la respuesta de células planctónicas a la acción de diferentes fármacos. Un estudio realizado por Singh et al. (2023) ilustra este uso al diferenciar, mediante espectroscopía Raman, aislamientos clínicos de *E. coli*, *A. baumanii* y *Enterobacter* sp. que muestran resistencia o sensibilidad a varios antibióticos con diferentes

mecanismos de acción, tales como ciprofloxacina, gentamicina, meropenem y nitrofurantoína. Este estudio comparó las características de las células expuestas a estos antibióticos con aquellas sin tratar.

La espectroscopía Raman asociada a un microscopio Confocal (Microscopía Raman Confocal) permite obtener los espectros característicos de una muestra en cada pixel de la imagen generando un sistema imagenológico de co-localización con resolución en escala sub-micrométrica.

En consecuencia, la Microscopía Raman Confocal se posiciona como una herramienta de gran interés para investigar las alteraciones celulares inducidas por diversos antimicrobianos y su potencial se incrementa al combinarse con otras técnicas tales como la Microscopía Electrónica de Transmisión, de Barrido o la Microscopía de Fuerza Atómica que permiten visualizar las interacciones entre las AgNP y las células. Este enfoque es fundamental para comprender tanto los mecanismos de acción de los fármacos como los procesos de resistencia, aspectos cruciales para el desarrollo de tratamientos más eficaces.

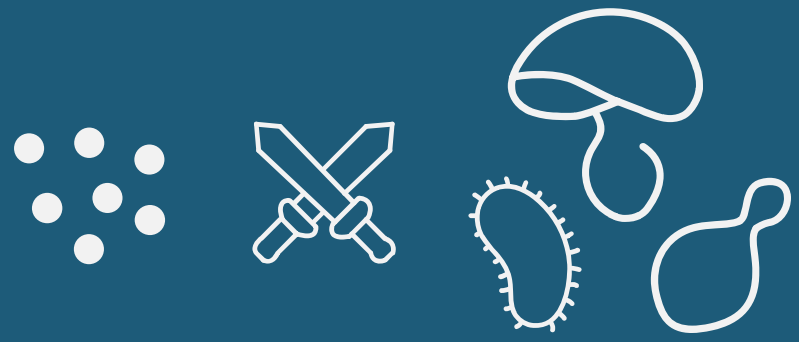
OBJETIVOS

- Evaluar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata (PeNP y PchNP) frente a bacterias, hongos filamentosos y levaduras de importancia a nivel de la salud humana, animal y agrícola.
- Estudiar la interacción entre las BNP y los microorganismos.
- Evaluar la generación de estrés oxidativo como uno de los posibles mecanismos de acción de las BNP.

ESTRATEGIA

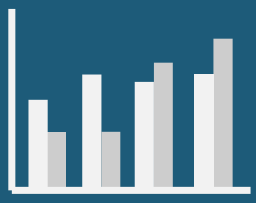
Para lograr los objetivos planteados, en primer lugar, se evaluó la Concentración Inhibitoria mínima de las BNP frente a diferentes bacterias (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumanii, Xanthomonas vesicatoria, Stpahylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae* y *Bacillus subtilis*), hongos filamentosos (*Penicillium expansum, Aspergillus niger, Fusarium graminearum, Rhizopus stolonifer, Alternaria alternata* y *Pyricularia oryzae*) y levaduras (*Candida albicans* y *Candida tropicalis*). Posteriormente se estudió la interacción entre algunos de los microorganismos que fueron sensibles a las BNP. Para ello se trabajó con diferentes técnicas, tales como Microscopía Raman Confocal, Microscopía Electrónica de Transmisión, Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental y Microscopía de Fuerza Atómica. Por último, se evaluó la generación de estrés oxidativo como uno de los posibles mecanismos de acción antimicrobianos de las BNP mediante la determinación de las especies reactivas del oxígeno (ERO) y las especies reactivas del nitrógeno (ERN).

CAPÍTULO III - Resumen gráfico

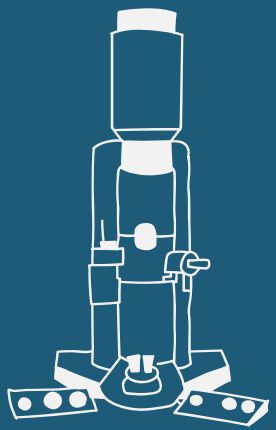


Potencial antimicrobiano

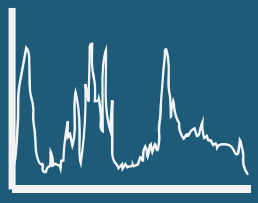
Interacción BNP-células microbianas



ROS
RNI



Microscopía Electrónica



MRC
AFM

METODOLOGÍA

Actividad antimicrobiana.

Material biológico.

Para los ensayos de actividad antimicrobiana se utilizaron microorganismos depositados en la Colección del Área de Microbiología, provenientes de distintas colecciones, tal como se muestra en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.1. Microorganismos utilizados para los ensayos de actividad antimicrobiana.

Bacterias	*Escherichia coli* ATCC 25922	*Staphylococcus aureus* ATCC 6538P
	Pseudomonas aeruginosa ATCC 15422	*Klebsiella pneumoniae* CCMG 12716
	Acinetobacter baumanii CCMG b1	*Bacillus subtilis* ATCC 6633
	Xanthomonas vesicatoria CCMG 28m	
Levaduras	*Candida albicans* ATCC 101231	*Candida tropicalis* ATCC 66029M*
Hongos filamentosos	*Penicillium expansum* CCMG 14g	*Aspergillus niger* CCMG 17
	Fusarium graminearum CCMG 31084	*Rhizopus stolonifer* CCMG 6227B
	Alternaria alternata CCMG 54027	*Pyricularia oryzae* Po290*

ATCC: American Type Culture Collection

CCMG: Colección de la Cátedra de Microbiología General.

*Colección de INIA, aislada por el Dr. Sebastián Martínez de cultivos de arroz del Uruguay.

Nanopartículas de plata biogénicas utilizadas.

Para los ensayos de actividad antimicrobiana e interacción de este capítulo se utilizaron las BNP sintetizadas en el **Capítulo II**:

- PeNP: tamaño de 32(11) nm por TEM y 16(4) nm por DLS.
- PchNP: tamaño de 17(7) nm por TEM y 43(15) nm por DLS.

Síntesis química de AgNP.

Los ensayos de actividad antimicrobiana se realizaron, para algunos casos, frente a nanopartículas de plata síntesis química (QNP), sintetizadas según lo descripto por Solomon et al. (2007) y Banne et al. (2017), con modificaciones. Se vertieron con probeta 150 mL de $NaBH_4$ 0.02 M (fresco) en un matraz de 250 mL (**Figura 3.1a**) y se colocó en un baño de hielo hasta enfriar (20 a 30 minutos). En una bureta se vertió $AgNO_3$ 0.01 M y se agregó gota a gota (a razón de una gota por segundo) al matraz conteniendo $NaBH_4$, con agitación magnética (**Figura 3.1b**). Luego del agregado de 2 mL de $AgNO_3$, la solución se tornó amarilla y se detuvo la agitación. El matraz conteniendo las QNP se dejó en reposo durante 4 horas, se centrifugó a 7000 rpm durante 10 minutos y se resuspendió en agua destilada (**Figura 3.1c**). Se realizó el espectro de las QNP mediante espectroscopía UV-visible en el rango de 200 a 800 nm (**Figura 3.1d**). La concentración se estimó según lo descrito por (Paramelle et al. (2014).

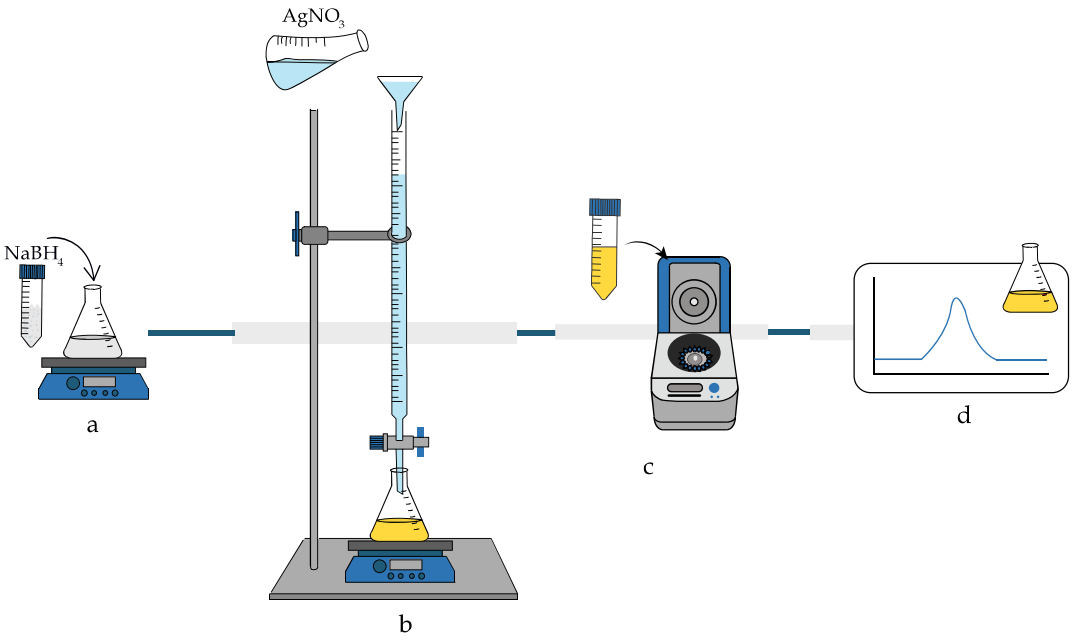


Figura 3.1. Metodología de la síntesis química de QNP. a) preparación de $NaBH_4$ 0.02 M, b) agregado de $AgNO_3$ 0.01 M a la solución de $NaBH_4$, c) centrifugación, d) medición del espectro UV-visible.

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

Se determinó la CIM de las BNP, QNP y $AgNO_3$ de acuerdo al Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, 2017) frente a los microorganismos de la **Tabla 3.1**. El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos estériles (300 µL de capacidad, MicroWell, NUNC, Thermo-FisherScientific, Waltham, MA) según lo esquematizado en la **Figura 3.2**, por triplicado para cada muestra.

Para ello se realizaron diluciones seriadas de las nanopartículas purificadas en caldo *Mueller-Hinton Broth* – MHB (HIMEDIA®) para la CIM de bacterias y levaduras y medio RPMI (Capricorn Scientific GmbH, Alemania) para la CIM de hongos filamentosos. Realizadas las diluciones, en los pocillos de la microplaca se sembraron además suspensiones de los microorganismos a evaluar:

- Bacterias: $3x10^8$ células/mL (escala McFarland N°1) en suero fisiológico
- Levaduras: $3x10^6$ células/mL (escala McFarland N°1) en suero fisiológico
- Hongos filamentosos: $1x10^4$ esporas/mL en suero fisiológico con *Tween* 20)

Como control de crecimiento se utilizó la suspensión de microorganismo sin el agregado de las muestras y como control de esterilidad se utilizó caldo de cultivo

sin muestra y sin suspensión celular. Las placas se incubaron a la temperatura adecuada para su crecimiento. Luego de 24 horas para las bacterias y levaduras y de 96 horas para los hongos filamentosos, se determinó la concentración mínima que provocó una inhibición visible del crecimiento microbiano.

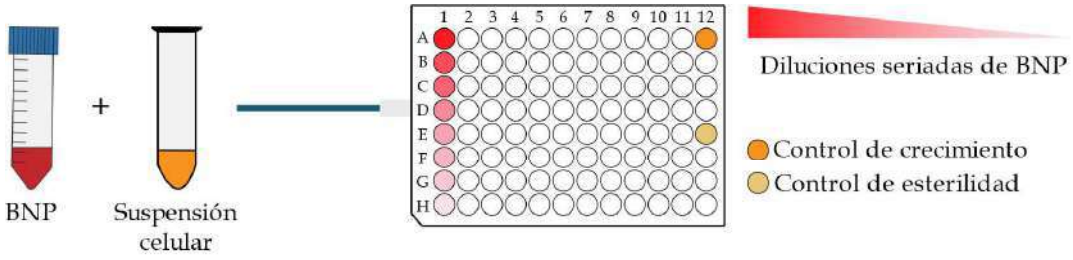


Figura 3.2. Esquema de la Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima de BNP, QNP y $AgNO_3$ frente a bacterias, levaduras y hongos filamentosos.

Interacción entre AgNP y células microbianas.

Microscopía Raman Confocal (MRC).

Bacterias y levaduras.

Para realizar los estudios del perfil fenotípico de células bacterianas y de levaduras antes y después del tratamiento con BNP mediante Microscopía Raman Confocal se realizó la metodología descrita para antibióticos (Athamneh et al., 2014). Se utilizó un Microscopio Raman Confocal WITec Alpha 300-RA (WITec GmbH, Ulm, Alemania) ubicado en el Instituto Polo Tecnológico de Pando (IPTP), DETEMA, Facultad de Química, UdelaR. Se preparó una suspensión celular (10^8 células/mL para bacterias y 10^6 células/mL para levaduras) a partir de un cultivo overnight al cual se le añadieron las BNP (a una concentración de tres veces la CIM) y se dejaron en contacto durante 30 minutos (**Figura 3.3a**). Posteriormente, se realizaron lavados de esta mezcla con buffer fosfato salino (PBS) mediante centrifugación a 2000 rpm durante 15 minutos (**Figura 3.3b**). Como control, se empleó una suspensión celular tratada únicamente con PBS. Las suspensiones celulares se depositaron sobre un soporte de aluminio a temperatura ambiente hasta secado total (**Figura 3.3c**). Las

mediciones se realizaron utilizando un láser de 532 nm enfocado a través de un objetivo de 100x. El procesamiento de datos y el análisis estadístico se realizó mediante análisis de componentes principales (PCA) utilizando un script desarrollado en el Área Física del DETEMA y que se ejecutó en entorno MATLAB. Los cambios obtenidos en los espectros Raman (perfil fenotípico) de las células tratadas con las BNP se evaluaron comparándolos con los de las células no tratadas (control) (**Figura 3.3d**).

Hongos filamentosos.

Para la puesta a punto de un protocolo que permitiera observar hongos filamentosos por Microscopía Raman Confocal se realizaron distintos protocolos de preparación de muestras, previamente reportadas en la literatura, utilizando distintas cepas fúngicas según lo especificado en la bibliografía. Para todos los casos, las condiciones para el análisis por Microscopía Raman Confocal fueron las mismas que para el análisis de células bacterianas.

Protocolo 1

Se siguió la metodología propuesta por Witkowska et al. (2017). Se cultivaron los hongos *P. expansum* y *P. chrysosporium* en medio Sabouraud Dextrose Agar (SDA, BD Difco, Sparks, MD, EEUU) durante 3 semanas a 28°C. Se tomó una porción de micelio y se suspendió en un eppendorf conteniendo 100 µL de las BNP diluidas en 0.9% de cloruro de sodio (NaCl). Como control sin tratamiento se suspendió el micelio en 100 µL 0.9% de NaCl. La suspensión se homogeneizó para fragmentar las hifas. Posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 1300 rpm y se resuspendió en 20 µL de 0.9% de NaCl. Se depositaron 5 µL de la suspensión sobre un soporte papel aluminio para el análisis por Microscopía Raman Confocal.

Protocolo 2

Se realizó tomando como referencia el ensayo de CIM descrito previamente para hongos (CLSI, 2017). A un tubo conteniendo 50 µL de medio MHB y 50 µL de BNP, se agregaron 5 µL de una suspensión de 1 x 10^7 esporas/mL del hongo *A. niger*. Como control negativo se agregaron 5 µL de la suspensión de esporas a 100

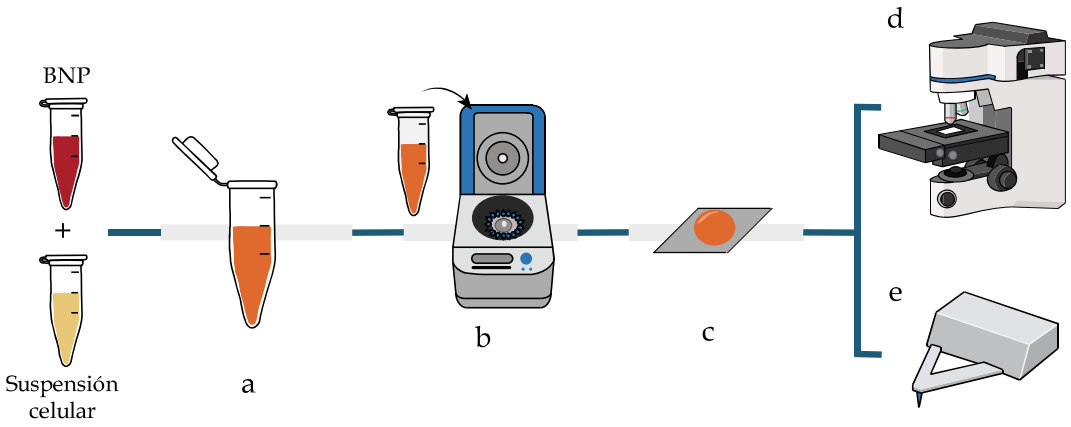
µL del medio MHB. Las muestras se homogenizaron con vortex y se depositaron 5 µL sobre un soporte de papel de aluminio para el análisis por Microscopía Raman Confocal.

Protocolo 3

Se siguió la metodología descripta por Perumal, *et. al* 2021 (Perumal et al., 2021) con modificaciones. Se sembró el hongo *P. oryzae* en placas de PDA y se incubó a 28°C. Transcurridos 10 días, se cortó un disco de micelio, se colocó sobre un papel de aluminio y se incubó a 28°C. Pasado el periodo de incubación, se agregaron 20 µL de las BNP sobre el disco de micelio. La muestra fue analizada mediante Microscopía Raman Confocal.

Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

Las células bacterianas sin tratamiento (control) y tratadas con BNP (tal como fueron preparadas para los análisis por Microscopía Raman Confocal) se observaron mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, por sus siglas en inglés) según lo reportado por Borowik et al. (2018). Las muestras se analizaron utilizando el modo AC (tapping) en un microscopio AFM WITec Alpha 300-RA (WITec GmbH, Ulm, Alemania) ubicado en el Instituto Polo Tecnológico de Pando (IPTP), DETEMA, Facultad de Química, UdelaR (**Figura 3.3e**). Las mediciones de AFM se obtuvieron colocando una gota de las suspensiones bacterianas sobre un sustrato de oblea de silicio y se dejaron secar a temperatura ambiente. Los sensores de AFM tuvieron una constante de fuerza de k = 42 N/m, una frecuencia de resonancia nominal de 285 kHz, un ancho promedio de 45 mm, una longitud de 160 mm y un espesor de 4.6 mm.



* Control: células + buffer

Figura 3.3. Esquema de la preparación de muestras para análisis mediante Microscopía Raman Confocal. a) suspensión de BNP y células (30 minutos de contacto), b) lavados mediante centrifugación, c) depósito en el sustrato, d) análisis por MRC, e) análisis por AFM.

Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM) y Microscopía Electrónica de Trasmisión (TEM).

Estos ensayos se realizaron en el marco de una pasantía en el Instituto de Nanociencia de Aragón, Zaragoza, España.

Previo a la preparación de las muestras de bacterias para Microscopía Electrónica se realizó, en una placa de 96 pocillos, el ensayo de viabilidad celular mediante resazurina (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) por el cual las células vivas reducen la resazurina (azul) a resorfurina (rosado) (Elshikh et al., 2016). Se preparó un inóculo ($1x10^6$ cfu/mL) de *E. coli* DH5α y de *B. subtilis* 1904-E en medio LB suplementado con diluciones seriadas al medio de las BNP. Como control negativo se utilizó un pocillo con el inóculo bacteriano sin el agregado de BNP. Luego de 24 horas de incubación a 37°C, se agregaron 30 µL de rezasurina (0.1 mg/mL en medio LB) a cada pocillo y se incubó en oscuridad a 37°C durante 1 hora bajo agitación. Cada muestra se analizó por triplicado y se determinó la concentración mínima que inhibió el crecimiento microbiano.

Para los análisis ESEM y TEM se incubaron, durante 24 horas, los cultivos bacterianos con dos concentraciones diferentes para cada BNP, seleccionadas de acuerdo a los resultados del ensayo con resazurina (a concentraciones cercanas y

menores que la CIM) (**Figura 3.4a**). 600 µL de estos cultivos (obtenidos a partir de tres pocillos) se centrifugaron a 1400 rpm (300 G) durante 10 minutos (**Figura 3.4b**) y se removió el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 1.5 mL de glutaraldehído 2.5% en buffer fosfato 10mM (pH 7.2) y la solución se incubó durante 2 horas en un rototorque (**Figura 3.4c**) para obtener las células fijadas. Posteriormente, las células se lavaron una vez con 1.5 mL de buffer PBS estéril y tres veces con agua destilada estéril para remover el glutaraldehído (**Figura 3.4d**). Finalmente, el pellet se resuspendió en 200 µL de agua MiliQ estéril (**Figura 3.4e**). Las muestras se analizaron en un SEM Quanta FEG-250 (FEI) para alta resolución funcionando en el modo ESEM usando un detector GSED bajo condiciones de elevada humedad relativa.

Para el análisis por TEM, las muestras se prepararon del mismo modo que para el análisis mediante ESEM (**Figura 3.4**), y con las mismas concentraciones de BNP. Los pellets se resuspendieron en agua destilada estéril y se depositaron 4 µL de la muestra en una grilla de cobre recubierta en carbono (Cu200 mesh). Se dejó secar al aire por un par de horas a temperatura ambiente. El análisis se llevó a cabo en un microscopio de electrones TECNAI T20 (FEI), trabajando a 60 kV (**Figura 3.4f**).

Criomicroscopía electrónica (Cryo-EM).

Estos ensayos se realizaron en el Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LNNano, CPNEM, Campinas/SP, Brasil) en el marco de una propuesta presentada por el grupo que fue aprobada, titulada "Interactions of biogenic silver nanoparticles with microbial cells" (Presentación de propuesta N° 20210454)

Para la preparación de las muestras, se incubaron cultivos de *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum* y *Candida albicans* con una concentración de cada BNP correspondiente a una dilución al medio de la CIM. La preparación de las muestras se realizó en Uruguay del mismo modo que para ESEM y se detuvo en la etapa de la fijación de las células (**Figura 3.4c**). Posteriormente, en Brasil, las

células fueron lavadas (**Figuras 3.4d** y **3.4e**) y depositadas en la grilla, como se explicó en el protocolo anterior.

Los análisis por criomicroscopía electrónica se realizaron utilizando un microscopio cryo-TEM Talos Arctica G2 (Thermo Fisher Scientific), en las instalaciones del Laboratorio Nacional de Nanotecnología (Campinas/SP, Brasil).

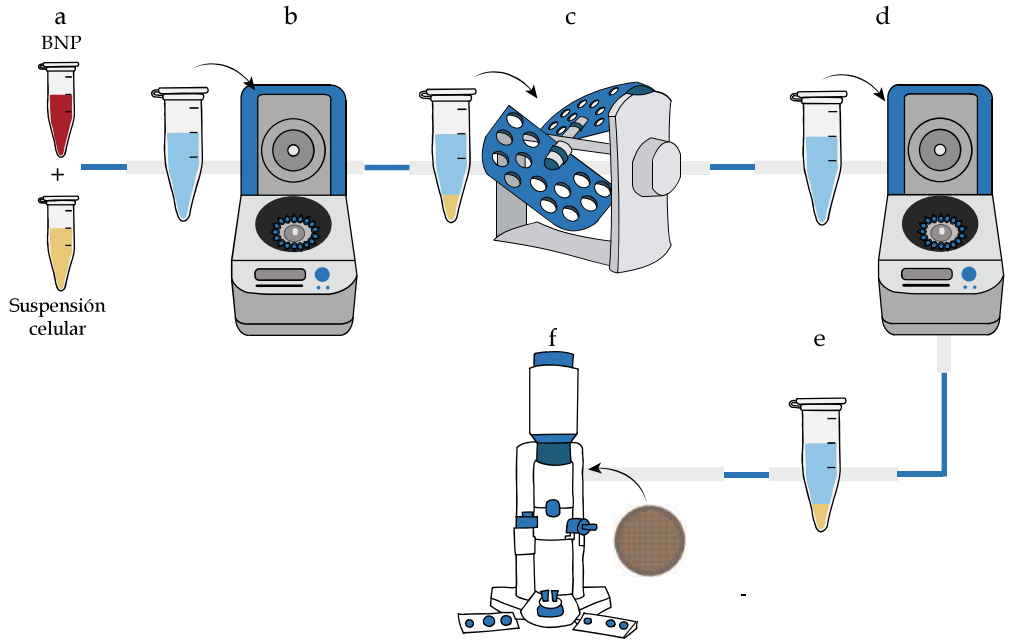


Figura 3.4. Esquema de la preparación de muestras para análisis mediante ESEM, TEM y Cryo-EM. a) preparación de la suspensión de BNP y células, b) centrifugación, c) fijación de células, d) lavados con PBS, e) resuspensión en agua MiliQ estéril, f) análisis por microscopías.

Mecanismos de acción antimicrobianos: estrés oxidativo.

Especies Reactivas del Oxígeno (ERO).

Se determinó la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) según lo descripto por Quinteros et al. (2016). Se incubaron a diferentes tiempos (0, 1, 2, 3 y 4 h) a 37°C, 100 µL de una suspensión del microorganismo proveniente de un cultivo fresco (10^8 células/mL para bacterias y 10^6 células/mL para levaduras) con 100 µL de las BNP en concentración de 3 veces la CIM (**Figuras 3.5 a y b**).

Posteriormente se agregaron 20 µL de una solución acuosa de 2',7' diclorofluoresceína (DHF) en concentración 0.5 µM. Se determinó la intensidad de fluorescencia luego de 15 minutos de incubación a 37°C con un espectrofluorímetro TECAN, Infinite M200 PRO con longitudes de onda de emisión y excitación de 480 nm y 520 nm, respectivamente (**Figura 3.5c**).

Como forma de normalizar los resultados se determinó la concentración de proteínas totales presentes en las diferentes muestras mediante el método de Bradford. Para ello se agregaron 200 µL del reactivo de Bradford (Sigma) a 5.7 µL de las muestras y se determinó la absorbancia a 595 nm luego de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente.

Los resultados fueron normalizados según la concentración de proteínas totales y se expresaron como intensidad de fluorescencia vs el tiempo de exposición.

Especies Reactivas del Nitrógeno (ERN).

Se determinó la generación de especies reactivas del nitrógeno (ERN) según lo descripto por Quinteros et al. (2016). Para llevar a cabo esta determinación se realizó un análisis espectrofotométrico del nitrito total mediante el reactivo de Griess, ya que este es un indicador de la concentración de $NO^{\cdot}$. Se incubaron a diferentes tiempos (0, 1, 2, 3 y 4 h) a 37°C, 100 µL de una suspensión del microorganismo proveniente de un cultivo fresco (10^8 células/mL para bacterias y 10^6 células/mL para levaduras) con 100 µL de las BNP en concentración de 3 veces la CIM. Luego se agregaron 50 µL de sulfanilamida al 2% en 5% (v/v) de HCl y 50 µL de una solución acuosa al 0.1% de N-(1-naftil) etilendiamina dihidrocloruro. La formación del colorante azoico se midió 15 minutos después por espectrofotometría a 540 nm en un espectrofluorímetro TECAN, Infinite M200 PRO, instalado en el Laboratorio de Bioquímica, DEPBIO, Facultad de Química, UdelaR (**Figura 3.5c**).

Como forma de normalizar los resultados se determinó la concentración de proteínas totales presentes en las diferentes muestras mediante el método de Bradford de igual modo que para la evaluación de ERO (punto anterior).

Los resultados fueron normalizados según la concentración de proteínas totales y se expresaron como absorbancia vs el tiempo de exposición.

Análisis estadístico.

Los resultados de ERO y ERN fueron analizados estadísticamente utilizando ANOVA y la prueba de Sidak para comparaciones múltiples (valor $p < 0.001$). Se utilizó GraphPad Prism (versión 8.0) para el análisis estadístico.

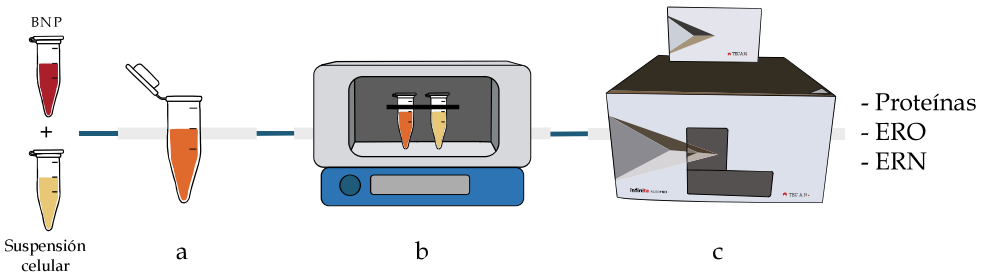


Figura 3.5. Esquema de la Determinación de generación de Especies Reactivas del Oxígeno (ERO) y Especies Intermediarias del Nitrógeno (ERN). a) suspensión de BNP y células, b) incubación a diferentes tiempos, c) medición de ERO, ERN y proteínas.

RESULTADOS

Síntesis química.

Se realizó la síntesis química de nanopartículas de plata (QNP), evidenciada por el espectro de absorción con el correspondiente pico correspondiente a la RPS a 400 nm (**Figura 3.6**).

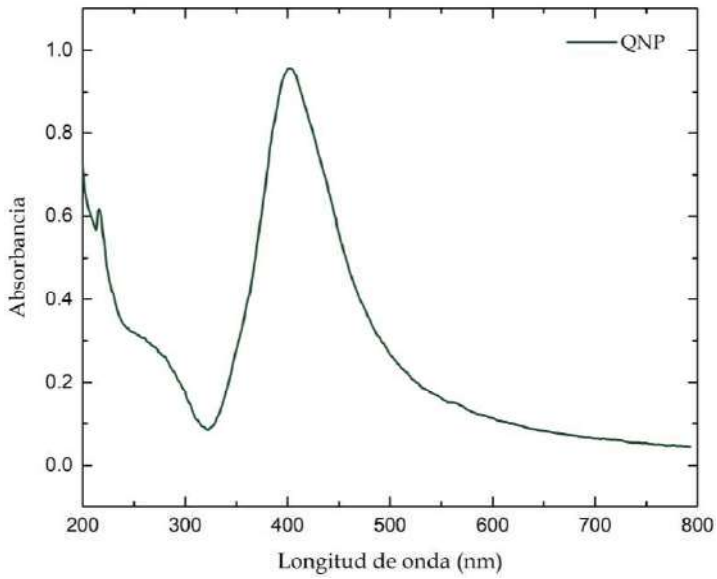


Figura 3.6. Espectro de absorción UV-visible de las QNP mostrando el pico correspondiente a la RPS.

Actividad antimicrobiana frente a bacterias.

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima.

La **Tabla 3.2** muestra los valores de CIM obtenidos para las BNP, la solución de $AgNO_3$ y las QNP frente a bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. La sensibilidad de todos los microorganismos a las BNP fue notable, evidenciándose cifras de CIM significativamente inferiores en comparación con las obtenidas mediante $AgNO_3$. En particular, se observaron valores de CIM más bajos para las PchNP en comparación con las QNP frente a *E. coli, S. aureus* y *P. aeruginosa*. En el caso de las PeNP, los valores de CIM fueron menores en comparación con las QNP, tanto para *S. aureus* como para *P. aeruginosa,* aunque fueron superiores frente a *E. coli.*

Tabla 3.2. Concentración Inhibitoria Mínima de las diferentes BNP, la solución de $AgNO_3$ y QNP frente a células bacterianas.

Bacteria	CIM PeNP	CIM PchNP	CIM $AgNO_3$	CIM QNP
E. coli ATCC 25922	0.600 nM	0.030 nM	7.8 µM	0.062 nM
P. aeruginosa ATCC 15422	0.032 nM	0.027 nM	7.8 µM	0.062 nM
X. vesicatoria CCMG 28m	0.016 nM	0.027 nM	630 µM	N/D
K. pneumoniae CCMG 12716	0.250 nM	0.055 nM	160 µM	N/D
A. baumanii CCMG b1	0.062 nM	0.027 nM	40 µM	N/D
S. aureus ATCC 6538P	0.030 nM	0.055 nM	80 µM	> 1 nM
B. subtilis ATCC 6633	0.087 nM	0.011 nM	40 µM	N/D

N/D: CIM no determinada

Interacción entre BNP y células bacterianas.

Microscopía Raman Confocal

Los cambios fenotípicos en células de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *B. subtilis* tratadas con BNP fueron analizados mediante Microscopía Raman Confocal (**Figura 3.7**). La asignación de las bandas (**Tablas 3.3 a 3.6**) se realizó en base a bibliografía previa (Nelson et al., 2004; Petra et al., 2005; De Gelder et al., 2007; Rusciano et al., 2015; Ayala et al., 2018; Lin et al., 2019; de Siqueira e Oliveira et al., 2021; Pistiki et al., 2022; Haq et al., 2023). Si bien se encontraron diferencias en los espectros Raman de las distintas bacterias, en todas ellas se observaron regiones de los espectros con similitud de bandas, atribuibles a las biomoléculas presentes en su estructura celular. En términos generales, las bandas asociadas a proteínas aparecieron en la región de 600-1600 cm^{-1}, los polisacáridos entre 500 y 1300 cm^{-1}, los ácidos grasos entre 800 cm^{-1} y 1600 cm^{-1} y los ácidos nucleicos entre 600 y 1600 cm^{-1}. Además, se encontraron las bandas asociadas a peptidoglicano (543 cm^{-1}, 630 cm^{-1} y 1380 cm^{-1}) y lipopolisacárido (962 cm^{-1}) en Gram negativas y al ácido teicurónico (852 cm^{-1}) de Gram positivas (de Siqueira e Oliveira et al., 2021). Los resultados muestran que el tratamiento con PeNP y PchNP afectó a todas las biomoléculas presentes en las estructuras celulares.

Además, se obtuvieron imágenes hiperespectrales (**Figura 3.8**) combinando las bandas correspondientes al estiramiento C-H de las bacterias (rojo) y las correspondientes al estiramiento Ag-N de cada BNP (PeNP: verde, PchNP:azul) (Estevez et al., 2020). En todos los casos se obtuvieron también las células bacterianas control (sin tratar con BNP). De este modo se puede visualizar la interacción de las BNP con las células microbianas.

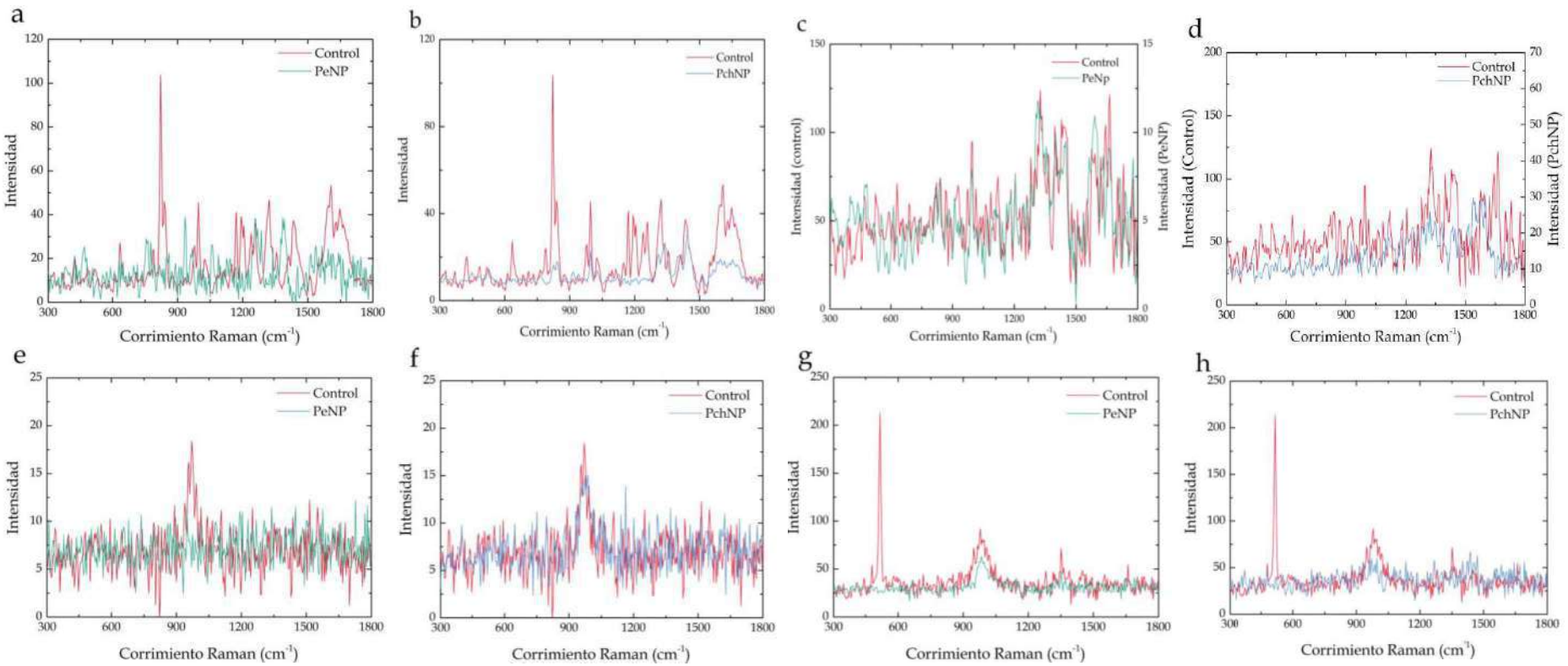


Figura 3.7. Espectros Raman de células control (rojo) y células tratadas con PeNP (verde) o PchNP (azul) para las bacterias *E. coli* (a y b), *S. aureus* (c y d), *P. aeruginosa* (e y f) y *B. subtilis* (g y h). Los espectros presentados son espectros promedio obtenidos mediante análisis de componentes principales (PCA)

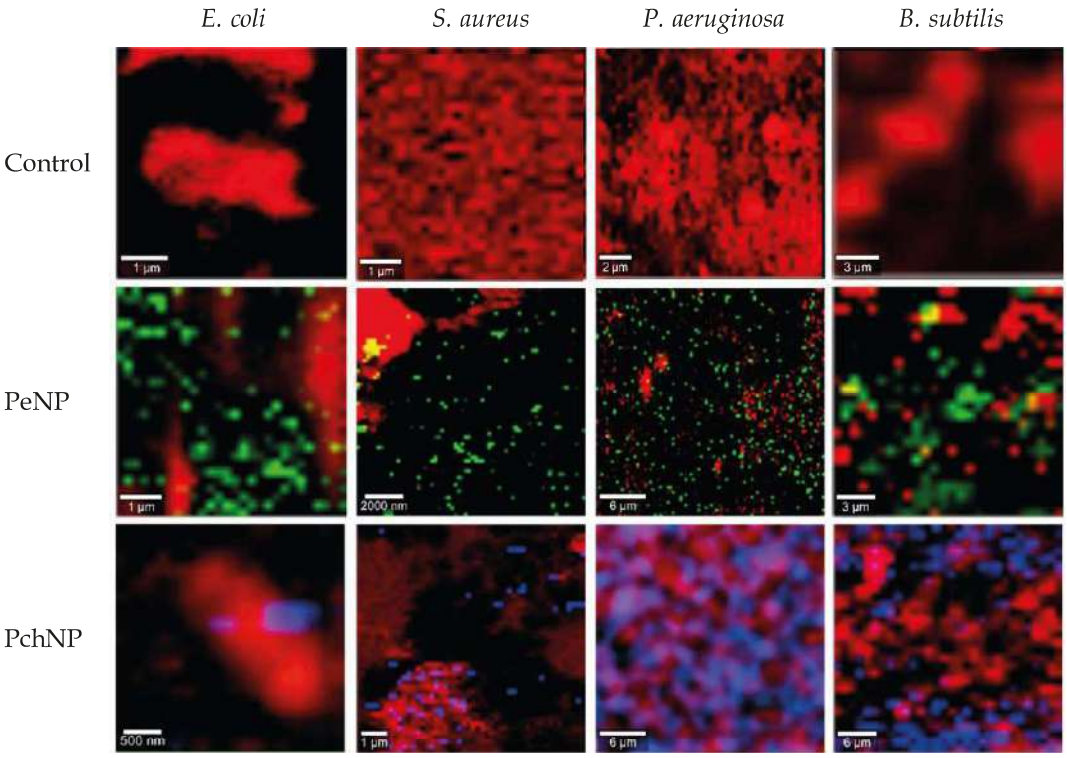


Figura 3.8. Imágenes de MRC obtenidas combinando las bandas correspondientes al estiramiento C-H de las bacterias (rojo) y las bandas asignadas a Ag-N para las PeNP (verde) y las PchNP (azul) para las bacterias *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *B. subtilis.* Control: células sin tratamiento, PeNP: células tratadas con PeNP (1.80 nM frente a *E. coli*, 0.09 nM frente a *S. aureus*, 0.09 nM frente a *P. aeruginosa* y 0.26 nM frente a *B. subtilis*), PchNP: células tratadas con PchNP (0.09 nM frente a *E. coli*, 0.16 nM frente a *S. aureus*, 0.08 nM frente a *P. aeruginosa* y 0.03 nm frente a *B. subtilis*).

Tabla 3.3. Asignaciones de las bandas Raman para células de *E. coli* control y tratadas con BNP.

Asignación	Biomolécula	Referencia	Corrimiento Raman (cm^{-1})	Tratamiento con PeNP	Tratamiento con PchNP
Tirosina	Proteínas	(Haq et al., 2023)	644	Aumenta	Disminuye
		(De Gelder et al., 2007)	810	Disminuye	Disminuye
ν (CC) - respiración del anillo		(Haq et al., 2023)	850	Disminuye	Disminuye
Estiramiento C-O-C del enlace glicosídico		(Haq et al., 2023)	905	Aumenta	Aumenta
Estiramiento C-C		(Haq et al., 2023)	930	Aumenta	Igual
Estiramiento C-C, C-N		(Lin et al., 2019)	1125	Aumenta	Aumenta
Amida III		(Lin et al., 2019)	1220	Disminuye	Disminuye
		(Haq et al., 2023)			
Amida III		(Haq et al., 2023)	1235	Disminuye	Disminuye
Vibración del anillo de la tirosina		(Lin et al., 2019)	1327	Disminuye	Disminuye
		(Haq et al., 2023)			
ν (CO_2) (α -aminoácidos)		(Haq et al., 2023)	1410	Disminuye	Disminuye
C=O stretching (amida I)		(Lin et al., 2019)	1658	Disminuye	Disminuye
Amida I		(Zhao et al., 2023)	1693	Disminuye	Disminuye
Carbohidratos	Polisacáridos	(Haq et al., 2023)	556	Aumenta	Aumenta
		(De Gelder et al., 2007)	982	Desaparece	Igual
		(De Gelder et al., 2007)	1186	Disminuye	Disminuye
		(De Gelder et al., 2007)	1243	Disminuye	Disminuye
δ (CH_2) lípidos saturados	Ácidos grasos	(Haq et al., 2023)	1460	Disminuye	Disminuye
		(De Gelder et al., 2007)	1593	Disminuye	Disminuye
Guanosina	Ácidos nucleicos	(Haq et al., 2023)	680	Disminuye	Disminuye
Adenina		(Haq et al., 2023)	706	Aumenta	Disminuye
Anillo glicosídico de la adenina y poliadenina (ADN/ARN)		(Haq et al., 2023)	730	Disminuye	Disminuye
Timina		(Lin et al., 2019)	746	Aumenta	Disminuye
ν (CC) -respiración del anillo (citosina, uracilo)		(Haq et al., 2023)	782	Disminuye	Disminuye

Ácidos nucleicos		(Lin et al., 2019)	1581	Disminuye	Disminuye
Enlace glicosídico entre N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico	Peptidoglicano	(de Siqueira e Oliveira et al., 2021)	543	Desaparece	Aumenta
Enlace glicosídico entre N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico		(de Siqueira e Oliveira et al., 2021)	630	Disminuye	Disminuye
Enlace glicosídico entre N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico		(de Siqueira e Oliveira et al., 2021)	1380	Aumenta	Aumenta
Estiramiento C-N de amida	Lipopolisacárido	(de Siqueira e Oliveira et al., 2021)	962	Aumenta	Disminuye

Tabla 3.4. Asignaciones de las bandas Raman para células de *S. aureus* control y tratadas con BNP.

Asignación	Biomolécula	Referencia	Corrimiento Raman (cm^{-1})	Tratamiento con PeNP	Tratamiento con PchNP
Aminoácidos	Proteínas	(De Gelder et al., 2007)	790	Disminuye	Disminuye
Aminoácidos		(De Gelder et al., 2007)	879	Disminuye	Disminuye
Deformación en el plano de CH (fenilalanina)		(Pistiki et al., 2022)	1031	Disminuye	Disminuye
Estiramiento C–-C_6H_5 (fenilalanina, tirosina)		(Pistiki et al., 2022)	1208	Disminuye	Disminuye
Doblamiento (CH_2/CH_3)		(Pistiki et al., 2022)	1451	Disminuye	Disminuye
		(Ayala et al., 2018)			
Estiramiento (C=C)		(Ayala et al., 2018)	1523	Disminuye	Aumenta
	Polisacáridos	(De Gelder et al., 2007)	929	Disminuye	Disminuye
		(De Gelder et al., 2007)	1092	Disminuye	Disminuye
		(De Gelder et al., 2007)	1116	Disminuye	Disminuye
Vibración del esqueleto de lípidos (C - O - O)	Ácidos grasos	(Pistiki et al., 2022)	896	Disminuye	Disminuye
Colesterol		(Pistiki et al., 2022)	959	Disminuye	Disminuye
Estiramiento C–C		(Pistiki et al., 2022)	1130	-	Aparece
deformación =C-H		(Pistiki et al., 2022)	1290	Disminuye	Disminuye
	Ácidos nucleicos	(De Gelder et al., 2007)	663	Disminuye	Disminuye
Respiración del anillo de pirimidina		(Ayala et al., 2018)	782	Disminuye	Disminuye
		(Pistiki et al., 2022)			
Estiramiento simétrico del esqueleto (PO_2)		(Pistiki et al., 2022)	1091	Disminuye	Disminuye
Guanina y adenina		(Pistiki et al., 2022)	1337	Disminuye	Disminuye
Estiramiento C-C de staphyloxantina	Carotenoides	(de Siqueira e Oliveira et al., 2021; Pistiki et al., 2022)	1160	Disminuye	Disminuye
Estiramiento C=C de staphyloxantina		(Pistiki et al., 2022)	1529	Disminuye	Disminuye
Enlace glicosídico entre N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico	Peptidoglicano	(de Siqueira e Oliveira et al., 2021)	543	Disminuye	Disminuye
Enlace glicosídico entre N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico		(de Siqueira e Oliveira et al., 2021)	630	Disminuye	Disminuye
	Ácido Teicurónico	(de Siqueira e Oliveira et al., 2021)	852	Disminuye	Disminuye

Tabla 3.5. Asignaciones de las bandas Raman para células de *P. aeruginosa* control y tratadas con BNP.

Asignación	Biomolécula	Referencia	Corrimiento Raman (cm^{-1})	Tratamiento con PeNP	Tratamiento con PchNP
Aminoácidos	Proteínas	(De Gelder et al., 2007)	810	Aumenta	Disminuye
Estiramiento C-C, C-N		(Lin et al., 2019)	1125	Aparece	Aumenta
Amida III		(Lin et al., 2019)	1220	Desaparece	Disminuye
Amida III		(Lin et al., 2019)	1308	Aumenta	Aumenta
Estiramiento C=O (amida I)		(Lin et al., 2019)	1658	Aparece	Aparece
	Polisacáridos	(De Gelder et al., 2007)	982	Disminuye	Aumenta
		(De Gelder et al., 2007)	1186	Aumenta	Disminuye
		(De Gelder et al., 2007)	1243	Aumenta	Aumenta
	Ácidos grasos	(De Gelder et al., 2007)	1593	Disminuye	Desaparece
	Ácidos nucleicos	(De Gelder et al., 2007)	624	Aumenta	Aumenta
Timina		(Lin et al., 2019)	746	Igual	Desaparece
Guanina		(Lin et al., 2019)	1581	Aumenta	Igual
Enlace glicosídico entre N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico	Peptidoglicano	(de Siqueira e Oliveira et al., 2021)	543	Disminuye	Disminuye
Enlace glicosídico entre N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico		(de Siqueira e Oliveira et al., 2021)	630	Desaparece	Disminuye
Enlace glicosídico entre N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico		(de Siqueira e Oliveira et al., 2021)	1380	Disminuye	Desaparece
Estiramiento C-N de amida	Lipopolisacárido	(de Siqueira e Oliveira et al., 2021)	962	Aparece	Aparece

Tabla 3.6. Asignaciones de las bandas Raman para células de *B. subtilis* control y tratadas con BNP.

Asignación	Biomolécula	Referencia	Corrimiento Raman (cm^{-1})	Tratamiento con PeNP	Tratamiento con PchNP
	Proteínas	(De Gelder et al., 2007)	810	Disminuye	Aumenta
ν_{as}(O-P-O),ν_{ring}(C-C) (tirosina)		(Rusciano et al., 2015)	830	Disminuye	Aumenta
ν (CC) - respiración del anillo		(Haq et al., 2023)	850	Disminuye	Disminuye
Estiramiento C-C		(Haq et al., 2023)	930	Disminuye	Aumenta
$\nu_s(PO_2)$, respiración del anillo glicosídico		(Rusciano et al., 2015)	1091	Desaparece	Aumenta
Amida III		(Haq et al., 2023)	1220	Desaparece	Aumenta
$\nu_s(PO_2)$, Amida III (Tyr, Phe)		(Rusciano et al., 2015)	1205	Disminuye	Disminuye
Amida III		(Haq et al., 2023)	1235	Disminuye	Aumenta
Anillo de la tirosina / vibración CH		(Haq et al., 2023)	1327	Desaparece	Aumenta
Amida II (triptofano)		(Rusciano et al., 2015)	1338	Disminuye	Aumenta
ν (CO_2) (α -aminoácidos)		(Haq et al., 2023)	1410	Disminuye	Aumenta
Amida II		(Rusciano et al., 2015)	1546	Disminuye	Aumenta
Amida II (fenilalanina, triptofano)		(Rusciano et al., 2015)	1574	Aumenta	Aumenta
Estiramiento C–O–C del enlace glicosídico (sacáridos)	Polisacáridos	(Haq et al., 2023)	905	Disminuye	Disminuye
		(De Gelder et al., 2007)	982	Disminuye	Disminuye
		(De Gelder et al., 2007)	1186	Disminuye	Aumenta
		(De Gelder et al., 2007)	1243	Disminuye	Aumenta
δ (CH_2), lípidos	Ácidos grasos	(Haq et al., 2023)	1460	Disminuye	Aumenta
		(De Gelder et al., 2007)	1593	Disminuye	Aumenta
Guanosina	Ácidos nucleicos	(Haq et al., 2023)	680	Disminuye	Aparece
Adenina		(Haq et al., 2023)	706	Igual	Aumenta

Anillo glicosídico de la adenina y poliadenina (ADN/ARN)		(Haq et al., 2023)	730	Desaparece	Aparece
v (CC) -respiración del anillo (citosina, uracilo)		(Haq et al., 2023)	782	Disminuye	Disminuye
dipicolinato cálcico (CaDPA)	Esporas	(Stöckel et al., 2010)	1017	Disminuye	Disminuye
dipicolinato cálcico (CaDPA)		(Stöckel et al., 2010)	1383	Disminuye	Disminuye
dipicolinato cálcico (CaDPA)		(Stöckel et al., 2010)	1440	Disminuye	Aumenta
Adenina y guanina		(Nelson et al., 2004)	1486	Disminuye	Aparece
dipicolinato cálcico (CaDPA)		(Petra et al., 2005)	1565	Disminuye	Aumenta
Enlace glicosídico entre N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico	Peptidoglicano	(de Siqueira e Oliveira et al., 2021)	543	Disminuye	Disminuye
Enlace glicosídico entre N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico		(de Siqueira e Oliveira et al., 2021)	630	Disminuye	Disminuye
Enlace glicosídico entre N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico		(de Siqueira e Oliveira et al., 2021)	1380	Disminuye	Disminuye
Estiramiento simétrico-asimétrico COO	Ácido Teicurónico	(de Siqueira e Oliveira et al., 2021)	852	Disminuye	Disminuye

Microscopía de Fuerza Atómica.

Adicionalmente a lo obtenido por Microscopía Raman Confocal, se evaluó la interacción de las BNP frente a *E. coli* (**Figura 3.9a-c**) y *S. aureus* (**Figura 3.9d-f**) mediante AFM. Las imágenes mostraron cambios en la morfología y pérdida de integridad en las células luego de la exposición con BNP (indicado con flechas).

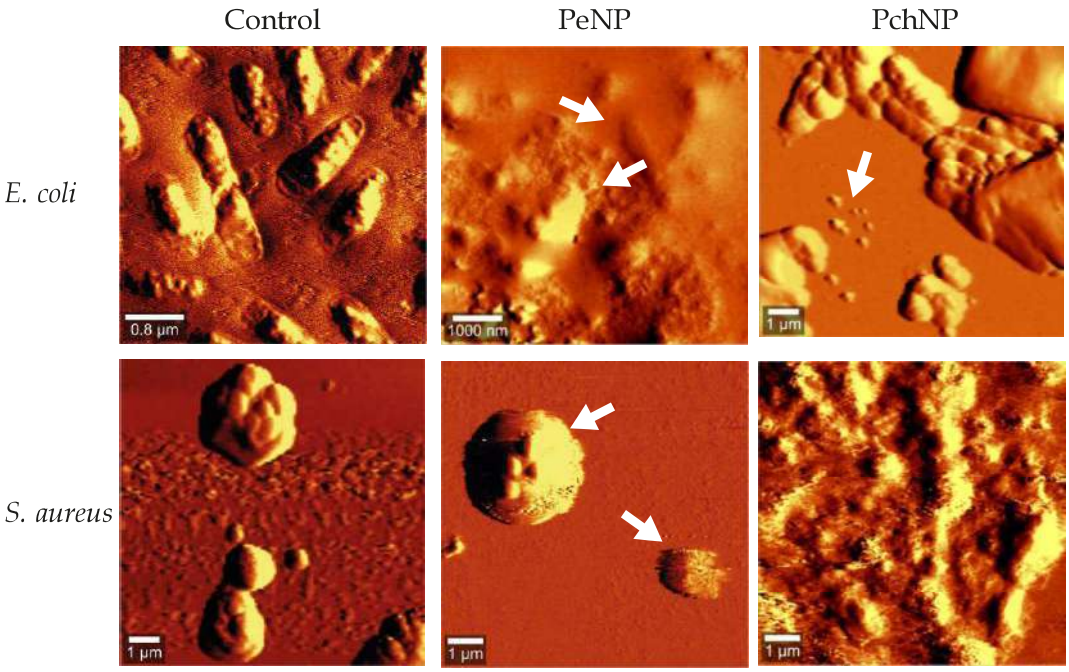


Figura 3.9. Imágenes de amplitud obtenidas por AFM para la interacción de BNP con células de *E. coli* y *S. aureus*. Control: células sin tratar, PeNP: células tratadas con PeNP (1.80 nM frente a *E. coli* y 0.09 nM frente a *S. aureus*), PchNP: células tratadas con PchNP (0.09 nM frente a *E. coli* y 0.16 nM frente a *S. aureus*).

Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

El ensayo de viabilidad mediante resazurina realizado previo al análisis de Microscopía Electrónica (como se explicó en la **Metodología**) mostró que la CIM frente a *E. coli* DH5α fue de 0.22 nM para las PeNP y de 0.25 nM para las PchNP mientras que para *B. subtilis* 1904-E, la CIM fue de 0.055 nM para las PeNP y de 0.062 nM para las PchNP.

Las imágenes obtenidas por ESEM indicaron daño en la integridad de la membrana celular de *E. coli* (**Figura 3.10**) y *B. subtilis* (**Figura 3.11**) ocasionado por

ambas nanopartículas en comparación con el control. Para el caso de *E. coli*, la pérdida de integridad en la membrana celular aumentó con la concentración de PeNP (**Figuras 3.10e-f**) y PchNP (**Figuras 3.10i-j**). Además, en algunos casos las bacterias liberaron componentes citoplasmáticos (indicado con flechas) como resultado de la interacción con las BNP.

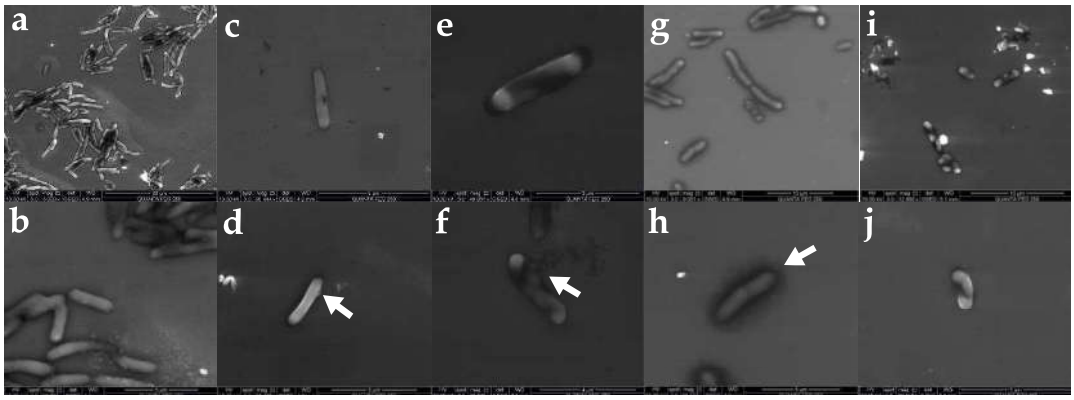


Figura 3.10. Imágenes representativas obtenidas por ESEM para la interacción de BNP con células de *Ecoli.* a, b: control; c-f: *E. coli* con una solución de PeNP (concentraciones: c-d 0.11 nM, e-f 0.15 nM); g-j: *E. coli* con una solución de PchNP (concentraciones: g-h 0.12 nM, i-j 0.25 nM).

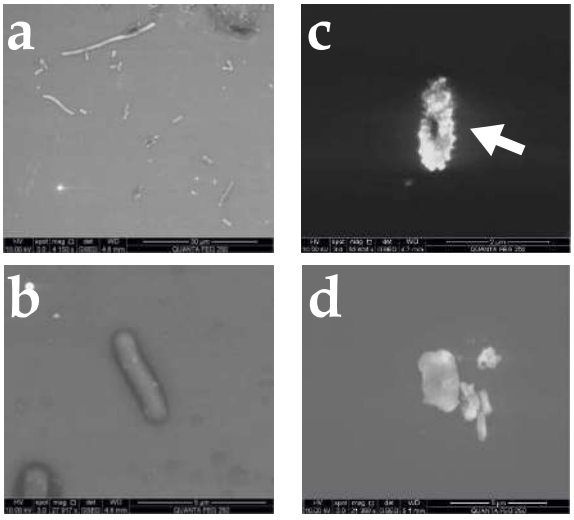


Figura 3.11. Imágenes representativas obtenidas por ESEM para la interacción de BNP con células de *B. subtilis* (a y b: control, c: tratadas con PeNP 0.027 nM, d: tratadas con PchNP 0.031 nM).

El daño en la membrana celular de *E. coli* ocasionado por las BNP también pudo verse en las imágenes TEM (**Figura 3.12**). A las concentraciones más bajas de

PeNP y PchNP, las imágenes mostraron a las BNP agregadas en la superficie bacteriana, generando conglomerados. A las concentraciones más altas de ambas nanopartículas se observó daño estructural, pérdida de consistencia y cambios en la morfología.

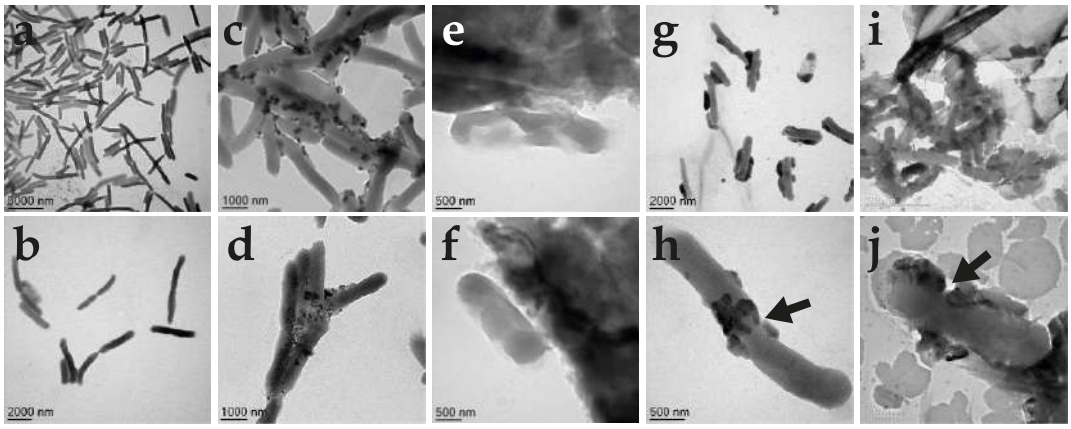


Figura 3.12. Imágenes representativas obtenidas por TEM para la interacción de BNP con células de *Ecoli.* a, b: control; c-f: *E. coli* con una solución de PeNP (concentraciones: c-d 0.11 nM, e-f 0.15 nM); g-j: *E. coli* con una solución de PchNP (concentraciones: g-h 0.12 nM, i-j 0.25 nM).

Mecanismos de acción antimicrobianos: estrés oxidativo.

Especies Reactivas del Oxígeno (ERO).

La generación de ERO se determinó comparando las células tratadas con PeNP y PchNP y células sin tratar (control), y se observó para ambas BNP frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa* y para las PeNP frente a *B. subtilis*. Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 3.13**.

Especies Reactivas del Nitrógeno (ERN).

La generación de ERN se determinó comparando las células tratadas con PeNP y PchNP y células sin tratar (control). Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 3.14**. Para ninguno de los casos se observó generación de ERN significativamente diferente del control a excepción de las células de *B. subtilis* con PeNP al tiempo de contacto inicial, en las gráficas expresado como 0 horas (**Figura 3.14g**).

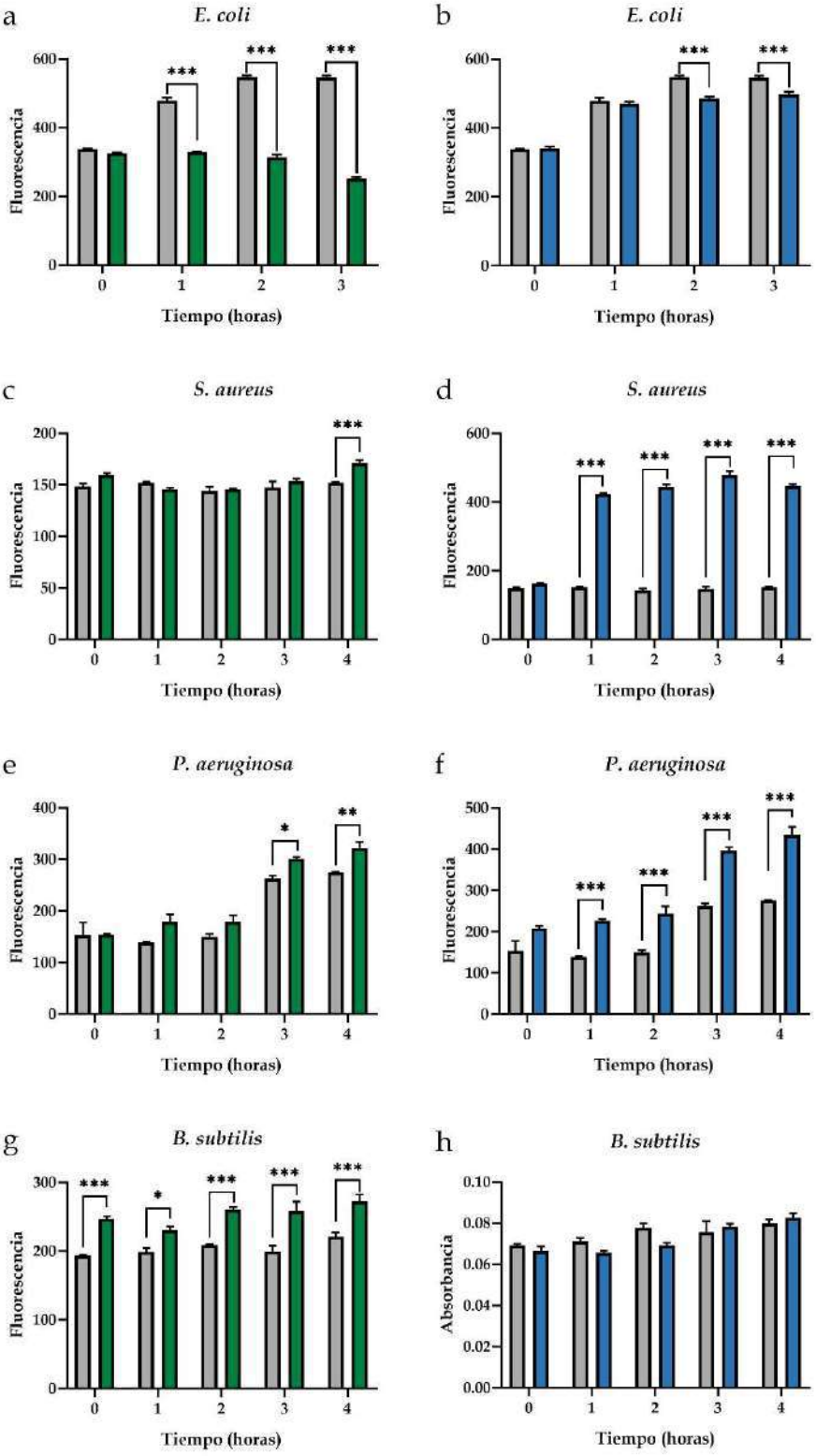


Figura 3.13. Evaluación de ERO para la acción de las BNP sobre *E. coli* (a y b), *S. aureus* (c y d), *P. aeruginosa* (e y f) y *B. subtilis* (g y h). Gris: control (sin BNP), verde: PeNP, azul: PchNP. Los asteriscos representan diferencias significativas a un nivel de probabilidad $p < 0.001$, según el ANOVA y la prueba de Sidak.

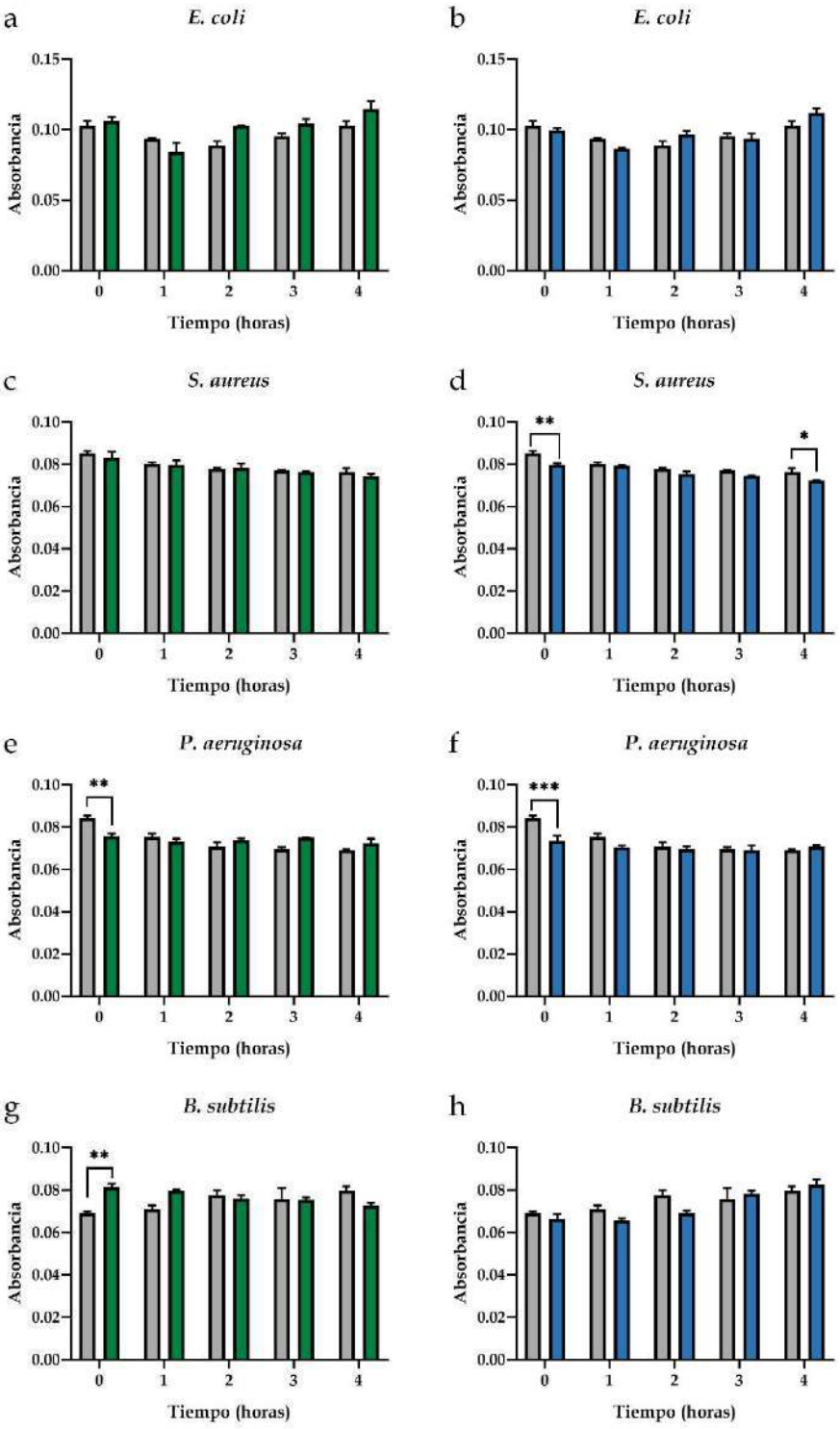


Figura 3.14. Evaluación de ERN para la acción de las BNP sobre E. coli (a y b), S. aureus (c y d), P. aeruginosa (e y f) y B. subtilis (g y h). Gris: control (sin BNP). Verde: PeNP. Azul: PchNP. Los asteriscos representan diferencias significativas a un nivel de probabilidad $p < 0.001$, según el ANOVA y la prueba de Sidak.

Actividad antimicrobiana frente a hongos filamentosos y levaduras.

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima.

La **Tabla 3.7** muestra los valores de CIM obtenidos para las BNP y la solución de $AgNO_3$ frente a hongos filamentosos y levaduras. Todos los hongos fueron sensibles al tratamiento con las BNP y las CIM obtenidas fueron mucho menores que las obtenidas para la solución de plata en todos los casos.

Tabla 3.7. Concentración Inhibitoria Mínima de las diferentes nanopartículas de plata y la solución de nitrato de plata frente a células de hongos filamentosos y levaduras.

Hongo	CIM PeNP	CIM PchNP	CIM $AgNO_3$
C. albicans ATCC 101231	0.100 nM	0.030 nM	0.078 mM
C. tropicalis ATCC 66029M*	0.125 nM	0.014 nM	0.3 mM
P. expansum CCMG 14g	0.008 nM	0.023 nM	0.04 mM
A. niger CCMG 17	0.031 nM	0.014 nM	0.62 mM
F. graminearum CCMG 31084	0.006 nM	0.0002 nM	0.01 mM
R. stolonifer CCMG 6227B	0.350 nM	0.006 nM	0.01 mM
A. alternata CCMG 54027	0.024 nM	0.067 nM	0.16 mM
P. oryzae Po290*	0.087 nM	0.016 pM	0.078 mM

Interacción entre BNP y células fúngicas.

Microscopía Raman Confocal.

Del mismo modo que para las bacterias se analizaron, mediante MRC, los cambios fenotípicos producidos por las BNP en células de *C. albicans* (**Figura 3.15**) y *P. oryzae* (**Figura 3.16**). La asignación de las bandas (**Tablas 3.8 y 3.9**) se realizó en base a bibliografía previa.

Para *C. albicans* (**Tabla 3.8**) se encontró, para ambas BNP, una disminución de las bandas a 642 cm^{-1}, 1056 cm^{-1} y 1148 cm^{-1}, asociadas a quitina (Pezzotti et al., 2022). En cuanto a las bandas asociadas al ergosterol (Pezzotti et al., 2022), las células tratadas con PeNP mostraron una disminución en las bandas respecto al control (594 cm^{-1}). Por otro lado, para las PchNP disminuyó la intensidad de la banda a 594 cm^{-1} mientras que la banda a 713 cm^{-1} apareció sólo en las células tratadas, pero no en el control.

En lo relativo a *P. oryzae* (**Tabla 3.9**), el tratamiento con PeNP provocó una disminución de todas las bandas del espectro. En particular, se encontró una disminución respecto al control en algunas bandas características, tales como las bandas a 1052 cm^{-1} asignada al ADN, 1454 cm^{-1} asignada a quitina, 593 cm^{-1} asignada a ergosterol y a 1657 cm^{-1} asignada a proteínas (Perumal et al., 2021). Estos resultados son indicativos del daño en la estructura celular producido por las BNP.

Además, se obtuvieron imágenes hiperespectrales (**Figura 3.17**) combinando las bandas correspondientes al estiramiento C-H de las levaduras (rojo) y las correspondientes al estiramiento Ag-N de cada BNP (PeNP: verde, PchNP:azul) (Estevez et al., 2020). En todos los casos se obtuvieron también las células bacterianas control (sin tratar con BNP). De este modo se puede visualizar la interacción de las BNP con las células microbianas.

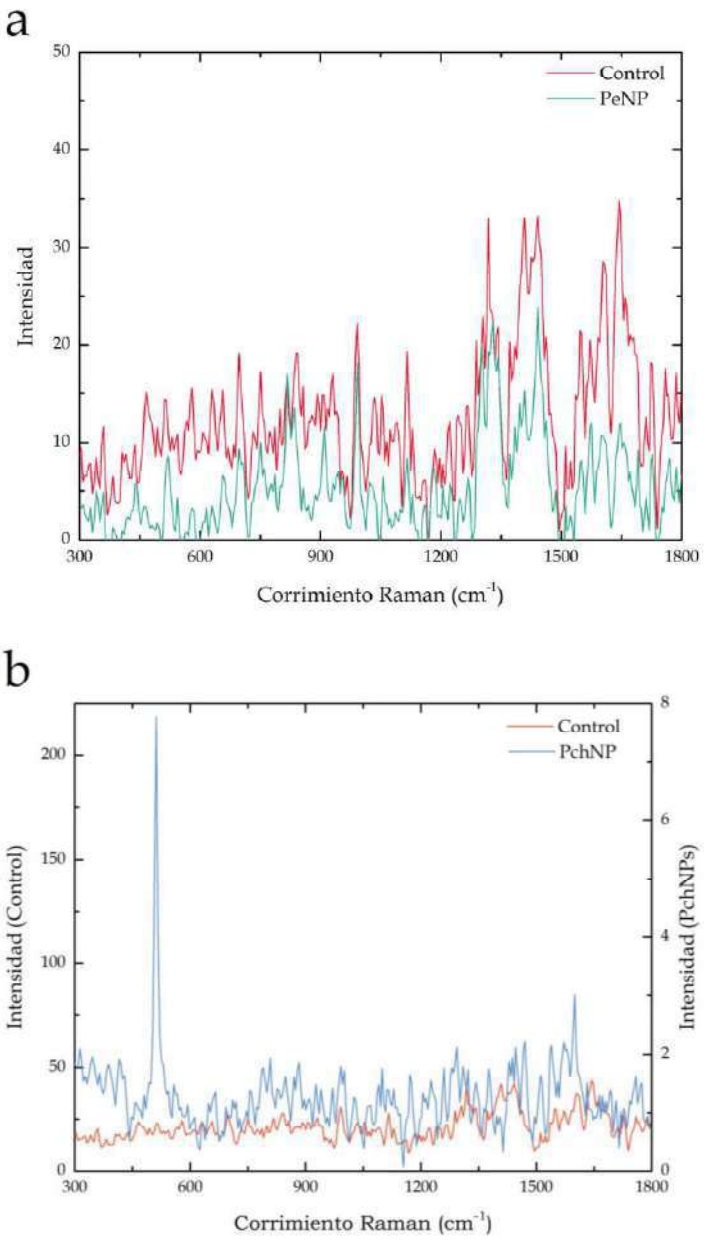


Figura 3.15. Espectros Raman de células control (rojo) y células tratadas con PeNP (verde) o PchNP (azul) para la levadura *C. albicans* (a y b). Los espectros presentados son espectros promedio obtenidos mediante análisis de componentes principales (PCA).

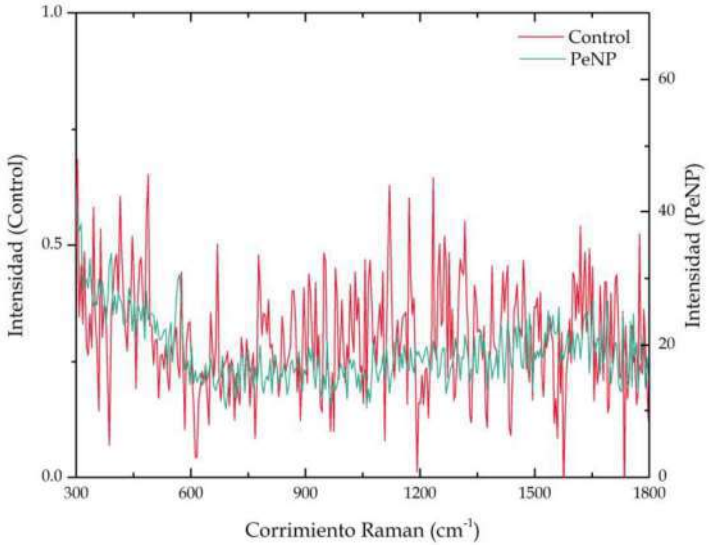


Figura 3.16. Espectros Raman de células control (rojo) y células tratadas con PeNP (verde) para el hongo *P. oryzae*. Los espectros presentados son espectros promedio obtenidos mediante análisis de componentes principales (PCA).

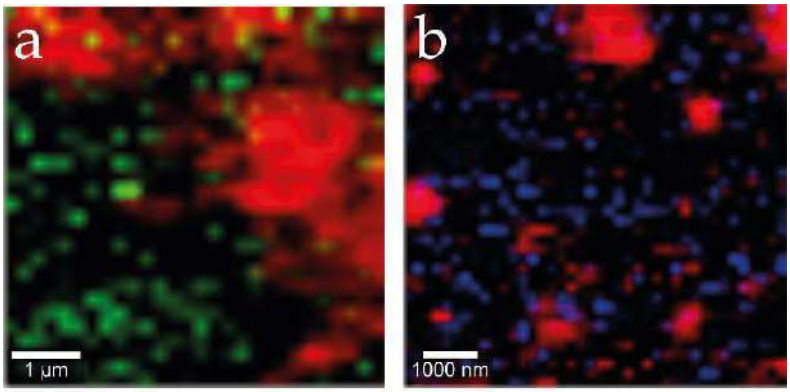


Figura 3.17. Imágenes de MRC obtenidas para las células de *C. albicans* combinando las bandas correspondientes al estiramiento C-H de las levaduras (rojo) y las bandas asignadas al estiramiento Ag-N de a) PeNP y b) PchNP.

Tabla 3.8. Asignaciones de las bandas Raman para células de *C. albicans* control y tratadas con BNP.

Asignación	Biomolécula	Referencia	Corrimiento Raman (cm^{-1})	Tratamiento con PeNP	Tratamiento con PchNP
Anillo de glucosa	Proteínas	(Pezzotti et al., 2022)	478	Disminuye	Disminuye
		(De Gelder et al., 2007)	788	Disminuye	Disminuye
		De Gelder 2007	885	Disminuye	Disminuye
	Polisacáridos	(De Gelder et al., 2007)	511	Disminuye	Disminuye
β-1.6-glucano (vibración del enlace glicosídico C-O-C de polisacáridos)		(Pezzotti et al., 2022)	890	Disminuye	Disminuye
α-1,6-glucano (estiramiento C-O-C)		(Pezzotti et al., 2022)	919	Desaparece	Desaparece
α-1,3-glucano (vibración del enlace glicosídico C-O-C de polisacáridos)		(Pezzotti et al., 2022)	941	Disminuye	Disminuye
	Ácidos grasos	(De Gelder et al., 2007)	1596	Disminuye	Disminuye
Xantina o guanina	Ácidos nucleicos	Li 2021	657	Disminuye	Desaparece
		(De Gelder et al., 2007)	670	Disminuye	Disminuye
		(De Gelder et al., 2007)	698	Disminuye	Disminuye
Estiramiento C-CH_3 (timidina)		(Pezzotti et al., 2022)	1194	Disminuye	Disminuye
Movimiento tijera de NH_2 (citidina)		(Pezzotti et al., 2022)	1542	Disminuye	Disminuye
Estiramiento C-C-C y C-O-C en polisacáridos	Quitina	(Pezzotti et al., 2022)	642	Disminuye	Disminuye
Estiramiento C-C-C y C-O-C en polisacáridos		(Pezzotti et al., 2022)	1056	Disminuye	Disminuye
Estiramiento C-C-C y C-O-C en polisacáridos		(Pezzotti et al., 2022)	1148	Disminuye	Disminuye
Modo de deformación del anillo en el plano	Ergosterol	(Pezzotti et al., 2022)	594	Desaparece	Disminuye
Modo de respiración de anillo pirrólico	Citocromos	(Pezzotti et al., 2022)	750	Disminuye	Disminuye
Citocromo c reducido		(Pezzotti et al., 2022)	1128	Disminuye	Disminuye
Citocromo c reducido		(Pezzotti et al., 2022)	1585	Disminuye	Disminuye

Tabla 3.9. Asignaciones de las bandas Raman para células de *P. oryzae* control y tratadas con PeNP.

Asignación	Biomolécula	Referencia	Corrimiento Raman (cm^{-1})	Tratamiento con PeNP
Aminoácidos	Proteínas	(De Gelder et al., 2007)	810	Disminuye
Estiramiento C-C de fenilalanina (anillo aromático)		(Perumal et al., 2021)	1009	Disminuye
Amida I		(Perumal et al., 2021)	1657	Disminuye
Carbohidratos	Polisacáridos	(Perumal et al., 2021)	513-535	Disminuye
Estiramiento C-O-C y estiramiento C-C (1,4-enlace glicosidico)		(Perumal et al., 2021)	860	Disminuye
		(De Gelder et al., 2007)	982	Disminuye
		(De Gelder et al., 2007)	1186	Disminuye
		(De Gelder et al., 2007)	1243	Disminuye
Deformación (CH) - glicogeno		(Perumal et al., 2021)	1344	Disminuye
Lípidos	Ácidos grasos	(Perumal et al., 2021)	1304	Disminuye
		(De Gelder et al., 2007)	1593	Disminuye
Timina	Ácidos nucleicos	(Perumal et al., 2021)	735	Disminuye
Anillo pirimidina (C,T,U)/estiramiento O-P-O simétrico (columna vertebral del fosfato)		(Perumal et al., 2021)	788	Aparece
Estiramiento C-C		(Perumal et al., 2021)	1052	Disminuye
	Quitina	(Perumal et al., 2021)	1454	Disminuye
Modo de deformación del anillo en el plano	Ergosterol	(Perumal et al., 2021)	593	Disminuye
	Citocromos	(Perumal et al., 2021)	1580	Disminuye

Criomicroscopía electrónica (Cryo-EM).

El estudio de la interacción de las BNP con células fúngicas se complementó mediante criomicroscopía electrónica. Para las células de *C. albicans* (**Figura 3.18**), el tratamiento con las BNP ocasionó daño en la pared y pérdida de integridad celular, alteraciones en la morfología y desorganización del citoplasma (indicado con flechas). En el caso de *P. expansum* (**Figura 3.19**) y *A. niger* (**Figura 3.20**), la interacción provocó daño en la pared, pérdida de la integridad celular y afinamiento de las hifas (indicado con flechas).

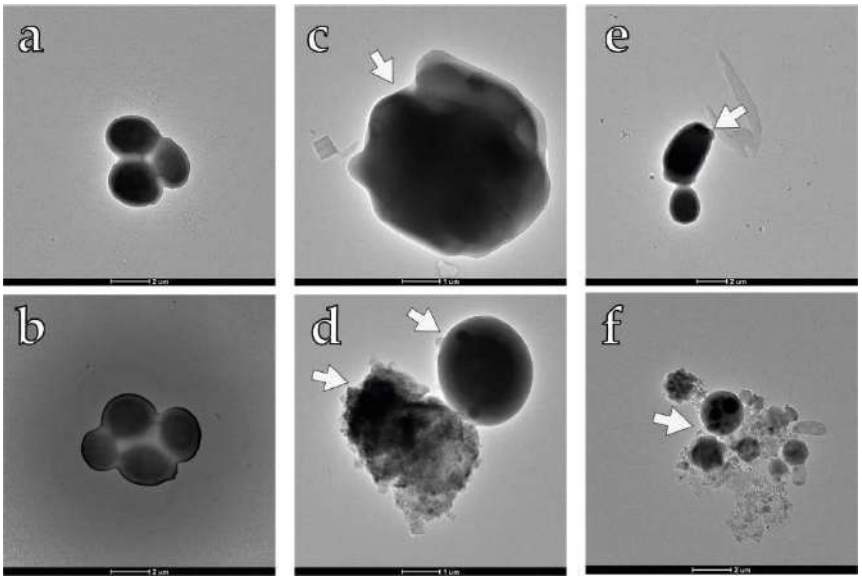


Figura 3.18. Imágenes representativas de Cryo-EM obtenidas para *C. albicans*. a y b: control, c y d: células tratadas con PeNP, g e i: células tratadas con PchNP.

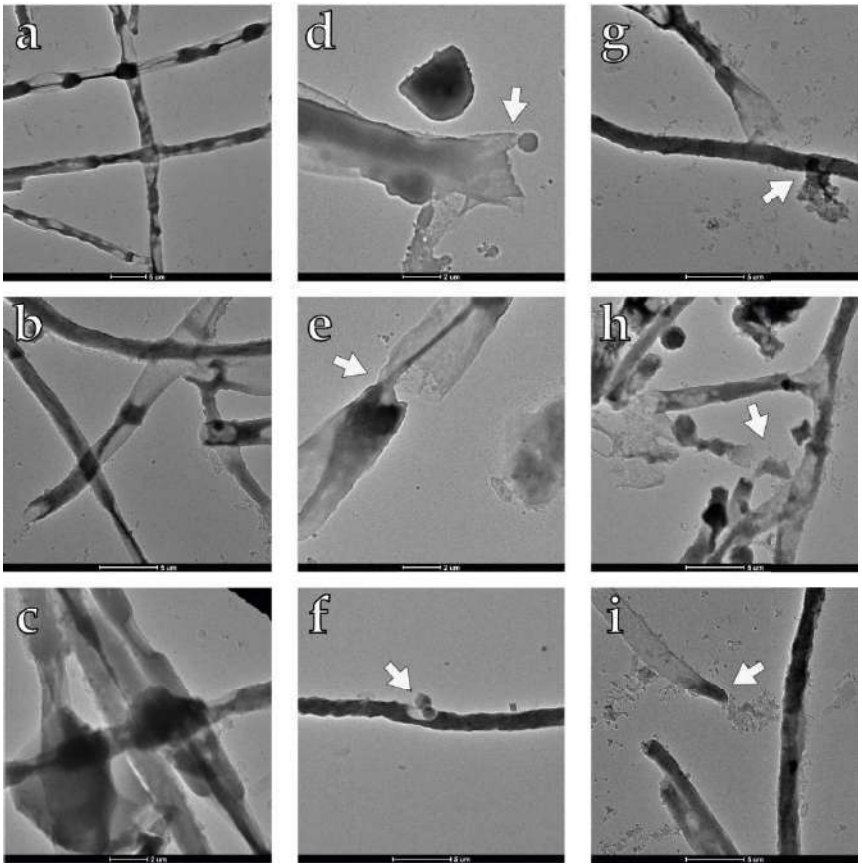


Figura 3.19. Imágenes representativas de Cryo-EM obtenidas para *P. expansum*. (a-c) Control, (d-f) células tratadas con PeNP, (g-i) células tratadas con PchNP.

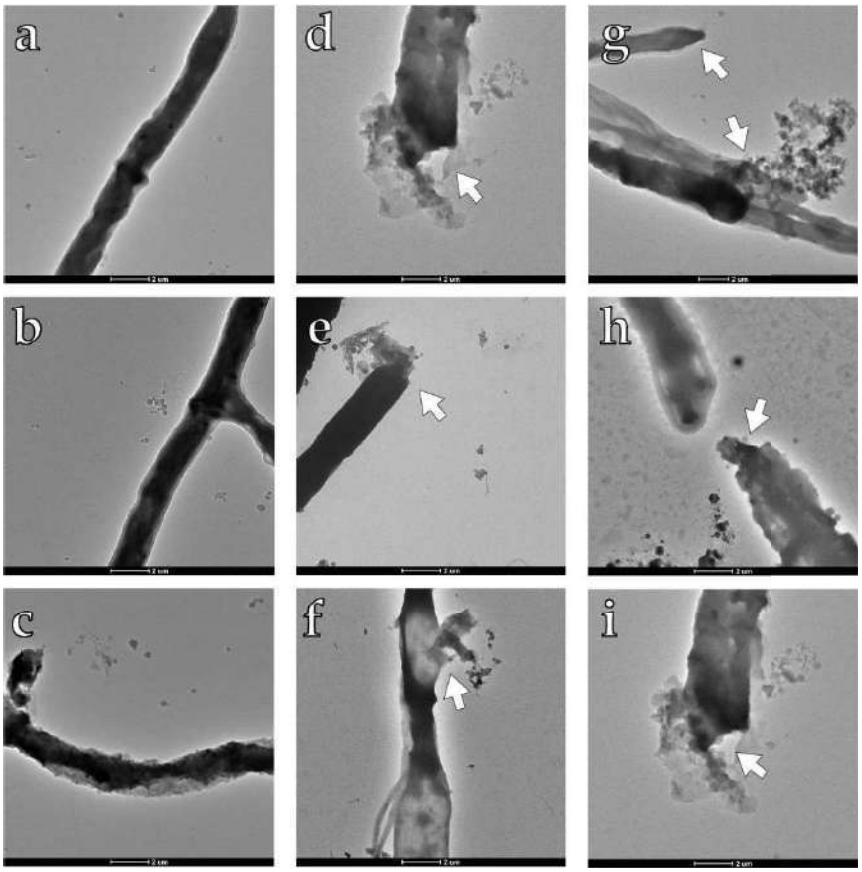


Figura 3.20. Imágenes representativas de Cryo-EM obtenidas para *A. niger*. (a-c) Control, (d-f) células tratadas con PeNP, (g-i) células tratadas con PchNP.

Mecanismos de acción: estrés oxidativo.

Especies Reactivas del Oxígeno (ERO).

Se estudió la generación de ERO como un posible mecanismo de acción de las BNP frente a células de *C. albicans* (**Figura 3.21**). Se observó generación de ERO significativamente diferente del control desde el inicio del tratamiento para ambas BNP.

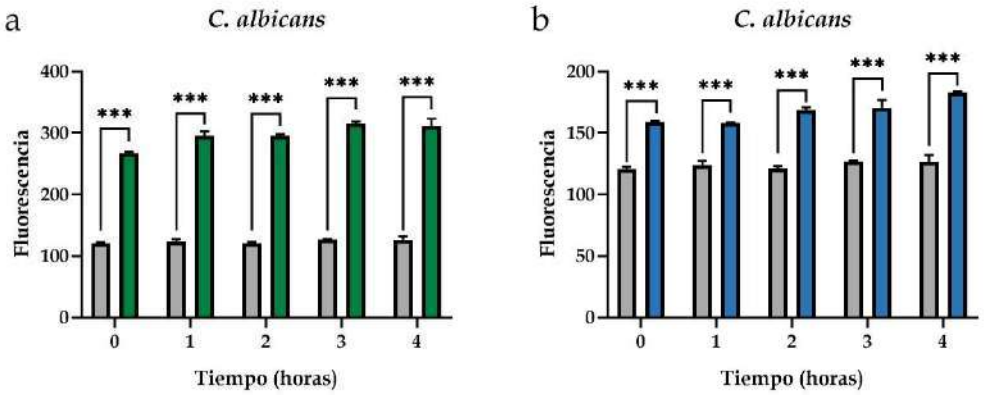


Figura 3.21. Evaluación de ERO para la acción de las BNP sobre *C. albicans*. a: células tratadas con PeNP, b: células tratadas con PchNP. Gris: control (sin BNP). Verde: PeNP. Azul: PchNP. Los asteriscos representan diferencias significativas a un nivel de probabilidad $p < 0.001$, según el ANOVA y la prueba de Sidak.

Especies Reactivas del Nitrógeno (ERN).

Además de la generación de ERO, también se estudió la generación de ERN como un posible mecanismo de acción frente a células de *C. albicans* (**Figura 3.22**). Sólo se observó generación de ERN significativamente diferente a la del control para las células tratadas con PeNP (**Figura 3.22a**).

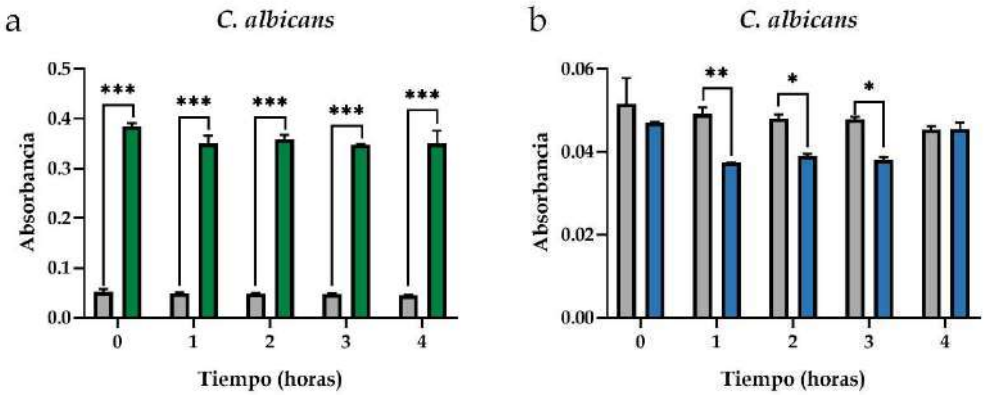


Figura 3.22. Evaluación de ERN para la acción de las BNP sobre *C. albicans*. a: células tratadas con PeNP, b: células tratadas con PchNP. Gris: control (sin BNP). Verde: PeNP. Azul: PchNP. Los asteriscos representan diferencias significativas a un nivel de probabilidad $p < 0.001$, según el ANOVA y la prueba de Sidak.

DISCUSIÓN

Tal y como se mencionó en la **Introducción**, las características de las AgNP implican que tengan un enorme potencial para el tratamiento de enfermedades infecciosas, siendo activas tanto frente a bacterias como frente a hongos (Hamad et al., 2020; Šebesta et al., 2022; Magdy et al., 2024). En este capítulo se evaluó el potencial antimicrobiano de las BNP y se estudió la interacción de las mismas con los microorganismos para avanzar en el conocimiento sobre el mecanismo de acción.

Del mismo modo que se hizo en la sección de **Resultados**, la discusión de este capítulo se presenta por separado para bacterias y hongos.

Actividad antimicrobiana frente a bacterias.

El potencial de las BNP como antimicrobianos se evaluó mediante la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *B. subtilis*) y Gram negativas (*E. coli, P. aeruginosa, A. baumanii* y *K. pneumoniae*). En particular, *S. aureus, P. aeruginosa, A. baumanii* y *K. pneumoniae* forman parte del grupo ESKAPE, caracterizados por la gran habilidad de "escapar" a la acción de antibióticos mediante diversos mecanismos de resistencia, tal como se mencionó en la **Introducción**. Estos patógenos se incluyen en las categorías de prioridad alta y crítica de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el desarrollo de nuevas drogas antimicrobianas (WHO, 2017). Además de evaluar la CIM para las BNP, también se evaluó el potencial antimicrobiano del precursor de síntesis ($AgNO_3$) y de nanopartículas de síntesis química (QNP) para comparar las actividades antimicrobianas de los tres tipos de agentes. Ambas BNP tuvieron capacidad antimicrobiana frente a todas las bacterias evaluadas, concordante con lo obtenido por otros autores para diferentes bio-AgNP (Keshari et al., 2020; Gökşen Tosun and Kaplan, 2021; Saravanakumar et al., 2021; Al-Dbass et al., 2022; Durán et al., 2023; Samuel et al., 2023).

Además, la CIM obtenida de las PeNP y las PchNP fue menor que la obtenida para el $AgNO_3$ frente a todos los microorganismos. Tal como fue mencionado en

el **Capítulo II**, las proteínas, azúcares y otras moléculas biológicas actúan como agentes estabilizantes de las nanopartículas en los métodos biológicos. En esta línea, el mayor poder antimicrobiano de las PeNP y PchNP frente a las QNP para los microorganismos evaluados (a excepción de *E. coli* tratada con PeNP) puede ser atribuido al *capping*, como fue reportado previamente para otras bio-AgNP sintetizadas por hongos (Durán et al., 2023). Esto demuestra el enorme potencial antimicrobiano de las nanopartículas de plata biogénicas, además de las ventajas ecológicas de su síntesis respecto a otros métodos.

Las diferencias en el poder antimicrobiano de una BNP frente a los distintos microorganismos pueden explicarse tanto por las diferencias estructurales de las células microbianas como por las características de las BNP, por ejemplo, la liberación de iones Ag^+. Aunque el contenido de plata determinado fue similar en ambas BNP, el proceso y mecanismo de liberación de Ag^+ podría ser diferente. El mayor poder antimicrobiano de las PchNP frente a las PeNP podría ser explicado, entonces, por las diferencias en el *capping*, formado por las proteínas liberadas al filtrado extracelular de cada hongo (Guilger-Casagrande et al., 2021).

Estudios de interacción.

La interacción de las BNP con las células bacterianas se estudió mediante diferentes técnicas. Los cambios en el perfil fenotípico de las bacterias ocasionados por la interacción con las BNP fueron estudiados mediante Microscopía Raman Confocal (MRC) ya que, como se explicó en la **Introducción**, los cambios que se producen en las diferentes bandas de los espectros Raman permiten monitorear los cambios en la composición celular (Nanda et al., 2016; de Siqueira e Oliveira et al., 2021; Novikov et al., 2022). Este estudio se realizó para *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *B. subtilis*.

En el caso de *E. coli*, se observó una reducción general de la intensidad de las bandas de los espectros Raman asociadas a proteínas, ácidos grasos, polisacáridos y ácidos nucleicos tras el tratamiento con ambas BNP, en concordancia con lo reportado por otros autores (Haq et al., 2023). Respecto a las bandas asociadas al peptidoglicano, la interacción con PeNP condujo a una

disminución en la intensidad de todas las bandas, mientras que la interacción con PchNP provocó un aumento en algunas de las bandas asociadas a esta biomolécula, posiblemente debido a una mayor exposición al láser como resultado del daño en la pared celular (Chao and Zhang, 2012).

En relación con las bandas asignadas al lipopolisacárido (LPS), la interacción con PeNP resultó en un aumento de la intensidad, mientras que las PchNP causaron una disminución. El incremento causado por las PeNP podría atribuirse a una mayor expresión del LPS para contrarrestar el ataque del agente (Goltermann et al., 2022). El LPS constituye uno de los componentes principales de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, dividido en tres regiones: la porción de lípido A, que se ancla a la membrana; el núcleo de oligosacárido; y el antígeno O, que se extiende hacia el exterior de la célula. Los microorganismos disponen de sistemas para regular la expresión de esta molécula, lo cual es crucial para modular la respuesta inmunitaria del hospedero y lograr la infección (Aldapa-Vega et al., 2016). Estudios previos con péptidos antimicrobianos sugieren que la composición química de la porción externa del núcleo del LPS puede determinar la susceptibilidad al agente antimicrobiano (Goltermann et al., 2022).

Estos hallazgos se reforzaron mediante el uso de AFM, ESEM y TEM. Las imágenes evidenciaron daños en la envoltura celular de *E. coli* tras la exposición a las BNP. Las distintas micrografías capturaron la interacción de las BNP con la superficie celular produciendo agregados, lo que condujo a la formación de poros en la pared y la pérdida de componentes citoplasmáticos.

Similar a lo ocurrido con los espectros Raman de *E. coli*, en el caso de los correspondientes a *S. aureus* también se observó una disminución de las bandas asociadas a proteínas, ácidos grasos, polisacáridos, ácidos nucleicos y componentes de la pared y membrana celulares tras el tratamiento con ambas BNP. Estos resultados fueron complementados por medio de AFM, en dónde se observó una clara alteración de la estructura celular debida a la interacción de las células con las BNP.

En cuanto a los espectros de *P. aeruginosa*, se observó que la intensidad de algunas de las bandas disminuye y otras aumentan tras el tratamiento con las BNP. Las

bandas asociadas al peptidoglicano disminuyeron su intensidad luego del tratamiento con las nanopartículas, indicando daño a nivel de dicha biomolécula. Esto podría implicar que algunas moléculas hayan quedado más expuestas, explicando el aumento de la intensidad de las bandas en el espectro. Interesantemente, las bandas asociadas a LPS aparecieron luego del tratamiento con ambas nanopartículas. Estudios realizados en bacterias Gram negativas tratadas con péptidos antimicrobianos mostraron que las bacterias producen cambios en la carga del LPS además de modificar la estructura del Lípido A para aumentar la rigidez de la membrana externa con el fin de resistir a la acción de los antimicrobianos (Joo et al., 2016). Este tipo de modificaciones podrían explicar el aumento en la intensidad de las bandas asociadas al LPS luego del tratamiento con las BNP.

Por último, el tratamiento con las BNP provocó cambios en los espectros Raman de *B. subtilis*, diferentes para cada nanopartícula. Por un lado, el tratamiento con PeNP provocó una disminución de la intensidad de las bandas asociadas a proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, esporas y componentes de la pared y membrana celulares. Por otro lado, el tratamiento con PchNP provocó una disminución de la intensidad de las bandas asociadas a la pared y membrana celulares pero las bandas asociadas al resto de biomoléculas mayormente aumentaron su intensidad. Este aumento de intensidad en las bandas podría estar involucrado en la formación de esporas, estructuras de resistencia de algunos tipos bacterianos como *Bacillus* spp., cuyo proceso de formación está caracterizado por un aumento en la síntesis de proteínas, ADN y ARN (Madigan et al., 2020). Las micrografías obtenidas por ESEM respaldaron estos resultados, mostrando un marcado daño a nivel de la estructura celular luego del tratamiento con las BNP. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en un estudio en el que se evaluaron los cambios provocados por el tratamiento de células de *B. subtilis* con péptidos aislados de la glicinina, en dónde se observó una superficie celular exterior irregular, fragmentación, daño celular y adhesión (Sitohy et al., 2014).

Según los resultados de las diferentes técnicas de microscopía, se sugiere un mecanismo de interacción común de las BNP con las bacterias estudiadas. En primera instancia, las BNP se unen a la superficie bacteriana, como fue evidenciado por las micrografías TEM. Posteriormente, se registra una disminución en la integridad celular debido a la pérdida de componentes citoplasmáticos causada por la generación de poros en la estructura celular, tal como observó en las micrografías ESEM, TEM, AFM, y en los espectros Raman con el daño a nivel de las diferentes biomoléculas. Los resultados son concordantes por lo obtenido por otros autores (Balakumaran et al., 2016; Ananda et al., 2019; Nwabor et al., 2021; Beltrán Pineda et al., 2022).

Mecanismo de acción: generación de estrés oxidativo.

Las AgNP tienen un enorme potencial antimicrobiano y poseen varios mecanismos de acción, algunos de ellos conocidos (Singh and Mijakovic, 2022). Estos mecanismos dependen tanto de las características de las AgNP como de las células involucradas (Javed et al., 2021). La generación de especies que llevan a estrés oxidativo, tales como las especies reactivas del oxígeno (ERO) y las especies reactivas del nitrógeno (ERN), es uno de los mecanismos de acción propuestos y uno de los más estudiados ya que los niveles intracelulares elevados de estas especies son mediadores de la muerte celular (Quinteros et al., 2016, 2018; Begum et al., 2022; Ali et al., 2023). En concordancia con lo propuesto por otros autores (Quinteros, 2017), en esta tesis se encontró generación de ERO para *S.aureus* y *P. aeruginosa* para ambas BNP, pero únicamente para las PeNP frente a *B. subtilis*. La generación de ERO se considera uno de los mecanismos que inducen la muerte celular al interactuar en la cadena de transporte de electrones, provocando interferencias en la respiración celular (Javed et al., 2021). Estas especies reactivas no solo interfieren en el proceso respiratorio, sino que también ocasionan daños en biomoléculas clave como proteínas, lípidos y ADN, exacerbando así el deterioro celular (Quinteros et al., 2016).

Aunque uno de los mecanismos de acción más propuestos para las BNP es la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO), los resultados para las

células planctónicas de *E. coli* obtenidos en esta tesis difieren de lo reportado por otros autores con bio-AgNP sintetizadas con otros organismos (por ejemplo *P. aeruginosa)* (Das et al., 2009; Quinteros, 2017; Kora and Sashidhar, 2018). Según nuestros hallazgos, la generación de ERO no sería el mecanismo predominante en la acción antimicrobiana de las BNP frente a *E. coli*. Una vez más, esta diferencia puede atribuirse a las diferencias en la composición del *capping* de las nanopartículas biogénicas, al provenir de distintos microorganismos.

Sobre estos resultados es interesante observar que el tiempo de contacto de las células con las BNP realizado para el estudio de interacción en Microscopía Raman Confocal (15 minutos) fue equivalente al tiempo inicial en la evaluación de la generación de ERO y ERN. Tal como se discutió, en el análisis de los espectros Raman se observó que las bandas asignadas a proteínas, lípidos y ADN disminuían, sin embargo, a excepción de PeNP frente a *B. subtilis,* no hubo generación de ERO en ese tiempo de exposición para ninguna de las bacterias restantes, sugiriendo que los cambios en las biomoléculas serían consecuencia de otro mecanismo de acción independiente del estrés oxidativo.

En suma, los resultados obtenidos en esta tesis muestran que para algunos microorganismos la generación de ERO puede ser uno de los principales mecanismos de acción antimicrobiano, pero no así para otros, reforzando la importancia de estudiar la interacción BNP-célula para cada microorganismo y para cada nanopartícula.

En cuanto a la generación de ERN, para ninguna de las bacterias evaluadas se observaron diferencias significativas con el control, a excepción de las PeNP frente a *B. subtilis* para el tiempo inicial de contacto. Esto podría explicarse por los efectos antioxidantes del óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) a bajas concentraciones (Quinteros, 2017) por lo que es esperable que sus niveles no aumenten (e incluso disminuyan) para compensar el aumento de ERO.

En base a los resultados obtenidos se proponen los mecanismos de interacción antimicrobianos de las BNP con las células bacterianas (**Figura 3.23**):

i. Las BNP se adhieren a la superficie celular

ii. Se generan poros en la membrana y pared celulares provocando la pérdida de los componentes citoplasmáticos.

iii. Las BNP ingresan al interior celular interaccionando y dañando componentes citoplasmáticos tales como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y polisacáridos. Este daño, en la mayoría de los casos, está mediado por la generación de especies reactivas del oxígeno.

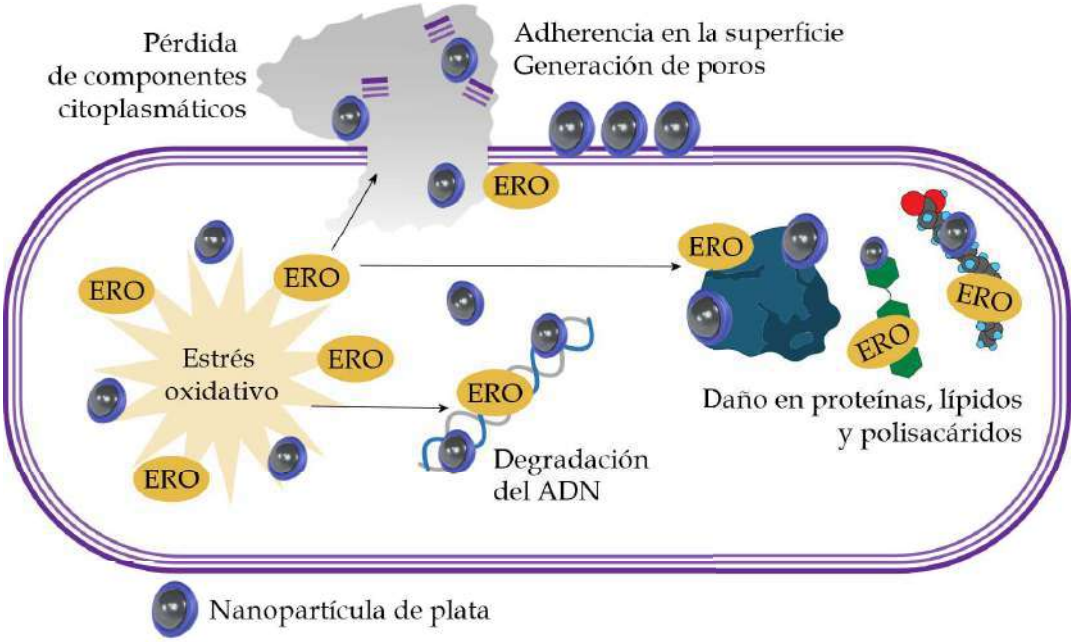


Figura 3.23. Mecanismo de acción antibacteriano propuesto para las BPN en base a los resultados obtenidos.

Actividad antimicrobiana frente a hongos

Los hongos patógenos representan una seria amenaza para la salud pública por su aumento en la prevalencia de enfermedades como en la resistencia a tratamientos. En la actualidad, contamos solamente con cuatro clases de fármacos antimicóticos y hay escasos candidatos en etapas avanzadas de desarrollo clínico. En el año 2022, la OMS emitió una lista de los patógenos fúngicos prioritarios (divididos en los grupos de crítica, alta y moderada prioridad) para la investigación y desarrollo en salud pública (WHO, 2022b). En esta tesis se estudió la actividad antimicrobiana de las BNP frente a microorganismos incluidos dentro de los grupos de prioridad crítica y alta de

dicha lista (*C. albicans, C. tropicalis* y *F. graminearum*) así como frente a otros patógenos fúngicos, tanto a nivel de salud humana como animal y agrícola (*P. expansum, A. niger, R. stolonifer, A. alternata y P. oryzae*). Los resultados obtenidos mostraron que tanto las PeNP como las PchNP tuvieron actividad antimicrobiana frente a los patógenos fúngicos evaluados, con CIM mucho menores que las obtenidas para el precursor de síntesis ($AgNO_3$). Esto es concordante con los resultados de actividad antifúngica obtenidos por otros autores para otras bio-AgNP (Nguyen et al., 2020; Gurunathan et al., 2022; Šebesta et al., 2022; Sanguiñedo et al., 2023).

Estudios de interacción.

Se examinó la interacción entre las BNP y células fúngicas mediante diversas técnicas, incluida la Microscopía Raman Confocal. Para la puesta a punto del análisis por MRC de los hongos filamentosos se probaron diferentes protocolos recopilando fuentes bibliográficas. De los tres protocolos implementados, únicamente el que analizó los cambios producidos en *P. oryzae* luego del tratamiento no produjo fluorescencia. La experiencia adquirida permitirá continuar en el futuro con el análisis de otros hongos filamentosos mediante esta técnica.

La tesis se enfocó en analizar la respuesta de las células de la levadura *C. albicans* ante ambas BNP y del hongo filamentoso *P. oryzae* ante las PeNP, comparando los espectros Raman antes y después del tratamiento con estas nanopartículas. Este enfoque permitió identificar cambios significativos en los espectros Raman de *P. oryzae*, evidenciados por una disminución en la intensidad de las bandas asociadas a diversas biomoléculas como proteínas, polisacáridos, ácidos grasos, ácidos nucleicos, ergosterol (componente de la membrana fúngica), glucanos y quitina (componentes de la pared celular), y citocromos. Los hallazgos sugieren que la interacción con las PeNP ocasionó daños en la pared celular, componentes citoplasmáticos y cadena de transporte de electrones de *P. oryzae*, posiblemente mediante la generación de estrés oxidativo ya que las especies intermediarias que

se forman disminuyen la actividad de los citocromos (Mussin and Giusiano, 2022).

En el caso de *C. albicans*, tanto la interacción con PeNP como con PchNP provocó una reducción en la intensidad de las bandas de los espectros Raman asociadas a proteínas, polisacáridos, ácidos grasos, ácidos nucleicos, citocromos, quitina y ergosterol. Este patrón, similar al observado en *P. oryzae*, sugiere que las BNP afectaron la membrana celular, generando daños a nivel estructural e interaccionando con componentes citoplasmáticos y de la cadena de transporte de electrones. Los resultados se complementaron con micrografías obtenidas mediante Cryo-EM, donde se evidencia cómo el tratamiento con BNP alteró la morfología celular al afectar la pared y la membrana celulares, desorganizando el citoplasma. Estos hallazgos son similares a los obtenidos en otras investigaciones (Fiołka et al., 2020).

Asimismo, los resultados coinciden con estudios previos que indican que las AgNP actúan en células fúngicas a múltiples niveles, acumulando especies reactivas de oxígeno, disminuyendo la actividad de los citocromos y perturbando la síntesis de ergosterol y el metabolismo de lípidos. Todo esto genera daños estructurales en membranas y orgánulos, llevando a la apoptosis celular (Šebesta et al., 2022).

Además del análisis de *C. albicans* mediante Cryo-EM, también se exploró la interacción entre células de *A. niger* y *P. expansum*. El tratamiento con BNP, al igual que lo discutido previamente, resultó en daño en la pared celular y pérdida de la integridad celular, y además en el adelgazamiento de las hifas. Bowen et al. (2007) examinaron la influencia de estímulos externos en los mecanismos de extensión de la punta de las hifas de *A. niger* al privarlas de nutrientes. Los resultados de este estudio demostraron que la punta de la hifa se aplanaba significativamente cuando los nutrientes eran limitados. Esta morfología de hifa aplanada es característica de la fase de crecimiento tigmotrópico en hongos fitopatógenos, permitiendo un contacto más directo entre el sustrato y los mecanismos de percepción topográfica en la punta. De acuerdo a lo observado en nuestra investigación, es de suponer entonces que, en el caso del tratamiento

con las BNP, las hifas buscaron esta morfología especial a fines de conseguir más nutrientes que permitieran un crecimiento más acelerado para resistir al ataque del antifúngico.

Mecanismo de acción: generación de estrés oxidativo.

Uno de los mecanismos de acción previamente discutidos fue la generación de estrés oxidativo. En esta investigación, se evaluó la producción de especies ERO y ERN en células de *C. albica*ns tratadas con PeNP y PchNP.

La generación de ERO se observó desde el inicio del tratamiento con ambas BNP mientras que la generación de ERN solo se observó en el caso del tratamiento con PeNP. Este resultado es peculiar ya que, como se explicó anteriormente en relación con las bacterias, el óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) tiene efectos antioxidantes a concentraciones bajas, lo que sugiere que un aumento de ERO debería mantener estables o incluso disminuir los niveles de nitritos. Sin embargo, en el caso de *C. albicans* tratadas con PeNP, se registró un aumento en los niveles de nitritos. Estos resultados sugieren que el estrés oxidativo provocado por las PeNP alteró el equilibrio entre la generación de especies reactivas de oxígeno y la producción de $NO^{\cdot}$. Estos hallazgos concuerdan con los obtenidos por Quinteros (2017) al investigar células de *E. coli* tratadas con diferentes concentraciones de nanopartículas biogénicas. Independientemente de esto, los resultados sobre la generación de estrés oxidativo de las BNP en las células de *C. albicans* respaldan los hallazgos obtenidos mediante Microscopía Raman Confocal y Cryo-EM, demostrando que estas especies reactivas son, efectivamente, uno de los principales mecanismos de acción antifúngicos de estas nanopartículas frente a estas células. Al igual que para el caso de las células bacterianas, se propone el mecanismo de acción de las BNP frente a células fúngicas (**Figura 3.24**):

i. Las BNP se adhieren a la pared y membrana celular.
ii. Se genera daño a nivel de la pared y la membrana por interacción de las BNP con los β-glucanos, quitina y ergosterol.

iii. Las BNP ingresan al interior celular dónde generan daño a nivel de proteínas y ácidos nucleicos e interaccionan con la cadena de transporte de electrones mediante la generación de especies reactivas del oxígeno.

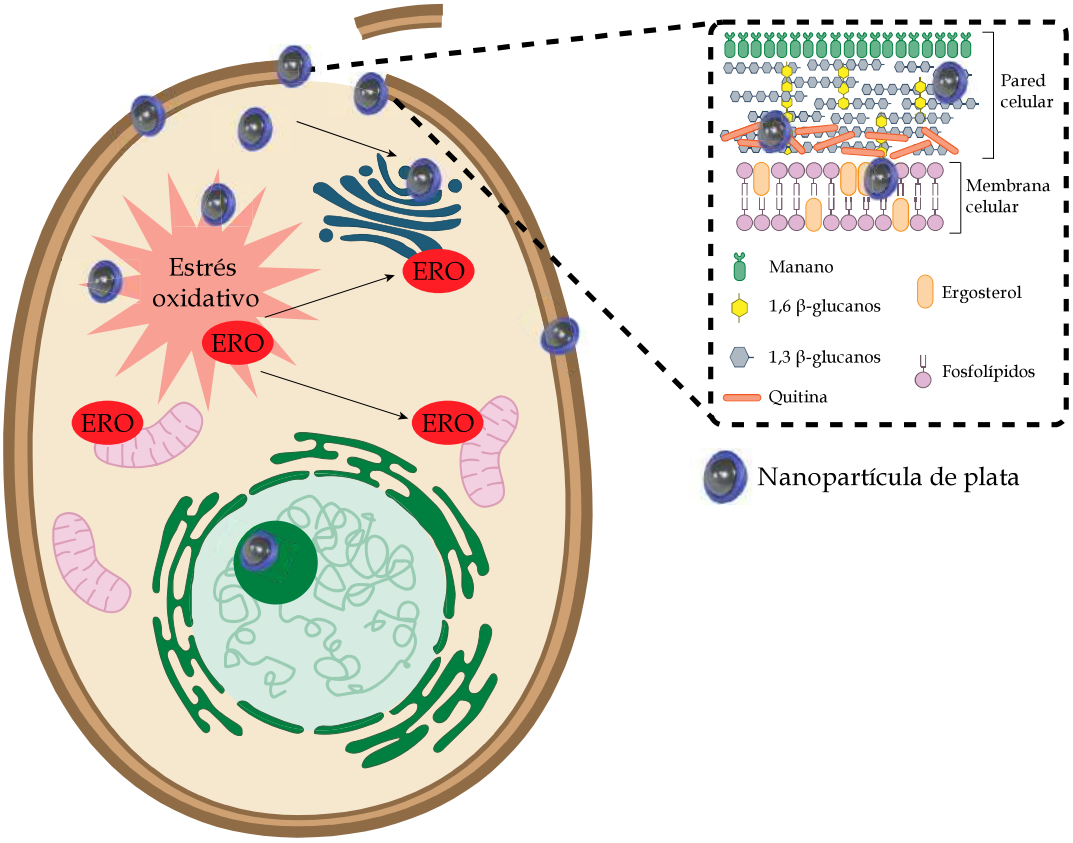


Figura 3.24. Mecanismo de acción antifúngico propuesto para las BPN en base a los resultados obtenidos.

CONCLUSIONES

En este capítulo se evaluó la capacidad antimicrobiana de las BNP frente a microorganismos patógenos de importancia a nivel de la salud humana y animal y del área agrícola.

Las nanopartículas presentaron actividad antimicrobiana frente las bacterias, levaduras y hongos filamentosos analizados, con CIM mucho menores que las obtenidas para el precursor de la síntesis.

Se evaluó también la concentración inhibitoria mínima para las nanopartículas de plata de síntesis química frente a *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, encontrando que estas eran mayores a las obtenidas para las nanopartículas de síntesis biológica. Esto muestra que las nanopartículas biosintetizadas presentan ventajas no solo a nivel económico y ambiental frente a las sintetizadas químicamente, sino también en la actividad antimicrobiana.

Se realizaron estudios de interacción y mecanismo de acción para las nanopartículas frente a bacterias y hongos mediante diversas técnicas.

Basándonos en los hallazgos obtenidos para las bacterias y las levaduras, esta tesis propone los mecanismos de acción antimicrobiana para las BNP evaluadas. En el caso de las bacterias y las levaduras, la interacción con las BNP se inicia con su unión a la superficie celular, lo que ocasiona la formación de poros en la pared bacteriana y la posterior internalización de las nanopartículas. Al internalizarse, las BNP interactúan con diversos componentes citoplasmáticos, pudiendo generar estrés oxidativo, dañando la célula a nivel del ADN, los lípidos, las proteínas y los polisacáridos y provocando, en última instancia, la muerte celular.

En el caso de los hongos filamentosos, se llevaron a cabo distintos protocolos para investigar la interacción mediante Microscopía Raman Confocal, logrando así estudiar la interacción entre las nanopartículas de plata biosintetizadas a partir de *P. expansum* (PeNP) y las células de *P. oryzae*. El mecanismo de acción propuesto implica el deterioro de la pared celular del hongo, así como de componentes citoplasmáticos y la cadena de transporte de electrones. Se postula que este daño podría ser resultado de la generación eventual de estrés oxidativo, dado que las especies generadas interactúan con los citocromos presentes en la

cadena de transporte de electrones. Además, se evaluó la interacción entre las BNP y células de *A. niger* y *P. expansum* encontrando que las nanopartículas interaccionaron a nivel de la pared celular alterando la morfología de las hifas.

En resumen, las nanopartículas de plata (BNP) evaluadas en este estudio demuestran un destacado potencial antimicrobiano contra bacterias, levaduras y hongos filamentosos, mostrando diversas vías de acción que podrían evitar la resistencia antimicrobiana que estos microorganismos puedan presentar.

Capítulo IV

Todo ello se reduce a: muere o adáptate.

BRET EASTON ELLIS, *American Psycho*.

Nanopartículas de plata *vs Salmonella enterica* multirresistentes

INTRODUCCIÓN

Salmonella enterica es un patógeno importante que afecta a una amplia gama de especies animales y a humanos, y es el agente causal de enfermedades transmitidas por alimentos con importante impacto en la salud pública. Las enfermedades transmitidas por los alimentos afectan al 10% de población mundial con 33 millones de muertes anuales. En particular la aparición de *Salmonella enterica* patógena serovar Typhimurium (S. Typhimurium) con múltiple resistencia a los antibióticos representa una considerable amenaza para la salud pública y la seguridad alimentaria a nivel mundial (Wang et al., 2022).

Dentro de los más de 2500 serotipos reportados de *Salmonella* spp., sólo unos pocos afectan al ganado, siendo S. Typhimurium uno de los más frecuentes agentes causales de enteritis, diarrea y septicemia (Casaux et al., 2019). La salmonelosis en terneros se trata con antibióticos, recomendándose ß-lactámicos y sulfonamidas en casos de septicemia o quinolonas como tratamiento alternativo para el caso de resistencia (Wang et al., 2022). Sin embargo, la aparición de resistencia a las quinolonas también ha sido reportada (Pribul et al., 2017). El uso indiscriminado de antibióticos, incluso como aditivos alimentarios para animales ha promovido la aparición y selección de microorganismos resistentes y multirresistentes que afectan la eficacia de la terapia con antibióticos tanto en animales como en seres humanos (Tang et al., 2017). La resistencia a múltiples fármacos es un problema emergente en todo el mundo. El mal uso de antibióticos es uno de los factores responsables de la alta resistencia a los antibióticos en varias bacterias patógenas, incluida S. Typhimurium (Wang et al., 2022). En América del Sur, esta bacteria se ha aislado de casos de enfermedades trasmitidas por alimentos y se ha detectado la resistencia a betalactámicos (Casaux et al., 2023).

En Uruguay, el grupo de investigación de la Plataforma de Salud Animal de INIA La Estanzuela (Colonia, Uruguay), se ha abocado a la investigación diagnóstica de brotes de Salmonella en el ganado lechero en distintas etapas de la crianza, entre otros. Estos estudios incluyeron estudios fenotípicos y genómicos para la caracterización del perfil de resistencia de las cepas aisladas (Casaux et al., 2019,

2023). En estos trabajos se demostró que S. Typhimurium fue el serotipo más frecuente obtenido de aislamientos realizados a partir de muestras fecales de terneros enfermos y muestras de órganos de terneros fallecidos por salmonelosis en granjas lecheras comerciales. Este serotipo presentó los mayores patrones de resistencia y ha sido reportado en humanos, destacándose su potencial zoonótico (Casaux et al., 2019).

En respuesta a los problemas ocasionados por la aparición de resistencia generalizada a los antibióticos se está impulsando una intensa búsqueda de enfoques terapéuticos alternativos contra los patógenos bacterianos (Schäberle and Hack, 2014).

El desarrollo de antimicrobianos en sistemas de nanopartículas se considera un excelente sistema alternativo para el tratamiento de enfermedades microbianas al aumentar el efecto terapéutico y superar los efectos secundarios (Youssef et al., 2019). En los últimos años la aplicación de nanopartículas para el control de microorganismos se ha expandido considerablemente en el área de la salud humana y animal. Varias clases de nanopartículas han sido efectivas para el tratamiento de enfermedades infecciosas frente a bacterias resistentes a antibióticos tanto en estudios *in vitro* como en modelos animales (Hajipour et al., 2012; Shanthi et al., 2016). En el campo de la Medicina Veterinaria la nanotecnología tiene un papel potencial en la prevención o el tratamiento de infecciones (Youssef et al., 2019).

Tal y como se comentó en el **Capítulo III**, los mecanismos de acción antimicrobianos de las AgNP son complejos y dependen, entre otros factores, de las propiedades fisicoquímicas de las AgNP y del tipo de microorganismo (Hajipour et al., 2012). Se ha demostrado que el tamaño nanométrico de las AgNP incrementa el potencial de penetración permitiendo una mejor utilización de las propiedades del metal, siendo de gran utilidad en el tratamiento de enfermedades microbianas. Algunas bio-AgNP sintetizadas por hongos, como las sintetizadas en esta tesis, presentan amplia actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas, Gram positivas y hongos (Rodrigues et al., 2013; Sanguiñedo et al., 2018, Capítulo III).

Este capítulo representa el primer trabajo realizado en colaboración entre el grupo interdisciplinario de Facultad de Química donde se llevó a cabo esta tesis y el grupo de Plataforma de Salud Animal de INIA La Estanzuela, trabajando con cepas de *Salmonella enterica* resistentes a antibióticos.

OBJETIVOS

- Evaluar la actividad antimicrobiana (bacteriostática y bactericida) de nanopartículas de plata biogénicas frente a *Salmonella* Typhimurium resistente a antibióticos provenientes de terneros en Uruguay.
- Evaluar la interacción entre las nanopartículas y las células de S. Typhimurium.

ESTRATEGIA

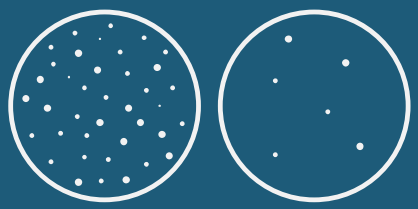
Para cumplir con los objetivos de este capítulo se trabajó con únicamente con las PchNP, buscando realizar un estudio detallado de la acción de estas nanopartículas frente a las cepas bacterianas.

Se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima de las PchNP frente a las cepas de S. Typhimurium, aisladas de terneros uruguayos, y se determinó la Concentración Bactericida Mínima para aquellas concentraciones de nanopartículas que inhibieron el crecimiento del microorganismo.

Para estudiar la interacción de las PchNP y las células de S. Typhimurium se seleccionaron las cepas que fueron más susceptibles a la acción de las nanopartículas. Los estudios se realizaron mediante Microscopía Raman Confocal y Microscopía de Fuerza Atómica.

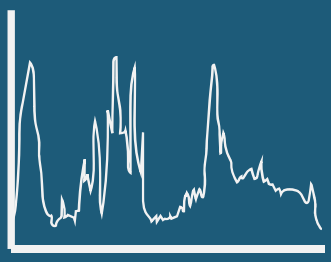
CAPÍTULO IV - Resumen gráfico

Actividad inhibitoria



Actividad bactericida

dd



Interacción

MRC

AFM

METODOLOGÍA

Nanopartículas de plata utilizadas.

Nanopartículas de plata biogénicas utilizadas.

Para los ensayos de actividad antimicrobiana e interacción de este capítulo se utilizaron las PchNP sintetizadas en el **Capítulo II**:

- PchNP: tamaño de 17(7) nm por TEM y 43(15) nm por DLS.

Actividad antimicrobiana.

Material biológico.

Para los ensayos de actividad antimicrobiana, se emplearon cepas de S. Typhimurium aisladas previamente de terneros en Uruguay con diarrea, septicemia y muerte. Se seleccionaron 12 cepas previamente caracterizadas con diferencias en sus perfiles de sensibilidad a antibióticos (**Tabla 4.1**, Casaux et al., 2019). Las cepas utilizadas fueron proporcionadas por el Dr. Martín Fraga de la Plataforma de Salud Animal de la Estación Experimental INIA La Estanzuela en Colonia. Estas cepas fueron subcultivadas en agar nutriente y posteriormente preservadas en glicerol 50% a -80°C hasta su utilización.

Tabla 4.1. Perfil de resistencia a antibióticos de las cepas de S. Typhimurium.

Cepa	Resistencia	Susceptibilidad Intermedia
16-025M4	Cefotaxima, estreptomicina, tetraciclina	-
16-045M5	Ciprofloxacina, enrofloxacina, estreptomicina, tetraciclina	-
16-058M4	Ampicilina, amoxicilina- ác-clavulánico, trimetoprim-sulfametoxazol estreptomicina, tetraciclina	-
16-078M4	Amoxicilina- ácido clavulánico, estreptomicina, tetraciclina	Ampicilina
17-032M21A	Enrofloxacina, gentamicina, estreptomicina, tetraciclina	Ciprofloxacina
17081M3A	Ampicilina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, estreptomicina, tetraciclina	Ácido-clavulánico
17-197M1	Ácido nalidíxico, estreptomicina, tetraciclina	Gentamicina, nitrofurantoína, ciprofloxacina
17-210M7B	Cefotaxima, estreptomicina, gentamicina, tetraciclina, azitromicina	Trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacina
19-027M2A	Ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, ácido clavulánico, estreptomicina, tetraciclina, azitromicina	Amoxicilina- ácido clavulánico, ciprofloxacina
16-073M11	Tetraciclina	-

Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

La determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima se realizó según lo detallado en el **Capítulo III**, de acuerdo al Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, 2015). Como control de esterilidad se utilizó caldo de cultivo sin suspensión bacteriana y sin nanopartículas y como control de crecimiento se utilizó la suspensión bacteriana en medio de cultivo. La CIM se realizó por triplicado. Se incubó a 37°C durante 24 horas y se determinó la mínima concentración que inhibió el crecimiento celular.

Concentración Bactericida Mínima (CBM).

La determinación de la Concentración Bactericida Mínima se realizó para las concentraciones de PchNP con capacidad inhibitoria según los resultados de CIM (**Figura 4.1a**). Para ello se depositaron 100 µL de cada pocillo con inhibición de crecimiento (de la placa de CIM) en una placa con medio agar nutriente (**Figura 4.1b**) y se diseminaron con un ansa de Driglasky (**Figura 4.1c**). Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C y se estimó el número de células viables según el número de unidades formadoras de colonias (ufc). La CBM se determinó como la concentración del agente antimicrobiano que causa la muerte del 99.9% del inóculo inicial (Díaz-García et al., 2020) (**Figura 4.1d**).

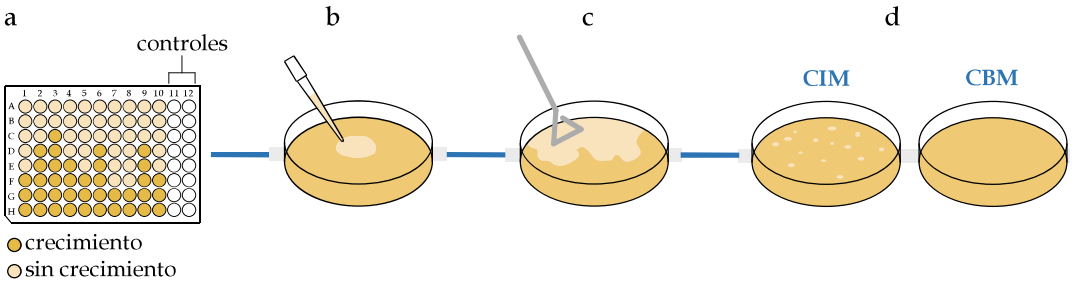


Figura 4.1. Esquema de la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM). a) selección de pocillos con inhibición de crecimiento, b) subcultivo a placa con medio agar nutriente, c) diseminación con ansa de Driglasky, d) determinación de CBM.

Interacción PchNP – *S. Typhimurium*.

Las cepas que presentaron mayor susceptibilidad a la acción de antimicrobiana de las PchNP fueron utilizadas para los estudios de interacción mediante Microscopía Raman Confocal y Microscopía de Fuerza Atómica.

Microscopía Raman Confocal.

Las células sin tratamiento (control) y tratadas con PchNP fueron preparadas según lo especificado en el **Capítulo III**, de acuerdo a lo reportado por (Athamneh et al., 2014), utilizando un Microscopio Raman Confocal WITec Alpha 300-RA (WITec GmbH, Ulm, Alemania) ubicado en el Instituto Polo Tecnológico de Pando (IPTP), DETEMA, Facultad de Química, UdelaR.

Microscopía de Fuerza Atómica.

Las células bacterianas sin tratamiento (control) y tratadas con PchNP (tal como fueron preparadas para los análisis por Microscopía Raman Confocal) se observaron mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, por sus siglas en inglés), según lo reportado por Borowik et al. (2018), tal como se detalló en el **Capítulo III**, utilizando un microscopio AFM WITec Alpha 300-RA (WITec GmbH, Ulm, Alemania) ubicado en el Instituto Polo Tecnológico de Pando (IPTP), DETEMA, Facultad de Química, UdelaR.

RESULTADOS

Actividad antimicrobiana.

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM).

En la **Tabla 4.2** se muestran los valores de CIM obtenidos para las PchNP y la solución de $AgNO_3$ frente a las distintas cepas de S. Typhimurium. Si bien las cepas fueron sensibles a la solución de $AgNO_3$, los valores de CIM obtenidos para PchNP resultaron muy inferiores a los de la solución de $AgNO_3$. Esta diferencia es más pronunciada en los resultados de determinación de CBM para algunas cepas de S. Typhimurium donde los valores de CBM de la solución de $AgNO_3$ fueron igual o mayor a 830 µM, comparado con las CBM de las nanopartículas.

Tabla 4.2. Concentración Inhibitoria Mínima y Bactericida Mínima de las PchNP y la solución de $AgNO_3$ frente a las cepas de *S.* Typhimurium.

Cepa	CIM PchNP	CBM PchNP	CIM $AgNO_3$	CBM $AgNO_3$
16-025M4	0,0078 nM	> 0,0156 nM	39 µM	>830 µM
16-045M5	0,0078 nM	0,0156 nM	39 µM	830 µM
16-058M4	0,0156 nM	0,0156 nM	39 µM	830 µM
16-078M4	0,0078 nM	> 0,0156 nM	39 µM	830 µM
17-032M21A	0,0156 nM	> 0,0156 nM	78 µM	>1250 µM
17081M3A	0,0156 nM	> 0,0156 nM	78 µM	1250 µM
17-197M1	0,0156 nM	0,0156 nM	39 µM	1250 µM
17-210M7B	0,0156 nM	>0,0156 nM	39 µM	>830 µM
19-027M2A	0,0156 nM	> 0,0156 nM	78 µM	1250 µM
16-073M11	0,0156 nM	> 0,0156 nM	78 µM	>1250 µM

Estudios de interacción bacteria-PchNP.

Para los estudios de interacción se seleccionaron las tres cepas de *S.* Typhimurium (16-045M5, 16-058M4 y 17-197M1) que presentaron mayor susceptibilidad a la acción antimicrobiana de las PchNP. Se compararon los perfiles de bandas Raman previamente reportados para *Salmonella* spp. con los obtenidos para las tres cepas evaluadas, observándose la presencia de 11 bandas coincidentes y bandas asociadas a bacterias Gram negativas que fueron asignadas a las correspondientes moléculas biológicas (Assaf et al., 2014; Witkowska et al., 2017) (**Tabla 4.3**).

Tabla 4.3. Bandas correspondientes a moléculas biológicas obtenidas por Microscopía Raman Confocal de las células control sin tratamiento con PchNP. La asignación de bandas se realizó en base a bibliografía (Assaf et al., 2014; Witkowska et al., 2017).

Corrimiento Raman (cm^{-1})			Asignación
16-045M5	**16-058M4**	**17-197M1**	
557	556	545	Carbohidratos
709	745	713	ADN, ARN
757	761	796	ADN, ARN
800	810	807	ARN
935	970	934	Lípidos
1098	1079	1092	Carbohidratos
1234	1248	1243	ARN
1350	1353	1354	Proteínas
1444	1448	1462	Lípidos
1554	1512	1510	Proteínas
1594	1575	1579	ADN, ARN

Mediante Microscopía Raman Confocal se determinaron las diferencias en los espectros Raman debido a los cambios fenotípicos de las células tratadas con nanopartículas frente a las células sin tratar (**Figura 4.2**). En todos los casos se observó que la interacción de las nanopartículas con las células de S. Typhimurium provocó cambios en las bandas correspondientes a proteínas,

lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. A través de las imágenes combinadas generadas mediante Microscopía Raman Confocal (**Figura 4.3**), utilizando las bandas espectrales características de las células bacterianas y las nanopartículas, se pudo observar la interacción de las células bacterianas con las nanopartículas. Estos resultados fueron complementados mediante Microscopía de Fuerza Atómica (**Figura 4.4**) donde se observó que el tratamiento con las nanopartículas produjo cambios en la morfología de las células y desintegración de estructuras celulares.

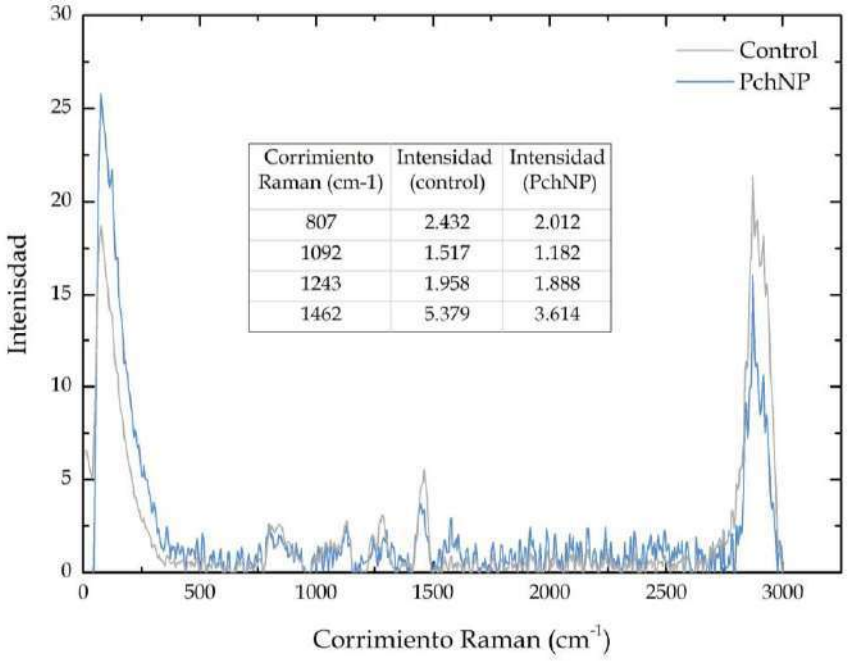


Figura 4.2. Espectro Raman obtenido para la cepa de S. Typhimurium 17-197. Se muestra en gris el espectro Raman de las células sin tratar (control) y en azul el de las células tratadas con PchNP. Se muestra en tabla la disminución de las bandas correspondientes a ARN, carbohidratos y lípidos luego del tratamiento

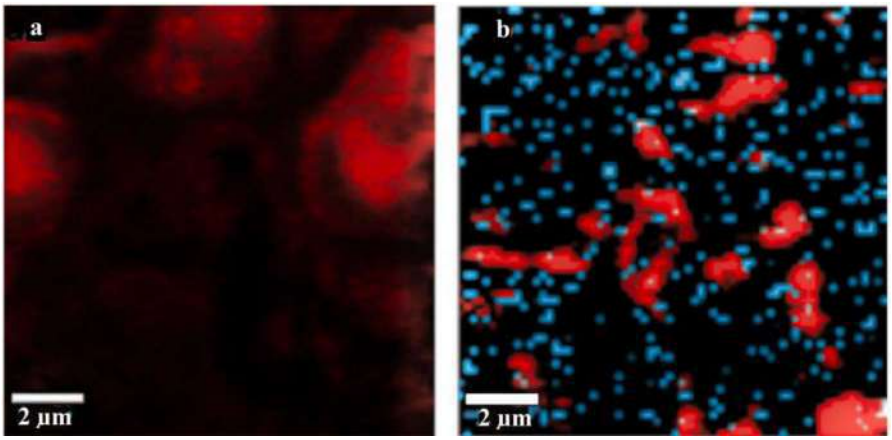


Figura 4.3. Imágenes de MRC para la cepa de S. Typhimurium 17-197, obtenidas combinando las bandas correspondientes al estiramiento C-H de las bacterias (rojo) y las bandas asignadas a Ag-N para las PchNP (azul). a) células sin tratamiento, b) células tratadas con PchNP.

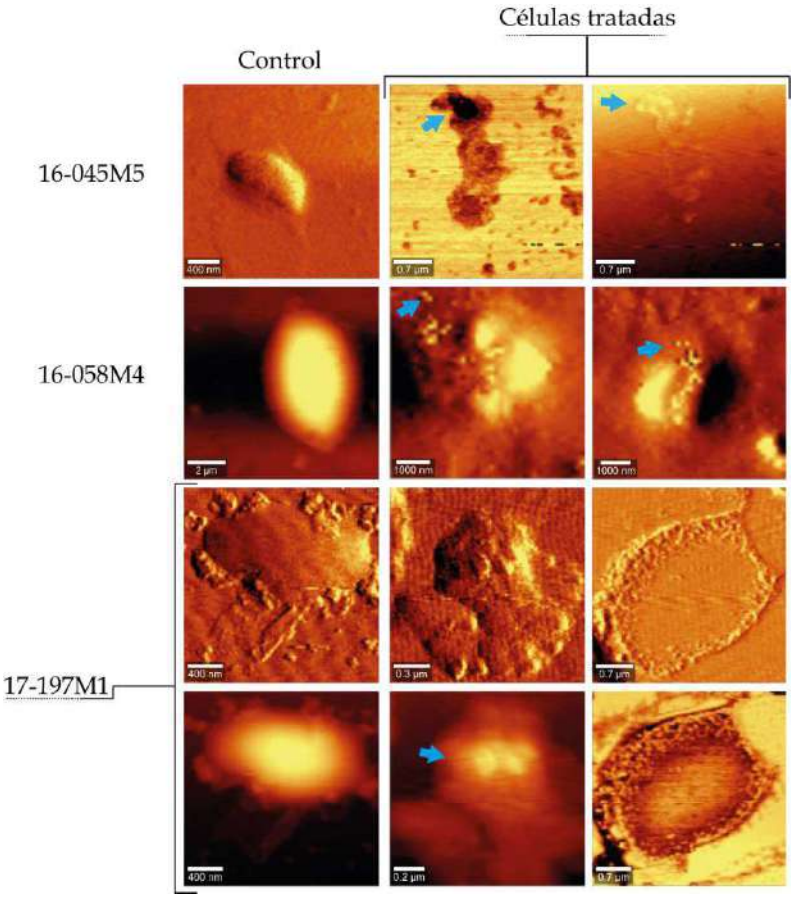


Figura 4.4. Imagen de topografía y contraste de fases obtenidas mediante Microscopía de Fuerza Atómica, mostrando los cambios en la morfología celular de S. Typhimurium (indicado con flechas) luego de exponerlas a las PchNP.

DISCUSIÓN

En este capítulo se abordó la aplicación de las PchNP como agente antimicrobiano frente a cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium provenientes de aislamientos obtenidos previamente en Uruguay de terneros con diarrea, septicemia y mortandad, que habían sido caracterizados por el grupo por su perfil de resistencia a antibióticos. Los ensayos de actividad antimicrobiana *in vitro* mostraron resultados muy promisorios. Si bien las cepas son resistentes al menos a un antibiótico, todas ellas fueron sensibles a las PchNP. Esto es de particular importancia como alternativa al tratamiento de cepas resistentes a las quinolonas, ya que el uso de estos antibióticos fue recomendado para S. Typhimurium en un trabajo reciente realizado con más de 11.000 cepas, sin embargo, dicho tratamiento no sería eficaz en las cepas aisladas de territorio uruguayo (Wang et al., 2022). En todos los casos las PchNP presentaron valores de CIM menores que las obtenidas para la solución de $AgNO_3$, demostrando el gran potencial antimicrobiano y su promisoria aplicación en el área de salud animal. Si bien se ha demostrado la resistencia de S. Typhimurium a la plata (Hooton et al., 2021), las propiedades nanométricas y la composición de las PchNP utilizadas en este estudio otorgan nuevas ventajas antimicrobianas por poseer mayor área superficial y mayor poder de penetración. Incluso se observó que, para tres cepas resistentes (cada una a entre 3 y 7 antibióticos diferentes) las PchNP mostraron una CBM de 0.0156 nM. Esas tres cepas fueron utilizadas para estudios de Microscopía Raman Confocal y Microscopía de Fuerza Atómica.

Como se mencionó en capítulos anteriores, en comparación con otros métodos que no requieren cultivo como el uso de sondas fluorescentes o magnéticas, la espectroscopía Raman tiene el potencial único de ser una técnica para identificación fenotípica que no requiere ningún tratamiento particular de las células (Ho et al., 2019). En este trabajo se compararon los perfiles de bandas Raman entre las células de S. Typhimurium tratadas con PchNP y células sin tratar (control). El análisis multivariado mostró que existieron cambios significativos en el perfil fenotípico de las bacterias luego del tratamiento con las PchNP respecto al control sin tratar, sugiriendo que las PchNP produjeron daño

celular a nivel de carbohidratos, ácidos grasos, proteínas y ácidos nucleicos, lo cual permite avanzar en el conocimiento de los sitios blanco de acción de las mismas.

Estos resultados fueron complementados mediante Microscopía de Fuerza Atómica donde se observó que el tratamiento con las PchNP produjo cambios en la morfología de las células, lo que se debería a la pérdida de integridad de la envoltura celular y la pérdida de contenido citoplasmático, como fue previamente observado para otra bacteria Gram negativa (*Escherichia coli*) en estudios realizados por Microscopía Electrónica (TEM y ESEM) luego del tratamiento con las BNP, como se explicó en el **Capítulo III**.

CONCLUSIONES

Las nanopartículas sintetizadas a partir de *Phanerochaete chrysosporium* fueron evaluadas contra distintas cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium resistentes y multirresistentes a diversos antibióticos, con el fin de determinar su potencial antimicrobiano. En todos los casos las PchNP presentaron valores de CIM menores que para la solución de $AgNO_3$. Tres de estas cepas fueron seleccionadas (basado en los resultados de actividad bactericida) para los estudios de interacción mediante Microscopía Raman Confocal y Microscopía de Fuerza Atómica. Los resultados mostraron que el tratamiento con las PchNP generó daño celular a nivel de carbohidratos, ácidos grasos, proteínas y ácidos nucleicos lo cual se refleja en la pérdida de la integridad de la envoltura celular y del contenido citoplasmático, llevando a la muerte bacteriana.

En suma, los resultados muestran la prometedora aplicación de las BNP obtenidas a partir de *Phanerochaete chrysosporium* como una alternativa para combatir a bacterias multirresistentes.

Capítulo V

El individualismo se consideraba una forma de demencia, como ser poseído por un demonio.

ISABEL ALLENDE, ***La ciudad de las bestias***

BIOFILMS

INTRODUCCIÓN

Un biofilm se define como una comunidad microbiana inmersa en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que constituye entre el 50% y el 90% de los elementos orgánicos presentes (Sharma et al., 2023) . La matriz de EPS tiene un papel crucial en la resistencia antimicrobiana de los biofilms al dificultar el transporte eficaz de los antimicrobianos a través de ellos. Esto convierte a los biofilms en un desafío importante para la salud ya que tienen ventajas importantes en la virulencia tales como la resistencia a condiciones ambientales estresantes, a antimicrobianos, a la respuesta inmune del huésped y la persistencia en la generación de infecciones (Paraje, 2011a; Nadar et al., 2022; Sharma et al., 2023). Se estima que alrededor del 70% de las infecciones bacterianas se relacionan con la formación de biofilms (Jamal et al., 2018; Sharma et al., 2023), pudiendo surgir tanto en tejidos vivos como en dispositivos médicos, generando infecciones crónicas. Las bacterias más comúnmente asociadas con la formación de biofilms incluyen *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus epidermidis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Staphylococcus viridans, Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* (Sharma et al., 2023) y en cuanto a las levaduras, las infecciones más comunes se producen por biofilms de especies de *Candida* (Cavalheiro and Teixeira, 2018).

Dado el desafío que suponen los biofilms para la salud, continuamente se están estudiando nuevas estrategias de control y erradicación. Dentro de estas estrategias, las AgNP muestran una actividad muy prometedora. Se ha observado su capacidad para inhibir tanto la formación de biofilm como la producción de EPS en diferentes bacterias resistentes, como *K. pneumoniae, P. aeruginosa, E. coli, S. aureus, A. baumanii* así como para prevenir la formación de biofilms de *E. faecalis* en tubos de catéter urinario (Mohanta et al., 2020; Siddique et al., 2020; Hetta et al., 2021; Swidan et al., 2022).

Las enfermedades humanas o animales no son el único problema asociado a biofilms. La formación de estas estructuras sobre superficies inanimadas es también un área de estudio y las AgNP han demostrado ser efectivas contra los biofilms responsables de este problema (Pérez et al., 2022).

Aún hoy la información sobre como las AgNP interactúan con los biofilms es limitada, sin embargo, se han realizado muchos avances en la comprensión de los mecanismos de inhibición de la formación de biofilms y de la erradicación de los biofilms ya formados. Por ejemplo, algunos estudios han demostrado que las AgNP son capaces de reducir la movilidad de las bacterias, uno de los factores claves en la formación de un biofilm (Masum et al., 2019; Saeki et al., 2021). Otros estudios han demostrado que las AgNP disminuyen la adhesión entre células (Goswami et al., 2015) y a superficies (Ahmed et al., 2022) además de interferir en la producción de EPS (Akther et al., 2020; Rajivgandhi et al., 2020), pasos claves en la formación y el mantenimiento de un biofilm. En un estudio realizado por Yalçın et al. (2022) se demostró que las bio-AgNP sintetizadas a partir de cianobacterias eran capaces de inhibir la producción de violaceína en *Chromobacterium violaceum*, un pigmento regulado por QS. Akter et al. (2018) también demostró la inhibición de piocianina (otro modulador de QS) en *P. aeruginosa* por medio de AgNP.

Posiblemente, el poder antibiofilm de las AgNP sea una combinación de todos los mecanismos de acción anteriormente mencionados.

Una técnica de gran utilidad para comprender el efecto antibiofilm de las AgNP es la espectroscopía Raman. Esta técnica se ha empleado para investigar el efecto de varios fármacos en células planctónicas y en biofilms. Por ejemplo, se estudió el impacto de la vancomicina en un biofilm de *S. aureus*, revelando un desafío significativo relacionado con la limitada penetración del antibiótico en la estructura. A pesar de su capacidad para eliminar el biofilm en regiones menos profundas, las células permanecían viables en las capas más profundas, lo que resultaba en un crecimiento recurrente del biofilm (Bae et al., 2019).

Los cambios en las distintas bandas de los espectros Raman permiten detectar alteraciones en las biomoléculas, tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Nanda et al., 2016). Además, cuando la espectroscopía Raman se asocia a un Microscopio Confocal, permite una visualización de alta resolución espacial en las tres dimensiones con la capacidad de seccionar el volumen de la muestra, produciendo imágenes tridimensionales (Ahlf et al., 2014). Otra de las ventajas

de la Microscopía Raman Confocal (comparando, por ejemplo, con la Microscopía Láser Confocal) es, tal como se mencionó en el **Capítulo III**, la simpleza y rapidez de la técnica además de no requerir tratamiento previo de la muestra (Perumal et al., 2021). Por tanto, la Microscopía Raman Confocal resulta ser una técnica sumamente útil para comprender en detalle las interacciones de las AgNP con los biofilms lo que podrá contribuir a mejorar su actividad contra estas estructuras.

OBJETIVOS

- Evaluar la capacidad de las BNP para erradicar biofilms de bacterias y levaduras.
- Evaluar la capacidad de las BNP para inhibir la formación de biofilms de bacterias y levaduras.
- Estudiar la interacción entre las BNP y los biofilms.

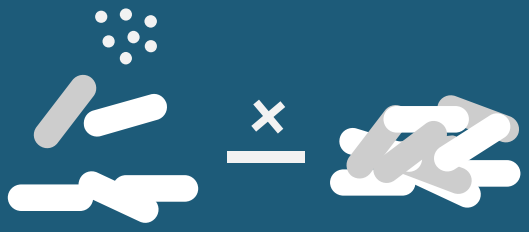
ESTRATEGIA

Para cumplir con los objetivos del capítulo, se llevaron a cabo experimentos de erradicación e inhibición de la formación de biofilms microbianos de bacterias (*Staphylococcus aureus, Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) y levaduras (*Candida albicans* y *Candida tropicalis*) de importancia clínica, mediante la técnica del cristal violeta. A partir de los resultados obtenidos se realizaron estudios mediante Microscopía Raman Confocal, Microscopía Láser Confocal y Microscopía de Fuerza Atómica para analizar la interacción entre las BNP y los biofilms en aquellos microorganismos en los que las BNP lograron su erradicación o inhibieron su formación.

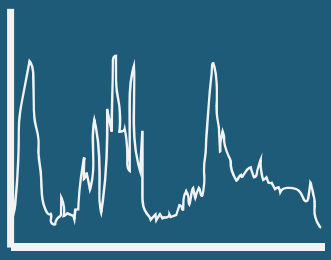
CAPÍTULO V - Resumen gráfico

Actividad anti-biofilms

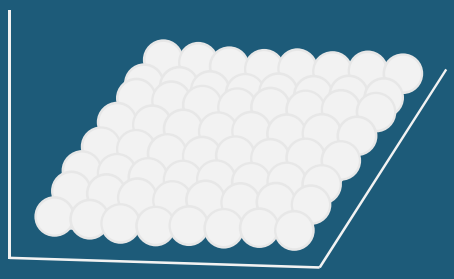
Erradicación



Inhibición



MRC
AFM



Microscopía
Láser
Confocal

METODOLOGÍA

Material biológico.

Para los ensayos de actividad contra biofilms se utilizaron las bacterias *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15422, y las levaduras *Candida albicans* ATCC 101231 y *Candida tropicalis* ATCC 66029M*. Todas las cepas fueron previamente evaluadas por el grupo por su capacidad para formar biofilms en las condiciones de los ensayos, mostrando ser productoras de biofilm moderadas o fuertes (Raffaelli et al., 2022).

Nanopartículas de plata biogénicas utilizadas.

Para los ensayos de actividad antimicrobiana e interacción de este capítulo se utilizaron las BNP sintetizadas en el **Capítulo II**:

- PeNP: tamaño de 32(11) nm por TEM y 16(4) nm por DLS.
- PchNP: tamaño de 17(7) nm por TEM y 43(15) nm por DLS.

Actividad contra biofilms.

Erradicación de biofilms.

Se llevaron a cabo ensayos de erradicación de biofilms basados en el método del cristal violeta (Villegas et al., 2012) en una placa de 96 pocillos (esterilizada, capacidad de 300 µL, MicroWell, NUNC).

Se preparó una suspensión celular de las bacterias (1 x 10^7 células/mL) y se diluyó a 1/10 en caldo nutriente. La suspensión se depositó en la placa de 96 pocillos (200 µL/pocillo) y se incubó durante 24 horas a 37 °C (**Figura 5.1a**). Como control se utilizaron pocillos conteniendo únicamente caldo nutriente.

Para el ensayo de levaduras, las placas se trataron previamente con suero fetal bovino (FBS) 50% en caldo de papa y dextrosa (PDB) a 37 °C durante 30 minutos y se lavaron con PBS 10 mM (pH = 7,2). Luego, se preparó una suspensión celular de las levaduras (1 x 10^6 células/mL) y se diluyó a 1/10 en caldo de cultivo. La suspensión se depositó en la placa de 96 pocillos (200 µL/pocillo) y se incubó

durante 24 horas a 37°C. Previamente, los pocillos de control conteniendo únicamente PDB se trataron con FBS.

A continuación, se retiró el sobrenadante, se agregaron 200 µL/pocillo de BNP y se agregó caldo de cultivo fresco a los pocillos de biofilm basal (pocillos sin BNP) (**Figura 5.1b**). La placa se incubó durante 48 horas a 37°C. Se retiró el sobrenadante, se lavaron los pocillos con agua destilada y se secaron a 50°C durante 40 minutos (**Figura 5.1c**). Se agregó cristal violeta a cada pocillo y se dejó a temperatura ambiente durante 3 minutos (**Figura 5.1d**). El contenido de los pocillos se lavó con agua y se resuspendió en etanol:acetona (70:30). El biofilm se cuantificó midiendo la absorbancia a 590 nm. Se calculó el porcentaje de erradicación comparando con la muestra basal (**Figura 5.1e**).

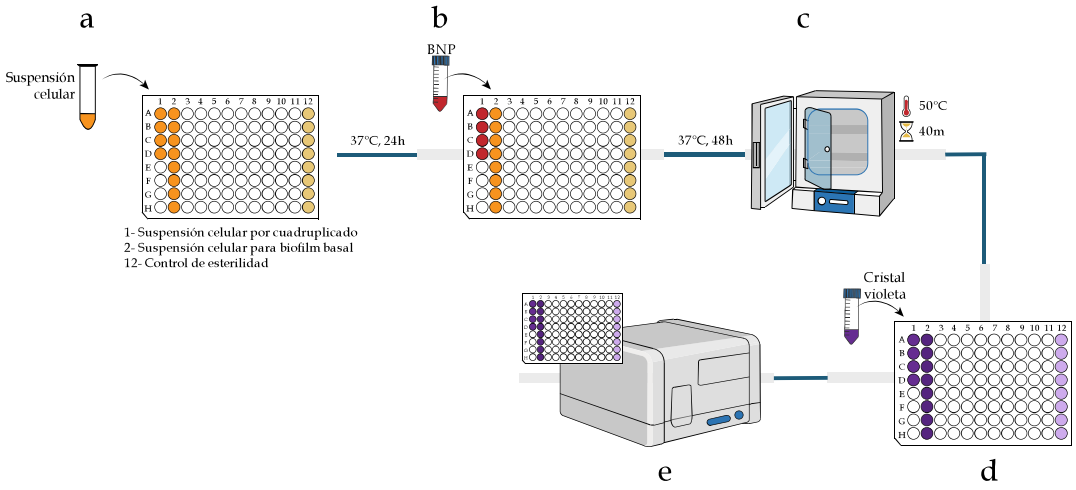


Figura 5.1. Procedimiento para evaluar la erradicación de biofilms mediante BNP. a) formación del biofilm, b) agregado de la muestra, c) incubación, d) agregado de cristal violeta, e) lectura de absorbancia a 590 nm.

Inhibición de biofilms.

Se determinó el efecto de las BNP sobre la formación de biofilms utilizando el método de microdilución según lo reportado por Raffaelli et al. (2022), en una placa de 96 pocillos. Se agregaron 20 µL de las BPN y 180 µL de caldo de cultivo en el primer pocillo y se realizaron diluciones seriadas al medio a las que se añadieron 20 µL de la suspensión bacteriana (1 x 10^8 células/mL) y 80 µL del

caldo de cultivo. Se incluyeron pocillos de control que contenían caldo nutriente estéril y caldo nutriente con suspensión bacteriana (biofilm basal, no tratado) (**Figura 5.2a**). La placa se incubó durante 24 horas a 37°C. Se retiró el sobrenadante y se lavaron los pocillos con agua destilada y se secaron a 50°C durante 40 minutos (**Figura 5.2b**). Luego, las células adheridas se tiñeron con una solución de cristal violeta al 1% (**Figura 5.2c**). El cristal violeta se resuspendió en etanol:acetona (70:30) y se midió la absorbancia de la solución a 590 nm. Se calculó el porcentaje de inhibición comparando con la muestra basal (**Figura 5.2d**). La Concentración Mínima Inhibitoria de Biofilm (CMIB) se determinó como la concentración mínima capaz de inhibir al menos el 90% de la formación de biofilm.

Para las levaduras, se incubaron 100 µL/pocillo de una suspensión de células (1 x 10^6 células/mL) en 100 µL de PDB a 37°C durante 30 minutos (excepto para el control estéril). Se retiró el sobrenadante y se lavaron los pocillos con PBS 1X. Luego se agregaron 100 µL de PDB y 100 µL de BNP y se realizaron diluciones seriadas. Se incluyeron pocillos de control que contenían PDB estéril y PDB y suspensión de levadura (biofilm no tratado). La placa se incubó a 37°C durante 24 horas. Luego se continuó el procedimiento tal como se describe para el ensayo con bacterias.

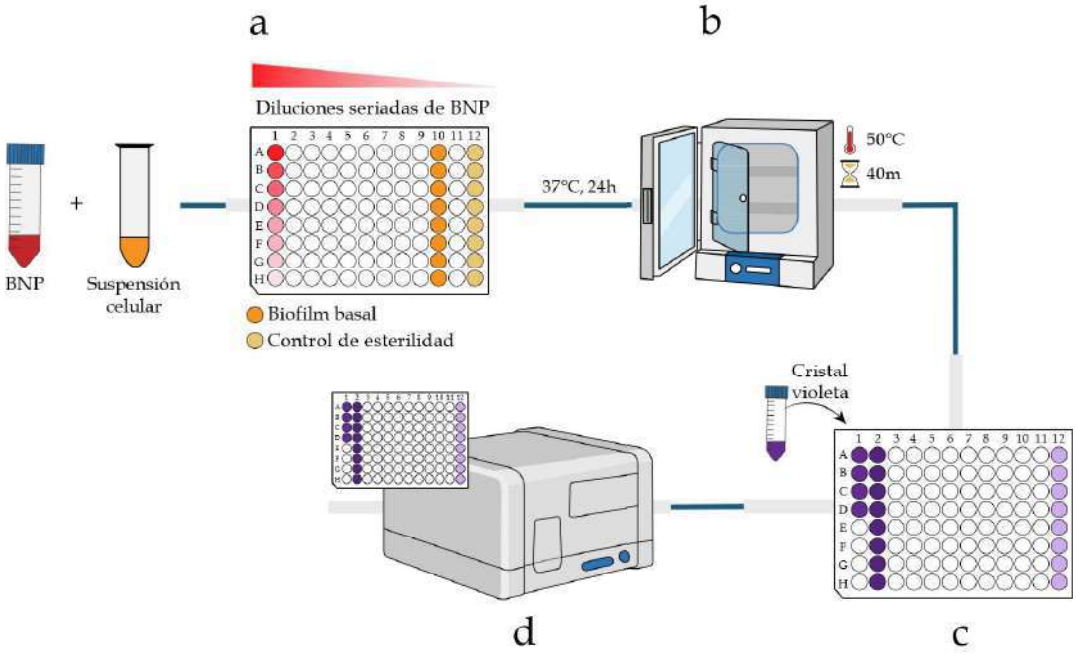


Figura 5.2. Procedimiento para evaluar la inhibición de biofilms mediante BNP. a) agregado de la suspensión celular y la muestra, b) incubación, c) agregado de cristal violeta, d) lectura de absorbancia a 590 nm.

Análisis estadístico.

Los experimentos se realizaron por cuadruplicado y se calcularon los promedios y desviaciones estándar para todos ellos. Los resultados se graficaron como los valores medios con barras de error que representan las desviaciones estándar. Los datos fueron analizados estadísticamente utilizando ANOVA y una prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples (p valor < 0.05).

Estudios de interacción con biofilms.

Microscopía Raman Confocal.

El estudio de la interacción se realizó para las muestras de BNP que presentaron capacidad de erradicar biofilms de *E. coli* y *C. albicans*. Para ello se reprodujeron los experimentos de erradicación sobre un soporte de papel de aluminio (Gieroba et al., 2020). Se preparó una suspensión del microorganismo (bacteria o levadura) en medio de cultivo (caldo nutriente o PDB, según corresponda) y se incubó a

37°C durante 24 horas. La suspensión se depositó sobre un soporte de aluminio estéril y se incubó a 37°C durante 24 horas (**Figura 5.3a**). Pasado ese tiempo, se retiró el medio de cultivo remanente, se lavó con PBS, se añadió la muestra de BNP y se incubó a 37°C durante 24 horas (**Figura 5.3b**). Luego, se retiró el líquido remanente, se lavó con PBS y se dejó secar el soporte a temperatura ambiente para ser medido mediante Microscopía Raman Confocal (**Figura 5.3c**).

Para las mediciones se utilizó un Microscopio Raman Confocal WITec Alpha 300-RA (WITec GmbH, Ulm, Alemania) ubicado en el Instituto Polo Tecnológico de Pando (IPTP), DETEMA, Facultad de Química, UdelaR. Las mediciones se realizaron utilizando un láser de 532 nm enfocado a través de un objetivo de 100X. El procesamiento de datos y el análisis estadístico se realizó mediante análisis de componentes principales (PCA) utilizando un script desarrollado en el Área Física del DETEMA que se ejecutó en entorno MATLAB.

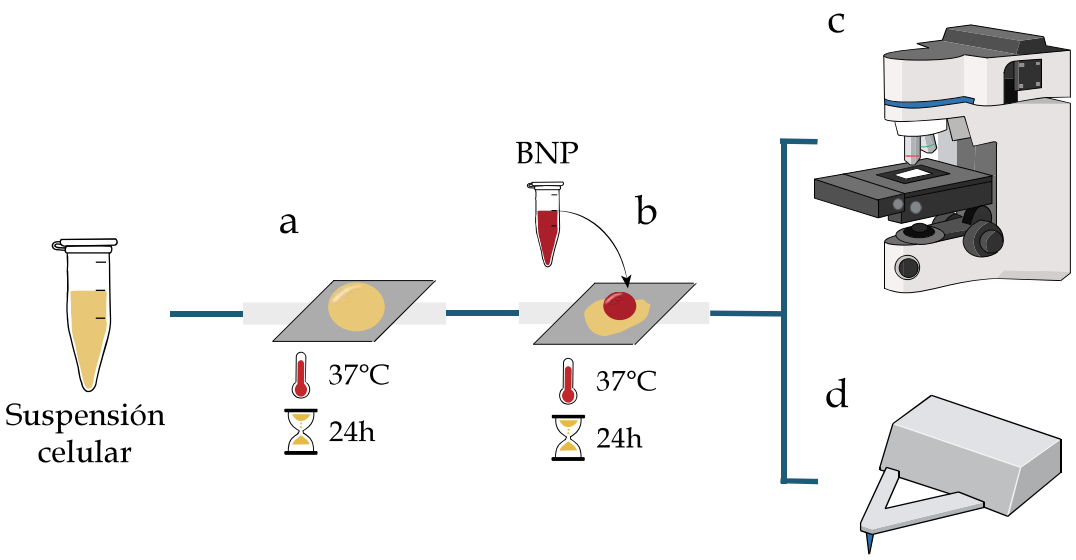


Figura 5.3. Estudio de la interacción de BNP con biofilms mediante Microscopía Raman Confocal y Microscopía de Fuerza Atómica. a) depósito de la suspensión celular en el soporte e incubación, b) agregado de BNP, c) análisis por MRC, d) análisis por AFM.

Microscopía de Fuerza Atómica.

Los biofilm de *E. coli* sin tratamiento (basal) y tratados con BNP (tal como fueron preparados para los análisis por Microscopía Raman Confocal) se observaron mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, por sus siglas en inglés), según lo reportado por Borowik et al. (2018). Las muestras se analizaron utilizando el modo AC (tapping) en un microscopio AFM WITec Alpha 300-RA (WITec GmbH, Ulm, Alemania) ubicado en el Instituto Polo Tecnológico de Pando (IPTP), DETEMA, Facultad de Química, UdelaR (**Figura 5.3e**). Las mediciones AFM se obtuvieron colocando una gota de las suspensiones bacterianas sobre un sustrato de wafer de silicio y se dejaron secar a temperatura ambiente. Los sensores de AFM tuvieron una constante de fuerza de k = 42 N/m, una frecuencia de resonancia nominal de 285 kHz, un ancho promedio de 45 mm, una longitud de 160 mm y un espesor de 4.6 mm.

Microscopía Láser Confocal.

El estudio por Microscopía Láser Confocal se realizó para las muestras de BNP que presentaron capacidad para inhibir la formación de los biofilms de *C. albicans* y *C. tropicalis*.

Para ello se incubó una suspensión estandarizada (300 µL) de células en cámaras del tipo Nunc Lab Tek Chamber Slide durante 30 minutos a 37°C para formar el biofilm (Raffaelli et al., 2022; Wang et al., 2022). El sobrenadante fue retirado y se agregaron 290 µL de caldo de cultivo con 10 µL de las BNP a analizar. La muestra fue incubada a 37°C durante 24 horas y el sobrenadante fue retirado. Los biofilms se tiñeron con Calcofluor-White 15 µl en una mezcla 1:1 de Calcofluor-White (0.5 g/L) y KOH al 10% (p/v) y se incubó durante 5 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

La medición final se realizó en un Microscopio Láser Confocal Leica modelo TCS SP5 II disponible en la Facultad de Medicina, UdelaR.

RESULTADOS

Erradicación de biofilms

Determinación de la capacidad para erradicar biofilms.

En la **Figura 5.4** se muestran los resultados obtenidos para la erradicación de biofilms para las bacterias *E. coli, S. aureus, P. aeruginosa* y las levaduras *C. albicans* y *C. tropicalis.* Tal como puede observarse, las nanopartículas solo fueron capaces de erradicar los biofilms formados de *E. coli* y *C. albicans* para las concentraciones utilizadas. Las PeNP lograron una erradicación del 33% para el biofilm de *E. coli* y del 80% para *C. albicans* en tanto que las PchNP erradicaron un 29% del biofilm *E. coli* y un 82% del biofilm de *C. albicans*.

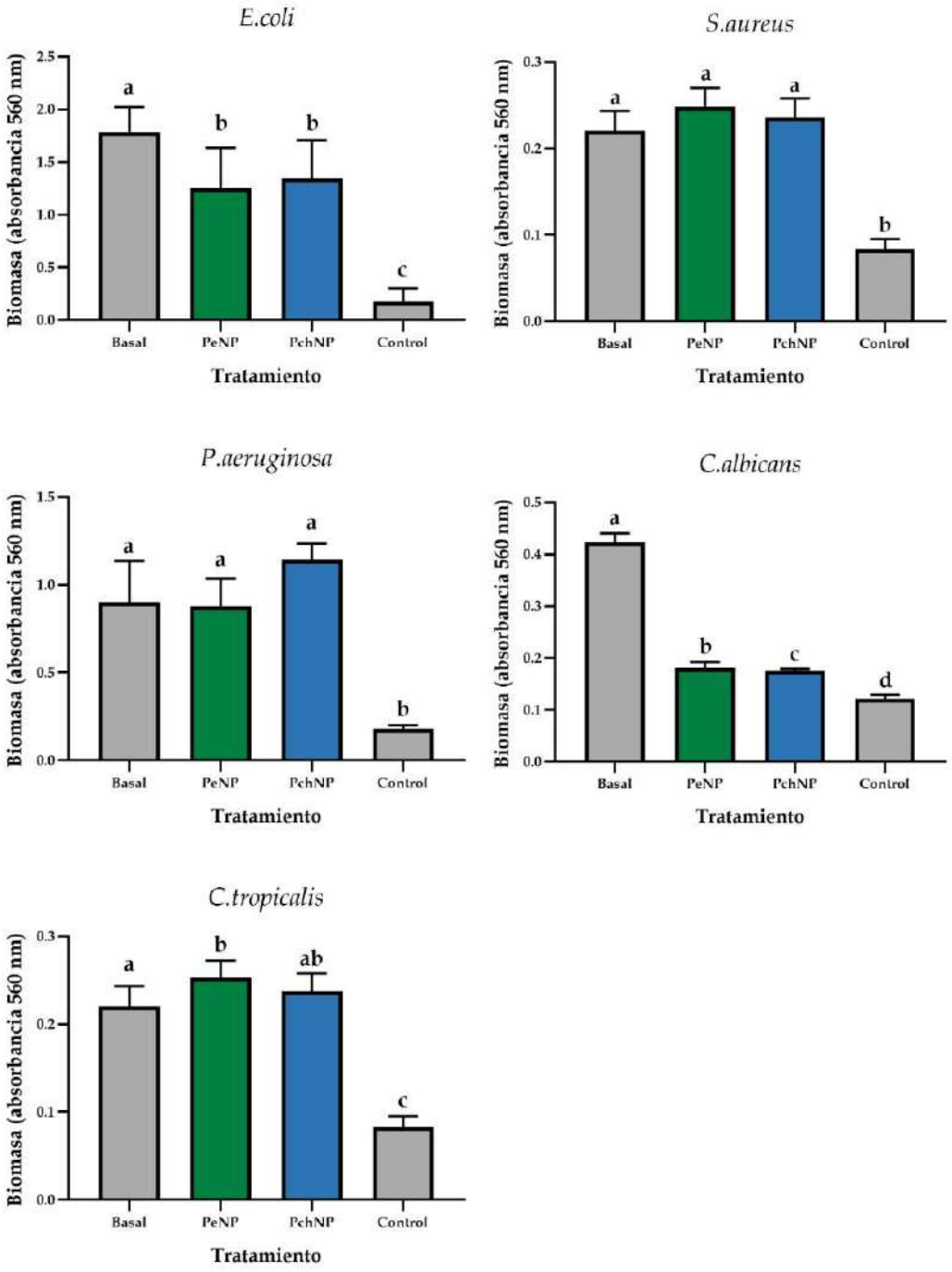


Figura 5.4. Erradicación de biofilms de diferentes bacterias y levaduras mediante diferentes tratamientos. Las diferentes letras representan diferencias significativas con un nivel de probabilidad $p<0.05$, de acuerdo al test ANOVA y test de Tukey. Basal: biofilm sin tratamiento. PeNP: biofilm tratado con PeNP (0.40 nM frente a *E. coli*; 0,58 nM frente a *C. albicans*). PchNP: biofilm tratado con PchNP (0.35 nM frente a *E.coli*; 0,30 nM frente a *C. albicans*). Control: sin biofilm.

Microscopía Raman Confocal.

La estructura de los biofilms, compuesta por proteínas, polisacáridos y otros elementos, puede ser identificada y caracterizada mediante la Microscopía Raman Confocal. El estudio de la interacción de las BNP con los biofilms se realizó para *E. coli* (**Figura 5.5**) y *C. albicans* (**Figura 5.6**) con ambas BNP ya que fueron capaces de erradicar los biofilms de ambos microorganismos. Además, se analizaron también los biofilms de *S. aureus* (**Figura 5.7**) tratados con PeNP para analizar mejor la interacción con las nanopartículas ya que estas no fueron capaces de erradicar el biofilm. Los principales cambios observados se encontraron en las regiones correspondientes a aminas I, II y III, carbohidratos y lípidos. La asignación de las bandas (**Tablas 5.1 a 5.3**) se realizó en base a estudios previos de MRC realizados con biofilms. Los resultados mostraron que la interacción de los biofilms de *E. coli* y *C. albicans* con las PeNP y las PchNP provocó una disminución en la intensidad de las bandas asignadas a proteínas, polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos (**Tablas 5.1 y 5.2**). En particular se encontró una disminución en la intensidad de la banda a 730 cm^{-1} asociada al ADN extracelular (Chao and Zhang, 2012) y en las bandas a 1280 cm^{-1} y 1380 cm^{-1} asociadas a los polisacáridos de la matriz extracelular (Gieroba et al., 2020).

En cuanto al análisis para los biofilms de *S. aureus* tratados con PeNP, los resultados mostraron un aumento en la intensidad de las bandas asociadas a proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y pared y membrana celulares en tanto que se vio una disminución en la intensidad de las bandas asociadas a los polisacáridos de la matriz extracelular (bandas a 1280 cm^{-1} y 1380 cm^{-1}) y algunas de las bandas asociadas a lípidos (**Tabla 5.3**).

Tabla 5.1. Asignaciones de las bandas Raman para los biofilms de *E. coli* basal y tratados con BNP

Asignación	Biomolécula	Referencia	Corrimiento Raman (cm-1)	Tratamiento con PeNP	Tratamiento con PchNP
Doblamiento COO^- o estiramiento C-S	Proteínas	(Chao and Zhang, 2012)	611	Aumenta	Disminuye
Estiramiento CS, twisting CC (tirosina)		(Chao and Zhang, 2012)	659	Aumenta	Aumenta
Estiramiento CN		(Chao and Zhang, 2012)	980	Disminuye	Disminuye
Fenilalanina		(Chao and Zhang, 2012)	1005	Disminuye	Disminuye
		(Kusić et al., 2015)			
Amida III		(Kusić et al., 2015)	1238	Disminuye	Disminuye
Doblamiento CH		(Chao and Zhang, 2012)	1320	Disminuye	Disminuye
Deformación CH_2/CH_3		(Kusić et al., 2015)	1450	Disminuye	Disminuye
Láminas β de Amidas I y II		(Gieroba et al., 2020)	1503	Disminuye	Disminuye
		(Gieroba et al., 2020)	1525	Disminuye	Disminuye
Amida II		(Chao and Zhang, 2012)	1570	Disminuye	Disminuye
Láminas β de Amidas I y II		Gieroba 2020	1607	Disminuye	Disminuye
Amida II		(Chao and Zhang, 2012)	1616	Aumenta	Disminuye
Láminas β de Amidas I y II		Gieroba 2020	1620	Disminuye	Disminuye
Amida I		(Kusić et al., 2015)	1669	Disminuye	Disminuye
Deformaciones de grupos laterales	Polisacáridos	(Gieroba et al., 2020)	790-950	Disminuye	Disminuye
Glucano y glucosa		(Gieroba et al., 2020)	950	Disminuye	Disminuye
		(Gieroba et al., 2020)	1020	Disminuye	Disminuye
Glucosa		(Gieroba et al., 2020)	1125	Disminuye	Disminuye

Polisacáridos polianiónicos de la matriz extracelular		(Gieroba et al., 2020)	1280	Disminuye	Disminuye
		(Gieroba et al., 2020)	1380	Disminuye	Disminuye
Guanina y adenina	Ácidos nucleicos	(Kusić et al., 2015)	690	Aumenta	Disminuye
eADN (ADN extracelular)		(Chao and Zhang, 2012)	730	Aumenta	Disminuye
Citosina y adenina		(Kusić et al., 2015)	778	Disminuye	Disminuye
O-P-O		(Chao and Zhang, 2012)	810	Disminuye	Disminuye
Guanina y adenina		Kusic 2015	1578	Disminuye	Disminuye
=C-C= en ácidos grasos insaturados	Lípidos	(Chao and Zhang, 2012)	1122	Disminuye	Disminuye
α-hélices de cadenas de poliproteínas		(Gieroba et al., 2020)	1276	Aumenta	Disminuye
CH_2/CH_3		(Gieroba et al., 2020)	1359	Disminuye	Disminuye
Estiramiento CN		(Gieroba et al., 2020)	1425	Disminuye	Disminuye
Deformación CH_2		(Chao and Zhang, 2012)	1445	Disminuye	Disminuye

Tabla 5.2. Asignaciones de las bandas Raman para los biofilms de *C. albicans* basal y tratados con BNP.

Asignación	Biomolécula	Referencia	Corrimiento Raman (cm^{-1})	Tratamiento con PeNP	Tratamiento con PchNP
Fenilalanina	Proteínas	(Kusić et al., 2015)	1004	Disminuye	Disminuye
Estiramiento en el plano de C-H (fenilalanina)		(Hrubanova et al., 2018)	1033	Aumenta	Aparece
Estiramiento C-N		(Samek et al., 2014)	1080-1095	Disminuye	Disminuye
Vibración del grupo PO_2		(Samek et al., 2014)	1080-1095	Disminuye	Disminuye
Estiramiento C-N		(Hrubanova et al., 2018)	1128	Disminuye	Disminuye
		(Hrubanova et al., 2018)	1209	Disminuye	Disminuye
Amida III		(Hrubanova et al., 2018)	1267-1270	Disminuye	Disminuye
Deformación CH_2		(Samek et al., 2014)	1440-1460	Aumenta	Disminuye
Amida I		(Hrubanova et al., 2018)	1660-1670	Disminuye	Aumenta
β-1.6-glucano (vibración del enlace glicosídico C-O-C de polisacáridos)	Polisacáridos	(Pezzotti et al., 2022)	890	Disminuye	Disminuye
α-1,6-glucano (estiramiento C-O-C)		(Pezzotti et al., 2022)	919	Aumenta	Disminuye
α-1,3-glucano (vibración del enlace glicosídico C-O-C de polisacáridos)		(Pezzotti et al., 2022)	941	Aumenta	Aparece
Polisacáridos polianiónicos de la matriz extracelular		(Gieroba et al., 2020)	1280	Disminuye	Disminuye
		(Gieroba et al., 2020)	1380	Aumenta	Aparece
eADN (ADN extracelular)	Ácidos nucleicos	(Chao and Zhang, 2012)	730	Disminuye	Disminuye
Estiramiento O-P-O de RNA		(Samek et al., 2014)	813	Disminuye	Aumenta
Estiramiento simétrico C-C-N	Lípidos	(Samek et al., 2014)	880	Aumenta	Disminuye
Estiramiento C-C		(Hrubanova et al., 2018)	1065	Disminuye	Igual
CH2 scissoring		(Hrubanova et al., 2018)	1456	Disminuye	Disminuye
Estiramiento C-C-C y C-O-C en polisacáridos	Quitina	(Pezzotti et al., 2022)	642	Aumenta	Aumenta

		(Pezzotti et al., 2022)	1056	Disminuye	Disminuye
		(Pezzotti et al., 2022)	1148	Aumenta	Aumenta
Modo de deformación del anillo en el plano	Ergosterol	(Pezzotti et al., 2022)	594	Disminuye	Disminuye
Modo de deformación del anillo y doblado CH		(Pezzotti et al., 2022)	713	Disminuye	Disminuye

Tabla 5.3. Asignaciones de las bandas Raman para los biofilms de *S. aureus* basal y tratados con PeNP.

Asignación	Biomolécula	Referencia	Corrimiento Raman (cm^{-1})	Tratamiento con PeNP
Fenilalanina	Proteínas	(Kusić et al., 2015)	1004	Aumenta
Láminas β de Amidas I y II		(Gieroba et al., 2020)	1503	Aumenta
		(Gieroba et al., 2020)	1525	Aumenta
		(Gieroba et al., 2020)	1620	Aumenta
Deformaciones de grupos laterales	Polisacáridos	(Gieroba et al., 2020)	790-950	Aumenta
Glucano y glucosa		(Gieroba et al., 2020)	950	Aumenta
		(Gieroba et al., 2020)	1020	Aumenta
Glucosa		(Gieroba et al., 2020)	1125	Disminuye
Polisacáridos polianiónicos de la matriz extracelular		(Gieroba et al., 2020)	1280	Disminuye
		(Gieroba et al., 2020)	1380	Disminuye
Guanina y adenina	Ácidos nucleicos	(Kusić et al., 2015)	690	Aumenta
eADN (ADN extracelular)		(Chao and Zhang, 2012)	730	Aumenta
α-hélices de cadenas de poliproteínas	Lípidos	(Gieroba et al., 2020)	1276	Disminuye
CH_2/CH_3		(Gieroba et al., 2020)	1359	Aumenta
Estiramiento CN		(Gieroba et al., 2020)	1425	Disminuye

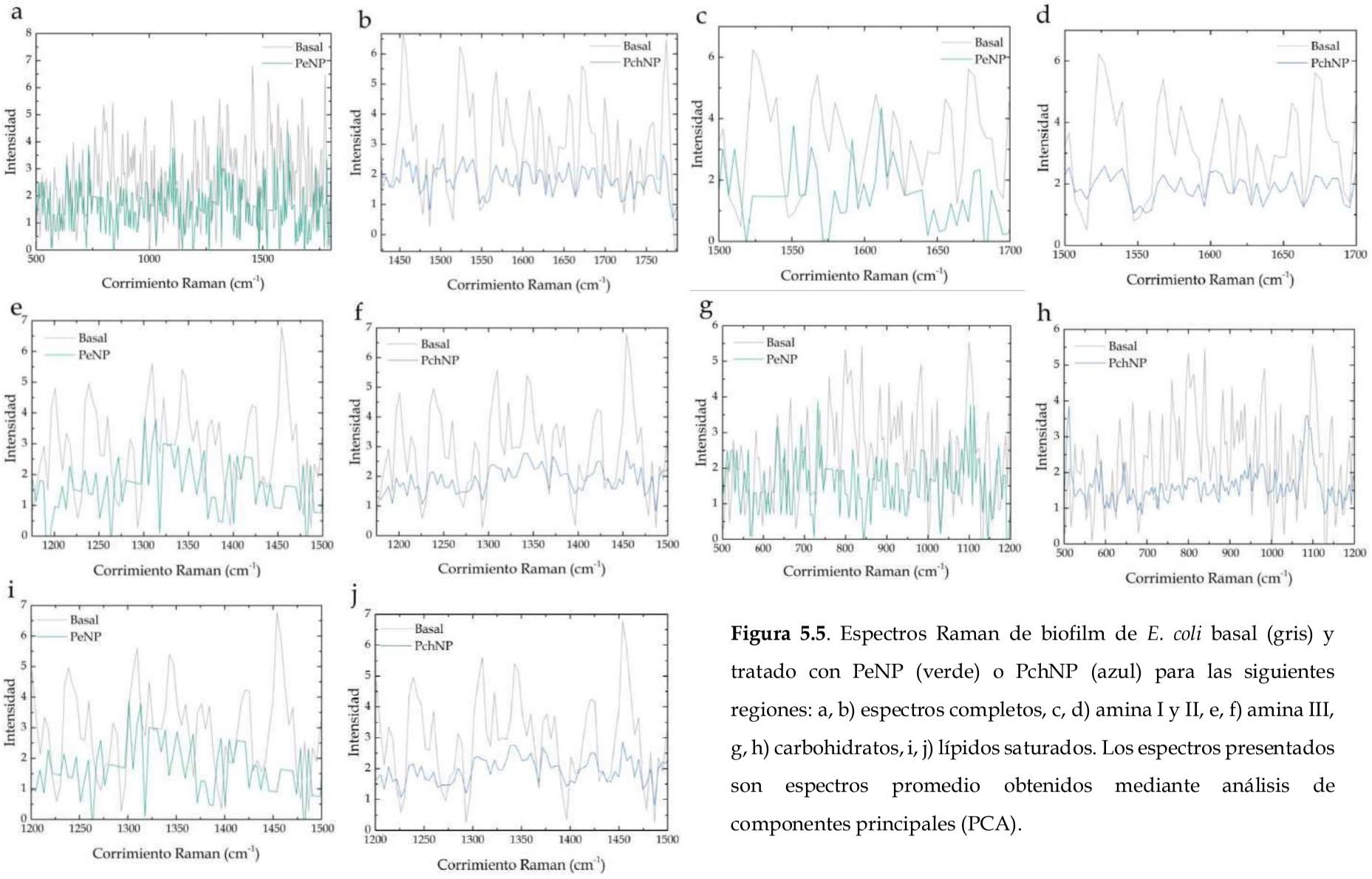


Figura 5.5. Espectros Raman de biofilm de *E. coli* basal (gris) y tratado con PeNP (verde) o PchNP (azul) para las siguientes regiones: a, b) espectros completos, c, d) amina I y II, e, f) amina III, g, h) carbohidratos, i, j) lípidos saturados. Los espectros presentados son espectros promedio obtenidos mediante análisis de componentes principales (PCA).

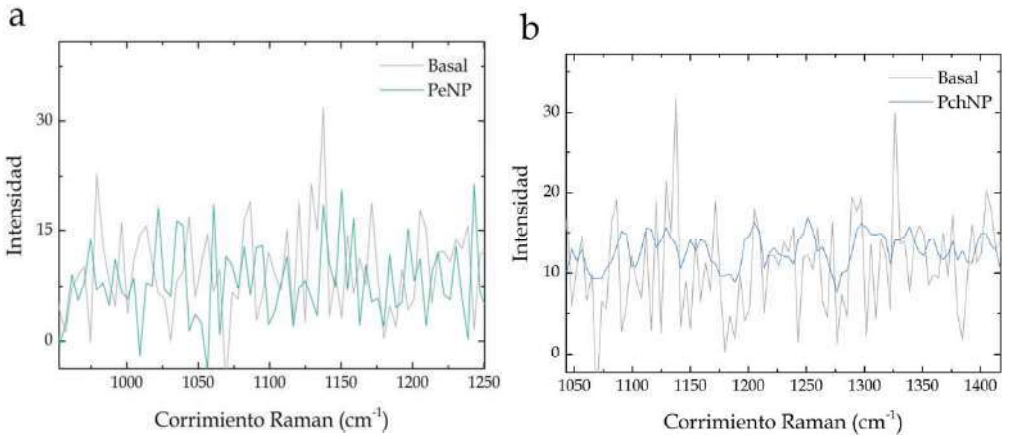


Figura 5.6. Espectros Raman de biofilm de *C. albicans* basal (gris) y tratado con PeNP (a) o PchNP (b). Los espectros presentados son espectros promedio obtenidos mediante análisis de componentes principales (PCA).

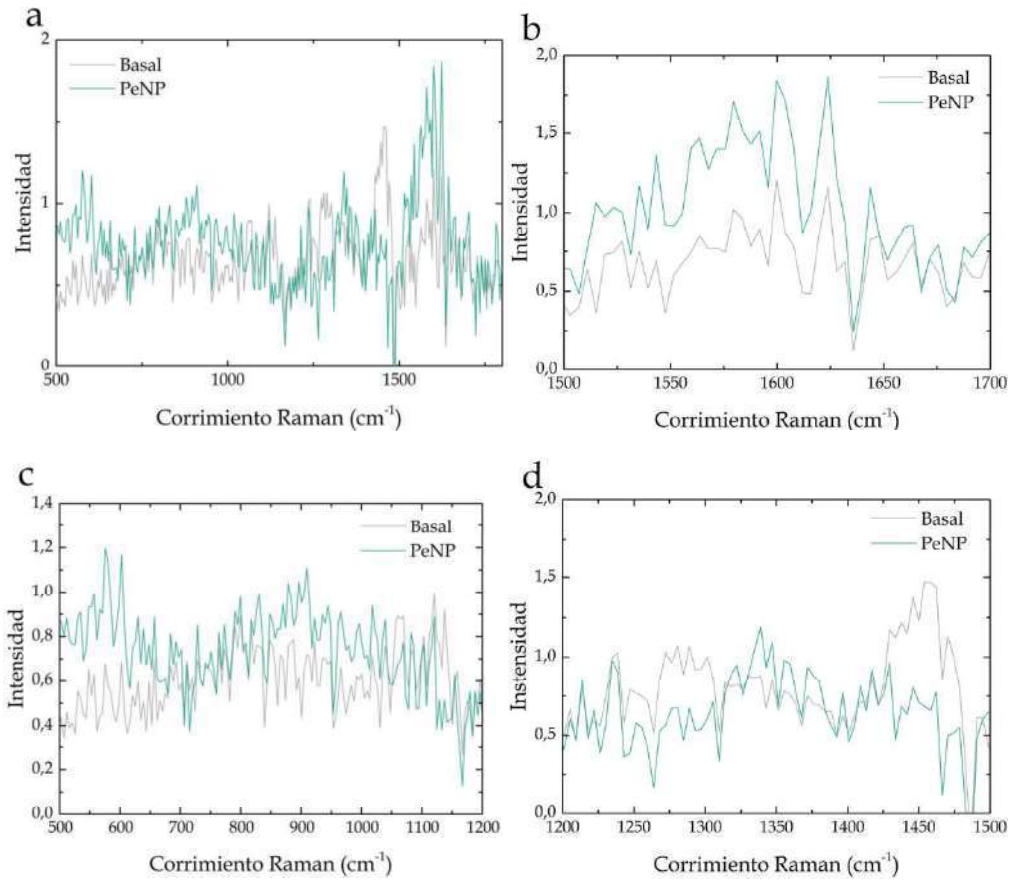


Figura 5.7. Espectros Raman de biofilm de *S. aureus* basal (gris) y tratado con PeNP (verde) para las siguientes regiones: a) espectros completos, b) amina I y II, c) carbohidratos, d) lípidos saturados. Los espectros presentados son espectros promedio obtenidos mediante análisis de componentes principales (PCA).

Para visualizar la interacción entre las BNP y los biofilms se obtuvieron imágenes hiperespectrales combinando bandas características a las células de *E. coli* (**Figura 5.8**) y *C. albicans* (**Figura 5.9**) con bandas específicas de los biofilms tales como el eADN para ambos microorganismos, los polisacáridos de la matriz de EPS para *E. coli* y las bandas asociadas a ergosterol y quitina para *C. albicans*. En todos los casos se obtuvieron también las imágenes de biofilm sin tratar con BNP. Los resultados muestran la disminución de las zonas con biomasa, eADN, EPS y ergosterol y quitina para *C. albicans* luego del tratamiento con las BNP.

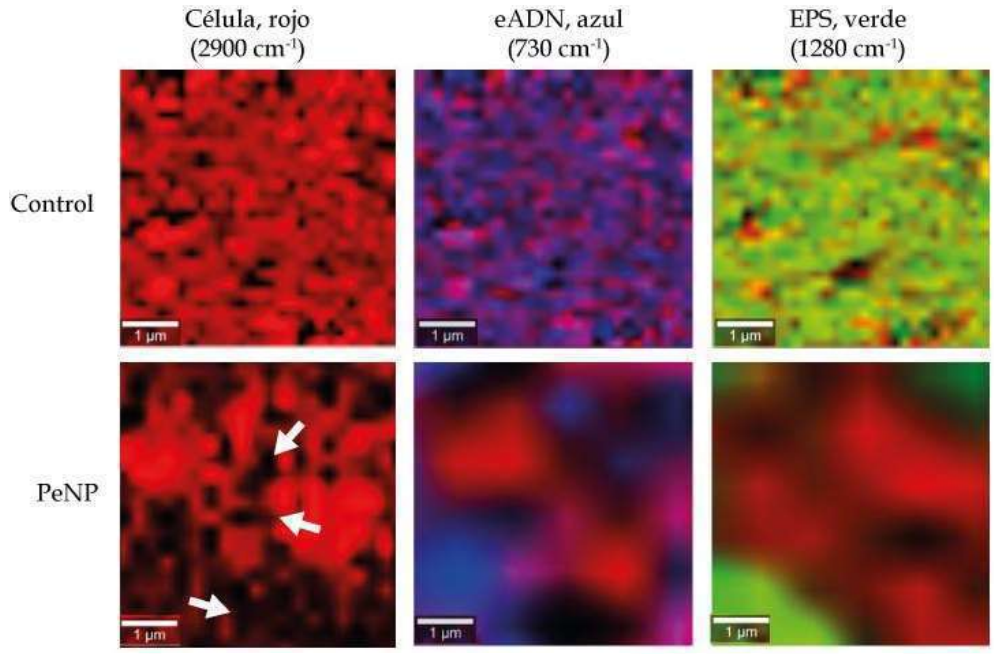


Figura 5.8. Imágenes de MRC obtenidas combinando las bandas correspondientes a las células de *E. coli* (rojo), las bandas asignadas a eADN (azul) y a EPS (verde). Control: biofilm sin tratamiento, PeNP: biofilm tratado con PeNP. Las flechas indican las zonas de la imagen donde no se observa biomasa microbiana (remoción de biofilm microbiano).

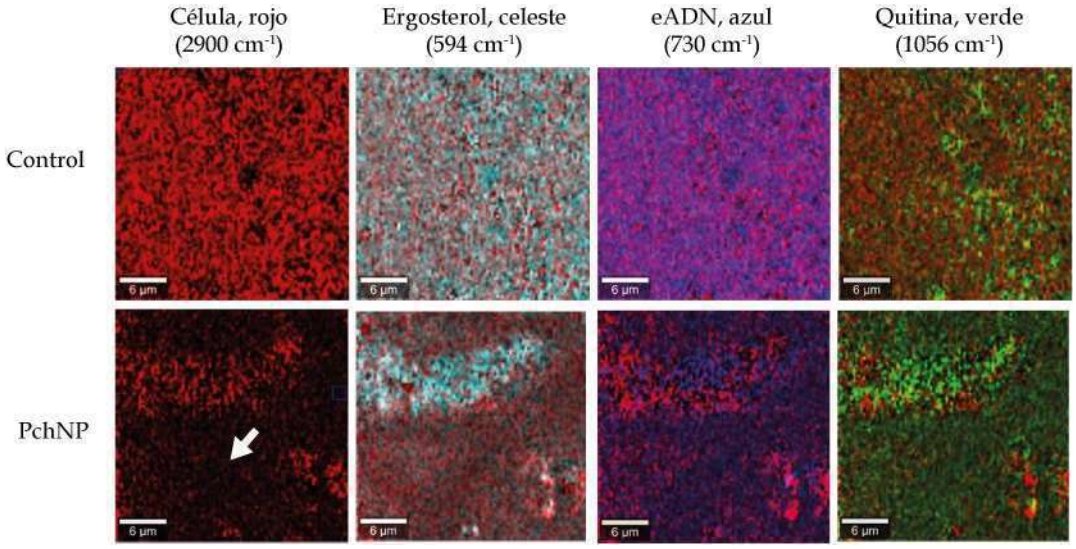


Figura 5.9. Imágenes de MRC obtenidas combinando las bandas correspondientes a las células de *C. albicans* (rojo), las bandas asignadas a eADN (azul), ergosterol (celeste) y quitina (verde). Control: biofilm sin tratamiento, PchNP: biofilm tratado con PchNP. Las flechas indican las zonas de la imagen donde no se observa biomasa microbiana (remoción de biofilm microbiano).

Microscopía de Fuerza Atómica.

Los resultados obtenidos por Microscopía Raman Confocal de los biofilms de *E. coli* tratados con PchNP se complementaron con Microscopía de Fuerza Atómica (**Figura 5.10**). Se observó que el tratamiento con las nanopartículas generó una disrupción de los biofilms. Al igual que en los análisis mediante Microscopía Raman Confocal, para analizar mejor los cambios producidos por las PchNP en el biofilm se analizó también el tratamiento de los biofilms de *S. aureus* con PchNP (**Figura 5.11**), que no presentó capacidad de erradicar. En concordancia con lo obtenido por la Microscopía Raman Confocal, los resultados mostraron un aumento en la población celular del biofilm luego del tratamiento con las PchNP.

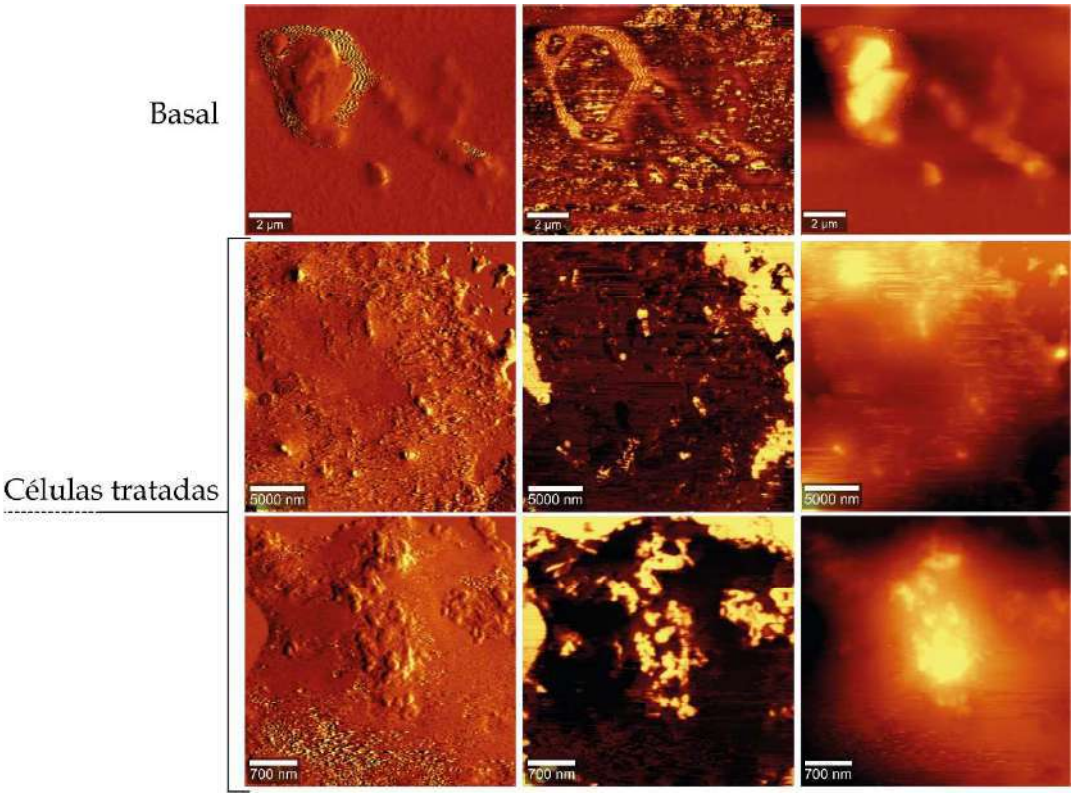


Figura 5.10. Imagen de amplitud, topografía y contraste de fases obtenidas mediante Microscopía de Fuerza Atómica, mostrando los cambios en la morfología de los biofilms de *E. coli* luego de exponerlos a PchNP.

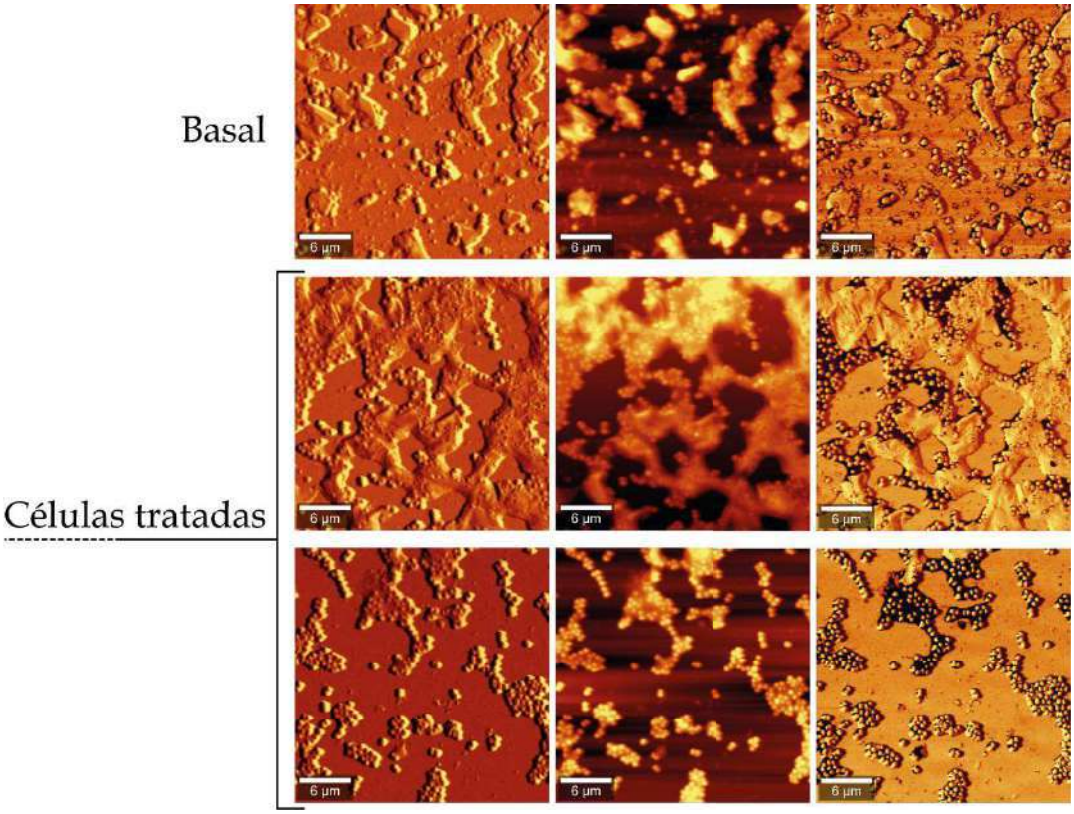


Figura 5.11. Imagen de amplitud, topografía y contraste de fases obtenidas mediante Microscopía de Fuerza Atómica de los biofilms de *S. aureus* basal y tratados con PchNP.

Inhibición de biofilms.

Determinación de la capacidad para Inhibir la formación de biofilms.

En las **Figura 5.12** y **5.13** se muestran los resultados obtenidos para la inhibición de la formación de biofilms para las bacterias *E. coli, S. aureus, P. aeruginosa* y las levaduras *C. albicans* y *C. tropicalis*. Los resultados mostraron que las PeNP fueron capaces de inhibir en diferentes porcentajes la formación de los biofilms de *C. albicans* y *C. tropicalis* en tanto que las PchNP fueron capaces de inhibir la formación de los biofilms de *E. coli, P. aeruginosa, C. albicans* y *C. tropicalis*. A pesar de esto, únicamente se pudo determinar la CIBM (concentración que inhibe al menos el 90% de la formación de biofilm) para el biofilm de *C. albicans* tratado con las PeNP (CIBM = 0.145 nM)

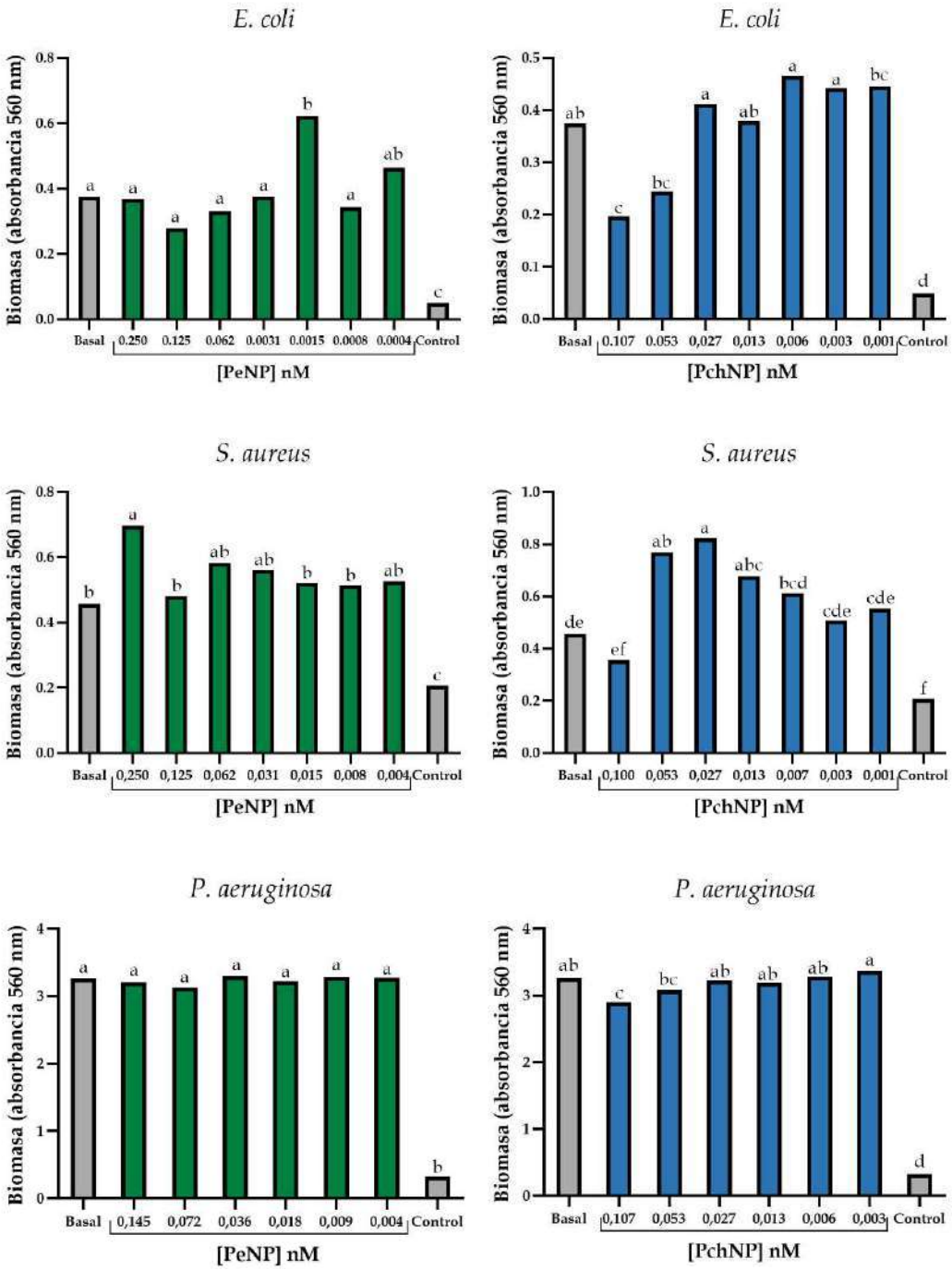


Figura 5.12. Inhibición de biofilms bacterianos a diferentes concentraciones de AgNP. Las diferentes letras representan diferencias significativas con un nivel de probabilidad $p<0.05$, de acuerdo al test ANOVA y test de Tukey. Basal: biofilm sin tratamiento. Verde: biofilm tratado con PeNP. Azul: biofilm tratado con PchNP. Control: sin biofilm.

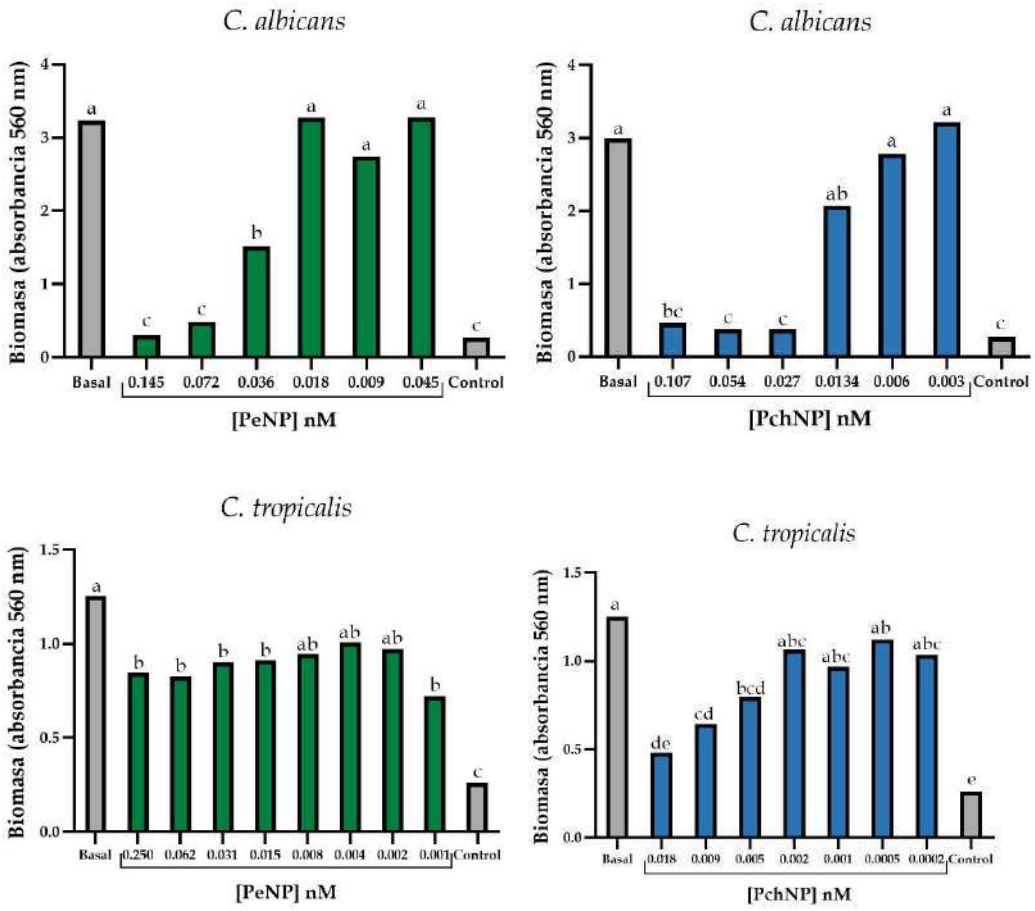


Figura 5.13. Inhibición de biofilms de levaduras a diferentes concentraciones de AgNP. Las diferentes letras representan diferencias significativas con un nivel de probabilidad $p<0.05$, de acuerdo al test ANOVA y test de Tukey. Basal: biofilm sin tratamiento. Verde: biofilm tratado con PeNP. Azul: biofilm tratado con PchNP. Control: sin biofilm.

Microscopía Láser Confocal.

Como modo de visualizar la inhibición de los biofilm de las levaduras se estudió, mediante Microscopía Laser Confocal, el tratamiento con PchNP de los biofilms de *C. albicans* (**Figura 5.14**) y *C. tropicalis* (**Figura 5.15**). Las imágenes muestran como el tratamiento de ambos biofilms generó una inhibición de su formación, así como una disminución en el contenido de pseudohifas, importantes para el desarrollo y maduración de la estructura.

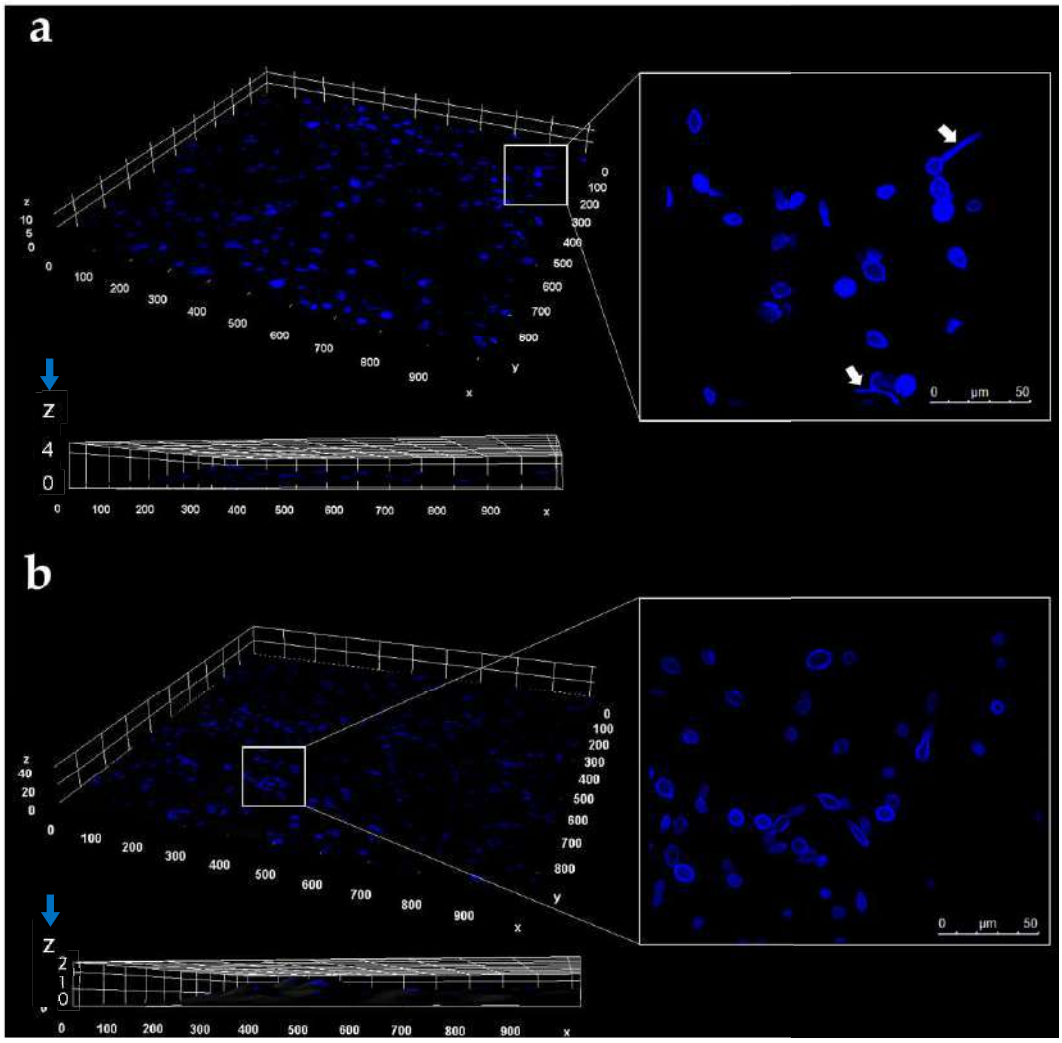


Figura 5.14. Imágenes de Microscopía Láser Confocal obtenidas para los biofilm de *C. albicans* basal (a) y tratadas con PchNP (b), mostrando las diferencias en el grosor (eje z, flechas azules) del biofilm y en el crecimiento filamentoso (flechas blancas).

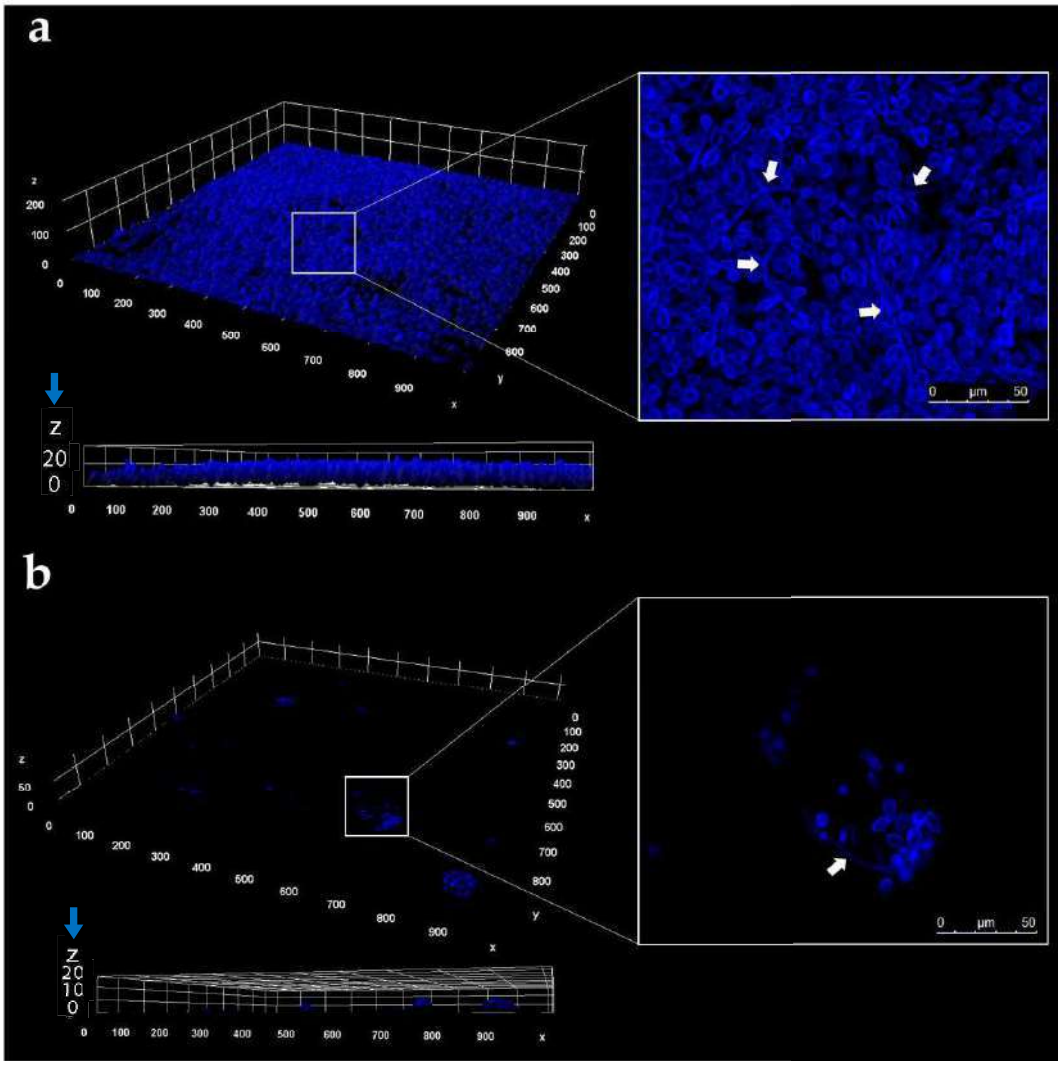


Figura 5.15. Imágenes de Microscopía Láser Confocal obtenidas para los biofilm de *C. tropicalis* basal (a) y tratadas con PchNP (b), mostrando las diferencias en el grosor del biofilm (eje z, flechas azules) y en el crecimiento filamentoso (flechas blancas).

DISCUSIÓN

La capacidad de los microorganismos para formar biofilms representa un desafío significativo para la salud ya que estas estructuras presentan características tales como la resistencia al estrés ambiental, a antibióticos, a la respuesta inmune del huésped y la capacidad de mantener infecciones persistentes (Nadar et al., 2022). Sumado a esto, el material genético en los biofilms tiende a intercambiarse con alta frecuencia debido a la proximidad celular (Paraje, 2011). Aproximadamente el 65% de las infecciones bacterianas se vinculan con la presencia de biofilms (Jamal et al., 2018) y se desarrollan tanto en tejidos vivos como en dispositivos médicos, ocasionando infecciones crónicas. Esto resalta la urgencia de comprender mejor los mecanismos de resistencia de estas estructuras para ofrecer tratamientos más efectivos y desarrollar nuevas fórmulas antimicrobianas.

En esta tesis se llevó a cabo la evaluación de la eficacia antibiofilm de las nanopartículas de plata biogénicas (BNP) mediante la tinción de la biomasa con cristal violeta. Al contrastar las mediciones iniciales del biofilm sin BNP con aquellos tratados, se exploró la capacidad de estas nanopartículas para combatir los biofilms.

En contraste con la actividad antimicrobiana observada sobre células planctónicas (como se describe en el **Capítulo III**), las BNP no exhibieron actividad antimicrobiana contra todos los biofilms. Tanto las PeNP como las PchNP demostraron ser efectivas en la erradicación de los biofilms formados por *E. coli* y *C. albicans*, pero no mostraron eficacia contra los biofilms de *S. aureus, P. aeruginosa y C. tropicalis*. Esto podría atribuirse a una potencial capacidad de penetración diferencial en la estructura del biofilm por parte de las BNP, relacionada con variaciones en la matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS). La presencia de la matriz de EPS puede influir en la actividad de las sustancias antimicrobianas, retardando su penetración o reaccionando con el agente, alterando así su efectividad (Sharma et al., 2023). Aún más, algunos estudios indican que *C. tropicalis* presenta mayor adherencia a ciertas superficies que el resto de las especies de *Candida* así como una mayor tolerancia a drogas

antifúngicas gracias a las proteínas del EPS (de Souza et al., 2023), lo cual también respalda el hecho de que las BNP evaluadas no hayan tenido capacidad de erradicar los biofilms de *C. tropicalis* pero sí los de *C. albicans*.

En particular para el caso de *S. aureus*, si bien los resultados de actividad antibiofilm no fueron auspiciosos en las condiciones evaluadas, es importante considerar que ha sido ampliamente demostrado que conjugar AgNP con otros antimicrobianos puede ser muy efectivo para potenciar su acción (Montazeri et al., 2020). Por ejemplo, aunque la nisina es un péptido antimicrobiano muy eficaz a bajas concentraciones frente a células planctónicas de *S. aureus,* no lo es así para inhibir la formación del biofilm de *S. aureus*. Es así que teniendo en cuenta como antecedente los resultados de esta tesis, nuestro grupo de investigación demostró que nanoconjugados de PchNP con nisina produjeron la inhibición del biofilm de *S. aureus* a concentraciones tan bajas como 0.009 µg/mL, y a concentraciones más elevadas inhibió más del 90% de la biomasa del biofilm (Zimet et al., 2021).

La evaluación de la actividad contra los biofilms de *E. coli* y *C. albicans* se complementó mediante estudios de erradicación utilizando Microscopía Raman Confocal. Se compararon biofilms sin tratamiento (basal) con aquellos tratados con BNP, evidenciando diferencias significativas en la composición de lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos, así como en los componentes de la pared y membrana celular. Además, para una comprensión más exhaustiva de los factores que influyen en la actividad antibiofilm, se examinaron los biofilms de *S. aureus*, tanto en su estado basal como después de ser tratados con PeNP (las cuales no produjeron erradicación), utilizando la misma técnica.

En el caso de los biofilms de *E. coli* y *C. albicans*, el tratamiento con BNP produjo una marcada reducción en la intensidad de las bandas vinculadas a los lípidos. Este descenso se asocia con cambios en la cantidad y composición de los lípidos durante la maduración de los biofilms, especialmente en relación con la saturación de ácidos grasos (Gieroba et al., 2020). Los lípidos desempeñan una función esencial al proporcionar el componente hidrofóbico crucial en la matriz extracelular, facilitando así la migración celular desde la superficie y promoviendo la formación de microcolonias para el crecimiento continuo

(Gieroba et al., 2020). En lo que respecta al biofilm de *S. aureus*, el tratamiento con las PeNP también ocasionó variaciones en los componentes lipídicos, con algunas bandas incrementando su intensidad y otras disminuyendo.

En relación con las proteínas, se detectaron diferencias en las intensidades de las bandas asociadas a amidas I, II y III, lo que sugiere una posible variación en las propiedades adhesivas del biofilm debido al tratamiento. Estas proteínas son fundamentales para mantener la estructura del biofilm y asegurar su supervivencia al permitir el acceso a nutrientes. En los biofilms de *E. coli* y *C. albicans*, las bandas vinculadas a proteínas disminuyeron su intensidad tras el tratamiento con BNP, sugiriendo un efecto sobre la estructura del biofilm. Mientras tanto, en el caso de *S. aureus*, se observó un aumento en la intensidad de estas bandas, indicando una mayor síntesis de proteínas que favorecen tanto la adhesión como el mantenimiento de la estructura. Las láminas beta, una estructura secundaria de las proteínas, desempeñan múltiples funciones y podrían estar implicadas en la virulencia del biofilm (Gieroba et al., 2020). Los resultados obtenidos respaldan esta idea, ya que las bandas asociadas a láminas beta disminuyeron su intensidad en los espectros Raman de los biofilms de *E. coli* después del tratamiento, pero aumentaron en los biofilms de *S. aureus* tratados con PeNP.

En relación con los azúcares, tras el tratamiento de los biofilms de *E. coli* se evidenció una disminución en la intensidad de la región de los espectros Raman asociada a las deformaciones de los grupos laterales de los carbohidratos (790-950 cm-1), características de estos biofilms. Se encontraron diferencias notables, tanto para los biofilms de *E. coli* como los de *C. albicans,* en la intensidad de las bandas vinculadas a los polisacáridos polianiónicos presentes en la matriz extracelular, así como en la de las bandas asociadas a glucosa y glucanos, elementos fundamentales para la adhesión y el mantenimiento estructural del biofilm (Gieroba et al., 2020).

En los biofilms de *S. aureus* tratados con PeNP, se detectó un aumento en la intensidad de las bandas relacionadas con la glucosa y las deformaciones de los grupos laterales, indicando un fortalecimiento en la adhesión y mantenimiento

estructural del biofilm. Contrariamente, se registró una disminución en la intensidad de las bandas asociadas a la glucosa y a los polisacáridos polianiónicos.

Además, se identificaron otras áreas con diferencias notables después del tratamiento, como aquellas relacionadas con ácidos nucleicos y específicamente para *C. albicans*, una disminución en la intensidad de las bandas asignadas a componentes de la pared celular. En los biofilms de *E. coli* y *C. albicans* tratados con BNP, se observó una disminución en la intensidad de la mayoría de las bandas en los espectros Raman, mientras que en los biofilms de *S. aureus* tratados con PeNP las bandas asociadas a lípidos aumentaron su intensidad. Es de destacar que la banda a 730 cm^{-1} que en células planctónicas se asigna al ADN (Haq et al., 2023), en biofilms se asigna al ADN extracelular (eADN). Esto es debido a que el eADN forma parte de la matriz de EPS (como lo observado en las imágenes hiperespectrales en las **Figuras 5.8** y **5.9** de **Resultados**) por lo que la molécula está más expuesta al láser y por tanto contribuye mucho más a la intensidad de la banda que el ADN celular (Chao and Zhang, 2012). En ese sentido es importante notar que en la mayoría de los casos la banda de eADN disminuyó su intensidad sugiriendo que las BNP afectan directamente a la matriz de EPS. En el caso de los biofilms *E. coli* tratados con PeNP, la banda asignada al eADN aumenta su intensidad lo que podría significar que se está liberando una mayor cantidad de esta biomolécula para aumentar la estabilidad del biofilm (Atriwal et al., 2021). Esto es respaldado por el tratamiento del biofilm de *S. aureus* con PeNP en el que aumenta la intensidad de la banda asignada a eADN a pesar de que no se logró una erradicación.

El aumento de las bandas en los espectros Raman de los biofilms de *S. aureus* después del tratamiento con PeNP se debe a la utilización de una concentración del agente que no supera el umbral necesario para la erradicación (Guo et al., 2019). Bajo esta concentración, las células perciben la amenaza y aumentan la producción de proteínas, lipopolisacáridos y factores de virulencia para reforzar sus defensas y evitar el ataque del agente. Cuando se incrementa la concentración para superar este umbral y lograr la erradicación del biofilm (como en el caso de

E. coli y *C. albicans*), el tratamiento con BNP provoca una disminución en la intensidad de las bandas asociadas a proteínas, azúcares, lípidos, ácidos nucleicos y componentes de la pared celular. Estos cambios afectan no solo la adherencia, sino también el mantenimiento de la estructura del biofilm. Estos resultados son concordantes con los mencionado por otros autores, que sugieren que el mecanismo de acción de las AgNP ocurre por la unión de estas al EPS, penetrando la estructura del biofilm y modificando su arquitectura lo que provoca daño en la pared celular, en la membrana y en la formación de la matriz de EPS (de Lacerda Coriolano et al., 2021).

Los resultados previamente mencionados para *E. coli* y *S. aureus* se complementaron además con Microscopía de Fuerza Atómica, permitiendo la observación de la disrupción de la estructura de los biofilms de *E. coli* tras el tratamiento con PchNP, pero no se evidenció lo mismo en los biofilms tratados de *S. aureus*.

En base a los resultados obtenidos se propone el mecanismo utilizado por las BNP para erradicar biofilms (**Figura 5.16**):

i) Las BNP interaccionan con la matriz de EPS afectando su estructura por la interacción con polisacáridos, proteínas y ADN extracelular

ii) La interacción de las BNP con lípidos y carbohidratos de la matriz de EPS disminuye la maduración del biofilm e interrumpe la migración de microcolonias y su adherencia.

iii) Finalmente, las BNP pueden penetrar al interior del biofilm por la desintegración de la matriz de EPS y actuar sobre las células microbianas.

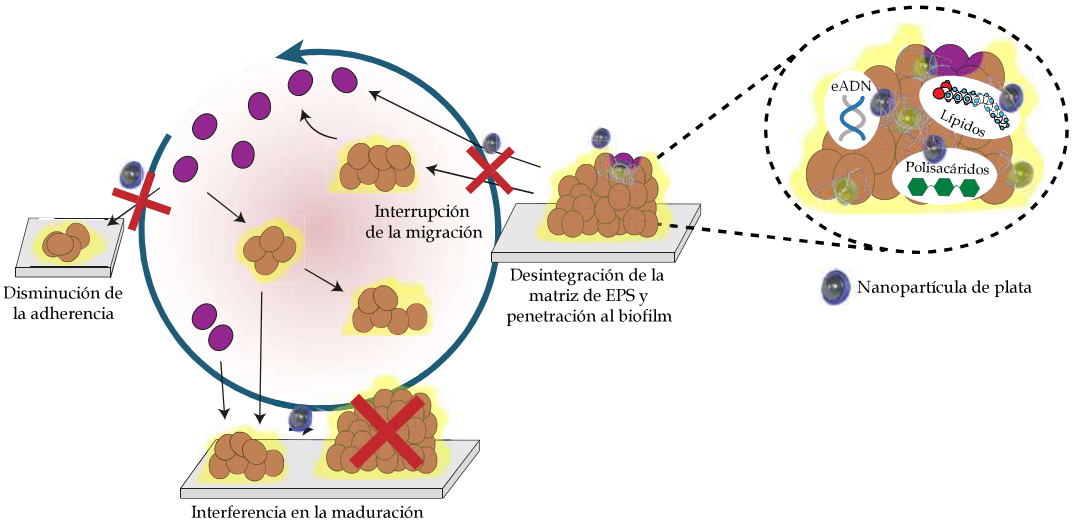


Figura 5.16. Mecanismo de erradicación de biofilms propuesto para las BPN en base a los resultados obtenidos.

Además de investigar la erradicación de biofilms, se exploró la capacidad de las AgNP para inhibir la formación de biofilms bacterianos y fúngicos mediante la técnica del cristal violeta. Ambas AgNP demostraron capacidad para inhibir la formación de los biofilms de *C. albicans* y *C. tropicalis*. Además, las PchNP exhibieron actividad inhibitoria contra los biofilms de *P. aeruginosa* y *E. coli*. Sorprendentemente, las PeNP no lograron inhibir la formación de biofilms en *E. coli* a pesar de su capacidad para erradicar los biofilms ya formados en tanto que lo contrario sucede para las PchNP que, aunque en un bajo porcentaje, fueron capaces de inhibir la formación de los biofilms de *P. aeruginosa* aun cuando no fueron capaces de erradicar los biofilms ya formados. Este caso podría explicarse si el mecanismo de acción de las PchNP en los biofilms de *P. aeruginosa* fuera la interferencia con las señales de QS (por ejemplo, mediante la molécula de piocianina) (Bodelón et al., 2016). Si este fuera el caso, las PchNP podrían interrumpir la formación de los biofilms, pero no podrían erradicarlos una vez que ya estuvieran formados. Lo mismo sucede para los biofilms de *C. tropicalis,* donde las BNP no fueron capaces de erradicar los biofilms ya formados, pero si inhibieron su formación.

La etapa crítica en la formación de los biofilms de *C. tropicalis* es el desarrollo de pseudohifas, un proceso crucial para su formación y maduración (de Souza et al., 2023). Una vez formado el biofilm, comienza la fase de dispersión, donde las levaduras del biofilm se separan y luego colonizan e infectan otros sitios. Estas estructuras se visualizaron en los resultados de esta investigación a través de la Microscopía Láser Confocal. Se observó claramente que en el biofilm basal, el contenido de hifas era significativamente mayor que en los biofilms tratados, tanto para *C. albicans* como para *C. tropicalis*, siendo esta diferencia más notable en el último caso.

CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluó la capacidad antibiofilm de las BNP sintetizadas en el **Capítulo I**, frente a biofilms de bacterias (*Escherichia coli, Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*) y levaduras (*Candida albicans* y *Candida tropicalis*). Los estudios por MRC y AFM fueron complementarios, demostrando la utilidad de estas herramientas para el estudio de biofilms microbianos. Los resultados mostraron que el tratamiento con las nanopartículas generó cambios a nivel de carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y componentes de la pared y membrana celular, llevando a la disrupción de la estructura de los biofilms de *E. coli, C. albicans* y *S. aureus*.

Se estudió también la capacidad de las BNP de inhibir la formación de los biofilms de *E. coli, S. aureus, P. aeruginosa, C. albicans* y *C. tropicalis*. La formación de los biofilms de *C. albicans* y *C. tropiclalis* fue inhibida por ambas nanopartículas en tanto que las PchNP tuvieron además la capacidad para inhibir la formación de los biofilms de *E. coli* y *P. aeruginosa.* Las observaciones y análisis realizados por Microscopía Láser Confocal evidenciaron que el tratamiento con las PchNP provocó una disminución en el contenido de pseudohifas, críticas para el desarrollo eficaz de los biofilms de *C. albicans* y *C. tropicalis*.

Candida albicans fue el microorganismo más sensible a la acción de las BNP ya que las mismas fueron capaces tanto de erradicar los biofilms ya formados como de inhibir la formación de los mismos.

Capítulo VI

Ningún hombre es una isla entera por sí mismo. Cada hombre es una pieza del continente, una parte del todo.

JOHN DONNE, ***Las campanas doblan por ti***

TOXICIDAD

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, ha surgido un creciente interés en la síntesis biológica de nanopartículas de plata (bio-AgNP) a partir de microorganismos y plantas. Este enfoque ha ganado relevancia debido a las ventajas que ofrece en comparación con los métodos convencionales de síntesis, como los químicos y físicos. Además, las bio-AgNP exhiben notables propiedades antimicrobianas, antibiofilm, anticancerígenas, antiinflamatorias, entre otras, según lo evidencian investigaciones recientes (Rajan et al., 2022; Luceri et al., 2023; Sharma et al., 2023; Magdy et al., 2024). En ese sentido, las bio-AgNP han mostrado efectividad para reducir la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer cervical HeLa (Al-Sheddi et al., 2018; Shejawal et al., 2021), cáncer de colon HT-29 (Shejawal et al., 2021; Kumar et al., 2022), cáncer hepático HEPG2 (Ottoni et al., 2017), cáncer de mama MCF-7 (Vasanth et al., 2023) y adenocarcinoma de pulmón A549 siendo incluso más efectivas a concentraciones menores que los medicamentos anticancerígenos actuales (Noorbazargan et al., 2021; Ali et al., 2023; Vasanth et al., 2023). El uso de bio-AgNP puede contribuir al desarrollo de un método biocompatible para el tratamiento del cáncer, alternativo a los agentes de quimioterapia actuales que presentan efectos secundarios tóxicos e indeseables.

Por otro lado, aunque las bio-AgNP (y las AgNP en general) presentan un considerable potencial para su aplicación, sus posibles efectos tóxicos deben ser tomados en cuenta e investigados. En el contexto de considerar la terapia antimicrobiana o anticancerígena utilizando bio-AgNP, resulta fundamental asegurar que estas nanopartículas no causen daño a las células sanas del organismo. Inicialmente, las investigaciones sobre AgNP se basaban principalmente en la síntesis, caracterización y aplicaciones, pero trabajos recientes han comenzado a evaluar la toxicidad de estos nanosistemas (Ferdous and Nemmar, 2020) (**Figura 6.1**). Aunque depende de las propiedades de cada tipo de AgNP, las vías más comunes de exposición son la dérmica, la oral y la inhalatoria, siendo esta última la de principales efectos dañinos para la salud (Ferdous and Nemmar, 2020; Rajan et al., 2022; Zhang et al., 2022) dada la tendencia de las AgNP a bioacumularse en órganos como riñón, pulmones,

hígado y cerebro, en dónde pueden causar daño a células y tejidos (Barua and Mitragotri, 2014; Ferdous and Nemmar, 2020; Waktole and Waktole, 2023).

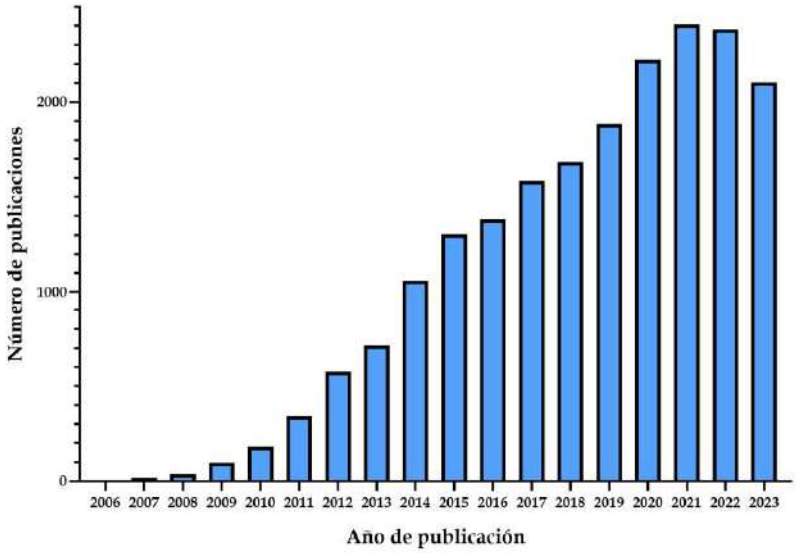


Figura 6.1. Resultados de la búsqueda de trabajos en la web *Scopus* usando las palabras claves "nanopartículas de plata" y "nanotoxicidad". Fecha de búsqueda: 15 de enero de 2024).

Dado que las mismas propiedades responsables del amplio rango de aplicaciones podrían estar implicadas en ocasionar daños a la salud o al ambiente, al evaluar la seguridad de las AgNP es crucial tener en cuenta parámetros tales como el tamaño, la distribución de tamaños, la morfología, el estado de agregación, los agentes estabilizantes de la superficie y la carga superficial (Krystek et al., 2015; Noga et al., 2023). El tamaño de las AgNP influye en gran medida en la interacción con las células. Se han realizado diversos estudios de toxicidad dependiente del tamaño de AgNP en distintas líneas celulares. Por ejemplo, en un trabajo realizado por Liu et al. (2010) utilizando las líneas celulares A549, HepG2, MCF-7 y SGC-7901 se encontró que las AgNP de 5 nm tenían mayores efectos citotóxicos que las de 20 y 50 nm.

Algunos reportes indican que las AgNP generan citotoxicidad al penetrar en el citoplasma y las mitocondrias, provocando mutaciones cromosómicas y daños genotóxicos en un intervalo de 24 a 72 horas después del tratamiento. Estos daños

genotóxicos podrían estar asociados al estrés oxidativo al formar aductos y causar roturas en el ADN (Jaswal and Gupta, 2023; Vasanth et al., 2023). En ese sentido, algunas bio-AgNP pueden presentar ventajas en cuanto a la biocompatibilidad dada por su cubierta proteica, no sólo a nivel de una menor toxicidad que las AgNP de síntesis físicas o químicas, sino que la literatura indica que pueden tener efectos protectores tanto en el ambiente como en la salud humana (Jaswal and Gupta, 2023). Otro parámetro a considerarse para evaluar la toxicidad de las AgNP es la dosis. Diversos estudios señalan que a dosis bajas las AgNP no ejercerían efecto citotóxico (Durán et al., 2019; Rajan et al., 2022).

En la actualidad la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) ha aprobado el uso de AgNP en dispositivos médicos, pero siempre y cuando cumplan determinados estándares de seguridad (Nelson et al., 2020). También la Unión Europea ha regulado el uso de las AgNP en varios productos como cosméticos y envases de alimentos (Schneider, 2017).

Diversos estudios han demostrado la biocompatibilidad de las bio-AgNP. En un estudio realizado por Oves et al. (2013) se demostró mayor toxicidad frente a la línea celular HeLa que frente esplenocitos y nula toxicidad frente a eritrocitos, además de una toxicidad mínima *in vivo* contra células hepáticas. También se estudió la interacción de bio-AgNP frente a células Vero sanas (Samuel et al., 2023) sin encontrar efectos citotóxicos. En otro estudio realizado por Ottoni et al. (2017) para bio-AgNP sintetizadas a partir del hongo *A. tubingensis* frente a células endoteliales HUVECs y fibroblastos humanos sanos, se encontró citotoxicidad a las 24 horas de tratamiento sólo a las concentraciones más elevadas (1.25 y 2.5 µM).

Sin dudas, las ventajas de las nanopartículas de plata en cuanto a su poder antimicrobiano son innegables. En un estudio realizado *in vivo* en heridas de ratones infectadas con *Staphylococcus pseudointermedius* resistente a meticilina se probó la capacidad de eliminar las heridas infectadas mediante la aplicación de geles de AgNP en un plazo de 7 días (Thammawithan et al., 2021). Los resultados mostraron que la aplicación del gel con AgNP redujo la formación de pus y favoreció la desaparición de cicatrices. En otro estudio *in vivo* realizado en

ratones se utilizaron bio-AgNP como adyuvantes en una vacuna contra el virus de la rabia sin observar efectos tóxicos en el organismo (Asgary et al., 2016).

Otro aspecto a considerar cuando se trata de evitar la toxicidad de las AgNP es la capacidad de funcionalizarse con diferentes antimicrobianos para lograr un efecto sinérgico, disminuyendo la dosis utilizada de AgNP. En un estudio en el que se conjugaron AgNP junto con fluconazol (antifúngico) y florfenicol (antibacteriano), el conjugado fue quien mostró mayor poder para inhibir el crecimiento microbiano (Hassan, 2016). En otro estudio se probaron bio-AgNP conjugadas con nisina (antibacteriano), mostrando mayor poder inhibitorio frente a células de *E. coli* y biofilms de *S. aureus* que la bio-AgNP y la nisina solas (Zimet et al., 2021). Los resultados obtenidos por ambos autores muestran que la conjugación con antimicrobianos permitiría disminuir la dosis de AgNP utilizadas y así evitar los efectos tóxicos que pudieran presentarse.

La toxicidad que las AgNP puedan tener en diversos ecosistemas debe ser investigada para cada caso en particular y frente a diversos sistemas biológicos dados los resultados dispares que se encuentran en la literatura (Gopinath et al., 2017; Durán et al., 2019; Rajan et al., 2022). Métodos *in vitro* como el análisis del MTT (Metil Tiazol Tetrazolio) ofrecen una primera aproximación a los ensayos de evaluación de la citotoxicidad (Gopinath et al., 2017).

OBJETIVOS

- Evaluar la citotoxicidad dependiente de la dosis y a diferentes tiempos de exposición de las BNP sintetizadas a partir de los filtrados extracelulares de *Penicillium expansum* y *Phanerochaete chrysosporium* frente a la línea celular THP-1.

ESTRATEGIA

Para cumplir con los objetivos se realizó el ensayo del MTT frente a la línea celular humana THP-1, derivada de una leucemia monocítica y que posteriormente se diferencia a macrófagos. En primera instancia se realizó una puesta a punto de la técnica para determinar la concentración de células de partida en los ensayos con las BNP. Posteriormente se seleccionaron diferentes concentraciones de las BNP y se evaluaron a 24 horas para determinar su toxicidad. Aquellas concentraciones que no presentaron citotoxicidad fueron seleccionadas para realizar un nuevo ensayo, esta vez evaluando a 48 y 72 horas para determinar la toxicidad a mayores tiempos de exposición.

Estas pruebas se realizaron en el marco de una colaboración que tiene nuestro grupo de investigación multidisciplinario desde 2019, durante una pasantía en el Laboratorio de Inmunología de Facultad de Química (Instituto de Higiene) bajo la supervisión del Dr. Gustavo Mourglia y el Dr. Claudio Rodríguez-Camejo.

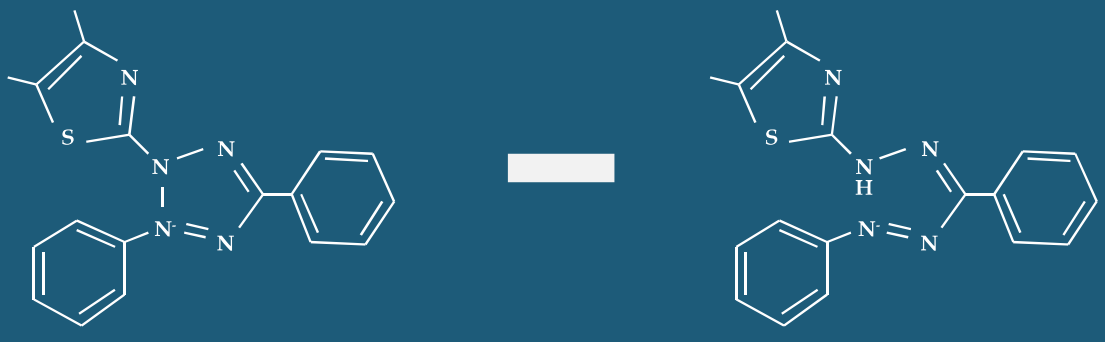
CAPÍTULO VI - Resumen gráfico

Citotoxicidad

Dosis-respuesta
Tiempo-respuesta

dd

MTT **Formazan**



Ensayo MTT

METODOLOGÍA

Material biológico.

Se utilizó la línea celular monocítica humana THP-1 (ATCC, Manassas VA, EE.UU.), derivada de un paciente con leucemia monocítica aguda.

Las células fueron tratadas según lo especificado por Rodríguez-Camejo et al. (2023). Se cultivaron a 37°C en una atmósfera controlada con 5% de CO_2 en un medio completo: medio de crecimiento RPMI 1640 (Capricorn Scientific GmbH, Alemania) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS) (Capricorn Scientific), 100 µg/mL de estreptomicina y 100 µg/mL de penicilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU.). Las células fueron contadas y diluidas de acuerdo con cada diseño experimental. Posteriormente, el volumen resultante fue centrifugado y las células fueron contadas y diluidas nuevamente según cada diseño experimental. La línea celular fue cultivada por no más de 15 pasajes.

Evaluación de la Citotoxicidad

La citotoxicidad de las nanopartículas de plata (BNP) fue evaluada mediante el método *in vitro* del MTT (metil tiazol tetrazolio). En este método las células viables catalizan la reducción del MTT, produciendo cristales púrpuras insolubles de formazán a través de una reacción enzimática (Gopinath et al., 2015). Las células THP-1 fueron diferenciadas a macrófagos (dTHP-1) mediante el uso de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (Rodríguez-Camejo et al., 2023).

Puesta a punto del ensayo de MTT con las células THP-1.

Se realizó en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany). En cada columna de la placa se agregó medio RPMI completo conteniendo distintas cantidades de células: 0 células/100µL, $0.5x10^4$ células/100µL, $1.0x10^4$ células/100µL, $2.0x10^4$ células/100µL, $5.0x10^4$ células/100µL y $10x10^4$ células/100µL (**Figura 6.2a**). La placa se incubó en una atmósfera con 5% de CO_2 a 37°C durante 24 horas. Pasado

el periodo de incubación, se retiró el medio de cultivo y se adicionó medio RMPI completo fresco. Nuevamente se incubó en una atmósfera con 5% de CO_2 a 37°C durante 24 horas y posteriormente se repitió lo anterior. Pasadas 24 horas se retiró el medio de los pocillos y se adicionaron 200 µL de MTT 0.5 mg/mL en PBS (**Figura 6.2b**). La placa se incubó en una atmósfera con 5% de CO_2 a 37°C durante 3 horas (**Figura 6.2c**). Luego de la incubación, se retiró cuidadosamente el sobrenadante y los cristales de formazán se solubilizaron con 170 µL por pocillo de dimetilsulfóxido (DMSO) 5% (v/v). Se transfirieron 150 µL por pocillo a una placa de 96 pocillos de fondo plano y se registró la absorbancia a 560 nm (**Figura 6.2d**).

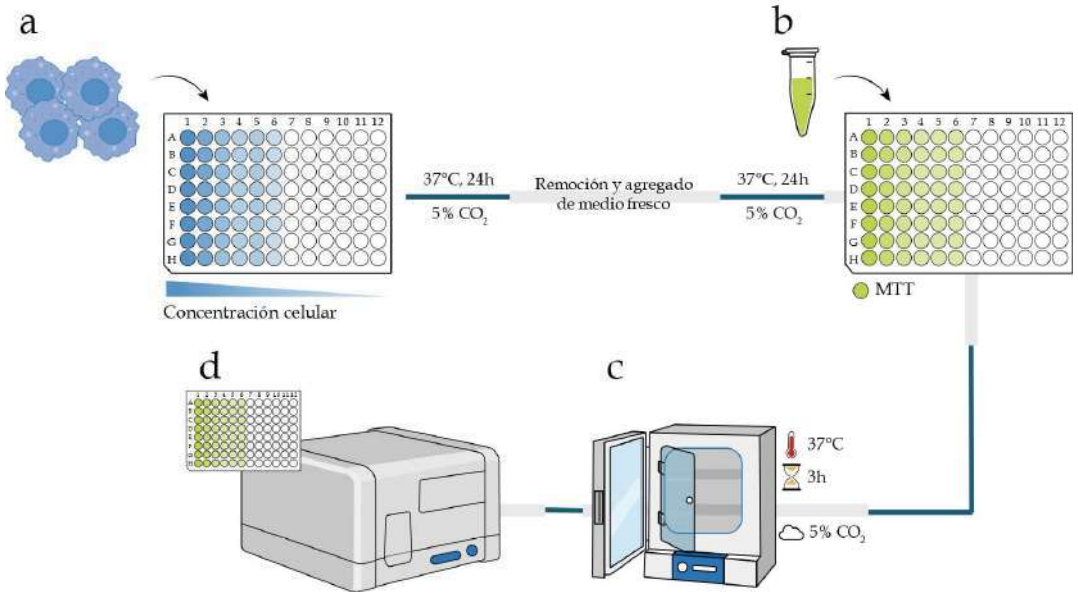


Figura 6.2. Puesta a punto del ensayo MTT con la línea celular THP-1. a) agregado de las células, b) adición de MTT, c) incubación, d) lectura de absorbancia a 560 nm.

Evaluación de la citotoxicidad dosis-dependiente de BNP frente a la línea celular THP-1.

En una placa de microtitulación de 96 pocillos se agregó en cada pocillo el medio RPMI completo conteniendo $5.0x10^4$ células/100 µL (**Figura 6.3a**). Se incubó en una atmósfera con 5% de CO_2 a 37°C durante 24 horas. Se retiró el medio de cultivo y se adicionó medio completo fresco. Se incubó a 37°C y 5% de CO_2 durante 24 horas. Posteriormente se retiró el medio y se sembraron las BNP a

diferentes concentraciones (diluciones seriadas al medio) (**Figura 6.3b**). Como control positivo de toxicidad se sembró DMSO 5% (v/v) y como blanco se dejaron pocillos sin células. Se incubó en una atmósfera con 5% de CO_2 a 37°C durante 24 horas. Pasado el tiempo de incubación se retiró el medio de los pocillos y se adicionaron 200 µL de MTT 0.5 mg/mL en PBS (**Figura 6.3c**). Se incubó en una atmósfera con 5% de CO_2 a 37°C durante 3 horas (**Figura 6.3d**). Luego de la incubación, se retiró cuidadosamente el sobrenadante y los cristales de formazán se solubilizaron con 170 µL por pocillo de DMSO. Se transfirieron 150 µL por pocillo a una placa de 96 pocillos de fondo plano y se registró la absorbancia a 560 nm (**Figura 6.3e**). Los resultados fueron normalizados a la condición sin BNP.

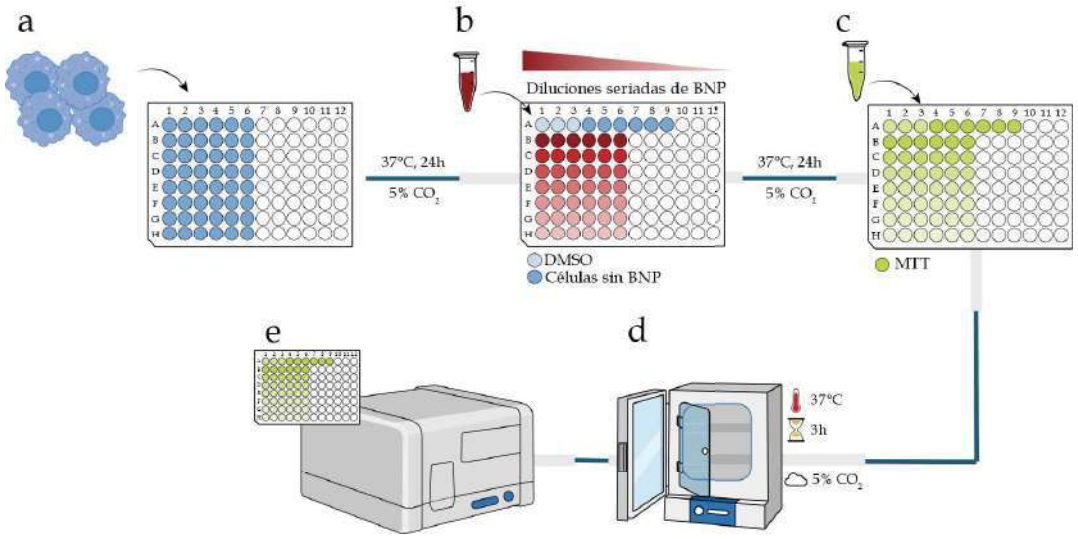


Figura 6.3. Evaluación de la citotoxicidad dosis-dependiente de BNP frente a la línea celular THP-1. a) agregado de las células, b) agregado de las muestras, c) adición de MTT, d) incubación, e) lectura de absorbancia a 560 nm.

Evaluación de la citotoxicidad tiempo-dependiente de BNP frente a la línea celular THP-1.

En una placa de microtitulación de 96 pocillos se agregó en cada pocillo el medio RPMI completo conteniendo $5.0x10^4$ células de THP-1/100 µL. Se incubó en una atmósfera con 5% de CO_2 a 37°C durante 24 horas. Se retiró el medio de cultivo y se adicionó medio completo fresco. Se incubó en una atmósfera con 5% de CO_2

a 37°C durante 24 horas. Posteriormente se retiró el medio y se sembraron las BNP a diferentes concentraciones (diluciones seriadas al medio) partiendo de la concentración para la cual las BNP no presentaron toxicidad en el ensayo dosis-tiempo. Como control positivo de toxicidad se sembró DMSO 5% (v/v) y como blanco se dejaron pocillos sin células. Se incubó en una atmósfera con 5% de CO_2 a 37°C durante 48 y 72 horas (**Figura 6.3b**). Pasado el tiempo de incubación se retiró el medio de los pocillos y se adicionó MTT 0.5 mg/mL en PBS. Se incubó en una atmósfera con 5% de CO_2 a 37°C durante 3 horas. Luego de la incubación, se retiró cuidadosamente el sobrenadante y los cristales de formazán se solubilizaron con 170 µL por pocillo de DMSO. Se transfirieron 150 µL por pocillo a una placa de 96 pocillos de fondo plano y se registró la absorbancia a 560 nm. Los resultados fueron normalizados a la condición sin BNP.

Análisis estadístico.

Los estudios se realizaron con 6 réplicas en dos experimentos independientes. Los resultados se expresan como el promedio y se muestra el error estándar del promedio (SE). Las comparaciones se realizaron mediante la prueba t de Student y ANOVA de una vía con la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey. Se utilizó GraphPad Prism (versión 8.0) para el análisis estadístico. El nivel de significancia estadística se definió como un 95% de confianza y se indica en las figuras con asteriscos: *p ≤0.05, **p ≤0.01 y ***p ≤0.001.

RESULTADOS

Se llevó a cabo la evaluación de la citotoxicidad de las nanopartículas de plata (PeNP y PchNP) sobre la línea celular THP-1 utilizando el método del MTT. Este enfoque permitió analizar la dependencia de la citotoxicidad en relación con la concentración de BNP y al tiempo de exposición.

Puesta a punto del ensayo de MTT con las células THP-1.

La puesta a punto del ensayo con las células THP-1 se realizó con el objetivo de determinar la concentración celular indicada para los ensayos de toxicidad con las BNP. En la **Figura 6.4** se puede observar que para las concentraciones de $5x10^4$ y $10x10^4$ células/100 µL se obtuvieron diferencias significativas respecto al blanco (0 células/100 µL). Para los ensayos posteriores se seleccionó la concentración celular menor ($5 x10^4$ células/100 µL).

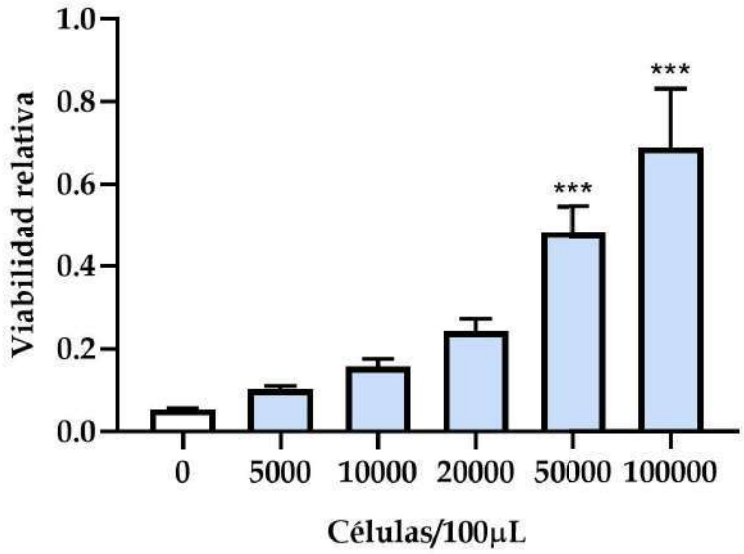


Figura 6.4. Viabilidad relativa vs concentración celular de THP-1 (células/100 µL) para el ensayo del MTT. Las barras representan el promedio ± la SE de las 6 réplicas. Los asteriscos sobre las barras indican las diferencias significativas respecto a la condición sin células (0 células/100 µL), determinado por el ANOVA de una vía (*** $p \leq 0.001$).

Evaluación de la citotoxicidad dosis-dependiente de BNP frente a la línea celular THP-1.

La evaluación de la concentración de las BNP frente a la línea celular THP-1 se muestra en la **Figura 6.5**. Las PeNP ejercieron un efecto citotóxico significativo a concentraciones mayores que 0.170 nM y las PchNP a concentraciones mayores a 0.054 nM, mostrando a dichas concentraciones un porcentaje de viabilidad celular de 70% y 50%, respectivamente.

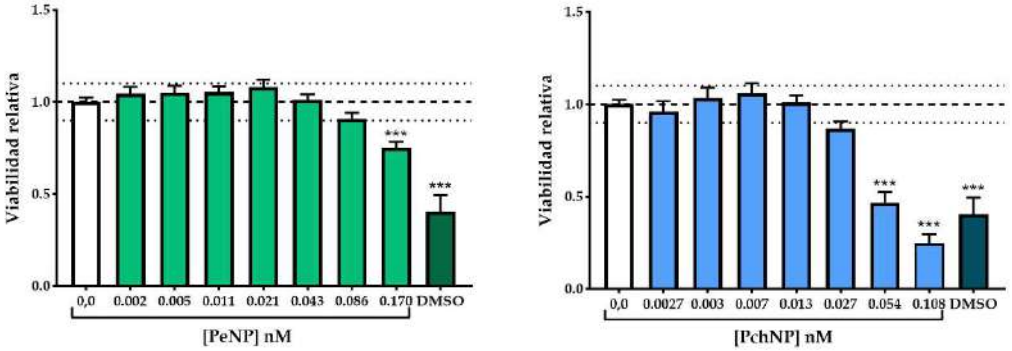


Figura 6.5. Efecto de la concentración de las PeNP (izquierda, verde) y las PchNP (derecha, azul) frente a la línea celular de THP-1, luego de 24 h de exposición. Las líneas punteadas muestran el rango de viabilidad obtenido a partir de 6 réplicas de células control sanas. Las barras representan el promedio ± la SE de las 6 réplicas. Los asteriscos sobre las barras indican las diferencias significativas respecto a la condición sin células (0 células/100 µL), determinado por el ANOVA de una vía (*** $p \leq 0.001$).

Evaluación de la citotoxicidad tiempo-dependiente de BNP frente a la línea celular THP-1.

Para evaluar la citotoxicidad dependiente del tiempo de exposición se seleccionaron las concentraciones de BNP que no presentaron efecto citotóxico en el ensayo anterior (a las 24 h) y se enfrentaron a las células THP-1 durante 48 y 72 horas de tratamiento. Ninguna de las concentraciones de BNP tuvo efectos citotóxicos significativos en el tiempo evaluado. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 6.6**.

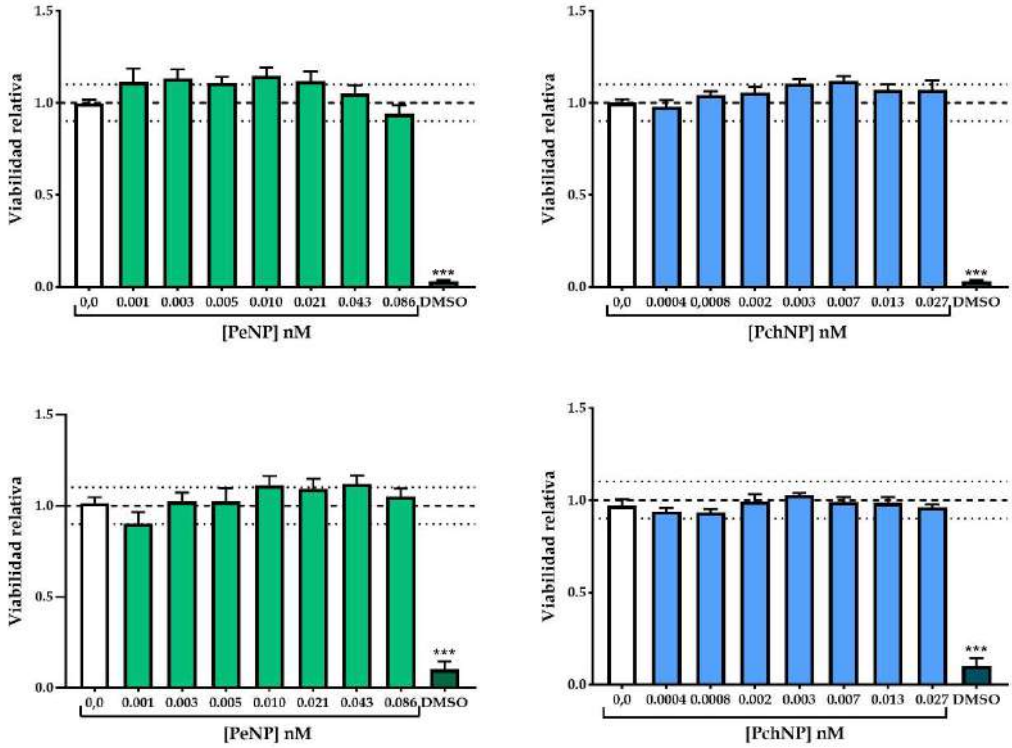


Figura 6.6. Efecto del tiempo en la citotoxicidad de las PeNP (izquierda, verde) y las PchNP (derecha, azul) frente la línea celular de THP-1 para 48 horas (arriba) y 72 horas (abajo) de contacto. Las líneas punteadas muestran el rango de viabilidad obtenido a partir de 6 réplicas de células control (sin tratamiento). Las barras representan el promedio ± la SE de las 6 réplicas. Los asteriscos sobre las barras indican las diferencias significativas respecto a la condición sin células (0 células/100 µL), determinado por el ANOVA de una vía (*** $p \leq 0.001$).

DISCUSIÓN

Las propiedades fisicoquímicas de las AgNP les otorgan promisorias aplicaciones en el campo de la medicina, como por ejemplo en el tratamiento de enfermedades infecciosas (Yanar et al., 2023; Magdy et al., 2024) lo que ha contribuido al rápido crecimiento en el uso de estas nanopartículas en una amplia variedad de productos comerciales. Por ejemplo, se han desarrollado formulaciones inyectables de plata coloidal para el tratamiento de infecciones de uso veterinario (Ucbvet) . A pesar de esto, aún existe una carencia de información sobre la exposición humana, animal y ecológica, y los posibles riesgos asociados a su toxicidad tanto a corto como a largo plazo (Noga et al., 2023).

La investigación de la citotoxicidad *in vitro* en cultivos celulares de las AgNP es una valiosa aproximación para la evaluación de la toxicidad.

En esta tesis, se realizó la evaluación de la toxicidad de las PeNP y las PchNP en macrófagos derivados de la línea celular de leucemia monocítica humana THP-1, analizando la relación entre la toxicidad y la dosis de la nanopartícula, así como con el tiempo de exposición a las mismas. Los macrófagos cumplen un rol crucial en la defensa inicial *in vivo* contra agentes externos, como lo son las AgNP por lo que esta línea celular presenta alta relevancia como modelo para el estudio de la citotoxicidad (Haase et al., 2011).

El primer paso antes de los ensayos de citotoxicidad fue poner a punto el método del MTT para determinar la cantidad de células a utilizar. Una vez que se determinó cuál era esa concentración celular se procedió a evaluar la toxicidad de las PeNP y PchNP a diferentes concentraciones y diferentes periodos de tiempo.

Los resultados mostraron que la toxicidad a 24 horas de exposición fue dependiente de la concentración de las BNP, en concordancia con lo reportado por la literatura (Haase et al., 2011; Akter et al., 2018). En dicho análisis se emplearon concentraciones bastante similares para las PeNP y las PchNP. No obstante, se observó que la toxicidad mostrada por las PchNP estuvo dada a concentraciones inferiores y con un menor porcentaje de viabilidad que para las PeNP.

Como parte de la respuesta inmune de los seres vivos, células como los monocitos, los neutrófilos y los macrófagos (a los cuales pertenecen las células THP-1) pueden captar las AgNP por pinocitosis o fagocitosis. Tanto el nivel de captación como su ubicación final en la célula (mitocondrias o núcleo) depende del tamaño y de los agentes de la superficie de la nanopartícula (Zhang et al., 2014; Kettler et al., 2016). El ingreso al núcleo, por ejemplo, está limitado por el tamaño de las AgNP ya que la membrana nuclear no permite el ingreso de nanopartículas de tamaños mayores a 9 nm (Barua and Mitragotri, 2014). Finalmente, una vez dentro de la célula, las AgNP pueden inducir efectos tóxicos que incluyen el estrés oxidativo, daño de la membrana celular, respuestas inflamatorias, detención del ciclo celular, genotoxicidad y daños cromosómicos (Zhang et al., 2014).

Algunos estudios muestran que a menor tamaño de AgNP, mayor es la captación (Kettler et al., 2016) y que tamaños pequeños de AgNP (entre 5 y 28 nm) producen mayores cantidades de especies reactivas del oxígeno (Zhang et al., 2014). En un estudio realizado con bio-AgNP obtenidas de aguas residuales de almazara se estudió la reducción en la viabilidad de células THP-1 utilizando dos tamaños (30 y 50 nm) y dos concentraciones (3 y 5 µM) de bio-AgNP diferentes. Se observó que, a igual concentración, las bio-AgNP de menor tamaño reducían en mayor medida la viabilidad además de producir mayor cantidad de citoquinas (De Matteis et al., 2023). En otro trabajo realizado por Liu et al. (2010) en diferentes líneas celulares (A549, SGC-7901. HepG2 y MCF-7) se encontró que la viabilidad celular era dependiente del tamaño de las AgNP y que las de menor tamaño penetraban a las células con mayor facilidad.

Esto muestra que la toxicidad celular no depende únicamente de la dosis utilizada si no también del tipo y características de las nanopartículas. Contrario a lo reportado en la literatura, las PeNP (de menor tamaño por DLS) fueron tóxicas a concentraciones mayores que las PchNP (de mayor tamaño por DLS) por lo que se piensa que las diferencias encontradas en la citotoxicidad de ambas BNP podrían atribuirse a las diferencias de su *capping*, proveniente del filtrado

fúngico utilizado en la síntesis (Guilger-Casagrande et al., 2021; Durán et al., 2023).

Al comparar con la actividad antimicrobiana de las BNP, es de destacar que las concentraciones que resultaron tóxicas ([PeNP]=0.17 nM y [PchNP]=0.054 nM) fueron en general mayores que las concentraciones inhibitorias mínimas determinadas (**Capítulos III y IV**), lo que sugiere que pueden existir mecanismos de toxicidad selectiva involucrados en la acción de las BNP, relevantes para su aplicación como antimicrobianos. Asimismo, para los casos excepcionales que mostraron CIM más alta, sería de interés realizar estudios de sinergia con antibióticos o antifúngicos. Como se mencionó en la **Introducción**, las BNP podrían conjugarse con distintos antimicrobianos permitiendo por un lado disminuir su concentración alejándose de concentraciones que podrían resultar tóxicas y por otro lado reutilizar antibióticos o antifúngicos que dejan de ser eficaces por el desarrollo de resistencia microbiana, como se explicó en el **Capítulo IV**.

Los resultados de toxicidad obtenidos también son muy promisorios en cuanto a la inhibición de la formación de biofilms (**Capítulo V**). Las concentraciones de BNP que lograron inhibir la formación de los biofilms fueron menores a las concentraciones que tuvieron efectos citotóxicos en las THP-1 (a excepción de *P. aeruginosa*). Sin embargo, las concentraciones que lograron erradicar biofilms ya formados fueron mayores a las concentraciones que resultaron tóxicas para las THP-1. Esto podría solventarse conjugando las BNP con un antimicrobiano para disminuir la dosis de BNP, tal como se explicó anteriormente. De este modo es posible disminuir la dosis de las BNP por sinergia con un agente antimicrobiano evitando alcanzar concentraciones tóxicas (Zimet et al., 2021).

En cuanto a la toxicidad a mayor tiempo de exposición con las BNP, los resultados son aún más promisorios ya que ninguna de las concentraciones evaluadas de PeNP y PchNP tuvo efectos citotóxicos en las células THP-1 en el periodo de tiempo evaluado (72 h). Esto lleva a pensar en la posibilidad de un tratamiento a largo plazo que no genere daño a nivel celular.

Es importante destacar que la literatura indica que las AgNP tienen mayor especificidad ante células tumorales que células sanas, por lo que es de esperar que aquellas concentraciones que no fueron tóxicas en las células THP-1 tampoco lo serán en su contraparte sana (Ottoni et al., 2017; Yeasmin et al., 2017; Khorrami et al., 2018; Kovács et al., 2022; Umapathi et al., 2022).

Diversos autores han reportado la no toxicidad de bio-AgNP (Shanker et al., 2017; Rajan et al., 2022). Recientemente se demostró que el *capping* no solo otorga mayor actividad biológica, sino que también podría ser el responsable de la menor citotoxicidad y genotoxicidad de las bio-AgNP, un factor fundamental a considerar para proponer su uso biomédico, tanto en salud humana como animal (Cho et al., 2018; Guilger-Casagrande et al., 2021; Umapathi et al., 2022; Durán et al., 2023; Nie et al., 2023). En un trabajo realizado por Nguyen et al. (2013) se compara la toxicidad de AgNP cubiertas con citrato, con PVP y sin cubierta frente a macrófagos (J774A.1) y células epiteliales (HT-29). Las AgNP con cubierta resultaron ser menos tóxicas que las que no tenían cubierta. El análisis del *capping* adquiere una importancia significativa al evaluar la toxicidad de las AgNP. La caracterización de los agentes estabilizantes se revela como un factor crucial para atenuar los efectos tóxicos en diversas líneas celulares. Por ejemplo, la posibilidad de seleccionar otros agentes para combinarlos con las AgNP podría ser una estrategia eficaz para mitigar dichos efectos.

Algunas bio-AgNP sintetizadas por plantas se evaluaron contra la misma línea celular evaluada en esta tesis (Tyavambiza et al., 2021). En ese caso se evaluaron concentraciones de entre 0.3 µg/mL a 20 µg/mL encontrando que las bio-AgNP no mostraban efectos tóxicos a concentraciones menores a 10 µg/mL. Comparando con los resultados de esta tesis y considerando lo determinado por ICP-AES, las BNP presentaron mayor toxicidad que lo reportado en el mencionado trabajo, siendo las concentraciones umbrales de toxicidad de 0.11 µg/mL para las PeNP y 0.035 µg/mL para las PchNP. Si bien la diferencia de concentraciones es grande entre un trabajo y el otro, vale destacar que el tamaño de bio-AgNP utilizado fue de 110 nm (determinado por DLS), notoriamente mayor al tamaño de las BNP usadas en esta tesis. Por otro lado, las

concentraciones inhibitorias mínimas determinadas para distintos microorganismos (*S. aureus, P. aeruginosa* y *C. albicans*) son casi mil veces mayores a las determinadas en esta tesis y además son superiores a 10 µg/mL (concentración por encima de la cual las bio-AgNP fueron tóxicas).

Estos resultados son una primera aproximación al estudio de citotoxicidad de las BNP en esta tesis. Los efectos tóxicos determinados por el análisis de MTT pueden variar según la línea celular empleada (Guilger et al., 2017), por lo que es necesario contemplar no solo cada BNP sino también distintas líneas celulares, además de realizar estudios *in vivo*.

CONCLUSIONES

En este capítulo, se llevó a cabo la evaluación de la toxicidad de las nanopartículas de PeNP y PchNP que fueron empleadas a lo largo de la tesis, utilizando la línea celular humana THP-1 diferenciada a macrófagos.

Se observó que a las 24 h de tratamiento las PeNP manifestaron un efecto citotóxico a concentraciones superiores a 0.17 nM, mientras que las PchNP lo hicieron a concentraciones mayores a 0.054 nM. Es importante destacar que estas concentraciones fueron mayores que las concentraciones inhibitorias mínimas determinadas en los capítulos anteriores, con la excepción de algunos pocos microorganismos. En estos últimos casos, la conjugación de las BNP con un antimicrobiano específico es una buena estrategia para disminuir la dosis de la nanopartícula y evitar el uso de concentraciones que podrían resultar tóxicas.

Por otro lado, en relación a las BNP evaluadas en diferentes concentraciones no se observaron efectos citotóxicos en las células después de 48 y 72 horas de tratamiento.

Estos resultados ofrecen una introducción relevante a la evaluación de la citotoxicidad de las nanopartículas sintetizadas en el marco de esta tesis presentándose como promisorios, dada la baja incidencia de efectos citotóxicos determinados en la línea celular utilizada en el ensayo.

Capítulo VII

¿Las aventuras nunca tienen un final? Supongo que no. Alguien más siempre tiene que continuar la historia.

J.R.R. TOLKIEN, ***El Señor de los Anillos***

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES FINALES

Esta tesis representa un análisis exhaustivo y completo de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los hongos *Penicillium expansum* y *Phanerochaete chrysosporium*. La adopción de un enfoque integral permitió establecer relaciones entre los parámetros asociados a la caracterización de estas nanopartículas y su eficacia antimicrobiana y antibiofilm, así como evaluar la citotoxicidad, proponiendo estrategias para mejorar los resultados obtenidos.

Este trabajo se enfocó en la biosíntesis de nanopartículas de plata (BNP), su caracterización y el estudio de la actividad antimicrobiana. El primer objetivo planteado fue la síntesis de las BNP a partir del filtrado extracelular de los hongos *Penicillium expansum* y *Phanerochaeate chrysosoporium* y la evaluación de la incidencia de las condiciones de síntesis. Luego de la obtención de las nanopartículas a partir de las condiciones que permitieron mejorar la producción se procedió a caracterizarlas. Utilizando diferentes técnicas se pudo determinar para cada BNP la morfología, el tamaño, la distribución de tamaños, la carga neta, los agentes estabilizantes, el contenido de plata y la estabilidad coloidal.

El interés que suscitamos en las BNP se fundamenta en su potencial actividad antimicrobiana, la cual ya había sido primariamente explorada en investigaciones previas llevadas a cabo por nuestro grupo de investigación. Esta tesis amplió y profundizó dichos estudios al analizar la capacidad antimicrobiana de las BNP frente a bacterias, levaduras, hongos filamentosos y biofilms.

En el contexto de la terapia antimicrobiana es esencial comprender los mecanismos de acción de las nanopartículas para mejorar la eficacia del agente. Para estudiar la interacción y el mecanismo de acción de nuestras BNP se emplearon diversas técnicas complementarias que posibilitaron la propuesta de diferentes mecanismos de acción según el tipo de microorganismo involucrado.

En este sentido, esta tesis en el área Química permitió la realización y la puesta a punto de los primeros trabajos en Uruguay de Microscopía Raman Confocal aplicada a microorganismos, consolidando un grupo interdisciplinario en Facultad de Química.

Un aspecto que históricamente ha recibido menos atención en relación con la aplicación de las nanopartículas de plata es su toxicidad en diversos sistemas. En los últimos años, el interés en este tema ha experimentado un notable crecimiento. Resulta fundamental asegurar que las nanopartículas de plata destinadas a la terapia antimicrobiana no causen daño en las células humanas. Para evaluar la toxicidad de las BNP se utilizó la línea celular de leucemia monocítica humana THP-1 con resultados altamente prometedores. Estas nanopartículas mostraron baja toxicidad e incluso cuando se observó toxicidad, las concentraciones fueron superiores a las determinadas para la actividad antimicrobiana y la inhibición de biofilms.

Los hallazgos representan una contribución significativa al campo de la nano-biotecnología, evidenciando el potencial de las nanopartículas de plata en el control y destrucción de microorganismos. Este potencial se extiende tanto al ámbito de la salud humana como animal, así como a la agricultura, o a la inocuidad alimentaria, destacando su versatilidad y aplicabilidad en diversas áreas.

PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos se derivan diversas ideas para la continuación de este trabajo, explorando diferentes ramas y enfoques. Dado el extenso alcance de las actividades realizadas, se presentan numerosas oportunidades para expandir y profundizar en la investigación de las nanopartículas de plata biogénicas.

Las perspectivas se describen a continuación:

- Evaluar otras condiciones de síntesis para mejorar la producción de las BNP tales como pH o composición del medio de cultivo.
- Estudiar el mecanismo de síntesis de las BNP con el fin de contribuir al conocimiento básico que pueda ser utilizado, por ejemplo, en mejorar los rendimientos de la síntesis
- Estudiar para una BNP y un determinado microorganismo la interacción por Microscopía Raman Confocal evaluando diferentes concentraciones de BNP con el fin de profundizar aún más en los mecanismos de interacción.
- Evaluar la generación de estrés oxidativo de las BNP en ADN y lípidos con el fin de confirmar si el daño encontrado mediante Microscopía Raman Confocal en dichas moléculas es debido a la generación de estrés oxidativo.
- Determinar el estrés oxidativo producido por las BNP en hongos filamentosos mediante el estudio de la generación de ERO y ERN para complementar los estudios del mecanismo de acción antifúngico.
- Estudiar la interacción mediante Microscopía Raman Confocal de las PchNP con *P. oryzae* e incorporar otros hongos filamentosos para su estudio con ambas BNP para profundizar en el conocimiento de su actividad antifúngica de las BNP.
- Evaluar la actividad antimicrobiana y la interacción de las PeNP contra las cepas de *S.* Typhimurium resistentes y multirresistentes.
- Respecto a los biofilms, realizar estudios de inhibición de las señales de *quorum sensing* y evaluar el estrés oxidativo mediante generación de ERO y

ERN a modo de complementar los estudios de interacción y mecanismos de acción realizados en esta tesis.

- Estudiar la actividad antibiofilm en sistemas continuos que se asemejen más a condiciones reales.
- Evaluar la toxicidad en otras líneas celulares de importancia en la bioacumulación de las BNP tales como hígado, pulmón, riñones y bazo.
- Realizar estudios de genotoxicidad y estrés oxidativo en las líneas celulares.
- Realizar estudio de toxicidad *in vivo*
- Realizar estudios de funcionalización de las BNP con antimicrobianos para evaluar su potencial contra microorganismos patógenos y biofilms con el fin de disminuir la dosis de BNP y evitar trabajar a las concentraciones que tuvieron efectos citotóxicos.

Basándome en esto, anticipo que investigaciones futuras podrán ahondar aún más en la utilización de nanopartículas de plata como agentes antimicrobianos, con el objetivo final de lograr nanopartículas de plata biogénicas que puedan ser evaluadas en ensayos clínicos. Indudablemente los resultados obtenidos en esta tesis constituyen un estímulo significativo para que la comunidad científica se embarque en la búsqueda y desarrollo de nuevos antimicrobianos basados en nanopartículas de plata sintetizadas por hongos con aplicaciones en salud humana, animal y en el área agroalimentaria.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abbaszadegan, A., Ghahramani, Y., Gholami, A., Hemmateenejad, B., Dorostkar, S., Nabavizadeh, M., et al. (2015). The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: A preliminary study. *J Nanomater* 2015, 8 páginas. doi: 10.1155/2015/720654

AbdelRahim, K., Mahmoud, S. Y., Ali, A. M., Almaary, K. S., Mustafa, A. E. Z. M. A., and Husseiny, S. M. (2017). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Rhizopus stolonifer*. *Saudi J Biol Sci* 24, 208–216. doi: 10.1016/J.SJBS.2016.02.025

Adiguzel, A. O., Adiguzel, S. K., Mazmanci, B., Tuncer, M., and Mazmanci, M. A. (2018). Silver nanoparticle biosynthesis from newly isolated *Streptomyces* genus from soil. *Mater Res Express* 5. doi: 10.1088/2053-1591/AAB861

Agressott, E. V. H., Blätte, D., Cunha, F. A., Noronha, V. T., Ciesielski, R., Hartschuh, A., et al. (2020). Vibrational Spectroscopy and Morphological Studies on Protein-Capped Biosynthesized Silver Nanoparticles. *ACS Omega* 5, 386–393. doi: 10.1021/acsomega.9b02867

Ahlf, D. R., Masyuko, R. N., Hummon, A. B., and Bohn, P. W. (2014). Correlated mass spectrometry imaging and confocal Raman microscopy for studies of three-dimensional cell culture sections. *Analyst* 139, 4578–4585. doi: 10.1039/C4AN00826J

Ahmed, O., Sibuyi, N. R. S., Fadaka, A. O., Madiehe, A. M., Maboza, E., Olivier, A., et al. (2022). Antimicrobial Effects of Gum Arabic-Silver Nanoparticles against Oral Pathogens. *Bioinorg Chem Appl* 2022, 9602325. doi: 10.1155/2022/9602325

AIKE (n.d.). Vidaké línea hogar. Available at: https://aikepinturas.com.ar/producto/plastico-hogar/ (Accessed February 7, 2024).

Akabri, B., Pirhadi Tavandashti, M., and Zandrahimi, M. (2011). Particle size characterization of nanoparticles - A practical approach. *IJMSE* 8, 48–56. Available at: http://inis.iaea.org/Search/search.aspx?orig_q=RN:43049756

Akter, M., Sikder, M. T., Rahman, M. M., Ullah, A. K. M. A., Hossain, K. F. B., Banik, S., et al. (2018). A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *J Adv Res* 9, 1–16. doi: 10.1016/J.JARE.2017.10.008

Akther, T., Khan, M. S., and S., H. (2020). Biosynthesis of silver nanoparticles via fungal cell filtrate and their anti-quorum sensing against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Environ Chem Eng* 8. doi: 10.1016/J.JECE.2020.104365

Al-Bahrani, R., Raman, J., Lakshmanan, H., Hassan, A. A., and Sabaratnam, V. (2017). Green synthesis of silver nanoparticles using tree oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* and its inhibitory activity against pathogenic bacteria. *Mater Lett* 186, 21–25. doi: https://doi.org/10.1016/j.matlet.2016.09.069

Albores, S., Moros, M., Cerdeiras, M. P., de la Fuente, J. M., Grazu, V., and Fraguas, L. F. (2016). A Lectin Purified from Blood Red Bracket Mushroom, *Pycnoporus sanguineus* (*Agaricomycetidae*), Mycelium Displayed Affinity Toward Bovine Transferrin. 18, 67–74. doi: 10.1615/IntJMedMushrooms.v18.i1.80

Aldapa-Vega, G., Pastelín-Palacios, R., Isibasi, A., Moreno-Eutimio, M. A., and López-Macías, C. (2016). Modulación de la respuesta inmune por los lipopolisacáridos bacterianos. *Rev Alerg Mex* 63, 293–302. doi: 10.29262/ram.v63i3.207

Aldayel, M. F., El Semary, N., and Adams, D. G. (2023). Differential Antimicrobial Effect of Three-Sized Biogenic Silver Nanoparticles as Broad-Spectrum Antibacterial Agents against Plant Pathogens. *Antibiotics* 12, 1114. doi: 10.3390/ANTIBIOTICS12071114/S1

Al-Dbass, A. M., Daihan, S. Al, Al-Nasser, A. A., Al-Suhaibani, L. S., Almusallam, J., Alnwisser, B. I., et al. (2022). Biogenic Silver Nanoparticles from Two Varieties of *Agaricus bisporus* and Their Antibacterial Activity. *Molecules* 27, 7656. doi: 10.3390/MOLECULES27217656

Alghuthaymi, M. A., Almoammar, H., Rai, M., Said-Galiev, E., and Abd-Elsalam, K. A. (2015). Myconanoparticles: Synthesis and their role in phytopathogens management. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 29, 221–236. doi: 10.1080/13102818.2015.1008194

Ali, H. M., Karam, K., Khan, T., Wahab, S., Ullah, S., and Sadiq, M. (2023). Reactive oxygen species induced oxidative damage to DNA, lipids, and proteins of antibiotic-resistant bacteria by plant-based silver nanoparticles. *3 Biotech* 13, 414. doi: 10.1007/s13205-023-03835-1

Al-khattaf, F. S. (2021). Gold and silver nanoparticles: Green synthesis, microbes, mechanism, factors, plant disease management and environmental risks. *Saudi J Biol Sci* 28, 3624–3631. doi: https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.03.078

Almatroudi, A. (2020). Silver nanoparticles: Synthesis, characterisation and biomedical applications. *Open Life Sci* 15, 819–839. doi: 10.1515/BIOL-2020-0094/ASSET/GRAPHIC/J_BIOL-2020-0094_FIG_002.JPG

Alqahtani, F. A., Almustafa, H. I., Alshehri, R. S., Alanazi, S. O., and Khalifa, A. Y. (2022). Combating Antibiotic Resistance in Bacteria: the Development of Novel therapeutic Strategies. *J Pure Appl Microbiol* 16. doi: 10.22207/JPAM.16.4.01

Al-Sheddi, E. S., Farshori, N. N., Al-Oqail, M. M., Al-Massarani, S. M., Saquib, Q., Wahab, R., et al. (2018). Anticancer Potential of Green Synthesized Silver Nanoparticles Using Extract of *Nepeta deflersiana* against Human Cervical Cancer Cells (HeLA). *Bioinorg Chem Appl* 2018, 9390784. doi: 10.1155/2018/9390784

Ammar, H. A. M., and El-Desouky, T. A. (2016a). Green synthesis of nanosilver particles by *Aspergillus terreus* HA1N and *Penicillium expansum* HA2N and its antifungal activity against mycotoxigenic fungi. *J Appl Microbiol* 121, 89–100. doi: 10.1111/JAM.13140

Ananda, A. P., Krishnamurthy, N. B., Savitha, K. R., and Nagendra, B. S. (2019). Biogenic synthesis of silver nanoparticles using *Priva cordifolia* leaf extract (PC@AgNPs) a potent antioxidant, antibacterial and catalytic activity. *SN Appl Sci* 1, 800. doi: 10.1007/s42452-019-0818-4

Anju, S., and Sarada, J. (2022). Quorum Quenching Potential of Biogenic Silver Nanoparticles against *Chromobacterium violaceum* 4212. *J Pure Appl Microbiol* 16, 2173–2196. doi: 10.22207/JPAM.16.3.77

Arrarte, E., Garmendia, G., Wisniewski, M., and Vero, S. (2023). Limiting the production of virulence factors as a mechanism of action for the control of *Penicillium expansum* by the Antarctic antagonistic yeast *Debaryomyces hansenii* F9D. *Biological Control* 177, 105104. doi: 10.1016/J.BIOCONTROL.2022.105104

Asgary, V., Shoari, A., Baghbani-Arani, F., Shandiz, S. A. S., Khosravy, M. S., Janani, A., et al. (2016). Green synthesis and evaluation of silver nanoparticles as adjuvant in rabies veterinary vaccine. *Int J Nanomedicine* 11, 3597–3605. doi: 10.2147/IJN.S109098

Assaf, A., Cordella, C. B. Y., and Thouand, G. (2014). Raman spectroscopy applied to the horizontal methods ISO 6579:2002 to identify *Salmonella* spp. in the food industry. *Anal Bioanal Chem* 406, 4899–4910. doi: 10.1007/s00216-014-7909-2

Athamneh, A. I. M., Alajlouni, R. A., Wallace, R. S., Seleem, M. N., and Sengera, R. S. (2014). Phenotypic profiling of antibiotic response signatures in *Escherichia coli* using Raman spectroscopy. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 1302–1314. doi: 10.1128/aac.02098-13

Atriwal, T., Azeem, K., Husain, F. M., Hussain, A., Khan, M. N., Alajmi, M. F., et al. (2021). Mechanistic Understanding of *Candida albicans* Biofilm Formation

and Approaches for Its Inhibition. *Front Microbiol* 12, 638609. doi: 10.3389/FMICB.2021.638609/BIBTEX

Aure (n.d.). Desodorante Orgânico Prata Silver 120 ml. Available at: https://aurenanoscience.com/index.php/produto/desodorante-organico-prata-silver-120-ml/ (Accessed February 7, 2024).

Ayala, O. D., Wakeman, C. A., Pence, I. J., Gaddy, J. A., Slaughter, J. C., Skaar, E. P., et al. (2018). Drug-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Reveal Distinct Biochemical Features with Raman Microspectroscopy. *ACS Infect Dis* 4, 1197–1210. doi: 10.1021/ACSINFECDIS.8B00029/SUPPL_FILE/ID8B00029_SI_001.PDF

Bae, K., Zheng, W., Ma, Y., and Huang, Z. (2019). Real-Time Monitoring of Pharmacokinetics of Antibiotics in Biofilms with Raman-Tagged Hyperspectral Stimulated Raman Scattering Microscopy. *Theranostics* 9, 1348–1357. doi: 10.7150/THNO.32043

Balakumaran, M. D., Ramachandran, R., Balashanmugam, P., Mukeshkumar, D. J., and Kalaichelvan, P. T. (2016). Mycosynthesis of silver and gold nanoparticles: Optimization, characterization and antimicrobial activity against human pathogens. *Microbiol Res* 182, 8–20. doi: 10.1016/J.MICRES.2015.09.009

Banne, S. V, Patil, M. S., Kulkarni, R. M., and Patil, S. J. (2017). Synthesis and Characterization of Silver Nano Particles for EDM Applications. *Mater Today Proc* 4, 12054–12060. doi: https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.09.130

Barabadi, H., Honary, S., Ebrahimi, P., Alizadeh, A., Naghibi, F., and Saravanan, M. (2019). Optimization of myco-synthesized silver nanoparticles by response surface methodology employing Box-Behnken design. *Inorg. Nano-met. Chem* 49, 33–43. doi: 10.1080/24701556.2019.1583251

Barhoum, A., García-Betancourt, M. L., Jeevanandam, J., Hussien, E. A., Mekkawy, S. A., Mostafa, M., et al. (2022). Review on Natural, Incidental, Bioinspired, and Engineered Nanomaterials: History, Definitions, Classifications, Synthesis, Properties, Market, Toxicities, Risks, and Regulations. *Nanomaterials* 12, 177. doi: 10.3390/NANO12020177

Barillo, D. J., and Marx, D. E. (2014). Silver in medicine: A brief history BC 335 to present. *Burns* 40, S3–S8. doi: https://doi.org/10.1016/j.burns.2014.09.009

Barua, S., and Mitragotri, S. (2014). Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects. *Nano Today* 9, 223–243. doi: 10.1016/J.NANTOD.2014.04.008

Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., and Rizzolio, F. (2020). The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical

applications to nanomedicine. *Molecules* 25. doi: 10.3390/MOLECULES25010112

Begum, S. J. P., Pratibha, S., Rawat, J. M., Venugopal, D., Sahu, P., Gowda, A., et al. (2022). Recent Advances in Green Synthesis, Characterization, and Applications of Bioactive Metallic Nanoparticles. *Pharmaceuticals* 15, 455. doi: 10.3390/PH15040455

Beltrán Pineda, M. E., Lizarazo Forero, L. M., and Sierra, y. C. A. (2022). Mycosynthesis of silver nanoparticles: a review. *BioMetals*, 1–32. doi: 10.1007/S10534-022-00479-1

Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* 235, 337–351. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017

BioGate (n.d.). Microsilver BG TM The innovative active for a beatiful and healthy skin. Available at: https://www.bio-gate.de/en/technologies/ (Accessed February 7, 2024).

BIONI (n.d.). he new antiviral and antibacterial interior paint based on silver system technology. Available at: https://www.bioni.de/bioni-hygienic-pro-farbe-gegen-corona-viren?lang=en (Accessed February 7, 2024).

Birla, S. S., Gaikwad, S. C., Gade, A. K., and Rai, M. K. (2013). Rapid Synthesis of Silver Nanoparticles from *Fusarium oxysporum* by Optimizing Physicocultural Conditions. *The Scientific World Journal* 2013. doi: 10.1155/2013/796018

Bodelón, G., Montes-García, V., López-Puente, V., Hill, E. H., Hamon, C., Sanz-Ortiz, M. N., et al. (2016). Detection and imaging of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm communities by surface-enhanced resonance Raman scattering. *Nat Mater* 15, 1203–1211. doi: 10.1038/nmat4720

Borowik, A., Prylutskyy, Y., Kawelski, Ł., Kyzyma, O., Bulavin, L., Ivankov, O., et al. (2018). Does C60 fullerene act as a transporter of small aromatic molecules? *Colloids Surf B Biointerfaces* 164, 134–143. doi: https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.01.026

Bowen, A. D., Gadd, ·G M, Davidson, F. A., Keatch, R., Bowen, A. D., Davidson, F. A., et al. (2007). Effect of nutrient availability on hyphal maturation and topographical sensing in *Aspergillus niger*. *Mycoscience* 48, 145–151. doi: 10.1007/S10267-007-0352-X

Brancatti, G., Garmendia, G., Pereyra, S., and Vero, S. (2022). Current species composition of *Fusarium* population affecting the main wheat-growing regions in Uruguay and evolution of their sensitivity to triazoles after long-term application. *Int J Pest Manag* 68, 349–358. doi: 10.1080/09670874.2022.2129509

Buranasinsup, S., Wiratsudakul, A., Chantong, B., Maklon, K., Suwanpakdee, S., Jiemtaweeboon, S., et al. (2023). Prevalence and characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from veterinary staff, pets, and pet owners in Thailand. *J Infect Public Health* 16, 194–202. doi: https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.11.006

Cao, W., Huang, T., Xu, X. H. N., and Elsayed-Ali, H. E. (2011). Localized surface plasmon resonance of single silver nanoparticles studied by dark-field optical microscopy and spectroscopy. *J Appl Phys* 109. doi: 10.1063/1.3544349/926583

Casaux, M. L., Caffarena, R. D., Schild, C. O., Giannitti, F., Riet-Correa, F., and Fraga, M. (2019). Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* isolated from dairy calves in Uruguay. *Braz J Microbiol* 50, 1139–1144. doi: 10.1007/s42770-019-00151-w

Casaux, M. L., D'Alessandro, B., Vignoli, R., and Fraga, M. (2023). Phenotypic and genotypic survey of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* isolates from dairy farms in Uruguay. *Front Vet Sci* 10, 1055432. doi: 10.3389/FVETS.2023.1055432/BIBTEX

Cavalheiro, M., and Teixeira, M. C. (2018). Candida Biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. *Front Med (Lausanne)* 5, 342803. doi: 10.3389/FMED.2018.00028/BIBTEX

Chao, Y., and Zhang, T. (2012). Surface-enhanced Raman scattering (SERS) revealing chemical variation during biofilm formation: From initial attachment to mature biofilm. *Anal Bioanal Chem* 404, 1465–1475. doi: 10.1007/S00216-012-6225-Y/TABLES/2

Chaudhari, P. R., Masurkar, S. A., Shidore, V. B., and Kamble, S. P. (2012). Antimicrobial Activity of Extracellularly Synthesized Silver Nanoparticles using *Lactobacillus* Species Obtained from VIZYLAC Capsule. *J Appl Pharm Sci* :, 25–29. doi: 10.7324/JAPS.2012.2305

Cho, Y.-M., Mizuta, Y., Akagi, J., Toyoda, T., Sone, M., and Ogawa, K. (2018). Size-dependent acute toxicity of silver nanoparticles in mice. *J Toxicol Pathol* 31, 73–80. doi: 10.1293/tox.2017-0043

Clavijo, F. (2018). Producción de lectinas de origen vegetal y fúngico y evaluación de su potencial antimicrobiano. Tesis de Licenciatura. Universidad de la República.

Clavijo, F., Curland, R. D., Croce, V., Lapaz, M. I., Dill-Macky, R., Pereyra, S., et al. (2022). Genetic and Phenotypic Characterization of *Xanthomonas* Species Pathogenic in Wheat in Uruguay. *Phytopathology* 112, 511–520. doi: 10.1094/PHYTO-06-21-0231-R/ASSET/IMAGES/LARGE/PHYTO-06-21-0231-RF4.JPEG

CLSI (2015). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. *Approved Standard, 10th Edition, CLSI* 35.

CLSI (2017). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. *Approved Standard, 3th Edition* .

CONICET (2021). Un nuevo barbijo ATOM PROTECT N95 PLUS para prevenir el COVID. Available at: https://www.conicet.gov.ar/un-nuevo-barbijo-atom-protect-n95-plus-para-prevenir-el-covid/ (Accessed February 7, 2024).

Cui, D., Kong, L., Wang, Y., Zhu, Y., and Zhang, C. (2022). In situ identification of environmental microorganisms with Raman spectroscopy. *Environmental Science and Ecotechnology* 11, 100187. doi: 10.1016/J.ESE.2022.100187

Das, C. G. A., Kumar, V. G., Dhas, T. S., Karthick, V., Govindaraju, K., Joselin, J. M., et al. (2020). Antibacterial activity of silver nanoparticles (biosynthesis): A short review on recent advances. *Biocatal Agric Biotechnol* 27, 101593. doi: https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101593

Das, S. K., Das, A. R., and Guha, A. K. (2009). Gold nanoparticles: Microbial synthesis and application in water hygiene management. *Langmuir* 25, 8192–8199. doi: 10.1021/la900585p

Dashora, A., Rathore, K., Raj, S., and Sharma, K. (2022). Synthesis of silver nanoparticles employing *Polyalthia longifolia* leaf extract and their in vitro antifungal activity against phytopathogen. *Biochem Biophys Rep* 31. doi: 10.1016/J.BBREP.2022.101320

De Gelder, J., De Gussem, K., Vandenabeele, P., and Moens, L. (2007). Reference database of Raman spectra of biological molecules. *Journal of Raman Spectroscopy* 38, 1133–1147. doi: 10.1002/jrs.1734

de Lacerda Coriolano, D., de Souza, J. B., Bueno, E. V., Medeiros, S. M. de F. R. dos S., Cavalcanti, I. D. L., and Cavalcanti, I. M. F. (2021). Antibacterial and antibiofilm potential of silver nanoparticles against antibiotic-sensitive and multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa strains. *Brazilian Journal of Microbiology* 52, 267–278. doi: 10.1007/s42770-020-00406-x

De Matteis, V., Griego, A., Scarpa, E., Cascione, M., Singh, J., and Rizzello, L. (2023). Size Effect of Silver Nanoparticles Derived from Olive Mill Wastewater in THP-1 Cell Lines. *Applied Sciences 2023, Vol. 13, Page 6033* 13, 6033. doi: 10.3390/APP13106033

de Siqueira e Oliveira, F. S. A., da Silva, A. M., Pacheco, M. T. T., Giana, H. E., and Silveira, L. (2021). Biochemical characterization of pathogenic bacterial species using Raman spectroscopy and discrimination model based on selected spectral features. *Lasers Med Sci* 36, 289–302. doi: 10.1007/S10103-020-03028-9/METRICS

de Souza, C. M., dos Santos, M. M., Furlaneto-Maia, L., and Furlaneto, M. C. (2023). Adhesion and biofilm formation by the opportunistic pathogen *Candida tropicalis*: what do we know? *Can J Microbiol* 69, 207–218. doi: 10.1139/CJM-2022-0195

Dehbanipour, R., and Ghalavand, Z. (2022). Acinetobacter baumannii: Pathogenesis, virulence factors, novel therapeutic options and mechanisms of resistance to antimicrobial agents with emphasis on tigecycline. *J Clin Pharm Ther* 47, 1875–1884. doi: 10.1111/JCPT.13787

Deniz, F., and Mazmanci, M. A. (2020). The biosynthesis of silver nanoparticles with fungal cytoplasmic fluid obtained from *Phanerochaete chrysosporium* ME446. *Environmental Research and Technology* 3, 187–192. doi: 10.35208/ert.788891

Díaz-García, D., Ardiles, P. R., Díaz-Sánchez, M., Mena-Palomo, I., del Hierro, I., Prashar, S., et al. (2020). Copper-functionalized nanostructured silica-based systems: Study of the antimicrobial applications and ROS generation against gram positive and gram negative bacteria. *J Inorg Biochem* 203, 110912.

Dixit, R., and Kumari, M. (2023). Microbial metabolites in plant disease management. *Microbial Biomolecules: Emerging Approach in Agriculture, Pharmaceuticals and Environment Management*, 159–179. doi: 10.1016/B978-0-323-99476-7.00005-3

Durán, N., Fávaro, W., Alborés, S., da Costa, T., and Tasic, L. (2023). Biogenic Silver Nanoparticles Capped with Proteins: Timed Knowledge and Perspectives. *J Braz Chem Soc*. doi: 10.21577/0103-5053.20230062

Durán, N., Marcato, P. D., Alves, O. L., De Souza, G. I. H., and Esposito, E. (2005). Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *J Nanobiotechnology* 3, 1–7. doi: 10.1186/1477-3155-3-8/FIGURES/9

Durán, N., Rolim, W. R., Durán, M., Fávaro, W. J., and Seabra, A. B. (2019). Nanotoxicologia de nanoparticulas de prata: toxicidade em animais e humanos. *Quim Nova* 42, 206–213. doi: 10.21577/0100-4042.20170318

Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop, P., McGaw, M., Marchant, R., et al. (2016). Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnol Lett* 38, 1015–1019. doi: 10.1007/s10529-016-2079-2

Estevez, M. B., Raffaelli, S., Mitchell, S. G., Faccio, R., and Alborés, S. (2020). Biofilm eradication using biogenic silver nanoparticles. *Molecules* 25. doi: 10.3390/molecules25092023

Fayaz, A. M., Balaji, K., Girilal, M., Yadav, R., Kalaichelvan, P. T., and Venketesan, R. (2010). Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their

synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine* 6, 103–109. doi: 10.1016/J.NANO.2009.04.006

Ferdous, Z., and Nemmar, A. (2020). Health Impact of Silver Nanoparticles: A Review of the Biodistribution and Toxicity Following Various Routes of Exposure. *International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 2375* 21, 2375. doi: 10.3390/IJMS21072375

Ferreyra Maillard, A. P. V., Gonçalves, S., Santos, N. C., López de Mishima, B. A., Dalmasso, P. R., and Hollmann, A. (2019). Studies on interaction of green silver nanoparticles with whole bacteria by surface characterization techniques. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1861, 1086–1092. doi: 10.1016/J.BBAMEM.2019.03.011

Fiołka, M. J., Mieszawska, S., Czaplewska, P., Szymańska, A., Stępnik, K., Sofińska-Chmiel, W., et al. (2020). *Candida albicans* cell wall as a target of action for the protein–carbohydrate fraction from coelomic fluid of *Dendrobaena veneta*. *Sci Rep* 10, 16352. doi: 10.1038/s41598-020-73044-w

Gautam, N., Salaria, N., Thakur, K., Kukreja, S., Yadav, N., Yadav, R., et al. (2020). Green Silver Nanoparticles for Phytopathogen Control. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 90, 439–446. doi: 10.1007/s40011-019-01115-8

Ghaith, E. S. I., Mohamed, M. A., and Abdel-Haliem, M. F. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial activities. *2020 Advances in Science and Engineering Technology International Conferences, ASET 2020*. doi: 10.1109/ASET48392.2020.9118339

Gieroba, B., Krysa, M., Wojtowicz, K., Wiater, A., Pleszczyńska, M., Tomczyk, M., et al. (2020). The FT-IR and Raman Spectroscopies as Tools for Biofilm Characterization Created by Cariogenic Streptococci. *Int J Mol Sci* 21. doi: 10.3390/IJMS21113811

Gökşen Tosun, N., and Kaplan, Ö. (2021). Optimization of the Green Synthesis of Silver Nanoparticle with Box-Behnken Design: Using Aloe Vera Plant Extract as a Reduction Agent. *Sakarya University Journal of Science* 25, 774–787. doi: 10.16984/SAUFENBILDER.806916

Goltermann, L., Zhang, M., Ebbensgaard, A. E., Fiodorovaite, M., Yavari, N., Løbner-Olesen, A., et al. (2022). Effects of LPS Composition in Escherichia coli on Antibacterial Activity and Bacterial Uptake of Antisense Peptide-PNA Conjugates. *Front Microbiol* 13, 877377. doi: 10.3389/FMICB.2022.877377/BIBTEX

Gonzalez Moreno, M., Wang, L., De Masi, M., Winkler, T., Trampuz, A., and Di Luca, M. (2019). In vitro antimicrobial activity against *Abiotrophia defectiva*

and *Granulicatella elegans* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 74, 2261–2268. doi: 10.1093/jac/dkz174

Gopinath, P. M., Narchonai, G., Dhanasekaran, D., Ranjani, A., and Thajuddin, N. (2015). Mycosynthesis, characterization and antibacterial properties of AgNPs against multidrug resistant (MDR) bacterial pathogens of female infertility cases. *AJPS* 2, 138-145. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2014.08.007

Gopinath, V., Priyadarshini, S., Loke, M. F., Arunkumar, J., Marsili, E., MubarakAli, D., et al. (2017). Biogenic synthesis, characterization of antibacterial silver nanoparticles and its cell cytotoxicity. *Arab. J. Chem.* 10, 1107–1117. doi: 10.1016/J.ARABJC.2015.11.011

Goswami, S. R., Sahareen, T., Singh, M., and Kumar, S. (2015). Role of biogenic silver nanoparticles in disruption of cell-cell adhesion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli biofilm. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 26, 73–80. doi: 10.1016/j.jiec.2014.11.017

Guilger, M., Pasquoto-Stigliani, T., Bilesky-Jose, N., Grillo, R., Abhilash, P. C., Fraceto, L. F., et al. (2017). Biogenic silver nanoparticles based on trichoderma harzianum: synthesis, characterization, toxicity evaluation and biological activity. *Sci Rep* 7, 44421. doi: 10.1038/srep44421

Guilger-Casagrande, M., Germano-Costa, T., Bilesky-José, N., Pasquoto-Stigliani, T., Carvalho, L., Fraceto, L. F., et al. (2021). Influence of the capping of biogenic silver nanoparticles on their toxicity and mechanism of action towards Sclerotinia sclerotiorum. *J Nanobiotechnology* 19, 53. doi: 10.1186/s12951-021-00797-5

Guilger-Casagrande, M., and Lima, R. de (2019). Synthesis of Silver Nanoparticles Mediated by Fungi: A Review. *Front Bioeng Biotechnol* 7, 486092. doi: 10.3389/FBIOE.2019.00287/BIBTEX

Gulati, M., and Nobile, C. J. (2016). Candida albicans biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect* 18, 310–321. doi: 10.1016/J.MICINF.2016.01.002

Guo, J., Qin, S., Wei, Y., Liu, S., Peng, H., Li, Q., et al. (2019). Silver nanoparticles exert concentration-dependent influences on biofilm development and architecture. *Cell Prolif* 52, e12616. doi: 10.1111/CPR.12616

Gurunathan, S., Lee, A. R., and Kim, J. H. (2022). Antifungal Effect of Nanoparticles against COVID-19 Linked Black Fungus: A Perspective on Biomedical Applications. *Int J Mol Sci* 23. doi: 10.3390/IJMS232012526

Haase, A., Tentschert, J., Jungnickel, H., Graf, P., Mantion, A., Draude, F., et al. (2011). Toxicity of silver nanoparticles in human macrophages: uptake,

intracellular distribution and cellular responses. *J Phys Conf Ser* 304, 012030. doi: 10.1088/1742-6596/304/1/012030

Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Akbar Ashkarran, A., Jimenez de Aberasturi, D., Larramendi, I. R. de, Rojo, T., et al. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol* 30, 499–511. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.06.004

Hamad, A., Khashan, K. S., and Hadi, A. (2020). Silver Nanoparticles and Silver Ions as Potential Antibacterial Agents. *J Inorg Organomet Polym Mater* 30, 4811–4828. doi: 10.1007/s10904-020-01744-x

Hamouda, R. A., Hussein, M. H., Abo-elmagd, R. A., and Bawazir, S. S. (2019). Synthesis and biological characterization of silver nanoparticles derived from the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Sci Rep* 9, 13071. doi: 10.1038/s41598-019-49444-y

Haq, A. ul, Majeed, M. I., Nawaz, H., Rashid, N., Javed, M. R., Iqbal, M. A., et al. (2023). Surface-enhanced Raman spectroscopy for monitoring antibacterial activity of imidazole derivative (1-benzyl-3-(sec-butyl)-1H-imidazole-3-ium bromide) against *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 42, 103533. doi: 10.1016/J.PDPDT.2023.103533

Hasan, K. M. F., Xiaoyi, L., Shaoqin, Z., Horváth, P. G., Bak, M., Bejó, L., et al. (2022). Functional silver nanoparticles synthesis from sustainable point of view: 2000 to 2023 – A review on game changing materials. *Heliyon* 8, e12322. doi: 10.1016/J.HELIYON.2022.E12322

Hassan, A. (2016). The efficiency of using silver nanoparticles singly and in combination with traditional antimicrobial agents un control of some fungal and bacterial affection of buffaloes. *Int J Curr Res* 8, 2016, pp. 29758–29770, April.

Hetta, H. F., Al-Kadmy, I. M. S., Khazaal, S. S., Abbas, S., Suhail, A., El-Mokhtar, M. A., et al. (2021). Antibiofilm and antivirulence potential of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Sci Rep* 11. doi: 10.1038/S41598-021-90208-4

Ho, C.-S., Jean, N., Hogan, C. A., Blackmon, L., Jeffrey, S. S., Holodniy, M., et al. (2019). Rapid identification of pathogenic bacteria using Raman spectroscopy and deep learning. *Nat Commun* 10, 1–8.

Høiby, N. (2017). A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *APMIS* 125, 272–275. doi: 10.1111/APM.12686

Hooton, S. P. T., Pritchard, A. C. W., Asiani, K., Gray-Hammerton, C. J., Stekel, D. J., Crossman, L. C., et al. (2021). Laboratory Stock Variants of the Archetype Silver Resistance Plasmid pMG101 Demonstrate Plasmid Fusion, Loss of Transmissibility, and Transposition of Tn7/pco/sil Into the Host

Chromosome. *Front Microbiol* 12, 723322. doi: 10.3389/FMICB.2021.723322/BIBTEX

Hrubanova, K., Krzyzanek, V., Nebesarova, J., Ruzicka, F., Pilat, Z., and Samek, O. (2018). Monitoring *Candida parapsilosis* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms by a Combination of Scanning Electron Microscopy and Raman Spectroscopy. *Sensors 2018, Vol. 18, Page 4089* 18, 4089. doi: 10.3390/S18124089

Huq, M. A., Ashrafudoulla, M., Rahman, M. M., Balusamy, S. R., and Akter, S. (2022). Green Synthesis and Potential Antibacterial Applications of Bioactive Silver Nanoparticles: A Review. *Polymers (Basel)* 14. doi: 10.3390/POLYM14040742

Iemyte̊, M. Z. ˇ, Escudero, A., Díez, P., Ferrer, M. D., Murguía, J. R., Martí-Centelles, V., et al. (2023). Ficin–Cyclodextrin-Based Docking Nanoarchitectonics of Self-Propelled Nanomotors for Bacterial Biofilm Eradication. *Chem. Mater.* doi: 10.1021/ACS.CHEMMATER.3C00587

Inovet (n.d.). OTÓPIC AG. Available at: https://ino.vet/produto/otopic-ag/ (Accessed February 7, 2024).

Israelsen, N. D., Hanson, C., and Vargis, E. (2015). Nanoparticle properties and synthesis effects on surface-enhanced Raman scattering enhancement factor: An introduction. *Sci. World J.* 2015. doi: 10.1155/2015/124582

Jadimurthy, R., Mayegowda, S. B., Nayak, S. C., Mohan, C. D., and Rangappa, K. S. (2022). Escaping mechanisms of ESKAPE pathogens from antibiotics and their targeting by natural compounds. *Biotechnol. Rep.* 34, e00728. doi: 10.1016/J.BTRE.2022.E00728

Jaidev, L. R., and Narasimha, G. (2010). Fungal mediated biosynthesis of silver nanoparticles, characterization and antimicrobial activity. *Colloids Surf B Biointerfaces* 81, 430–433. doi: 10.1016/J.COLSURFB.2010.07.033

Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., et al. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *J. Chin. Med. Assoc.* 81, 7–11. doi: 10.1016/j.jcma.2017.07.012

Jaswal, T., and Gupta, J. (2023). A review on the toxicity of silver nanoparticles on human health. *Mater Today Proc* 81, 859–863. doi: https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.04.266

Javed, B., Ikram, M., Farooq, F., Sultana, T., Mashwani, Z.-R., and Raja, N. I. (2021). Biogenesis of silver nanoparticles to treat cancer, diabetes, and microbial infections: a mechanistic overview. *Appl Microbiol Biotechnol* 105, 2261–2275. doi: 10.1007/s00253-021-11171-8

Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., and Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein J. Nanotechnol.* 9, 1050–1074. doi: 10.3762/bjnano.9.98

Jiang, Y., Zheng, W., Tran, K., Kamilar, E., Bariwal, J., Ma, H., et al. (2022). Hydrophilic nanoparticles that kill bacteria while sparing mammalian cells reveal the antibiotic role of nanostructures. *Nat. Commun.* 13, 1–17. doi: 10.1038/s41467-021-27193-9

Johnston, R. L. (2012). Metal Nanoparticles and Nanoalloys. *Front. Nanosci.* 3, 1–42. doi: 10.1016/B978-0-08-096357-0.00006-6

Joo, H. S., Fu, C. I., and Otto, M. (2016). Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371. doi: 10.1098/RSTB.2015.0292

Joshi, N., Jain, N., Pathak, A., Singh, J., Prasad, R., and Upadhyaya, C. P. (2018). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Carissa carandas* berries and its potential antibacterial activities. *J Solgel Sci Technol* 86, 682–689. doi: 10.1007/s10971-018-4666-2

Kędziora, A., Wieczorek, R., Speruda, M., Matolínová, I., Goszczyński, T. M., Litwin, I., et al. (2021). Comparison of Antibacterial Mode of Action of Silver Ions and Silver Nanoformulations With Different Physico-Chemical Properties: Experimental and Computational Studies. *Front Microbiol* 12, 659614. doi: 10.3389/FMICB.2021.659614/BIBTEX

Keshari, A. K., Srivastava, R., Singh, P., Yadav, V. B., and Nath, G. (2020). Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cestrum nocturnum*. *J Ayurveda Integr Med* 11, 37–44. doi: 10.1016/J.JAIM.2017.11.003

Kettler, K., Giannakou, C., de Jong, W. H., Hendriks, A. J., and Krystek, P. (2016). Uptake of silver nanoparticles by monocytic THP-1 cells depends on particle size and presence of serum proteins. *J. Nanoparticle Res.* 18, 1–9. doi: 10.1007/S11051-016-3595-7/TABLES/2

Khalid Mohamed, T., Osman Widdatallah, M., Musa Ali, M., Mubarak Alhaj, A., and Abdelmagied Elhag, D. (2021). Green Synthesis, Characterization, and Evaluation of the Antimicrobial Activity of *Camellia sinensis* Silver Nanoparticles. *J Nanotechnol* 2021. doi: 10.1155/2021/2867404

Khan, A. U., Malik, N., Khan, M., Cho, M. H., and Khan, M. M. (2017). Fungi-assisted silver nanoparticle synthesis and their applications. *Bioprocess and Biosyst. Eng.* 41, 1–20. doi: 10.1007/S00449-017-1846-3

Khan, I., Saeed, K., and Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab. J. Chem.* 12, 908–931. doi: 10.1016/J.ARABJC.2017.05.011

Khan, M., Karuppiah, P., Alkhathlan, H. Z., Kuniyil, M., Khan, M., Adil, S. F., et al. (2022). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Juniperus procera* Extract: Their Characterization, and Biological Activity. *Crystals (Basel)* 12. doi: 10.3390/CRYST12030420

Khorrami, S., Zarrabi, A., Khaleghi, M., Danaei, M., and Mozafari, M. R. (2018). Selective cytotoxicity of green synthesized silver nanoparticles against the MCF-7 tumor cell line and their enhanced antioxidant and antimicrobial properties. *Int J Nanomedicine* 13, 8013–8024. doi: 10.2147/IJN.S189295

Khristoforova, Y., Bratchenko, L., and Bratchenko, I. (2023). Raman-Based Techniques in Medical Applications for Diagnostic Tasks: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 15605. doi: 10.3390/IJMS242115605

Kim, J., and Chin, Y. W. (2023). Antimicrobial Agent against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm Monitored Using Raman Spectroscopy. *Pharm.* 15, 1937. doi: 10.3390/PHARMACEUTICS15071937

Kora, A. J., and Sashidhar, R. B. (2018). Biogenic silver nanoparticles synthesized with hamnogalacturonan gum: Antibacterial activity, cytotoxicity and its mode of action. *Arab. J. Chem.* 11, 313–323. doi: 10.1016/J.ARABJC.2014.10.036

Kovács, D., Igaz, N., Gopisetty, M. K., and Kiricsi, M. (2022). Cancer Therapy by Silver Nanoparticles: Fiction or Reality? *Int. J. Mol. Sci.* 23, 839. doi: 10.3390/IJMS23020839

Kovács, R., and Majoros, L. (2020). Fungal Quorum-Sensing Molecules: A Review of Their Antifungal Effect against *Candida Biofilms*. *J. Fung.* 6, 99. doi: 10.3390/JOF6030099

Krystek, P., Kettler, K., van der Wagt, B., and de Jong, W. H. (2015). Exploring influences on the cellular uptake of medium-sized silver nanoparticles into THP-1 cells. *Microchem. J.* 120, 45–50. doi: https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.01.005

Kumar, C. R., Ramaiah, DR. S., and Anandadanbarasu, DR. (2022). Unveiling the apoptotic potential of silver nanoparticles on human colon carcinoma HT29 cells. *J Pharm Negat Results* 13, 2618–2623. doi: 10.47750/PNR.2022.13.S06.338

Kumar, M., Ranjan, R., Sinha, M. P., and Raipat, B. S. (2023). Different Techniques Utilized for Characterization of Metallic Nanoparticles Synthesized Using Biological Agents: A Review. *Balneo and PRM Research Journal* 14, 534. doi: https://doi.org/ 10.12680/balneo.2023.534

Kusić, D., Kampe, B., Ramoji, A., Neugebauer, U., Rösch, P., and Popp, J. (2015). Raman spectroscopic differentiation of planktonic bacteria and biofilms. *Anal Bioanal Chem* 407, 6803–6813. doi: 10.1007/s00216-015-8851-7

Lan Chi, N. T., Veeraragavan, G. R., Brindhadevi, K., Chinnathambi, A., Salmen, S. H., Alharbi, S. A., et al. (2022). Fungi fabrication, characterization, and anticancer activity of silver nanoparticles using metals resistant *Aspergillus niger*. *Environ Res* 208, 112721. doi: 10.1016/J.ENVRES.2022.112721

Li, T., Senesi, A. J., and Lee, B. (2016). Small Angle X-ray Scattering for Nanoparticle Research. *Chem Rev* 116, 11128–11180. doi: 10.1021/ACS.CHEMREV.5B00690/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CR-2015-00690Z_0049.GIF

Lin, Z., Zhao, X., Huang, J., Liu, W., Zheng, Y., Yang, X., et al. (2019). Rapid screening of colistin-resistant *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* by the use of Raman spectroscopy and hierarchical cluster analysis. *Analyst* 144, 2803–2810. doi: 10.1039/C8AN02220H

Ling, W., Paterson, D. L., Harris, P. N. A., Furuya-Kanamori, L., Edwards, F., and Laupland, K. B. (2024). Mortality, hospital length of stay, and recurrent bloodstream infections associated with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a low prevalence region: A 20-year population-based large cohort study. *IJID* 138, 84–90. doi: https://doi.org/10.1016/j.ijid.2023.11.007

Liu, L., Liu, T., Tade, M., Wang, S., Li, X., and Liu, S. (2014). Less is more, greener microbial synthesis of silver nanoparticles. *Enzyme Microb Technol* 67, 53–58. doi: https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.09.003

Liu, W., Wu, Y., Wang, C., Li, H. C., Wang, T., Liao, C. Y., et al. (2010). Impact of silver nanoparticles on human cells: Effect of particle size. *Nanotoxicology* 4, 319–330. doi: 10.3109/17435390.2010.483745

Lu, J., Bravo-Suárez, J. J., Takahashi, A., Haruta, M., and Oyama, S. T. (2005). In situ UV-vis studies of the effect of particle size on the epoxidation of ethylene and propylene on supported silver catalysts with molecular oxygen. *J Catal* 232, 85–95. doi: 10.1016/j.jcat.2005.02.013

Luceri, A., Francese, R., Lembo, D., Ferraris, M., and Balagna, C. (2023). Silver Nanoparticles: Review of Antiviral Properties, Mechanism of Action and Applications. *Microorganisms* 11, 629. doi: 10.3390/MICROORGANISMS11030629

Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., and Stahl, D. A. (2020). *Brock biology of microorganisms*., 16th Edn.

Magdy, G., Aboelkassim, E., Abd Elhaleem, S. M., and Belal, F. (2024). A comprehensive review on silver nanoparticles: Synthesis approaches, characterization techniques, and recent pharmaceutical, environmental, and antimicrobial applications. *Microchemical Journal* 196, 109615. doi: 10.1016/J.MICROC.2023.109615

Marques, F. C., Oliveira, G. P., Teixeira, R. A. R., Justo, R. M. S., Neves, T. B. V., and Andrade, G. F. S. (2018). Characterization of 11-mercaptoundecanoic and 3-mercaptopropionic acids adsorbed on silver by surface-enhanced Raman scattering. *Vib Spectrosc* 98, 139–144. doi: 10.1016/J.VIBSPEC.2018.07.015

Masum, M. I., Siddiqa, M. M., Ali, K. A., Zhang, Y., Abdallah, Y., Ibrahim, E., et al. (2019). Biogenic synthesis of silver nanoparticles using *Phyllanthus emblicafruit* extract and its inhibitory action against the pathogen *Acidovorax oryzaestrain* RS-2 of rice bacterial brown stripe. *Front Microbiol* 10, 820. doi: 10.3389/FMICB.2019.00820/BIBTEX

Mesosilver (n.d.). Mesosilver webpage. Available at: https://www.mesosilver.com/ (Accessed February 7, 2024).

Modi, S. K., Gaur, S., Sengupta, M., and Singh, M. S. (2023). Mechanistic insights into nanoparticle surface-bacterial membrane interactions in overcoming antibiotic resistance. *Front Microbiol* 14, 1135579. doi: 10.3389/FMICB.2023.1135579/BIBTEX

Mohammadi, B., and Salouti, M. (2015). Extracellular bioynthesis of silver nanoparticles by *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium expansum*. *Synth React Inorg, M.* 45, 844–847. doi: 10.1080/15533174.2013.862640

Mohanta, Y. K., Biswas, K., Jena, S. K., Hashem, A., Abd_Allah, E. F., and Mohanta, T. K. (2020). Anti-biofilm and Antibacterial Activities of Silver Nanoparticles Synthesized by the Reducing Activity of Phytoconstituents Present in the Indian Medicinal Plants. *Front Microbiol* 11, 499780. doi: 10.3389/FMICB.2020.01143/BIBTEX

Mombrú, Á. (2013). "Nanotecnología y Uruguay," in *Las nanotecnologías en Uruguay*, (1era Edición Colección Interdisciplinarias 2012). Available at: https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/7583/1/nanotecnolog%C3%ADas.pdf (Accessed February 13, 2024).

Montazeri, A., Salehzadeh, A., and Zamani, H. (2020). Effect of silver nanoparticles conjugated to thiosemicarbazide on biofilm formation and expression of intercellular adhesion molecule genes, icaAD, in Staphylococcus aureus. *Folia Microbiol (Praha)* 65, 153–160. doi: 10.1007/S12223-019-00715-1

More, P. R., Pandit, S., Filippis, A. De, Franci, G., Mijakovic, I., and Galdiero, M. (2023). Silver Nanoparticles: Bactericidal and Mechanistic Approach against Drug Resistant Pathogens. *Microorganisms 2023, Vol. 11, Page 369* 11, 369. doi: 10.3390/MICROORGANISMS11020369

Mussin, J., and Giusiano, G. (2022). Biogenic silver nanoparticles as antifungal agents. *Front Chem* 10. doi: 10.3389/FCHEM.2022.1023542

Mustapha, T., Misni, N., Ithnin, N. R., Daskum, A. M., and Unyah, N. Z. (2022). A Review on Plants and Microorganisms Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles, Role of Plants Metabolites and Applications. *IJERPH* 19, 674. doi: 10.3390/IJERPH19020674

Mwangi, R. W., Mustafa, M., Charles, K., Wagara, I. W., and Kappel, N. (2023). Selected emerging and reemerging plant pathogens affecting the food basket: A threat to food security. *J Agric Food Res* 14, 100827. doi: 10.1016/J.JAFR.2023.100827

Nadaf, S. J., Jadhav, N. R., Naikwadi, H. S., Savekar, P. L., Sapkal, I. D., Kambli, M. M., et al. (2022). Green synthesis of gold and silver nanoparticles: Updates on research, patents, and future prospects. *OpenNano* 8, 100076. doi: 10.1016/J.ONANO.2022.100076

Nadar, S., Khan, T., Patching, S. G., and Omri, A. (2022). Development of Antibiofilm Therapeutics Strategies to Overcome Antimicrobial Drug Resistance. *Microorganisms* 10, 303. doi: 10.3390/MICROORGANISMS10020303

Nagaprasad, N., Chandralekha, D., Karri, V. V. S. R., Shanmugam, R., Dwarampudi, L. P., Tesfaye, J. L., et al. (2022). Synchronous and Futuristic Views on the Application of Silver Nanoparticles: A Journey towards Green Synthesis. *J Nanomater* 2022. doi: 10.1155/2022/7411352

Nanda, S. S., Yi, D. K., and Kim, K. (2016). Study of antibacterial mechanism of graphene oxide using Raman spectroscopy. *Sci Rep* 6. doi: 10.1038/srep28443

Nanox (2023). Nanox webpage. Available at: https://www.nanoxtech.com/textil (Accessed February 7, 2024).

National Nanotechnology Initiative (NNI) (2024). About Nanotechnology. Available at: https://www.nano.gov/about-nanotechnology (Accessed February 7, 2024).

Neethu, S., Midhun, S. J., Radhakrishnan, E. K., and Jyothis, M. (2018). Green synthesized silver nanoparticles by marine endophytic fungus *Penicillium polonicum* and its antibacterial efficacy against biofilm forming, multidrug-resistant *Acinetobacter baumanii*. *Microb Pathog* 116, 263–272. doi: 10.1016/J.MICPATH.2018.01.033

Nelson, B. C., Minelli, C., Doak, S. H., and Roesslein, M. (2020). Emerging Standards and Analytical Science for Nanoenabled Medical Products. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 13, 431–452. doi: 10.1146/ANNUREV-ANCHEM-091619-102216

Nelson, W. H., Dasari, R., Feld, M., and Sperry, J. F. (2004). Intensities of Calcium Dipicolinate and *Bacillus subtilis* Spore Raman Spectra Excited with 244 nm Light. *SAS* 58, 1408–1412. doi: 10.1366/0003702042641290

Nguyen, D. H., Vo, T. N. N., Nguyen, N. T., Ching, Y. C., and Thi, T. T. H. (2020). Comparison of biogenic silver nanoparticles formed by *Momordica charantia* and *Psidium guajava* leaf extract and antifungal evaluation. *PLoS One* 15, e0239360. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0239360

Nguyen, K. C., Seligy, V. L., Massarsky, A., Moon, T. W., Rippstein, P., Tan, J., et al. (2013). Comparison of toxicity of uncoated and coated silver nanoparticles. *J Phys Conf Ser* 429, 012025. doi: 10.1088/1742-6596/429/1/012025

Nie, P., Zhao, Y., and Xu, H. (2023). Synthesis, applications, toxicity and toxicity mechanisms of silver nanoparticles: A review. *Ecotoxicol Environ Saf* 253, 114636. doi: 10.1016/J.ECOENV.2023.114636

NIVEA (n.d.). Antitranspirante Silver Protect Roll-ON. Available at: https://www.nivea.cl/productos/antitranspirante-silver-protect-roll-on-40058083073260025.html (Accessed February 7, 2024).

Noga, M., Milan, J., Frydrych, A., and Jurowski, K. (2023). Toxicological Aspects, Safety Assessment, and Green Toxicology of Silver Nanoparticles (AgNPs)—Critical Review: State of the Art. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 5133. doi: 10.3390/IJMS24065133

Noorbazargan, H., Amintehrani, S., Dolatabadi, A., Mashayekhi, A., Khayam, N., Moulavi, P., et al. (2021). Anti-cancer & anti-metastasis properties of bioorganic-capped silver nanoparticles fabricated from *Juniperus chinensis* extract against lung cancer cells. *AMB Express* 11, 1–14. doi: 10.1186/S13568-021-01216-6/FIGURES/10

Novikov, A., Sayfutdinova, A., Botchkova, E., Kopitsyn, D., and Fakhrullin, R. (2022). Antibiotic Susceptibility Testing with Raman Biosensing. *Antibiotics* 11, 1812. doi: 10.3390/ANTIBIOTICS11121812

Nwabor, O. F., Singh, S., Ontong, J. C., Vongkamjan, K., and Voravuthikunchai, S. P. (2021). Valorization of Wastepaper Through Antimicrobial Functionalization with Biogenic Silver Nanoparticles, a Sustainable Packaging Composite. *Waste Biomass Valorization* 12, 3287–3301. doi: 10.1007/s12649-020-01237-5

Oshima, Y., Haruki, T., Koizumi, K., Yonezawa, S., Taketani, A., Kadowaki, M., et al. (2023). Practices, Potential, and Perspectives for Detecting Predisease Using Raman Spectroscopy. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 12170. doi: 10.3390/IJMS241512170

Otari, S. V., Patil, R. M., Ghosh, S. J., Thorat, N. D., and Pawar, S. H. (2015). Intracellular synthesis of silver nanoparticle by actinobacteria and its antimicrobial activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 136, 1175–1180. doi: 10.1016/J.SAA.2014.10.003

Ottoni, C. A., Simões, M. F., Fernandes, S., dos Santos, J. G., da Silva, E. S., de Souza, R. F. B., et al. (2017). Screening of filamentous fungi for antimicrobial silver nanoparticles synthesis. *AMB Express* 7, 1–10. doi: 10.1186/S13568-017-0332-2

Oves, M., Khan, M. S., Zaidi, A., Ahmed, A. S., Ahmed, F., Ahmad, E., et al. (2013). Antibacterial and Cytotoxic Efficacy of Extracellular Silver Nanoparticles Biofabricated from Chromium Reducing Novel OS4 Strain of *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS One* 8, e59140. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0059140

Paraje, M. (2011a). Antimicrobial resistance in biofilms. *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances* 2.

Paraje, M. G. (2011b). Antimicrobial resistance in biofilms. *A. Méndez-Vilas (Ed.)*.

Paramelle, D., Sadovoy, A., Gorelik, S., Free, P., Hobley, J., and Fernig, D. G. (2014). A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. *Analyst* 139, 4855–4861. doi: 10.1039/c4an00978a

Pareek, V., Gupta, R., and Panwar, J. (2018). Do physico-chemical properties of silver nanoparticles decide their interaction with biological media and bactericidal action? A review. *Mater. Sci. Eng.: C* 90, 739–749. doi: 10.1016/J.MSEC.2018.04.093

Peiris, M. M. K., Fernando, S. S. N., Jayaweera, P. M., Arachchi, N. D. H., and Guansekara, T. D. C. P. (2018). Comparison of Antimicrobial Properties of Silver Nanoparticles Synthesized from Selected Bacteria. *Indian J Microbiol* 58, 301–311. doi: 10.1007/S12088-018-0723-3/METRICS

Pérez, H., Vargas, G., and Silva, R. (2022). Use of Nanotechnology to Mitigate Biofouling in Stainless Steel Devices Used in Food Processing, Healthcare, and Marine Environments. *Toxics* 10, 35. doi: 10.3390/TOXICS10010035

Periyasami, G., Palaniappan, S., Karuppiah, P., Rahaman, M., Karthikeyan, P., Aldalbahi, A., et al. (2022). Biogenic Silver Nanoparticles Fabricated by *Euphorbia granulata* Forssk's Extract: Investigating the Antimicrobial, Radical Scavenging, and Catalytic Activities. *J Nanomater* 2022. doi: 10.1155/2022/3864758

Perumal, A. B., Li, X., Su, Z., and He, Y. (2021). Preparation and characterization of a novel green tea essential oil nanoemulsion and its antifungal mechanism of action against *Magnaporthae oryzae*. *Ultrason Sonochem* 76, 105649. doi: 10.1016/J.ULTSONCH.2021.105649

Petra, R., Michaela, H., Michael, S., Klaus-Dieter, P., Olaf, R., Hans, B., et al. (2005). Chemotaxonomic Identification of Single Bacteria by Micro-Raman Spectroscopy: Application to Clean-Room-Relevant Biological

Contaminations. *Appl Environ Microbiol* 71, 1626–1637. doi: 10.1128/AEM.71.3.1626-1637.2005

Pezzotti, G., Kobara, M., Nakaya, T., Imamura, H., Miyamoto, N., Adachi, T., et al. (2022). Raman Spectroscopy of Oral Candida Species: Molecular-Scale Analyses, Chemometrics, and Barcode Identification. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 5359. doi: 10.3390/IJMS23105359

Phanjom, P., Ahmed, G., Phanjom, P., and Ahmed, G. (2017). Effect of different physicochemical conditions on the synthesis of silver nanoparticles using fungal cell filtrate of *Aspergillus oryzae* (MTCC No. 1846) and their antibacterial effect. *ANSNN* 8, 045016. doi: 10.1088/2043-6254/AA92BC

Phillips, N. A., Rocktashel, M., and Merjanian, L. (2023). Ibrexafungerp for the Treatment of Vulvovaginal Candidiasis: Design, Development and Place in Therapy. *Drug Des Devel Ther* 17, 363–367. doi: 10.2147/DDDT.S339349

Pistiki, A., Monecke, S., Shen, H., Ryabchykov, O., Bocklitz, T. W., Rösch, P., et al. (2022). Comparison of Different Label-Free Raman Spectroscopy Approaches for the Discrimination of Clinical MRSA and MSSA Isolates. *Microbiol Spectr* 10. doi: 10.1128/SPECTRUM.00763-22

Preda, P., Avram, M., Stan, D., Romanitan, C., Craciun, G., Simion, M., et al. (2020). Biogenic synthesis of silver nanoparticles using sea buckthorn fruits aqueous extract and antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Int. Semi. Conf., CAS* 2020-October, 203–206. doi: 10.1109/CAS50358.2020.9268024

Pribul, B. R., Festivo, M. L., Rodrigues, M. S., Costa, R. G., Rodrigues, E. C. dos P., de Souza, M., et al. (2017). Characteristics of quinolone resistance in *Salmonella* spp. isolates from the food chain in Brazil. *Front Microbiol* 8, 299. doi: 10.3389/fmicb.2017.00299

Quinteros, M. A., Cano Aristizábal, V., Dalmasso, P. R., Paraje, M. G., and Páez, P. L. (2016). Oxidative stress generation of silver nanoparticles in three bacterial genera and its relationship with the antimicrobial activity. *Toxicology in Vitro* 36, 216–223. doi: 10.1016/J.TIV.2016.08.007

Quinteros, M. A., Viviana, C. A., Onnainty, R., Mary, V. S., Theumer, M. G., Granero, G. E., et al. (2018). Biosynthesized silver nanoparticles: Decoding their mechanism of action in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Int J Biochem Cell Biol* 104, 87–93. doi: 10.1016/J.BIOCEL.2018.09.006

Quinteros, M. de los Á. (2017). Biosíntesis de nanopartículas metálicas. Estudio de la actividad antimicrobiana y de su relación con la generación de estrés oxidativo en bacterias multirresistentes. Tesis Doctoral. Córdoba, Argentina: Facultad de Ciencias Químicas.

Raffaelli, S., Abreo, E., Altier, N., Vázquez, Á., and Alborés, S. (2022). Bioprospecting the Antibiofilm and Antimicrobial Activity of Soil and Insect Gut Bacteria. *Molecules* 27. doi: 10.3390/molecules27062002

Raj, S., Trivedi, R., and Soni, V. (2021). Biogenic Synthesis of Silver Nanoparticles, Characterization and Their Applications—A Review. *Surfaces* 5, 67–90. doi: 10.3390/SURFACES5010003

Rajan, R., Huo, P., Chandran, K., Manickam Dakshinamoorthi, B., Yun, S.-I., and Liu, B. (2022). A review on the toxicity of silver nanoparticles against different biosystems. *Chemosphere* 292, 133397. doi: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133397

Rajivgandhi, G. N., Ramachandran, G., Maruthupandy, M., Manoharan, N., Alharbi, N. S., Kadaikunnan, S., et al. (2020). Anti-oxidant, anti-bacterial and anti-biofilm activity of biosynthesized silver nanoparticles using *Gracilaria corticata* against biofilm producing *K. pneumoniae*. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 600, 124830. doi: https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124830

Raza, S., Wdowiak, M., Grotek, M., Adamkiewicz, W., Nikiforow, K., Mente, P., et al. (2023). Enhancing the antimicrobial activity of silver nanoparticles against ESKAPE bacteria and emerging fungal pathogens by using tea extracts. *Nanoscale Adv* 5, 5786–5798. doi: 10.1039/D3NA00220A

Rodrigues, A. G., Ping, L. Y., Marcato, P. D., Alves, O. L., Silva, M. C. P., Ruiz, R. C., et al. (2013). Biogenic antimicrobial silver nanoparticles produced by fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 775–782. doi: 10.1007/s00253-012-4209-7

Rodríguez-Camejo, C., Puyol, A., Arbildi, P., Sóñora, C., Fazio, L., Siré, G., et al. (2023). Effects of human donor milk on gut barrier function and inflammation: in vitro study of the beneficial properties to the newborn. *Front Immunol* 14, 1282144. doi: 10.3389/FIMMU.2023.1282144/BIBTEX

Rose, G. K., Soni, R., Rishi, P., and Soni, S. K. (2019). Optimization of the biological synthesis of silver nanoparticles using *Penicillium oxalicum* GRS-1 and their antimicrobial effects against common food-borne pathogens. *Green Processing and Synthesis* 8, 144–156. doi: 10.1515/GPS-2018-0042/MACHINEREADABLECITATION/BIBTEX

Rusciano, G., Zito, G., Pesce, G., Sasso, A., Isticato, R., and Ricca, E. (2015). Tip-Enhanced Raman Scattering of *Bacillus subtilis* spores. *Novel Biophotonics Techniques and Applications III*, ed. A. and V. Amelink I. (Munich: Optica Publishing Group), 95400S. doi: 10.1364/ECBO.2015.95400S

Saeki, E. K., Yamada, A. Y., de Araujo, L. A., Anversa, L., Garcia, D. de O., de Souza, R. L. B., et al. (2021). Subinhibitory Concentrations of Biogenic Silver Nanoparticles Affect Motility and Biofilm Formation in *Pseudomonas*

aeruginosa. *Front Cell Infect Microbiol* 11, 253. doi: 10.3389/FCIMB.2021.656984/BIBTEX

Sahoo, J. P., Mishra, A. P., Samal, K. C., and Dash, A. K. (2021). Insights into the antibiotic resistance in Biofilms – A Review. *Environ Conserv J* 22, 59–67. doi: 10.36953/ECJ.2021.22307

Salleh, A., Naomi, R., Utami, N. D., Mohammad, A. W., Mahmoudi, E., Mustafa, N., et al. (2020). The potential of silver nanoparticles for antiviral and antibacterial applications: A mechanism of action. *Nanomaterials* 10, 1–20. doi: 10.3390/NANO10081566

Salvioni, L., Galbiati, E., Collico, V., Alessio, G., Avvakumova, S., Corsi, F., et al. (2017). Negatively charged silver nanoparticles with potent antibacterial activity and reduced toxicity for pharmaceutical preparations. *Int J Nanomedicine* 12, 2517–2530. doi: 10.2147/IJN.S127799

Samek, O., Mlynariková, K., Bernatová, S., Ježek, J., Krzyžánek, V., Šiler, M., et al. (2014). *Candida parapsilosis* Biofilm Identification by Raman Spectroscopy. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 23924–23935. doi: 10.3390/IJMS151223924

Samuel, J., Selvam, M. M., Manigundan, K., Abirami, B., Thangavel, S., and Manikkam, R. K. (2023). Biosynthesis, Characterization and Evaluation of Antimicrobial, Antioxidant and Antiproliferiative Activities of Biogenic Silver Nanoparticles Using Streptomyces KBR3. *Indian J Pharm Sci* 85, 23–30. doi: 10.36468/PHARMACEUTICAL-SCIENCES.1064

Sancho, R. E., Govindsamy, A., and Pillay, K. (2023). Optimization of Growth Conditions for *Magnetospirillum magnetotacticum* and Green Synthesis of Metallic Nanoparticles. *App. Sci. (Switzerland)* 13, 8491. doi: 10.3390/APP13148491/S1

Sanguiñedo, P., Faccio, R., Abreo, E., and Alborés, S. (2023). Biogenic Silver and Copper Nanoparticles: Potential Antifungal Agents in Rice and Wheat Crops. *Chem. (Switzerland)* 5, 2104–2119. doi: 10.3390/CHEMISTRY5040143/S1

Sanguiñedo, P., Fratila, R. M., Estevez, M. B., Martínez de la Fuente, J., Grazú, V., and Alborés, S. (2018). Extracellular Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Fungi and Their Antibacterial Activity. *Nano Biomed Eng* 10, 156–164. doi: 10.5101/nbe.v10i2.p156-164.

Saravanakumar, K., Sriram, B., Sathiyaseelan, A., Mariadoss, A. V. A., Hu, X., Han, K.-S., et al. (2021). Synthesis, characterization, and cytotoxicity of starch-encapsulated biogenic silver nanoparticle and its improved anti-bacterial activity. *Int J Biol Macromol* 182, 1409–1418. doi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.036

Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., et al. (2022). The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat Rev Microbiol* 20, 608–620. doi: 10.1038/s41579-022-00767-0

Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., and Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nat Ecol Evol* 3, 430–439. doi: 10.1038/s41559-018-0793-y

Schäberle, T. F., and Hack, I. M. (2014). Overcoming the current deadlock in antibiotic research. *Trends Microbiol* 22, 165–167. doi: 10.1016/j.tim.2013.12.007

Schneider, G. (2017). Antimicrobial silver nanoparticles - Regulatory situation in the European Union. *Mater Today Proc* 4, S200–S207. doi: 10.1016/J.MATPR.2017.09.187

Šebesta, M., Vojtková, H., Cyprichová, V., Ingle, A. P., Urík, M., and Kolenčík, M. (2022). Mycosynthesis of Metal-Containing Nanoparticles—Fungal Metal Resistance and Mechanisms of Synthesis. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 14084. doi: 10.3390/IJMS232214084

Shahzad, A., Saeed, H., Iqtedar, M., Hussain, S. Z., Kaleem, A., Abdullah, R., et al. (2019). Size-Controlled Production of Silver Nanoparticles by *Aspergillus fumigatus* BTCB10: Likely Antibacterial and Cytotoxic Effects. *J Nanomater* 2019, 14 páginas. doi: 10.1155/2019/5168698

Shanker, K., Mohan, G. K., Hussain, M., Jayarambabu, N., and Pravallika, P. L. (2017). Green Biosynthesis, Characterization, In vitro Antidiabetic Activity, and Investigational Acute Toxicity Studies of Some Herbal-mediated Silver Nanoparticles on Animal Models. *Pharmacogn Mag* 13, 188–192. doi: 10.4103/0973-1296.197642

Shanthi, S., David Jayaseelan, B., Velusamy, P., Vijayakumar, S., Chih, C. T., and Vaseeharan, B. (2016). Biosynthesis of silver nanoparticles using a probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 and their antibiofilm activity and toxicity effects in *Ceriodaphnia cornuta*. *Microb Pathog* 93, 70–77. doi: 10.1016/j.micpath.2016.01.014

Sharma, S., Mohler, J., Mahajan, S. D., Schwartz, S. A., Bruggemann, L., and Aalinkeel, R. (2023). Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. *Microorganisms* 11, 1614. doi: 10.3390/MICROORGANISMS11061614

Sharma, V. (2022). Review and Synthesis of Silver Nanoparticles, Characterization and Application.

Shejawal, K. P., Randive, D. S., Bhinge, S. D., Bhutkar, M. A., Todkar, S. S., Mulla, A. S., et al. (2021). Green synthesis of silver, iron and gold nanoparticles of

lycopene extracted from tomato: their characterization and cytotoxicity against COLO320DM, HT29 and Hella cell. *J Mater Sci Mater Med* 32, 19. doi: 10.1007/s10856-021-06489-8

Siddique, M. H., Aslam, B., Imran, M., Ashraf, A., Nadeem, H., Hayat, S., et al. (2020). Effect of Silver Nanoparticles on Biofilm Formation and EPS Production of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Biomed Res Int* 2020, 9 páginas. doi: 10.1155/2020/6398165

Singh, P., and Mijakovic, I. (2022). Strong Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles Obtained by the Green Synthesis in *Viridibacillus* sp. Extracts. *Front Microbiol* 13, 820048. doi: 10.3389/FMICB.2022.820048/BIBTEX

Singh, S., Verma, T., Khamari, B., Bulagonda, E. P., Nandi, D., and Umapathy, S. (2023). Antimicrobial Resistance Studies Using Raman Spectroscopy on Clinically Relevant Bacterial Strains. *Anal Chem* 95, 11342–11351. doi: 10.1021/acs.analchem.3c01453

Sitohy, M. Z., Osman, A. O., and Mahgoub, S. A. (2014). Bioactive proteins against pathogenic and spoilage bacteria. *FFHD* 4, 451–462. doi: 10.31989/FFHD.V4I10.155

Skiba, M. I., Vorobyova, V. I., Pivovarov, A., and Makarshenko, N. P. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles in the presence of polysaccharide: Optimization and characterization. *J Nanomater* 2020, 10 páginas. doi: 10.1155/2020/3051308

Solomon, S. D., Bahadory, M., Jeyarajasingam, A. V., Rutkowsky, S. A., Boritz, C., and Mulfinger, L. (2007). Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. *J Chem Educ* 84, 322–325. doi: 10.1021/ED084P322

Souza, T. G. F., Ciminelli, V. S. T., and Mohallem, N. D. S. (2016). A comparison of TEM and DLS methods to characterize size distribution of ceramic nanoparticles. *J Phys Conf Ser* 733, 012039. doi: 10.1088/1742-6596/733/1/012039

Sowmya, N., Mohanty, D., Nirosha, B., Kumar, N. U., and Patra, K. (2023). A Systematic Review Of Metallic Nanoparticles: Synthesis, Biological Activities & Applications. *J Pharm Negat Results* 14, 2525–2533. doi: 10.47750/PNR.2023.14.S02.297

Stöckel, S., Schumacher, W., Meisel, S., Elschner, M., Rösch, P., and Popp, J. (2010). Raman spectroscopy-compatible inactivation method for pathogenic endospores. *Appl Environ Microbiol* 76, 2895–2907. doi: 10.1128/AEM.02481-09/ASSET/3F1BBBD7-CDD5-4558-B64F-1DEB2762F4B5/ASSETS/GRAPHIC/ZAM9991009000006.JPEG

Swidan, N. S., Hashem, Y. A., Elkhatib, W. F., and Yassien, M. A. (2022). Antibiofilm activity of green synthesized silver nanoparticles against biofilm

associated enterococcal urinary pathogens. *Scientific Reports* 12, 1–13. doi: 10.1038/s41598-022-07831-y

Tang, K. L., Caffrey, N. P., Nóbrega, D. B., Cork, S. C., Ronksley, P. E., Barkema, H. W., et al. (2017). Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Planet Health* 1, e316–e327.

Tashi, T., Vishal Gupta, N., and Mbuya, V. B. (2016). Silver nanoparticles: Synthesis, mechanism of antimicrobial action, characterization, medical applications, and toxicity effects. *J Chem Pharm Res* 8, 526–537. Available at: https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84992295218&partnerID=40&md5=05472717d1d96f6555524ac4ef80b330

Thambirajoo, M., Maarof, M., Lokanathan, Y., Katas, H., Ghazalli, N. F., Tabata, Y., et al. (2021). Potential of Nanoparticles Integrated with Antibacterial Properties in Preventing Biofilm and Antibiotic Resistance. *Antibiotics* 10, 1338. doi: 10.3390/antibiotics10111338

Thammawithan, S., Srichaiyapol, O., Siritongsuk, P., Daduang, S., Klaynongsruang, S., Prapasarakul, N., et al. (2021). Anisotropic Silver Nanoparticles Gel Exhibits Antibacterial Action and Reduced Scar Formation on Wounds Contaminated with Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) in a Mice Model. *Animals* 11, 3412. doi: 10.3390/ANI11123412

Tyavambiza, C., Elbagory, A. M., Madiehe, A. M., Meyer, M., and Meyer, S. (2021). The Antimicrobial and Anti-Inflammatory Effects of Silver Nanoparticles Synthesised from Cotyledon orbiculata Aqueous Extract. *Nanomaterials* 11, 1343. doi: 10.3390/NANO11051343

Ucbvet (n.d.). Cursotrat. Available at: https://ucbvet.com/produto/cursotrat/ (Accessed February 7, 2024).

Umapathi, A., Madhyastha, H., Navya, P. N., Singh, M., Madhyastha, R., and Daima, H. K. (2022). Surface chemistry driven selective anticancer potential of functional silver nanoparticles toward lung cancer cells. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 652, 129809. doi: https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129809

Vademecum (2020). Silver sulfadiazine cream 1%. Available at: https://www.vademecum.es/estados-unidos/medicamento/28010063/silver-sulfadiazine-cream-1- (Accessed February 7, 2024).

Vasanth, N., Dons, T., Michaelraj, L. J., Ganesan, P., Salmen, S. H., Alharbi, S. A., et al. (2023). Effect of biofilm formation and cytotoxicity of biogenic silver

nanoparticles (AgNPs) synthesized from a medicinal plant *Sterculia foetida* L. *Dig J Nanomater Biostruct* 18, 1503–1513. doi: 10.15251/DJNB.2023.184.1503

Verma, A. K., and Kumar, P. (2022). On Recent Developments in Biosynthesis and Application of Au and Ag Nanoparticles from Biological Systems. *J Nanotechnol* 2022. doi: 10.1155/2022/5560244

Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R., and Nesse, L. L. (2020). Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics* 9, 59. doi: 10.3390/ANTIBIOTICS9020059

Vigneshwaran, N., Kathe, A. A., Varadarajan, P. V, Nachane, R. P., and Balasubramanya, R. H. (2006). Biomimetics of silver nanoparticles by white rot fungus, *Phaenerochaete chrysosporium*. *Colloids Surf B Biointerfaces* 53, 55–59. doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.07.014

Villegas, A. N., Arce Miranda, J. E., Becerra, M. C., Baronetti, J. L., Ravetti, S., Sotomayor, C. E., et al. (2012). How different culture conditions affect cellular stresses in the biofilms. *Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges, Malaga, Spain, 14 - 16 September 2011*, 629–635. doi: 10.1142/9789814405041_0128

Vishwanath, R., and Negi, B. (2021). Conventional and green methods of synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial properties. *CRGSC* 4, 100205. doi: 10.1016/J.CRGSC.2021.100205

Wahab, S.;, Salman, A. ;, Khan, Z. ;, Khan, S. ;, Krishnaraj, C. ;, Alfei, S., et al. (2023). Metallic Nanoparticles: A Promising Arsenal against Antimicrobial Resistance—Unraveling Mechanisms and Enhancing Medication Efficacy. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 14897. doi: 10.3390/IJMS241914897

Waktole, G., and Waktole, G. (2023). Toxicity and Molecular Mechanisms of Actions of Silver Nanoparticles. *J Biomater Nanobiotechnol* 14, 53–70. doi: 10.4236/JBNB.2023.143005

Wang, L., Liu, W., Tang, J. W., Wang, J. J., Liu, Q. H., Wen, P. B., et al. (2021). Applications of Raman Spectroscopy in Bacterial Infections: Principles, Advantages, and Shortcomings. *Front Microbiol* 12, 683580. doi: 10.3389/FMICB.2021.683580/BIBTEX

Wang, Y., Bian, Z., and Wang, Y. (2022). Biofilm formation and inhibition mediated by bacterial quorum sensing. *App Microbiol Biotech* 106, 6365–6381. doi: 10.1007/S00253-022-12150-3

WHO (2015). Global action plan on antimicrobial resistance. Available at: https://iris.who.int/handle/10665/193736 (Accessed February 7, 2024).

WHO (2017). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Available at: https://www.who.int/news/item/27-02-

2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed (Accessed February 10, 2024).

WHO (2022a). One health joint plan of action (2022–2026): working together for the health of humans, animals, plants and the environment. Available at: https://www.who.int/publications/i/item/9789240059139 (Accessed February 7, 2024).

WHO (2022b). WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Available at: https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241 (Accessed February 9, 2024).

WHO (2023). Antimicrobial resistance. Available at: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance (Accessed February 7, 2024).

Wilson, B. K., and Prud'homme, R. K. (2021). Nanoparticle size distribution quantification from transmission electron microscopy (TEM) of ruthenium tetroxide stained polymeric nanoparticles. *J Colloid Interface Sci* 604, 208–220. doi: 10.1016/J.JCIS.2021.04.081

Win, T. T., Khan, S., and Fu, P. C. (2020). Fungus- (Alternaria sp.) mediated silver nanoparticles synthesis, characterization, and screening of antifungal activity against some phytopathogens. *J Nanotechnol* 2020, 9 páginas. doi: 10.1155/2020/8828878

Witkowska, E., Korsak, D., Kowalska, A., Księżopolska-Gocalska, M., Niedziˇłka-J, J., Roźniecka, E., et al. (2017). Surface-enhanced Raman spectroscopy introduced into the International Standard Organization (ISO) regulations as an alternative method for detection and identification of pathogens in the food industry. *Anal Bioanal Chem* 409, 1555–1567. doi: 10.1007/s00216-016-0090-z. Epub 2016 Dec 21

Wu, S., Song, R., Liu, T., and Li, C. (2023). Antifungal therapy: Novel drug delivery strategies driven by new targets. *Adv Drug Deliv Rev* 199, 114967. doi: 10.1016/J.ADDR.2023.114967

Xue, B., He, D., Gao, S., Wang, D., Yokoyama, K., and Wang, L. (2016). Biosynthesis of silver nanoparticles by the fungus *Arthroderma fulvum* and its antifungal activity against genera of *Candida*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *Int J Nanomedicine* 11, 1899–1906. doi: 10.2147/IJN.S98339

Yalçın, D., Erkaya, İ. A., and Erdem, B. (2022). Antimicrobial, antibiofilm potential, and anti-quorum sensing activity of silver nanoparticles synthesized from *Cyanobacteria Oscillatoria princeps*. *Environ Sci Pollut Res Int* 29, 89738–89752. doi: 10.1007/s11356-022-22068-y

Yanar, F., Carugo, D., and Zhang, X. (2023). Hybrid Nanoplatforms Comprising Organic Nanocompartments Encapsulating Inorganic Nanoparticles for Enhanced Drug Delivery and Bioimaging Applications. *Molecules* 28, 5694. doi: 10.3390/MOLECULES28155694

Yaqoob, A. A., Ahmad, H., Parveen, T., Ahmad, A., Oves, M., Ismail, I. M. I., et al. (2020). Recent Advances in Metal Decorated Nanomaterials and Their Various Biological Applications: A Review. *Front Chem* 8, 528583. doi: 10.3389/FCHEM.2020.00341/BIBTEX

Yassin, M. T., Mostafa, A. A. F., Al-Askar, A. A., and Al-Otibi, F. O. (2022). Synergistic Antibacterial Activity of Green Synthesized Silver Nanomaterials with Colistin Antibiotic against Multidrug-Resistant Bacterial Pathogens. *Crystals* 12, 1057. doi: 10.3390/CRYST12081057

Yeasmin, S., Datta, H. K., Chaudhuri, S., Malik, D., and Bandyopadhyay, A. (2017). In-vitro anti-cancer activity of shape controlled silver nanoparticles (AgNPs) in various organ specific cell lines. *J Mol Liq* 242, 757–766. doi: https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.06.047

Youssef, F. S., El-Banna, H. A., Elzorba, H. Y., and Galal, A. M. (2019). Application of some nanoparticles in the field of veterinary medicine. *Int J Vet Sci Med* 7, 78–93. doi: 10.1080/23144599.2019.1691379

Zarnowski, R., Westler, W. M., Lacmbouh, G. A., Marita, J. M., Bothe, J. R., Bernhardt, J., et al. (2014). Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *mBio* 5, 1–13. doi: 10.1128/MBIO.01333-14/SUPPL_FILE/MBO00414939S1.DOCX

Zhang, J., Wang, F., Yalamarty, S. S. K., Filipczak, N., Jin, Y., and Li, X. (2022). Nano Silver-Induced Toxicity and Associated Mechanisms. *Int J Nanomedicine* 17, 1851–1864. doi: 10.2147/IJN.S355131

Zhang, T., Wang, L., Chen, Q., and Chen, C. (2014). Cytotoxic Potential of Silver Nanoparticles. *Yonsei Med J* 55, 283–291. doi: 10.3349/YMJ.2014.55.2.283

Zhao, Y., Zhang, Z., Ning, Y., Miao, P., Li, Z., and Wang, H. (2023). Simultaneous quantitative analysis of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* using surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with partial least squares regression and artificial neural networks. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 293, 122510. doi: https://doi.org/10.1016/j.saa.2023.122510

Zimet, P., Valadez, R., Raffaelli, S., Estevez, M. B., Pardo, H., and Alborés, S. (2021). Biogenic Silver Nanoparticles Conjugated with Nisin: Improving the Antimicrobial and Antibiofilm Properties of Nanomaterials. *Chem. (Switzerland)* 3, 1271–1285. doi: https://doi.org/10.3390/chemistry3040092

Anexo I

MEDIOS DE CULTIVO

COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

AN (agar nutriente)

Polvo "Lab-Lemco"..... 1.0 g

Extracto de levadura..... 2.0 g

Peptona..... 5.0 g

Cloruro de sodio..... 5.0 g

Agar..... 15.0 g

Agua..... 1 L

pH después de la esterilización: 7.4 ± 0.2

CN (caldo nutriente)

Polvo "Lab-Lemco"..... 10.0 g

Peptona..... 10 g

Cloruro de sodio..... 5.0 g

Agua..... 1 L

pH después de la esterilización: 7.5 ± 0.2

LB (caldo Luria Bertani)

Cloruro de sodio..... 5.0 g

Extracto de levadura..... 5.0 g

Peptona de caseína..... 10.0 g

Agua..... 1 L

pH después de la esterilización: 7.2 ± 0.2

MHB (caldo Müeller-Hinton)

Infusión deshidratada de carne de res..... 300 g

Hidrolizado de caseína..... 17.5 g

Almidón..... 1.5 g

Agua..... 1 L

pH después de la esterilización: 7.3 ± 0.1

PDA (agar papa dextrosa)

Infusión de Papa…… 200.0 g

Glucosa…… 20.0 g

Agar…….. 15.0 g

Agua…… 1 L

pH después de la esterilización: 5.6 ± 0.2

PDB (caldo papa dextrosa)

Infusión de papa…… 4.0 g

Glucosa…… 20.0 g

Agua…… 1 L

pH después de la esterilización: 5.6 ± 0.2

SDA (agar Sabouraud glucosado)

Glucosa…… 40.0 g

Digerido péptico de tejido animal…….. 5.0 g

Digerido pancreático de caseína…….. 5.0g

Agar…… 15.0 g

Agua…… 1 L

pH después de la esterilización: 5.6 ± 0.2

Anexo II

PUBLICACIONES

Biogenic silver nanoparticles: understanding the antimicrobial mechanism using Confocal Raman Microscopy

María Belén Estevez[1], Scott G. Mitchell[2,3], Ricardo Faccio[4*] and Silvana Alborés[1*]

[1]Área de Microbiología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo (Uruguay).
[2]Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón (ICMA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)-Universidad de Zaragoza, C/ Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza (Spain).
[3]CIBER-BBN, Instituto de Salud Carlos III, Madrid (Spain)
[4]Centro NanoMat & Grupo Física, Departamento de Experimentación y Teoría de la Estructura de la Materia y sus Aplicaciones (DETEMA), Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo (Uruguay).

*Corresponding authors:
E-mail: salbores@fq.edu.uy; rfaccio@fq.edu.uy

Abstract

The antimicrobial properties of silver nanoparticles (AgNPs) have made them ubiquitous in a number of real-world industrial applications; however, the antimicrobial mode of action of biogenic AgNPs is not entirely understood. The use of Raman spectroscopy can provide molecular fingerprint information on various chemical and biochemical components in complex systems like microbial cultures, without the need for any complex sample pre-treatment. Consequently, the antimicrobial mechanism of AgNPs can be inferred through morphological and compositional changes of microbial cells that are monitored *via* changes in Raman band profiles. Here we show the synthesis of biogenic AgNPs using the extracellular cell-free filtrates of *Penicillium expansum.* The antimicrobial activity of the *Penicillium expansum* synthesized silver nanoparticles (hereafter PeNPs) was evaluated and the interactions between the nanoparticles and *Escherichia coli* were studied using Transmission Electron Microscopy (TEM) and Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM), showing the attachment of PeNPs to the surface of the bacteria and rupture of the bacterial cell membrane. Importantly, we show how Confocal Raman Microscopy can be used as an innovative approach to study the antimicrobial mechanisms, the results of which confirm that the PeNPs induce damage to bacterial and fungal cells, resulting in critical changes to polysaccharides, lipids, proteins and nucleic acids.

Keywords: biogenic nanoparticles, antimicrobial, Confocal Raman Microscopy, nanoparticle-microorganism interactions

1. Introduction

In recent years, the biological synthesis of nanoparticles, including the intracellular or extracellular production of nanoparticles by microorganisms [1; 2] has gained interest over other chemical and physical methods [3]. Extracellular biosynthesis using fungi could also make downstream processing much easier than the intracellular biosynthesis [4]. In particular, silver nanoparticles (AgNPs) have attracted considerable attention due to their applications as antimicrobial agents [5; 6]. The antimicrobial action mechanisms of AgNPs are known to be complex [7] and depend on many factors such as the physicochemical properties of the type of nanoparticle (for example, their size, shape and surface charge) or type of microorganism [8].

The use of Raman spectroscopy is an important vibrational spectroscopic tool that can provide molecular fingerprint information on various chemical and biochemical components in complex systems like microbial cultures, without any complex sample pre-treatment. Changes in cellular composition, such as proteins, lipids and nucleic acids, can be monitored using changes in Raman band profiles, which can be associated with the morphological changes of microbial cells, providing an image of the antimicrobial effect [9]. In recent times, Raman difference spectroscopy has been shown to provide molecular details on changes within *E. coli* cells caused by antibiotics, hydrogen peroxide [10; 11] or graphene oxide [9]. The objective of the present study was to produce silver nanoparticles (AgNPs) using the extracellular cell-free filtrates of *Penicillium expansum*, evaluate their antimicrobial activity and study nanoparticle-microorganism interactions. Furthermore, we propose a new approach using Confocal Raman Microscopy to study the antimicrobial mechanism of silver nanoparticles.

2. Material and Methods

2.1 Synthesis of silver nanoparticles

Strain of *Penicillium expansum* (14S) from the Cátedra de Microbiología General Collection of CCMG, Facultad de Química, Montevideo, Uruguay, was used for the nanoparticle biosynthesis.

The mycelia were grown in Potato Dextrose Agar (PDA, BD Difco) at 28 °C and two plugs of 0.9 cm in diameter were then transferred to 500 mL flasks containing 100 mL Potato Dextrose Broth (PDB, BD Difco). Fermentations were carried out at 28 °C, with agitation on an orbital shaker operating at 150 rpm for 72 hours. The biomass from cultures was harvested by filtration and then washed extensively with sterilized distilled water to remove any remaining media components. Then, synthesis of silver nanoparticles was carried out as described in Sanguiñedo *et al.,* 2018 [12]. Wet fungal mycelia were suspended in sterilized distilled water (0.1 g/mL) and incubated with agitation on an orbital shaker operating at 150 rpm. Then, the cell-free filtrate was collected by filtration of this suspension through membrane filter with 0.45 µm pore size. Finally, 50 mL of the cell-free filtrate was added to 50 mL of a silver nitrate solution. The mixture was incubated in dark. The absorbance spectrum was measured in the range of 250-800 nm and the maximum peak was determined, at different times. The reaction was stopped when there was no increase in the maximum absorption peak of silver nanoparticles. The remaining cell-free filtrate was used as control.

To evaluate the incidence of the reaction variables in the biosynthesis of the nanoparticles, the following experimental conditions were modified: incubation time of the mycelium with water, concentration of $AgNO_3$ and incubation temperature in the synthesis reaction.

After synthesis reaction, the samples were centrifuged at 10000 rpm for 10 min. The supernatant was removed and nanoparticles (PeNPs) were washed twice using sterilized distilled water, by centrifuging the nanoparticles for 5 min at 10000 rpm. The absorbance peak of the purified silver nanoparticles was measured and the concentration was estimated according to Paramelle *et al.* [13].

2.2 Characterization of silver nanoparticles

2.2.1 UV-Vis spectroscopy

The absorbance spectrum was measured in the range of 250-800 nm as evidence for silver nanoparticles formation.

2.2.2 Small Angle X-ray Scattering (SAXS)

For the Small Angle X-ray Scattering measurements, an X-Ray Powder Diffractometer, Rigaku Ultima IV model, using radiation CuK_α = 1.5418 Å was used. The measurements were made at low angle, in Bragg-Brentano geometry, applying an offset of 0.2 $Å^{-1}$ on nanoparticle deposits on silicon substrate. The measurement ranges of q = 0.05 $Å^{-1}$ to 1.50 $Å^{-1}$.

2.2.3 Dynamic Light Scattering (DLS) and ζ-potential

The hydrodynamic diameter and the ζ-potential of the nanoparticles were determined by Dynamic Light Scattering (DLS) utilizing a Malvern Instruments Zetasizer. Samples were prepared at pH 6, in Milli-Q water. For DLS determination, each sample was measured at 25 °C, 10 times, combining 5 runs per measurement. In the case of ζ-potential,

each sample was measured at 25 °C, three times, combining 10 runs per measurement. Results were treated using the Malvern software Zetasizer.

2.2.4 Confocal Raman Microscopy

An aliquot of PeNPs was deposited on an aluminum support and dried at room temperature for a further analysis by Confocal Raman Microscopy. The measurements were made on an Alpha 300 RA WITec Raman Microscope using a λ=532 nm excitation laser and focused through a 100X objective.

2.2.5 Colloidal stability assays

The nanoparticles colloidal stability was studied at different pH (3 -10) and ionic strength (10-500 mM NaCl) conditions by the measurement of the absorbance spectrum.

2.3 Antimicrobial activity of PeNPs against E. coli

2.3.1 Resazurin cell viability assays

Cell viability was analyzed using a Resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) assay in a 96-well plate. A bacterial inoculum ($1x10^6$ CFU/mL) of *E. coli* DH5α in LB media was supplemented with different concentrations of PeNPs and a blank sample (bacteria without PeNPs) was also included in the assay as negative control. Once the microbial cultures had been grown for a total of 24 h, 30 µL of 0.1 mg/mL Resazurin in LB media was added to each well and incubated in the dark at 37 °C for 1 h under stirring.

2.3.2 Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM)

Bacterial cells were incubated with PeNPs (0.11 nM and 0.15 nM), in the same way as in the Resazurin assay. Then, three wells of 200 µL each were mixed into an Eppendorf and centrifuged at 1400 rpm (300 G) for 10 minutes. The supernatant was removed and the pellet was resuspended into 1.5 mL of 2.5 % glutaraldehyde in phosphate buffer 10 mM pH 7.2 for fixation of the cells. The solutions were left for 2 hours in the wheel. Afterwards, the cells were washed once with 1.5 mL of sterile PBS and three times with sterile distilled water to remove glutaraldehyde. Finally, the pellets were resuspended in 200 µL of sterile MilliQ water. Data were collected on a Quanta FEG-250 (FEI Company) field emission SEM for high-resolution imaging working in ESEM mode using a GSED detector under high relative humidity conditions.

2.3.3 Transmission Electron Microscopy (TEM)

Samples were prepared in the same way as in the ESEM assay, including the PeNPs concentrations. After de pellets were resuspended in sterile distilled water, 4 µL of the sample was deposited onto a carbon-coated copper grid (Cu200 mesh) and left to dry in air for several hours at room temperature. TEM analysis was carried out in a TECNAI T20 electron microscope (FEI) working at 60 kV.

2.4 Antimicrobial properties of PeNPs using Confocal Raman Microscopy

2.4.1 Antimicrobial activity

Minimum inhibitory concentration (MIC) of the nanoparticles was determined by the microdilution technique according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), against the following microorganisms: Gram-negative *Escherichia coli ATCC 25922,* Gram positive *Staphylococcus aureus ATCC 6538*, and *Candida albicans ATCC 101231.* MIC analyses were carried out in a 96-well plate (sterilized, 300 µL capacity, MicroWell, NUNC, Thermo-FisherScientific, Waltham, MA). The initial solutions of the nanoparticles were prepared in water and further serial dilutions were performed. The MIC was determined as the lowest silver nanoparticles concentration (antimicrobial agent) that inhibited the visible growth of a microorganism after 24 h incubation.

2.4.2 Microorganism-nanoparticle interactions by Confocal Raman Microscopy.

Studies of the phenotypic profile of microbial cells before and after treatment with silver nanoparticles were carried out using Confocal Raman Microscopy according to the methodology described for antibiotics [14]. The cell suspensions were deposited on an aluminum support and dried at room temperature. The measurements were made using a 532 nm laser focused through a 100 X objective. The data processing and statistical analysis was performed by principal component analysis (PCA) using a script to be executed with the MATLAB software. The changes obtained in the Raman spectra (phenotypic profile) of the cells treated with the nanoparticles were evaluated by comparing them with those of the untreated cells (control).

3. Results

3.1 Synthesis of silver nanoparticles (PeNPs) using Penicillium expansum

Penicillium expansum synthesized silver nanoparticles (hereafter PeNPs) were synthesized by incubating an aqueous cell-free filtrate with silver nitrate solution in the dark. A color change in the reaction mixtures, characterised by the appearance of absorption bands between 400 and 450 nm, were indicative of silver plasmon resonances associated with the production of AgNPs (Fig. 1b). No color change was

observed in the cell-free supernatant alone used as control (Fig. 1a). The spectroscopic signature associated with the biosynthesis of PeNPs (plasmon band at 440 nm) is shown in Fig. 1c.

The samples were centrifuged and the nanoparticles in the pellet were washed with water to remove unwanted reagents. After centrifugation, UV-vis spectroscopy was used to determine the stability of the PeNPs, which displayed an absorption band at 439 nm corresponding to the resonance bands of the PeNPs (Fig. 2).

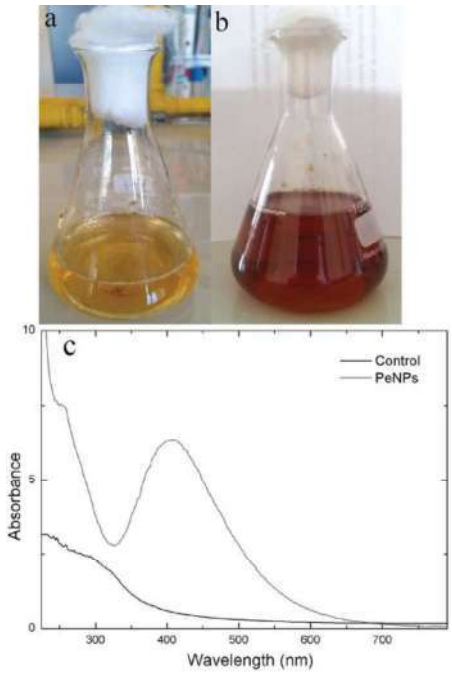


Fig. 1 Color change obtained for silver nanoparticles synthesized a) control, b) AgNPs and c) UV-Vis absorption spectra, after 24 h of reaction.

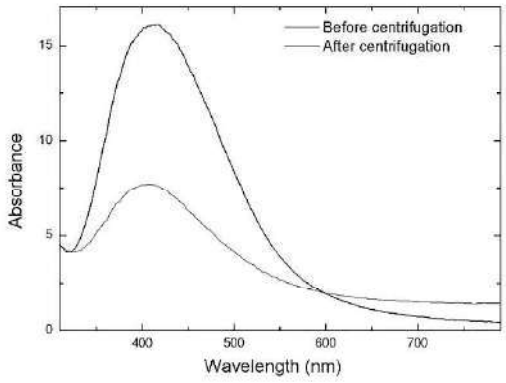


Fig. 2 UV-visible absorption spectra (before and after centrifugation) showing the plasmon resonance band of the PeNPs at 440 nm.

3.2 Evaluation of the reaction conditions in the biosynthesis of PeNPs

The $AgNO_3$ concentration, the reaction temperature and the incubation time of the mycelium with water were evaluated. 5 mM $AgNO_3$ was found to be the concentration that gave the highest yield for the nanoparticle synthesis (Fig. 3a). This concentration was selected for all subsequent biosyntheses. Moreover, results indicated that the biosynthesis reaction allowing greatest nanoparticle production in the shortest time was at 37 °C (Fig. 3b). Fig. 3c shows the evolution of silver nanoparticle synthesis over time (by measuring absorbance at 440 nm) at different incubation times. The highest biosynthesis yield of PeNPs was obtained by incubating the mycelium with water for 72 hours at 37 °C.

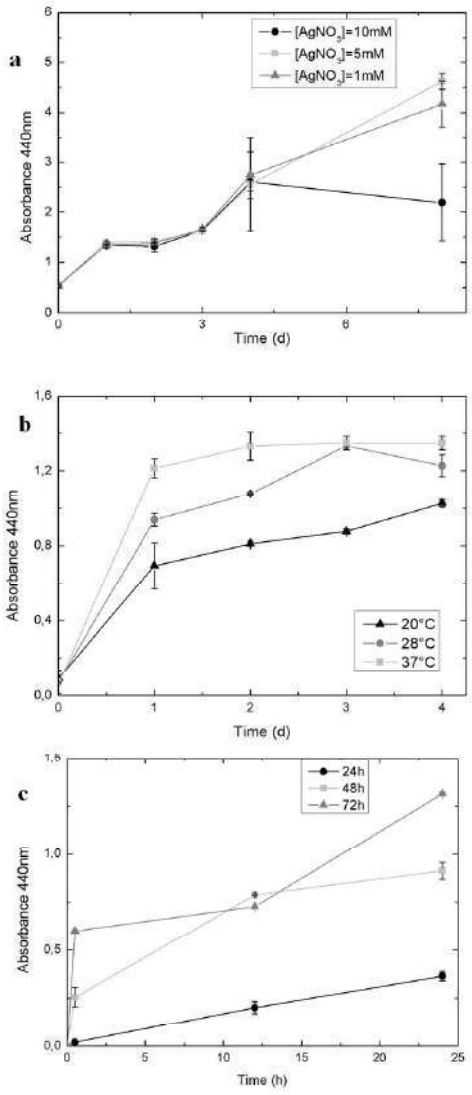


Fig. 3 Effect of different reaction conditions on the synthesis

of nanoparticles (measured by absorbance at 440 nm) over time (error bars indicate the standard deviation). a: different concentrations of silver nitrate, b: different reaction temperatures, c: different incubation times of the mycelium with water.

3.3 Characterization of PeNPs

3.3.1 DLS and SAXS

DLS characterization of the PeNPs (Fig. 4a) showed a single nanoparticle population with a hydrodynamic diameter of *ca.* 15 nm (see Online Resource 1). According to the Small Angle X-Ray Scattering measurements, the curve was fitted with a two-size-distribution model, corresponding to two-correlation lengths: one at 16 nm and another at 40 nm, the nanoparticle diameter and the distance between nanoparticles, respectively (Fig. 4b). These differences arise on the preparation of the samples, since DLS is obtained in solution, while SAXS is applied on a dried deposit from the nanoparticle solution. It is likely that during the drying process, the proximity effects of the PeNPs contributed to the second peak in the SAXS measurements.

3.3.2 ζ-potential

The stability of the PeNPs were evaluated by ζ-potential, which corresponded to -18.5 mV, indicating a relatively stable colloidal charge (see Online Resource 1)

3.3.3 Confocal Raman Microscopy

In order to further characterize the synthetized nanoparticles, Confocal Raman Microscopy was used to obtain more information about the nature of the surface functional groups capping the PeNPs. The presence of the band positioned at 230 cm^{-1} can be attributed to the Ag-N stretching mode, which may originate from the fungal extract, providing the nitrogen atoms that will finally take part of the capping of the silver nanoparticle. Additionally, the bands positioned at 1320 and 1586 cm^{-1} could be attributed to the D- and G-band of a carbonaceous component (Fig. 5).

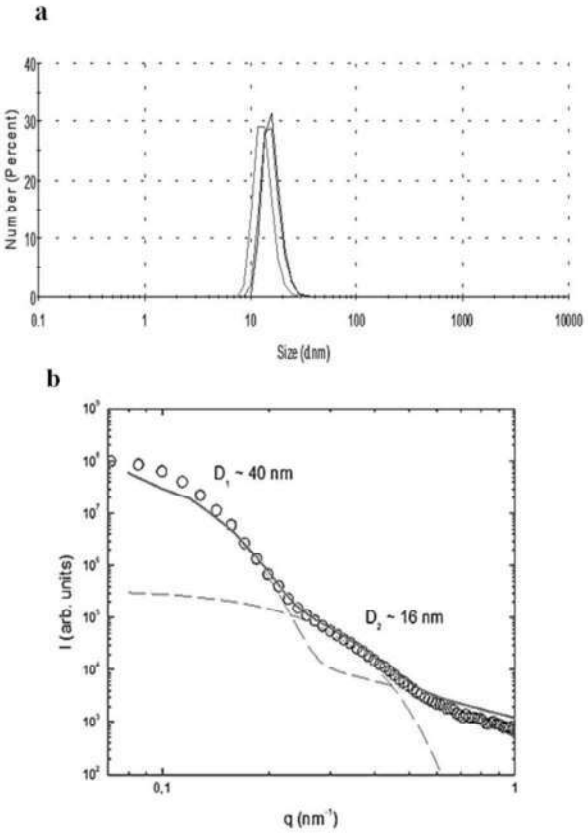
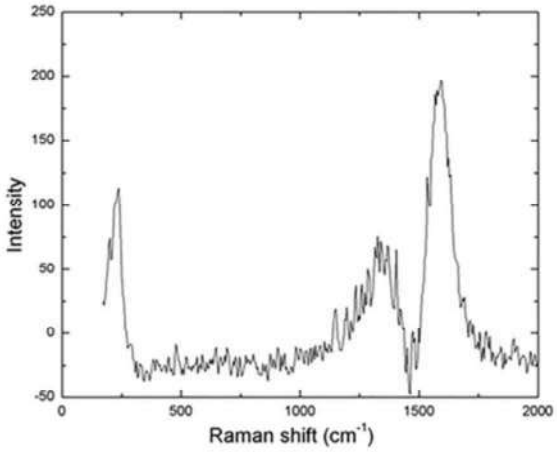


Fig. 4 (a) DLS measurement indicating monodisperse nanoparticles of *ca.* 15 nm diameter in solution and (b) the SAXS curve showing two characteristic correlated distances.



Raman Shift (cm^{-1})	Raman Assignment
219 [1]	Ag-N / Ag-O stretching
1320 [2]	D-band graphitic
1586 [2]	G-band graphitic

Fig. 5 Raman spectrum and assignment table for PeNPs.

3.3.4 Colloidal stability assays

In order to further evaluate the colloidal stability of PeNPs, we analyzed the shift in wavelength (nm) of the colloidal suspension at different pH (3-9) and ionic strength ([NaCl] = 10-500 mM). According to the results, no relevant changes occurred, thus demonstrating that the PeNPs were stable over relatively broad range of pH and conditions of onic strength (Fig. 6).

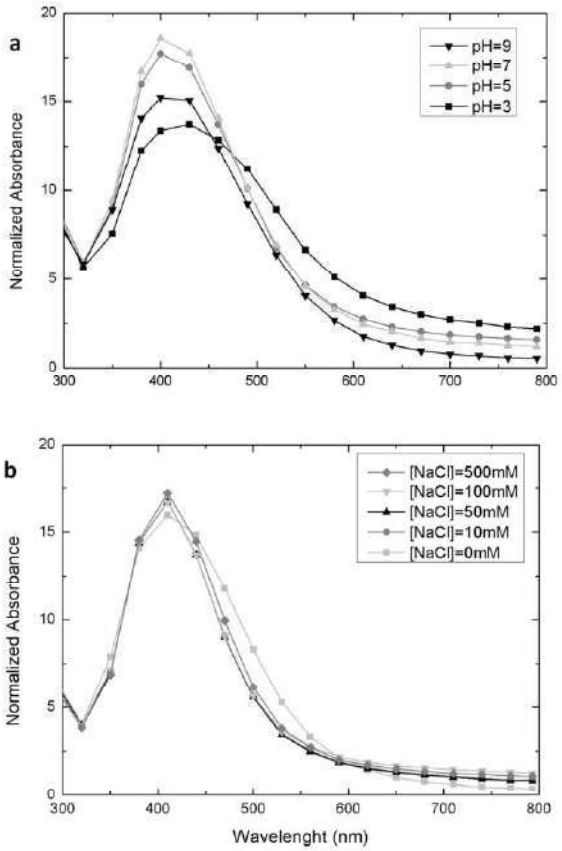


Fig. 6 Stability of PeNPs at different pH (a) and ionic strength (b).

3.4 Antimicrobial activity of PeNPs against E. coli

Cell viability assays showed that the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) was 0.22 nM. TEM and ESEM analyses where carried out to evaluate the interaction of the PeNPs with the bacteria. Sub-MBCs of 0.11 nM and 0.15 nM were used.

ESEM images in Fig. 7 show damage to the cell membrane integrity of E. coli due to the presence of PeNPs (Fig. 7c-7f), when compared with the control (Fig. 7a and 7b). This loss of the cell membrane integrity increases with PeNP concentration (Fig. 7e and 7f). Also, at both concentrations, some bacteria liberate cytoplasmic components (Fig. 7d and 7f, indicated by arrows) as a result of the interaction with the PeNPs, may be due to the generation of pores on the cell wall (see Fig. 7c).

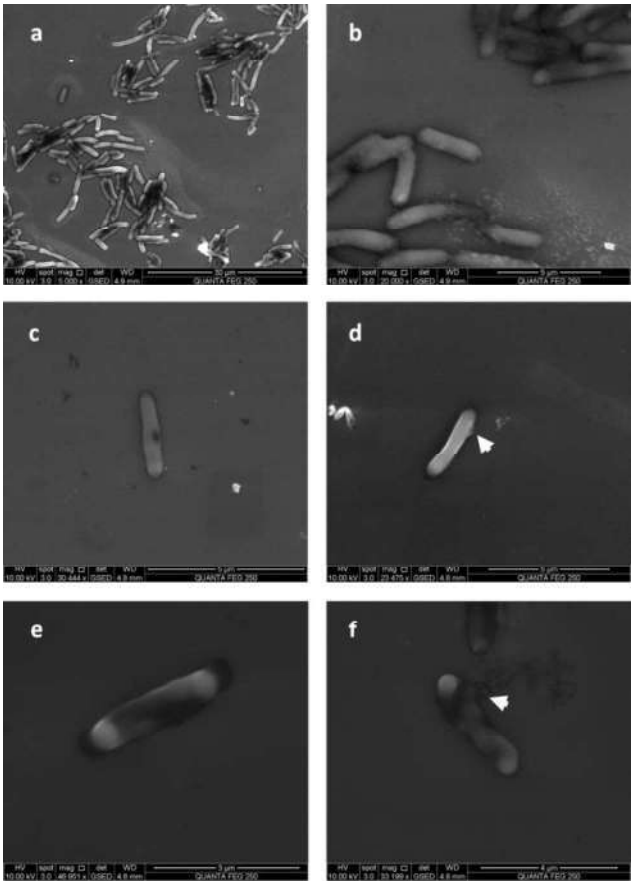


Fig. 7 ESEM images of the interaction between *E. coli* and PeNPs. a,b: control, c-f: *E. coli* with a solution of PeNPs (concentrations: c-d 0.11 nM and e-f 0.15 nM).

Damage to the cell membrane at higher PeNP concentration can be also seen in the TEM images (Fig. 8e and 8f). Furthermore, at the lowest PeNP concentration (Fig. 8c and 8d), TEM shows the nanoparticles aggregating on the surface of the bacteria, generating conglomerate PeNPs.

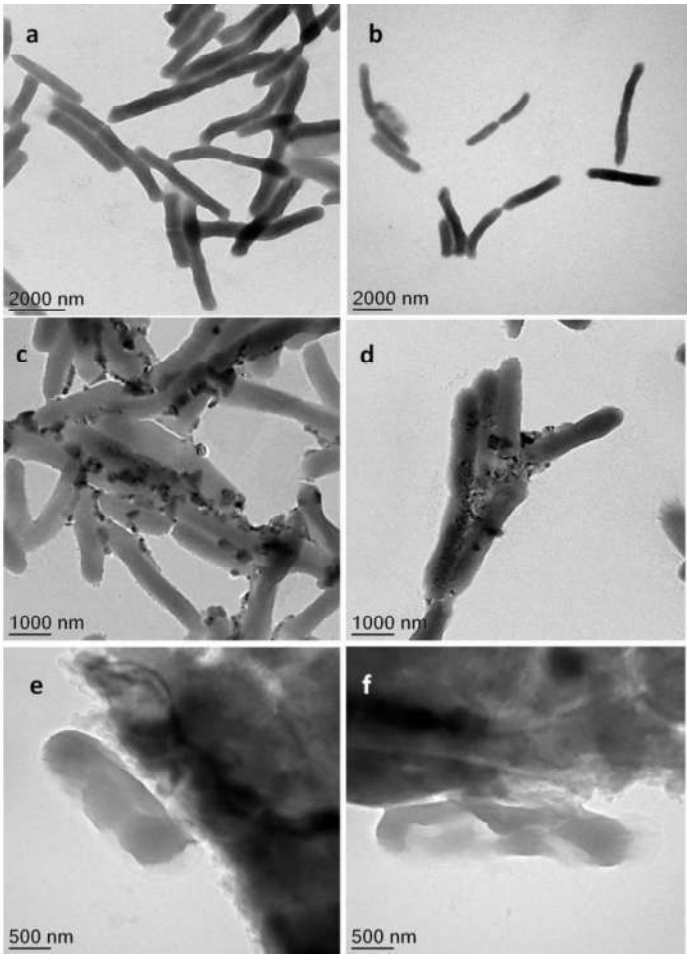


Fig. 8 TEM images of the interaction between *E. coli* and PeNPs. a,b: control, c-f: *E. coli* with a solution of PeNPs (concentrations c-d 0.11 nM and e-f 0.15 nM)

3.5 Antimicrobial properties of PeNPs using Confocal Raman Microscopy

3.5.1 Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Table 1 shows the MIC values obtained for the PeNPs and the $AgNO_3$ solution against the gram-negative bacteria *Escherichia coli*, gram-positive *Staphylococcus aureus* and the yeast *Candida albicans*. All the microorganisms tested were more sensitive to the PeNPs than to $AgNO_3$ solution.

Table 1: Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the PeNPs and the $AgNO_3$ solution against different microorganisms.

	Escherichia coli	*Staphylococcus aureus*	*Candida albicans*
PeNPs	0.6 nM	30 pM	0.1 nM
$AgNO_3$	7.8 µM	0.6 nM	7.8 µM

3.5.2 Nanoparticle-microorganism interactions

Phenotypic changes in *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans* cells treated with PeNPs were analyzed by means of Confocal Raman Microscopy (Table 2). In the case of E. coli, the interaction with the nanoparticles induces an increase in the intensity of some Raman bands, while others decrease or disappear. The interaction of the nanoparticles with *S. aureus* causes a decrease in the intensity of all the bands of the Raman spectrum and for the case of *C. albicans* some bands decrease and others remain with the same intensity.

In addition, hyperspectral images were obtained in order to visualize the main characteristics of the interaction between the PeNPs and the microorganisms (see Fig. 9). These images are obtained from the combination of the bands corresponding to the C-H stretching of the microorganisms and the bands corresponding to the Ag-N stretching of the PeNPs (Raman spectra are shown in Online Resource 1).

Table 2: Raman band assignment of microbial cells, control and treated cells with PeNPs. The band assignment was made based on previous work [15].

Microorganism	Raman Shift (cm^{-1})	Band Assignment	Effect on treated cells
E. coli			
	624	Nucleic acids	Disappear
	810	Amino acids	Diminishes
	982	Polysaccharides	Increases
	1186	Polysaccharides	Disappear
	1308	Amino acids or nucleic acids	Increases
S. aureus			
	993	Polysaccharides	Diminishes
	1092	Polysaccharides	Diminishes
	1327	Amino acids or nucleic acids	Diminishes
	1587	Fatty acids	Diminishes
C. albicans			
	698	Nucleic acids	Diminishes
	750	Amino acids	Diminishes
	991	Polysaccharides	No changes
	1318	Amino acids or nucleic acids	No changes
	1597	Fatty acids	Diminishes

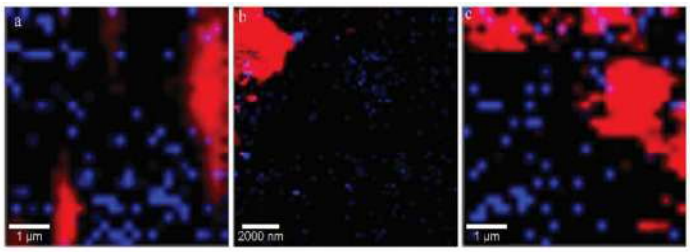


Fig. 9 Confocal Raman images obtained by combination of stretching C-H bands from microorganism (red) and the Ag-N bands assigned to the PeNPs (blue). a) *E. coli*, b) *S. aureus*, c) *C. albicans.*

4. Discussion

The silver nanoparticles synthesised with *Penicillium expansum* were stable after their purification by centrifugation [12]. The evaluation of the biosynthesis conditions of PeNPs was carried out in order to produce more stable nanoparticles in higher yield in less time, for their potential use in biotechnological applications requiring large quantities.

The size of the PeNPs was determined by Dynamic Light Scattering (DLS) and X-ray diffraction at low angles (SAXS). The average hydrodynamic diameter obtained from DLS was 14 nm. Dispersity Parameter (PDI) showed a moderate polydisperse distribution (<0.4) from DLS results. In addition, Small Angle X-ray Scattering (SAXS) analysis showed two peaks associated with populations of spherical nanoparticles. The characteristic distances obtained from the adjustment correspond to 15 nm and 40 nm (Figure 5). The first population could be attributed to the size of the single nanoparticles, while the second could correspond to a second larger population, resulting from the drying process necessary to make the preparation on silicon substrate. ζ-potential determination showed that PeNPs had net negative surface charge (-18.5 mV), indicating their stability. Nanoparticle suspensions showing ζ-potential net charges close to neutrality do not possess sufficient electrostatic repulsion to remain stable in solution.

In addition, the absorption spectrum of the nanoparticle solutions showed that the nanoparticles were stable to pH and high ionic strength. However, for the most extreme pH conditions (pH = 3 and pH = 9), a decrease in the plasmon resonance band suggested mild aggregation. Furthermore, a slight broadening of the peak is observed at pH 3 which could be attributed to the neutralization of surface charges of the PeNPs, which presented negative net charge at pH 6, resulting in their aggregation.

The characterization of the PeNPs was complemented by Confocal Raman Microscopy studies which indicated that this biological synthesis first produces AgNPs coordinated with N or O atoms, coming from the protein matrix, which enable their synthesis. In addition, the bands associated with the vibrational modes corresponding to the C-C stretching of the D- and G-bands of the carbonaceous matrix were found. These bands can be attributed to oxidized organic matter. In particular, the nature of silver nanoparticles gives rise to SERS phenomenon (Surface-Enhanced Raman Scattering), which produces a local effect. Due to this antenna and amplifier effect, it is possible to enhance the Raman signal of those molecular fragments near the surface of the nanoparticles of great importance to assess the nature of the stabilizing agent [16].

The application of biogenic PeNPs as antimicrobial agents was evaluated. The *in vitro* antimicrobial activity assays showed promising results, with MIC values lower than silver nitrate solution against bacteria and yeasts.

A first approach on the interaction between the PeNPs and *Escherichia coli* was carried out using electron microscopy techniques (TEM and ESEM). The first step in the interaction seems to be the attachment of the silver nanoparticles to the surface of the bacteria, as seen in TEM images. Thereafter, both ESEM and TEM show a decrease in the integrity of the cell membrane, probably as a consequence of the loss of cytoplasmic components due to de generation of pores on the cell, as shown in the ESEM images. In summary, the interaction of these silver nanoparticles and *Escherichia coli* seems to occur in three main stages: i) the attachment of the silver nanoparticles to the bacterial surface, ii) the generation of pores and the damage of the cell wall, and iii) the loss of cytoplasmic components and the death of the bacteria.

In order to advance in the knowledge of the antimicrobial mechanisms of action of the PeNPs against different microorganisms, Confocal Raman Microscopy studies were carried out. For this purpose, Principal Components Analysis (PCA) was used. This systematic and statistical power tool was able to demonstrate the existence of significant changes in the phenotypic profile of the microorganisms evaluated against the PeNPs (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*). The results suggest that the AgNPs produce cellular damage, producing changes at polysaccharides, lipids, proteins and nucleic acids. Although these studies had already been addressed in studies against antibiotics, this is the first report made with biogenic silver nanoparticles, which allows to advance in the knowledge of the target sites of nanoparticles. Changes in the phenotypic profile of the Raman spectra could be associated with the generation of reactive oxygen species (ROS) and intermediate nitrogen species (RNI) since they are extremely toxic and can cause damage to proteins, lipids and DNA. Previous studies have reported that the oxidative stress would be one of the mechanisms by which the nanoparticles synthetized by *P. aeruginosa* exert their toxicity [17]. On the other hand, Raman studies on antibiotics against microorganisms showed DNA fragmentation. The decrease of the band associated with DNA in *E. coli* and *S. aureus* and the disappearance of the same Raman band for the case of *C. albicans* can be attributed to a combination of mechanisms, possibly associated with the generation of ROS, which lead to the fragmentation and death of the microbial cells [18].

5. Conclusions

Extracellular cell-free filtrates of *Penicillium expansum* were used for the biosynthesis of monodisperse 15-nm diameter silver nanoparticles (PeNPs). Here we reported the optimum biosynthesis conditions to obtain the highest production of PeNPs in the shortest time for their potential use in biotechnological applications requiring large quantities of silver nanoparticles. The size, surface charge and stabilizing agent of the PeNPs were characterized, showing that the

biogenic PeNPs were stable over a wide range of pH and ionic strength. The *in vitro* antimicrobial activity assays showed promising results for the application of biogenic nanoparticles as antimicrobial agents with MICs in the nM range. The interaction between the PeNPs and *Escherichia coli* was characterized using TEM and ESEM, showing the attachment of silver nanoparticles to the surface of the bacteria, which was accompanied by a coresponding decrease in the integrity of the cell wall. Importantly, a new approach to study the antimicrobial mechanism of biogenic silver nanoparticles, using Confocal Raman Microscopy allowed us to suggest that the damage to bacterial and fungal cells produced by the PeNPs induces changes to polysaccharides, lipids, proteins and nucleic acids.

Acknowledgements

This work was supported by the Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) y Comisión Académica de Posgrado (CAP) (Universidad de la República, Uruguay), Program for the Development of Basic Sciences (PEDECIBA-Química) and Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) -Uruguay. Authors acknowledge use of the Advanced Microscopy Laboratory at The University of Zaragoza.

References

[1] Alamri SAM, Hashem, M., Nafady, N.A., Sayed, M.A., Alshehri, A.M., Alshaboury, G. Controllable biogenic synthesis of intracellular Silver/Silver Chloride Nanoparticles by *Meyerozyma guilliermondii* KX008616. Journal of Microbiology and Biotechnology. 2018; 28(6):917.

[2] Javani S, Marín I, Amils R, Abad JP. Four psychrophilic bacteria from Antarctica extracellularly biosynthesize at low temperature highly stable silver nanoparticles with outstanding antimicrobial activity. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2015; 483:60-9.

[3] Husain S, Sardar M, Fatma T. Screening of cyanobacterial extracts for synthesis of silver nanoparticles. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2015;31(8):1279-83.

[4] Li G, He D, Qian Y, Guan B, Gao S, Cui Y, et al. Fungus-mediated green synthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus terreus*. International Journal of Molecular Sciences. 2012;13(1):466-76.

[5] Sripriya J, Anandhakumar S, Achiraman S, Antony JJ, Siva D, Raichur AM. Laser receptive polyelectrolyte thin films doped with biosynthesized silver nanoparticles for antibacterial coatings and drug delivery applications. International Journal of Pharmaceutics. 2013;457(1):206-13.

[6] Mosselhy DA, El-Aziz MA, Hanna M, Ahmed MA, Husien MM, Feng Q. Comparative synthesis and antimicrobial action of silver nanoparticles and silver nitrate. Journal of Nanoparticle Research. 2015;17(12):1-10.

[7] Durán N, Durán M, de Jesus MB, Seabra AB, Fávaro WJ, Nakazato G. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. 2016;12(3):789-99.

[8] Kedziora, A, Speruda, M, Krzyzewzca, E, Rybka, J, Lukowiac, A, Bugla-Ploskonska, G. Similarities and Differences between Silver Ions and Silver in Nanoforms as Antibacterial Agents. International Journal of Molecular Science. 2018;19(2): pii: E444. doi: 10.3390/ijms19020444

[9] Nanda SS, Yi DK, Kim K. Study of antibacterial mechanism of graphene oxide using Raman spectroscopy. Scientific Reports. 2016;6.

[10] Xuan Nguyen NT, Sarter S, Hai Nguyen N, Daniel P. Detection of molecular changes induced by antibiotics in *Escherichia coli* using vibrational spectroscopy. Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2017; 183:395-401.

[11] Carey PR, Whitmer GR, Yoon MJ, Lombardo MN, Pusztai-Carey M, Heidari-Torkabadi H, et al. Measuring Drug-Induced Changes in Metabolite Populations of Live Bacteria: Real Time Analysis by Raman Spectroscopy. Journal of Physical Chemistry B. 2018;122(24):6377-85.

[12] Sanguiñedo P, Fratila, R. M., Estevez, M. B., Martínez de la Fuente, J., Grazú, V., Alborés, S.. Extracellular Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Fungi and Their Antibacterial Activity. Nano Biomedicine and Engineering. 2018;10(2):156-64.

[13] Paramelle D, Sadovoy A, Gorelik S, Free P, Hobley J, Fernig DG. A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. Analyst. 2014;139(19):4855-61.

[14] Athamneh AIM, Alajlouni RA, Wallace RS, Seleem MN, Sengera RS. Phenotypic profiling of antibiotic response signatures in *Escherichia coli* using raman spectroscopy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2014;58(3):1302-14.

[15] De Gelder, J, De Gussem, K, Vandenabeele, P, Moens, L. Reference database of Raman spectra of biological molecules. Journal of Raman Spectroscopy. 2007;38(9):1133-1147

[16] Joshi N, Pathak A, Upadhyaya CP, Jain N, Singh J, Prasad R. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Carissa carandas* berries and its potential antibacterial activities. Journal of Sol-Gel Science and Technology. 2018;86(3):682-9.

[17] Quinteros MA, Cano Aristizábal V, Onnainty R, Mary VS, Theumer MG, Granero GE, Paraje MG, Páez PL. Biosynthesized silver nanoparticles: Decoding their mechanism of action in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2018; 104:87-93.

[18] Bernatová S, Samek O, Pilát Z, Šerý M, Ježek J, Jákl P, et al. Following the mechanisms of bacteriostatic versus bactericidal action using raman spectroscopy. Molecules. 2013;18(11):13188-99.

molecules

MDPI

Article

Biofilm Eradication Using Biogenic Silver Nanoparticles

María Belén Estevez [1], Sofía Raffaelli [1], Scott G. Mitchell [2,3,*], Ricardo Faccio [4] and Silvana Alborés [1,*]

1 Área de Microbiología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo 11800, Uruguay; bestevez@fq.edu.uy (M.B.E.); sraffaelli@fq.edu.uy (S.R.)
2 Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón (ICMA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)-Universidad de Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain
3 CIBER-BBN, Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain
4 Centro NanoMat & Grupo Física, Departamento de Experimentación y Teoría de la Estructura de la Materia y sus Aplicaciones (DETEMA), Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo 11800, Uruguay; rfaccio@fq.edu.uy
* Correspondence: scott@unizar.es (S.G.M.); salbores@fq.edu.uy (S.A.)

Academic Editor: Russell Crawford
Received: 28 March 2020; Accepted: 24 April 2020; Published: 26 April 2020

Abstract: Microorganisms offer an alternative green and scalable technology for the synthesis of value added products. Fungi secrete high quantities of bioactive substances, which play dual-functional roles as both reducing and stabilizing agents in the synthesis of colloidal metal nanoparticles such as silver nanoparticles, which display potent antimicrobial properties that can be harnessed for a number of industrial applications. The aim of this work was the production of silver nanoparticles using the extracellular cell free extracts of *Phanerochaete chrysosporium*, and to evaluate their activity as antimicrobial and antibiofilm agents. The 45–nm diameter silver nanoparticles synthesized using this methodology possessed a high negative surface charge close to −30 mV and showed colloidal stability from pH 3–9 and under conditions of high ionic strength (*[NaCl]* = 10–500 mM). A combination of environmental SEM, TEM, and confocal Raman microscopy was used to study the nanoparticle-*E. coli* interactions to gain a first insight into their antimicrobial mechanisms. Raman data demonstrate a significant decrease in the fatty acid content of *E. coli* cells, which suggests a loss of the cell membrane integrity after exposure to the PchNPs, which is also commensurate with ESEM and TEM images. Additionally, these biogenic PchNPs displayed biofilm disruption activity for the eradication of *E. coli* and *C. albicans* biofilms.

Keywords: biogenic nanoparticles; silver nanoparticles; antimicrobial; antibiofilm

1. Introduction

Biological synthesis is an alternative green technology used for the production of metal nanoparticles, compared to the conventional physical and chemical methods that may use toxic and/or expensive reagents and severe reaction conditions [1]. Some microorganisms are able to accumulate and detoxify heavy metals due to various reductase enzymes, which reduce metal salts to metal nanoparticles with a narrow size distribution. For this reason, microorganisms have immense potential as ecofriendly and cost-effective tools for biological synthesis of nanoparticles, avoiding toxic, harsh chemicals and the high energy demand required for physiochemical synthesis [2] Biological synthesis by microorganisms includes the intracellular or extracellular production [3,4]. Extracellular synthesis of nanoparticles has received much attention because it eliminates the downstream processing steps required for the recovery of nanoparticles in intracellular methodologies, such as sonication to break

down the cell wall and several centrifugation and washing steps required for nanoparticle purification. Additionally, extracellular peptides, enzymes, reducing cofactors, and organic materials have significant roles by acting as reducing agents, providing natural capping to synthesize nanoparticles [5]. Crucially, such capping prevents nanoparticle aggregation and helps them to remain stable for long periods of time [2].

The commercial interest in silver nanoparticles lies in their various applications in diverse fields where their potent antimicrobial properties can be harnessed [6]. Recently there has been a drive towards the synthesis of silver nanoparticles by microorganisms [7,8]. In a previous study, our group reported an extracellular cell-free filtrate method for the biological synthesis of silver nanoparticles. The fungal strains were selected based on their silver nanoparticle synthesis capacity, yield of production, resistance to centrifugation and long-term colloidal stability of the obtained nanoparticles following their purification protocols. Moreover, these nanoparticles showed antibacterial activity against *Escherichia coli* in agar diffusion assays [7].

Another important aspect of the antimicrobial properties of silver nanoparticles is their potential to eradicate or inhibit microbial biofilm formation, which is an important virulence factor in many localized chronic infections [9,10]. One of the most notable emergent biofilm properties is that adhering microorganisms can embed themselves in a self-produced matrix of extracellular polymeric substances (EPS) composed of proteins, polysaccharides, humic acids and DNA. This matrix of EPS acts as the glue that holds together bacterial biofilms, protecting them against host immune systems and environmental challenges, among other exogenous threat to survival and proliferation. Consequently, the polymeric matrix plays a crucial role in antimicrobial resistance by preventing antibiotic penetration inside the biofilm. Despite the EPS-matrix containing water-filled channels required for the exchange of nutrients and metabolic waste-products with their environment, most antimicrobials have difficulty penetrating EPS, either through size limitations or ready adsorption onto the EPS-matrix or to bacterial cell surfaces that can be highly negatively charged at physiological pH, but becoming more positively charged with decreasing pH inside a biofilm. Such phenomena help the survival of internal biofilm cells and illustrate the limitation of traditional molecular approaches to biofilm eradication. In this sense, advances in nanotechnology can provide a great tool [11,12]. For example, reports on silver nanoparticles have shown they are able to diffuse toward the inner part of the biofilm before releasing Ag^+ ions, where this penetration leading to a high kill rate against the bacteria in the lower layers of the biofilm [13].

Different nanomaterials, non-adhesive, drug-releasing and contact-killing coatings, are under design to prevent biomaterial-associated infection of implants such as artificial hips and knees. Moreover, nanotechnology is looked at as an extremely promising way to create new antimicrobials and delivery systems, able to penetrate biofilms and kill multidrug resistant strains [14]. Size, shape and surface properties of the resulting nanomaterials are important to consider with respect to the control of biofilm-infection [15]. Nanoparticle size is important for penetration into biofilms [13]; the ideal diameter for NPs in biofilm-infection control would range between five and 100–200 nm, and not exceeding 500 nm [14].

Antimicrobial and antibiofilm mechanisms of silver nanoparticles are not completely known, and they depend on the type of microorganism and the physicochemical properties of the nanoparticle [16,17]. Nanoparticles are able to contact with bacterial cell walls through different interactions, cross microbe membranes, interfere with metabolic pathways, induce changes in membrane shape and function, interact with the microbial cellular machinery to inhibit enzymes, deactivate proteins, induce oxidative stress and electrolyte imbalance, or modify gene expression levels. Given their enormous therapeutic potential, understanding the modes of action responsible for the bactericidal properties of NPs becomes imperative [18]. Furthermore, it is also important to develop accessible, cheap, rapid and reliable methods as alternatives to traditional biochemical methods which often determine only one mechanism of action at sub-cellular level. For this purpose, we used three complementary techniques: transmission electron microscopy (TEM), environmental scanning electron

microscopy (ESEM), and confocal Raman microscopy (CRM). Raman spectroscopy provides us with molecular fingerprint information and permits us to study subtle changes in cellular structure, as a result of modification of proteins, lipids and nucleic acids that undergo changes in their Raman band profiles. This technique has been used to provide an image of the antimicrobial effect and was recently used to study molecular changes within bacterial cells after antibiotic treatment [19,20].

The aim of this work was to produce silver nanoparticles using the extracellular cell free extracts of *Phanerochaete chrysosporium* and evaluate their antimicrobial and antibiofilm properties. To achieve this, our study focused on the interactions between the biogenic silver nanoparticles (PchNPs) and *E. coli* cells using TEM, ESEM and CRM, in order to ascertain the antimicrobial mechanisms of these nanoparticles; while the effect of these antimicrobial nanoparticles on the disruption and eradication of *E. coli* and *C. albicans* biofilms was also evaluated.

2. Results and Discussion

2.1. Synthesis of Biogenic Silver Nanoparticles (PchNPs)

The biomass from cultures of the fungus *Phanerochaete chrysosporium* was harvested, washed and suspended in sterilized distilled water. After incubation, the cell-free filtrate was added to a silver nitrate solution and the mixture was incubated in dark. The absorbance spectrum was measured in the range of 250–800 nm and the maximum peak was determined. Color change in the reaction mixture (Figure 1a,b) as well as the appearance of an absorption band between 400 and 450 nm corresponding to the surface plasmon resonance (SPR) (Figure 1c) were indicative of the formation of silver nanoparticles (Figure 1b).

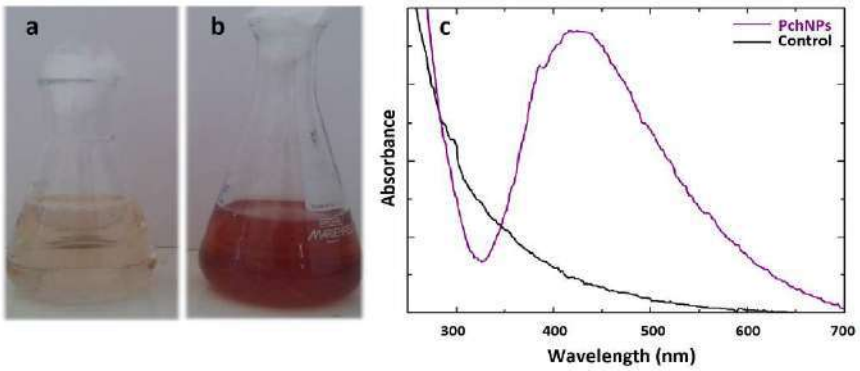


Figure 1. Color change obtained for silver nanoparticles synthesized (**a**) control, (**b**) PchNPs and (**c**) UV-Vis absorption spectra, after 24 h of reaction.

After a 24 h period an 87% yield was obtained from the synthesis. The reaction mixture was centrifuged and the pellet containing the silver nanoparticles was washed with and resuspended in water. The UV-vis spectra after centrifugation showed an absorption band at 442 nm, corresponding to the SPR band of silver nanoparticles (Figure 2).

2.2. Evaluation of the Incidence of Reaction Conditions in the Biosynthesis of PchNPs

The evolution of silver nanoparticle synthesis over time was monitored by measuring the formation of SPR band via UV-vis spectroscopy absorbance at 440 nm. The incidence of $AgNO_3$ concentration, reaction temperature and incubation time of the mycelium with water are shown in Figure 3. 5 mM $AgNO_3$ was the concentration that reached the highest yield for the nanoparticle synthesis (Figure 3a). In addition, the conditions for the greatest nanoparticle production in the shortest time found at a reaction temperature of 37 °C (Figure 3b) and 41 h of incubation of the mycelium with water (Figure 3c). All subsequent biosyntheses were carried out using these conditions to obtain the highest production of stable PchNPs in the shortest time.

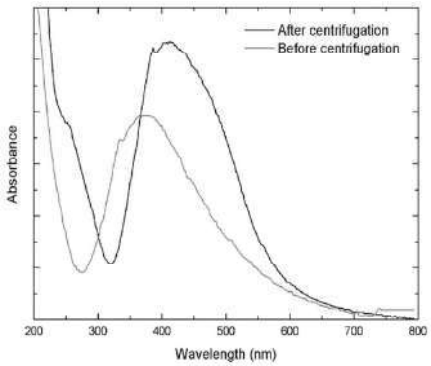


Figure 2. UV-visible absorption spectrum before and after centrifugation showing the final SPR band of the resuspended PchNPs at 442 nm, corresponding to the stable silver nanoparticles.

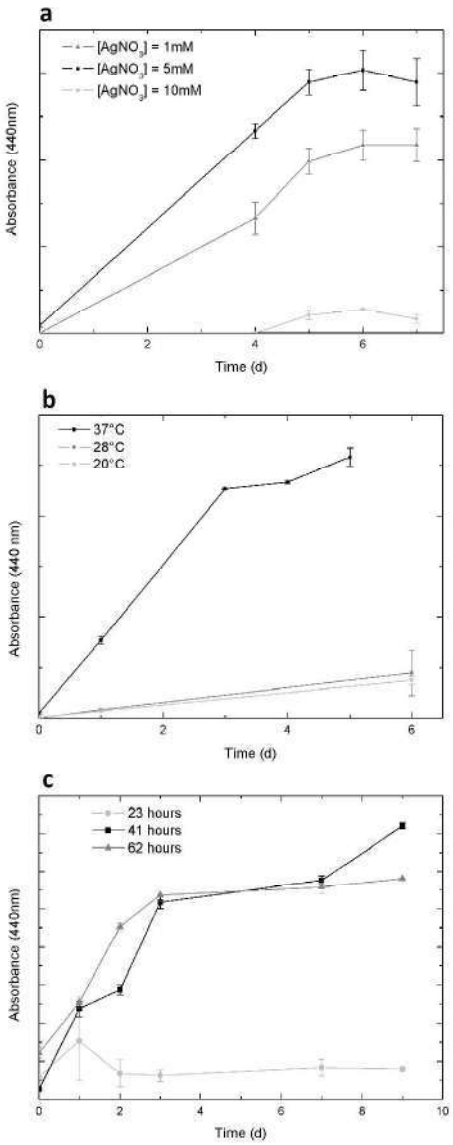


Figure 3. Effect of different reaction conditions on the synthesis of PchNPs (measured by absorbance at 440 nm) over several days, where error bars indicate the standard deviation: (**a**) concentration of $AgNO_3$, (**b**) reaction temperatures, (**c**) incubation times of the fungal mycelium with water.

2.3. Characterization of PchNPs

2.3.1. ζ-potential: Surface Charge of PchNPs

ζ-potential determination showed that PchNPs had a high net negative surface charge, close to −30 mV (−24.8 mV), indicating their colloidal stability in aqueous media.

2.3.2. DLS and SAXS: Diameter of PchNPs

According to the Small Angle X-Ray Scattering (SAXS) measurement, silver nanoparticle size was 26(2) nm (Figure 4a). DLS characterization showed a single population with a hydrodynamic diameter of ca. 45 nm (Figure 4b), larger than the diameter obtained using SAXS, which is to be expected, since DLS measures the hydrodynamic diameter of the nanoparticles.

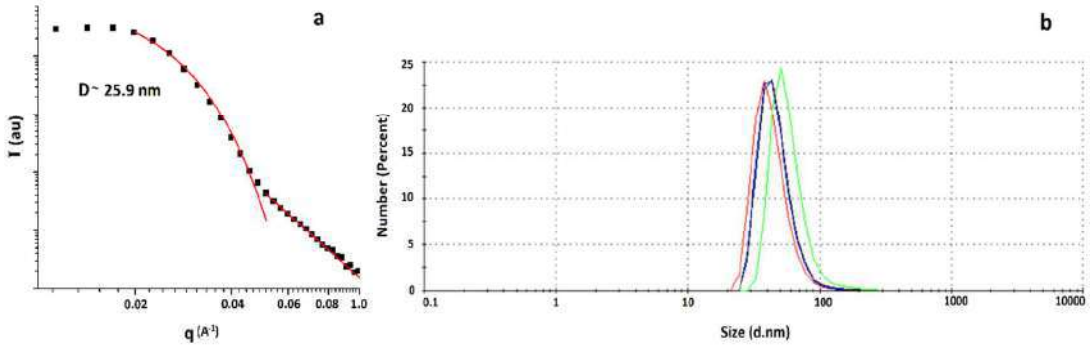


Figure 4. (**a**) SAXS curve showing one characteristic correlated distance and (**b**) DLS measurement indicating nanoparticles of ca. 45 nm diameter in solution with low polydispersity.

2.3.3. Confocal Raman Microscopy: Surface Functional Groups of PchNPs

The use of fungi for silver nanoparticle production provides improved production capacity due to the high quantities of secreted substances; these bioactive substances play a dual functional role as reducing and stabilizing agents to the colloidal nanoparticles [21]. Confocal Raman Microscopy was used to characterize the surface functional groups capping of the silver nanoparticles (Figure 5). In particular, the nature of silver nanoparticles gives rise to Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) phenomena, which produce a local field effect at the surface of the nanoparticle. Due to this amplifier effect, it is possible to enhance the Raman signal of those molecular fragments near the surface of the nanoparticles, which is of great importance to assess the nature of the stabilizing agent (capping) [22]. The presence of the band positioned at 230 cm^{-1} can be attributed to the Ag-N stretching mode, which may be originated from the fungal extract, providing the nitrogen atoms that will finally take part of the capping of the silver nanoparticle. Even more, bands positioned at the fingerprint region can be attributed to the presence of L-valine and L-alanine, which indicate that proteins from the fungal extract are part of the capping, or are near the nanoparticle metallic surface [22].

2.4. Colloidal Stability Assays

The colloidal stability of PchNPs over pH 3–9 and under conditions of high ionic strength (*[NaCl]* = 10–500 mM) were evaluated (Figure 6a,b respectively). Aggregation of the nanoparticles generates a decrease in intensity at the Surface Plasmon Resonance (SPR) band, as well as a shift in the visible spectrum towards the infrared. Although PchNPs were stable for most of the evaluated conditions, a decrease at the band corresponding to the SPR band, as well as a slight broadening of the peak, were observed at 100 and 500 mM NaCl and pH 3. These results could be attributed to the neutralization of surface charges of PchNPs, which presented negative net charge at pH 6, resulting in their aggregation.

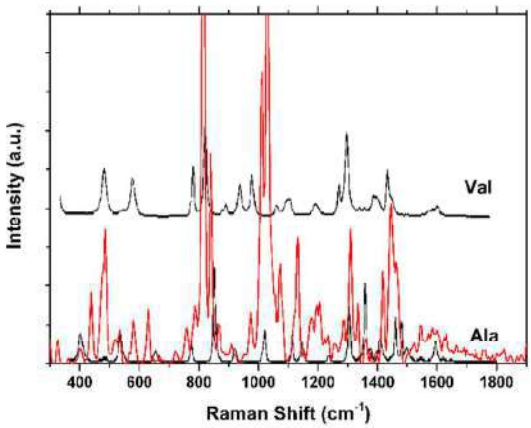


Figure 5. Raman spectrum for PchNPs with superimposed Raman spectra of L-valine and L-alanine.

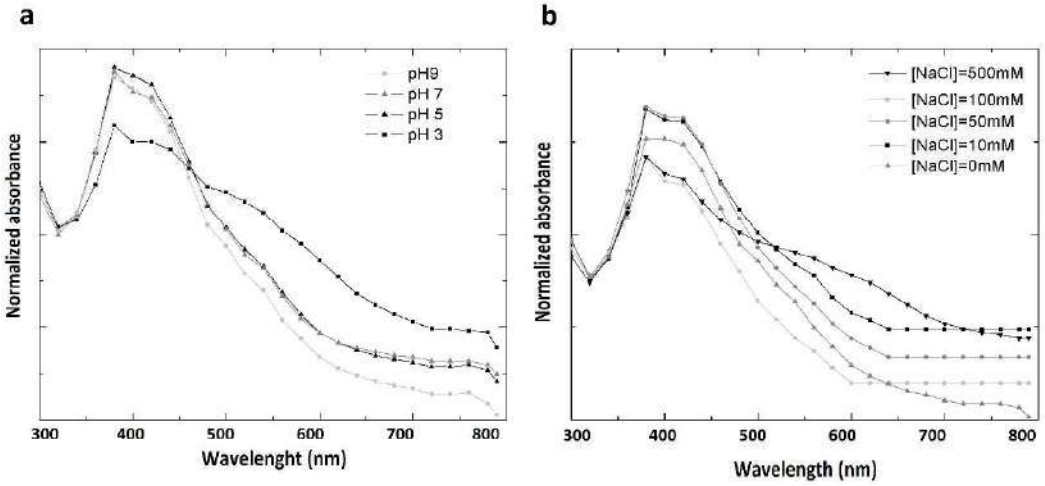


Figure 6. Stability of PchNPs (**a**) from pH 3 to 9, and (**b**) at different ionic strength, *[NaCl]* 0–500 nM

2.5. Antimicrobial Activity of PchNPs against E. coli

2.5.1. Antibacterial Activity against *E. coli*

In order to determine the antibacterial activity of PchNPs, a bacterial inoculum of *E. coli* in LB media was supplemented with different concentrations of PchNPs and incubated for 24 h. Consistent with results reported by other authors using biogenic nanoparticles [23], in this work the Resazurin cell viability assays showed minimum inhibitory concentration (MIC) of PchNP of 0.25 nM for *E coli* cells.

2.5.2. ESEM and TEM of *E. coli* Cells Exposed to PchNPs

Based on the results of antibacterial assays, we opted to use electron microscopy techniques (TEM and ESEM) to evaluate the interaction of the silver nanoparticles (at 0.12 and 0.25 nM) with *E. coli*. ESEM imaging shows that when *E. coli* cells are exposed to PchNPs (Figure 7c–f), their cell wall shows loss of integrity when compared to the control (Figure 7a,b). At lower, sub-MIC, PchNPs concentrations (Figure 7c,d), bacterial cells appear to be losing part of their cytoplasmic components (indicated by arrows in Figure 7d) and, with the increment of the concentration (Figure 7e,f), the damage of the cell membrane is clearly evidenced (indicated by arrows in Figure 7f). Meanwhile TEM images demonstrate that at the lowest PchNP concentration of 0.12 nM (Figure 8c,d), bacterial cells possess large conglomerates of silver nanoparticles on their surface (indicated by arrows) and show distinctive morphological changes when compared to control (Figure 8a,b).

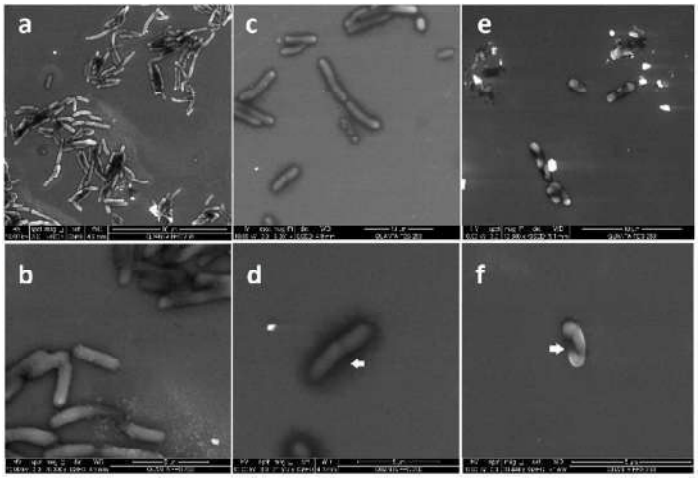


Figure 7. ESEM images of the interaction between *E. coli* and PchNPs. (**a**,**b**): control, (**c**–**f**): *E. coli* treated with PchNPs (**c**,**d**: 0.12 nM and **e**,**f**: 0.25 nM). Membrane puncturing and cell lysis indicated by white arrows. Note that panel **e** contains bright artifacts from the glutaraldehyde fixation.

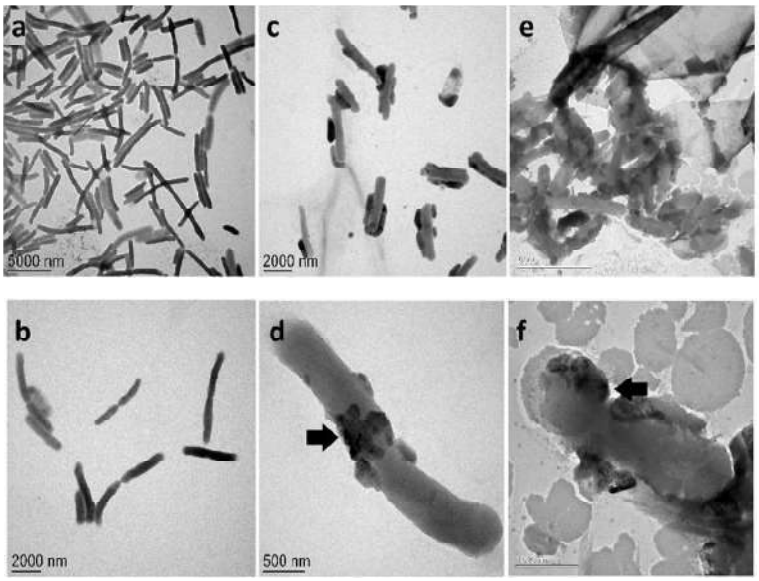


Figure 8. TEM images of the interaction between *E. coli* and PchNPs. (**a**,**b**): control, (**c**–**f**): *E. coli* treated with PchNPs (**c**,**d**: 0,12 nM and **e**,**f**: 0,25 nM). Black arrows indicate cell membrane puncturing. Panel **f** shows a significant amount of debris from cell lysis in addition to the bacterial cells.

Increasing silver nanoparticle concentration to 0,25 nM (Figure 8e,f) resulted in a decrease in the integrity of the cell membrane (indicated by black arrows in Figure 8d,f), probably as a consequence of the loss of cytoplasmic components due to degeneration of pores on the cell, as shown in the ESEM images.

2.6. Antimicrobial Properties of PchNPs Using Confocal Raman Microscopy

Studies of the phenotypic profile of *E. coli* and *C. albicans* cells before and after treatment with silver nanoparticles were carried out using confocal Raman microscopy. In order to evaluate the antimicrobial activity of PchNPs we selected two very different microorganisms (a prokaryotic and a eukaryotic microorganism). An important structural difference between them, that is the target of action of several antimicrobials, is the composition of the cell envelope. *E. coli* cells have a complex cell envelope

composed of the cytoplasmic membrane, the periplasm with a thin peptidoglycan layer, and the outer membrane. In *C. albicans* the major components of the cell wall are fibrillar polysaccharides and proteins, with an inner layer enriched for chitin and polysaccharide matrix and outer layers enriched for mannoprotein. Minimum inhibitory concentration (MIC) of the nanoparticles was determined. MIC of PchNPs were 3.0×10^{-2} nM against *E. coli* and *C. albicans*. Both microorganisms tested were more sensitive to the PchNPs than to $AgNO_3$ solution (MIC 7.8 μM).

Then, interaction assays between microorganisms and silver nanoparticles were carried out using confocal Raman microscopy. Changes in cellular composition can be monitored using changes in Raman band profiles, which can be associated with the morphological changes of microbial cells, providing an image of the antimicrobial effect [24]. Recent reports have shown that Raman difference spectroscopy is able to provide molecular details on changes within *E. coli* cells caused by antibiotics, hydrogen peroxide [20,25] or graphene oxide [19]. In this work, the interaction of PchNPs with *E. coli* caused a decrease in the intensity of most Raman bands, while other remain the same (Table 1). The significant decrease in fatty acid Raman bands of *E. coli* cells could be associated to the loss of the cell membrane integrity after the PchNPs treatment, as observed in ESEM and TEM images (Figures 7 and 8, respectively). In the case of the interaction with *C. albicans*, all bands of the Raman spectrum decreased in intensity. In addition, hyperspectral images were obtained in order to visualize the main characteristics of the interaction between the PchNPs and the microorganisms (see Figure 9). These images were obtained from the combination of the bands corresponding to the C-H stretching of the microorganisms and the bands corresponding to the Ag-N stretching of the PchNPs (Raman spectra are shown in Suplementary Materials, Figures S1 and S2). As shown in Figure 9a, the hyperspectral image shows PchNP interaction with an *E. coli* cell, providing structural information, which is comparable, and complementary to that obtained from the TEM and ESEM images.

Table 1. Raman band assignment of microbial cells, control and treated cells with PchNPs. The band assignment was made based on previous work [26].

Microorganism	Raman Shift (cm^{-1})	Band Assignment	Effect on Treated Cells
E. coli	624	Nucleic acids	Diminishes
	810	Aminoacids	Diminishes
	982	Polysaccharides	No changes
	1186	Polysaccharides	Diminishes
	1243	Polysaccharides	Diminishes
	1308	Aminoacids or nucleic acids	Diminishes
	1344	Aminoacids or fatty acids	No changes
	1593	Fatty acids	Diminishes
C. albicans	670	Nucleic acids	Diminishes
	788	Aminoacids	Diminishes
	885	Aminoacids	Diminishes
	999	Polysaccharides	Diminishes
	1100	Polysaccharides	Diminishes
	1319	Aminoacids or nucleic acids	Diminishes
	1596	Fatty acids	Diminishes

2.7. Antibiofilm Activiy of PchNPs

The biofilm biomass of *E. coli* and *C. albicans* was measured with crystal violet stain. Comparison of the basal measures (biofilm without PchNP) with treated biofilm allowed analyzing the nanoparticles ability to eradicate biofilms.

Reports on the antibiofilm activity of silver nanoparticles have been promising; showing that exposure to silver nanoparticles produced changes to the structural biofilm conformation of *Candida albicans* [27] and effectively inhibited *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation [24]. Unfortunately, silver nanoparticles are prone to aggregation, reducing their antimicrobial efficacy and

therefore surface functionalization before application is important to prevent aggregation and enhance their killing efficacy in biofilms, and reduce their cellular uptake and cytotoxicity. So natural and environmentally benign compounds, such as extracellular fungal compounds used in this work for the nanoparticle synthesis, could constitute effective stabilizing agents enhancing bacterial killing in biofilms and reducing cytotoxicity of silver nanoparticles [14]. According to the results, the biogenic nanoparticles synthesized in this work were able to eradicate the *E. coli* and *C. albicans* biofilms (Figure 10). Future works will include optimization of these biofilm eradication experiments, evaluating the effect of different treatment condition for biofilms, including incubation time and nanoparticle dose.

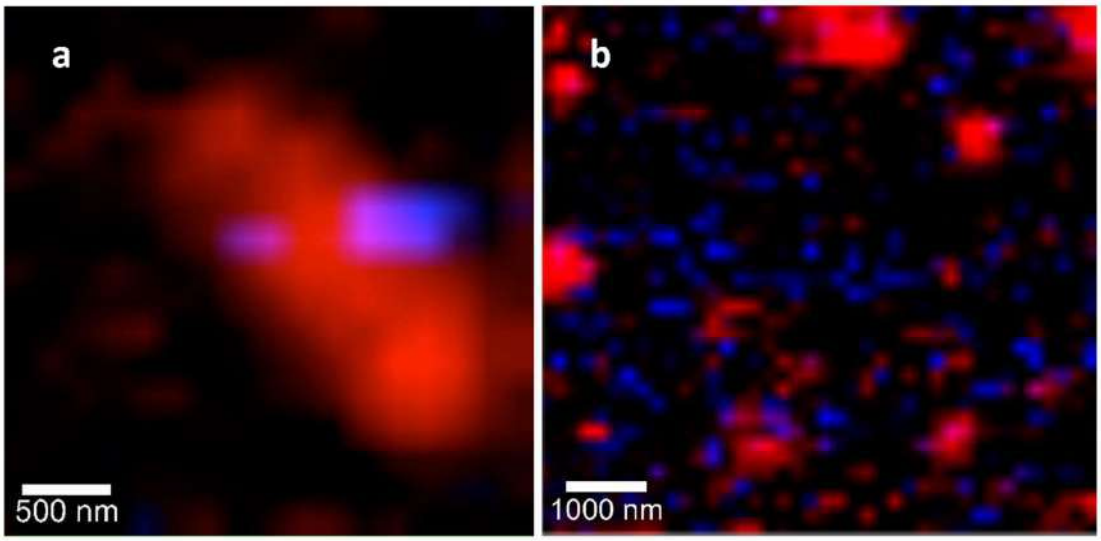


Figure 9. Confocal Raman spectroscopy images obtained by combination of stretching C-H bands from microorganism (red) and the Ag-N bands assigned to the PchNPs (blue): (**a**) *E. coli*, (**b**) *C. albicans*.

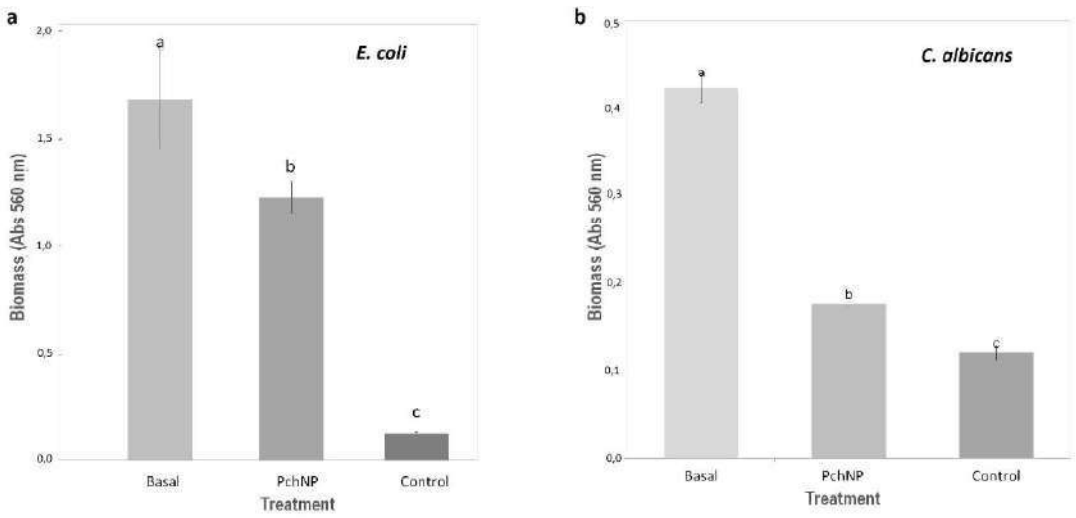


Figure 10. Activity of PchNPs against (**a**): *E. coli* and (**b**): *C. albicans* biofilms. Different letters represent significant differences at $p < 0.05$ probability level, according to ANOVA and Tukey's test. *Basal*: biofilm without PchNPs, *PchNP*: biofilm treated with PchNPs, *Control:* No biofilm.

PchNPs produced 29% reduction in biomass of *E. coli* biofilm (Figure 10a) and 80% reduction in biomass of *C. albicans* biofilm (Figure 10b). *Candida albicans* virulence is a result of its capacity to

form biofilms, a complex of cells, DNA, polymeric matrix, etc., on the surface of biomaterials and on catheters and prosthetic devices. The polymeric matrix has a crucial role in the antifungal resistance since it prevents the antimicrobial penetration inside the biofilm, allowing the internal cells to survive. Due of their intrinsic resistance to almost all antifungals in clinical use, increased resistance to this therapy, and the ability of cells within biofilms to withstand host immune defenses, the antifungal resistance of biofilms results most probably from the conjunction of several mechanisms that act in a time-dependent manner. Previous reports showed the antibiofilm activity of nanoparticles depends on their physicochemical properties, such as the size [28]. Similar to previously reported research by these authors, PchNPs of ca. 45 nm were able to eradicate biofilm of *C. albicans*. From these results, the biogenic silver nanoparticles synthesized in this work would be a useful tool for the development of biofilm disruption materials.

3. Materials and Methods

3.1. Synthesis of Silver Nanoparticles

Strain of *Phanerochaete chrysosporium* (12G) from the Cátedra de Microbiología General Collection CCMG, Facultad de Química (Montevideo, Uruguay), was used for the nanoparticle biosynthesis.

The mycelia were grown in Potato Dextrose Agar (PDA, BD Difco, Sparks, MD, USA) at 28 °C and two plugs of 0.9 cm in diameter were then transferred to 500 mL flasks containing 100 mL Potato Dextrose Broth (PDB, BD Difco). Fermentation was carried out at 28 °C, with agitation on an orbital shaker operating at 150 rpm for 72 h. The biomass from cultures was harvested by filtration and then washed extensively with sterilized distilled water to remove any remaining media components. Then, synthesis of silver nanoparticles was carried out as described in Sanguiñedo et al. [7]. Wet fungal mycelia were suspended in sterilized distilled water (0.1 g/mL) and incubated with agitation on an orbital shaker operating at 150 rpm. Then, the cell-free filtrate was collected by filtration of this suspension through membrane filter with 0.45 µm pore size. Finally, 50 mL of the cell-free filtrate was added to 50 mL of a silver nitrate solution. The mixture was incubated in dark. The absorbance spectrum was measured in the range of 250–800 nm and the maximum peak was determined, at different times. The reaction was stopped when there was no increase in the maximum absorption peak of silver nanoparticles. The remaining cell-free filtrate was used as control. Percentage yield was calculated according to weight of lyophilized silver nanoparticles and weight of silver nitrate used in the reaction, as previously reported [26].

To evaluate the incidence of the reaction variables in the biosynthesis of the nanoparticles, the following experimental conditions were modified: incubation time of the mycelia with water, concentration of $AgNO_3$ and incubation temperature in the synthesis reaction.

After the synthesis reactions, the samples were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. The supernatant was removed and nanoparticles (PchNPs) were washed twice using sterilized distilled water, by centrifuging the nanoparticles for 10 min at 10,000 rpm. The absorbance peak of the purified silver nanoparticles was measured and the concentration was estimated according to Paramelle et al. [29].

3.2. Characterization of Silver Nanoparticles

3.2.1. UV-Vis Spectroscopy

The absorbance spectrum was measured in the range of 250–800 nm, at predetermined time intervals. Also, the color changes of reaction mixtures were used as evidence for silver nanoparticles formation.

3.2.2. ζ-Potential and DYNAMIC Light Scattering (DLS)

The measurement of ζ-potential and the hydrodynamic diameter of the nanoparticles were determined by Dynamic Light Scattering (DLS) utilizing a Zetasizer (Malvern Instruments, Malvern, UK). Samples were prepared at pH 6, in Milli-Q water. For ζ-potential determination, each sample was measured at 25 °C, three times, combining 10 runs per measurement. In the case of DLS, each sample was measured at 25 °C, 10 times, combining five runs per measurement. Results were treated using the Malvern Zetasizer software (Malvern, UK).

3.2.3. Small Angle X-ray Scattering (SAXS)

An model Ultima IV X-ray powder diffractometer (Rigaku, Tokyo, Japan) using CuK_α = 1.5418 Å radiation was used for the small angle X-ray scattering measurements. They were made at low angle in Bragg-Brentano geometry, applying an offset of 0.08º in order to get the SAXS signal, on nanoparticle deposits on silicon substrate, with measurement ranges of q = 0.05 to 1.50 $Å^{-1}$.

3.2.4. Confocal Raman Microscopy

An aliquot of PchNPs was deposited on an aluminum support and dried at room temperature for a further analysis by confocal Raman microscopy. The measurements were made on an Alpha 300 RA WITec Raman microscope (WITec GmbH, Ulm, Germany) using a λ = 532 nm excitation laser wavelength and focused through a 100× objective.

3.2.5. Colloidal Stability Assays

The colloidal stability of PchNPs was studied at different and ionic strength (10–500 mM NaCl) and pH (3–10) conditions by the measurement of the absorbance spectrum in the range of 200–800 nm.

3.3. Antimicrobial Activity of PchNPs

3.3.1. Antibacterial Activity against *E. coli*

In order to determine the antibacterial activity of PchNPs, a bacterial inoculum (1×10^6 CFU/mL) of *Escherichia coli ATCC 25922* in LB media was supplemented with different concentrations of PchNPs and a blank sample (bacteria without PchNPs) was also included in the assay as negative control, in a 96-well plate. Once the microbial cultures had been grown for a total of 24 h, 30 μL of 0.1 mg/mL resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) in LB media was added to each well and incubated in the dark at 37 °C for 1 h under stirring.

Enviromental Scanning Electron Microscopy (ESEM)

E. coli cells were incubated with PchNPs (0.12 and 0.25 nM), in the same way as in the resazurin assay. Then, three wells of 200 μL each were mixed into an Eppendorf and centrifuged at 1400 rpm (300 G) for 10 min. The supernatant was removed and, for fixation of the cells, the pellet was resuspended into 1.5 mL of 2.5% glutaraldehyde in phosphate buffer 10 mM pH 7.2. The solutions were left for 2 h in the wheel. Then, the cells were washed once with 1.5 mL of sterile PBS and three times with sterile distilled water to remove glutaraldehyde. Finally, the pellets were resuspended in 200 μL of sterile MilliQ water. Data were collected on a Quanta FEG-250 (FEI Company, Hillsboro, OR, USA.) field emission SEM for high-resolution imaging working in ESEM mode using a GSED detector under high relative humidity conditions.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

Samples were prepared as in the ESEM assay, including the PchNPs concentrations. The pellets were resuspended in sterile distilled water, 4 μL of the sample was deposited onto a carbon-coated

copper grid (Cu200 mesh) and left to dry in air for several hours at room temperature. TEM analysis was carried out in a TECNAI T20 electron microscope (FEI) working at 60 kV.

3.3.2. Antimicrobial Properties of PchNPs Using Confocal Raman Microscopy

Minimum inhibitory concentration (MIC) of the nanoparticles was determined by the microdilution technique according to the Clinical and Laboratory Standards Institute [30] in a 96-well plate (sterilized, 300 µL capacity, MicroWell, NUNC, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), against the following microorganisms: *Escherichia coli ATCC 25922,* and *Candida albicans ATCC 101231.* The initial solutions of the nanoparticles were prepared in water and further serial dilutions were performed. The MIC was determined as the lowest concentration of silver nanoparticles that inhibited the visible growth of a microorganism after 24 h of incubation.

Studies of the phenotypic profile of microbial cells before and after treatment with silver nanoparticles were carried out using confocal Raman microscopy as previously described for antibiotics [28]. The cell suspensions were deposited on an aluminum support and dried at room temperature. The measurements were made using a 532 nm laser focused through a 100× objective. The data processing and statistical analysis was performed by principal component analysis (PCA) using a script of the research group. The Raman spectra (phenotypic profile) of the cells treated with the nanoparticles were compared to those of the untreated cells (control).

3.4. Antibiofilm Activiy of PchNPs

Assays against *E. coli* and *C. albicans* biofilms were carried out in a 96-well plate (sterilized, 300 µL capacity, MicroWell, NUNC), with six replicates.

A cell suspension of *E. coli ATCC 25922* (1×10^7 cells/mL) was prepared and diluted to 1/10 in Nutrient Broth. Suspension was deposited in the 96-well plate and incubated 24 h at 37 °C. Control wells contained only Nutrient Broth. For *C. albicans* assay, plates were pretreated with 50% Fetal Bovine Serum (FBS) in Potato Dextrose Broth (PDB) at 37 °C for 30min and washed with 10mM PBS (pH 7.2). Then, a cell suspension of *C. albicans ATCC 101231* (1×10^6 cells/mL) was prepared and diluted to 1/10 in culture broth. Suspension was deposited in the 96-well plate and incubated 24 h at 37 °C. Control wells were pre-treated with FBS and contained only PDB.

Then, supernatant was removed and the PchNPs solutions were added. Fresh culture broth was added to the basal biofilm wells. The plate was incubated 48 h at 37 °C. Supernatant was removed, the wells were washed with distilled water and dried at 50 °C for 40 min. Crystal Violet was added to each well and left at room temperature for 3 min. The contents of the wells were washed with water and resuspended in ethanol:acetone (70:30). The biofilm was quantified by measuring the absorbance at 560 nm and statistical analysis was carried out by Variance Analysis and Tukey Test.

Supplementary Materials: The following are available online, Figure S1. Raman spectra for *E. coli* cells, control and treated cells with PchNPs, Figure S2. Raman spectra for *C. albicans* cells, control and treated cells with PchNPs.

Author Contributions: Methodology, M.B.E. (performed most of the experiments) and S.R. (performed biofilm experiments); writing—Original draft preparation, S.A.; writing—Review and editing, S.G.M., R.F., M.B.E. and S.R.; supervision, S.A. (supervised most of the experiments), R.F. (supervised the nanoparticles characterization and Confocal Microscopy experiments), S.G.M. (supervised the SEM and TEM experiments); project administration, S.A.; funding acquisition, S.A., R.F. and S.G.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Espacio Interdisciplinario (EI) y Comisión Académica de Posgrado (CAP) (Universidad de la República, Uruguay), Program for the Development of Basic Sciences (PEDECIBA-Química) and Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) -Uruguay.

Acknowledgments: Authors acknowledge the use of the Advanced Microscopy Laboratory at The University of Zaragoza.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Gour, A.; Jain, N.K. Advances in green synthesis of nanoparticles. *Artif. CellsNanomed. Biotechnol.* **2019**, *47*, 844–851. [CrossRef] [PubMed]
2. Singh, Y.N. Kava: An overview. *J. Ethnopharmacol.* **1992**, *37*, 13–45. [CrossRef]
3. Alamri, S.A.M.; Hashem, M.; Nafady, N.A.; Sayed, M.A.; Alshehri, A.M.; Alshaboury, G. Controllable biogenic synthesis of intracellular Silver/Silver Chloride Nanoparticles by Meyerozyma guilliermondii KX008616. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *28*, 917. [CrossRef] [PubMed]
4. Javani, S.; Marín, I.; Amils, R.; Abad, J.P. Four psychrophilic bacteria from Antarctica extracellularly biosynthesize at low temperature highly stable silver nanoparticles with outstanding antimicrobial activity. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2015**, *483*, 60–69. [CrossRef]
5. Khan, M.R.; Fromm, K.M.; Rizvi, T.F.; Giese, B.; Ahamad, F.; Turner, R.J.; Füeg, M.; Marsili, E. Metal Nanoparticle–Microbe Interactions: Synthesis and Antimicrobial Effects. *Part. Part. Syst. Charact.* **2020**, 1900419. [CrossRef]
6. Su, D.-L.; Li, P.-J.; Ning, M.; Li, G.-Y.; Shan, Y. Microwave assisted green synthesis of pectin based silver nanoparticles and their antibacterial and antifungal activities. *Mater. Lett.* **2019**, *244*, 35–38. [CrossRef]
7. Sanguiñedo, P.; Fratila, R.M.; Estevez, M.B.; Martínez de la Fuente, J.; Grazú, V.; Alborés, S. Extracellular Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Fungi and Their Antibacterial Activity. *Nano Biomed. Eng.* **2018**, *10*, 156–164. [CrossRef]
8. Quinteros, M.A.; Cano Aristizábal, V.; Dalmasso, P.R.; Paraje, M.G.; Páez, P.L. Oxidative stress generation of silver nanoparticles in three bacterial genera and its relationship with the antimicrobial activity. *Toxicol. Vitr.* **2016**, *36*, 216–223. [CrossRef]
9. Neethu, S.; Midhun, S.J.; Radhakrishnan, E.K.; Jyothis, M. Surface functionalization of central venous catheter with mycofabricated silver nanoparticles and its antibiofilm activity on multidrug resistant Acinetobacter baumannii. *Microb. Pathog.* **2020**, *138*. [CrossRef]
10. Markowska, K.; Grudniak, A.M.; Wolska, K.I. Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. *Acta Biochim. Pol.* **2013**, *60*, 523–530. [CrossRef]
11. Koo, H.; Allan, R.N.; Howlin, R.P.; Stoodley, P.; Hall-Stoodley, L. Targeting microbial biofilms: Current and prospective therapeutic strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* **2017**, *15*, 740–755. [CrossRef] [PubMed]
12. Srivastava, S.; Bhargava, A. Biofilms and human health. *Biotechnol. Lett.* **2016**, *38*, 1–22. [CrossRef] [PubMed]
13. Le Ouay, B.; Stellacci, F. Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. *Nano Today* **2015**, *10*, 339–354. [CrossRef]
14. Liu, Y.; Shi, L.; Su, L.; van der Mei, H.C.; Jutte, P.C.; Ren, Y.; Busscher, H.J. Nanotechnology-based antimicrobials and delivery systems for biofilm-infection control. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 428–446. [CrossRef]
15. Luan, Y.; Liu, S.; Pihl, M.; van der Mei, H.C.; Liu, J.; Hizal, F.; Choi, C.-H.; Chen, H.; Ren, Y.; Busscher, H.J. Bacterial interactions with nanostructured surfaces. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2018**, *38*, 170–189. [CrossRef]
16. Durán, N.; Durán, M.; de Jesus, M.B.; Seabra, A.B.; Fávaro, W.J.; Nakazato, G. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2016**, *12*, 789–799. [CrossRef]
17. Rafique, M.; Sadaf, I.; Rafique, M.S.; Tahir, M.B. A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* **2017**, *45*, 1272–1291. [CrossRef]
18. Shaikh, S.; Nazam, N.; Rizvi, S.M.D.; Ahmad, K.; Baig, M.H.; Lee, E.J.; Choi, I. Mechanistic Insights into the Antimicrobial Actions of Metallic Nanoparticles and Their Implications for Multidrug Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2468. [CrossRef]
19. Nanda, S.S.; Yi, D.K.; Kim, K. Study of antibacterial mechanism of graphene oxide using Raman spectroscopy. *Sci. Rep.* **2016**, *6*. [CrossRef]

20. Xuan Nguyen, N.T.; Sarter, S.; Hai Nguyen, N.; Daniel, P. Detection of molecular changes induced by antibiotics in Escherichia coli using vibrational spectroscopy. Spectrochim. *Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2017**, *183*, 395–401. [CrossRef]
21. Quinteros, M.A.; Bonilla, J.O.; Alborés, S.V.; Villegas, L.B.; Páez, P.L. Biogenic nanoparticles: Synthesis, stability and biocompatibility mediated by proteins of Pseudomonas aeruginosa. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *184*. [CrossRef] [PubMed]
22. De Gelder, J.; De Gussem, K.; Vandenabeele, P.; Moens, L. Reference database of Raman spectra of biological molecules. *J. Raman Spectrosc.* **2007**, *38*, 1133–1147. [CrossRef]
23. Soto, K.M.; Quezada-Cervantes, C.T.; Hernández-Iturriaga, M.; Luna-Bárcenas, G.; Vazquez-Duhalt, R.; Mendoza, S. Fruit peels waste for the green synthesis of silver nanoparticles with antimicrobial activity against foodborne pathogens. *LWT* **2019**, *103*, 293–300. [CrossRef]
24. Singh, P.; Pandit, S.; Beshay, M.; Mokkapati, V.R.S.S.; Garnaes, J.; Olsson, M.E.; Sultan, A.; Mackevica, A.; Mateiu, R.V.; Lütken, H.; et al. Anti-biofilm effects of gold and silver nanoparticles synthesized by the Rhodiola rosea rhizome extracts. *Artif. CellsNanomed. Biotechnol.* **2018**, *46*, S886–S899. [CrossRef] [PubMed]
25. Carey, P.R.; Whitmer, G.R.; Yoon, M.J.; Lombardo, M.N.; Pusztai-Carey, M.; Heidari-Torkabadi, H.; Che, T. Measuring Drug-Induced Changes in Metabolite Populations of Live Bacteria: Real Time Analysis by Raman Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122*, 6377–6385. [CrossRef] [PubMed]
26. Sood, R. Improved yield of green synthesized crystalline silver nanoparticles with potential antioxidant activity. *Int. Res. J. Pharm.* **2017**, *8*, 5. [CrossRef]
27. Castillo, H.A.P.; Castellanos, L.N.M.; Chamorro, R.M.; Martínez, R.R.; Borunda, E.O. Nanoparticles as New Therapeutic Agents against Candida albicans. *Candida Albicans* **2018**. [CrossRef]
28. Kumar, J.S.; Umesha, S.; Prasad, K.S.; Niranjana, P. Detection of Quorum Sensing Molecules and Biofilm Formation in Ralstonia solanacearum. *Curr. Microbiol.* **2016**, *72*, 297–305. [CrossRef]
29. Paramelle, D.; Sadovoy, A.; Gorelik, S.; Free, P.; Hobley, J.; Fernig, D.G. A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. *Analyst* **2014**, *139*, 4855–4861. [CrossRef]
30. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard*, 10th ed.; CLSI: Wayne, PA, USA, 2015; p. 35.

Sample Availability: Samples of the PchNPs are available from the authors.

© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

frontiers in Bioengineering and Biotechnology

ORIGINAL RESEARCH
published: 26 April 2021
doi: 10.3389/fbioe.2021.644014

Biogenic Silver Nanoparticles as a Strategy in the Fight Against Multi-Resistant *Salmonella enterica* Isolated From Dairy Calves

María Belén Estevez[1,2], María Laura Casaux[3], Martín Fraga[3], Ricardo Faccio[4] and Silvana Alborés[1]**

[1] *Área de Microbiología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay,* [2] *Posgrado en Química, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay,* [3] *Plataforma de Investigación en Salud Animal, Estación Experimental INIA La Estanzuela, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Colonia, Uruguay,* [4] *Departamento de Experimentación y Teoría de la Estructura de la Materia y sus Aplicaciones (DETEMA), Facultad de Química, Centro NanoMat and Grupo Física, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay*

Infectious diseases are one of the most important health problems worldwide, one of the main causes being the development of multi-resistant microorganisms. Likewise, the zoonotic potential of some pathogens and their ability to transfer resistance mechanisms, reduce the therapeutic options in both humans and animals. *Salmonella enterica* is an important pathogen that affects a wide range of animal species and humans, being *Salmonella* Typhimurium one of the most frequent serotypes affecting cattle, causing enteritis, diarrhea, and septicemia. The search for alternative therapeutic approaches has gained importance since the emergence of multidrug resistance to antibiotics and periodic outbreaks of salmonellosis. In this sense, the discovery of new drugs and the development of new strategies, such as the use of nanoparticles with antimicrobial activity, are very promising. The aim of this work was the extracellular production of biogenic silver nanoparticles using fungal extracts and the evaluation of their antimicrobial activity against resistant and multi-resistant *Salmonella* Typhimurium strains. We here demonstrated the potential of the biogenic nanoparticles as effective bacteriostatic and bactericidal agents for use in biomedical applications. In addition, Confocal Raman Microscopy and Atomic Force Microscopy were used to advance the understanding of the antimicrobial mechanism of biogenic nanoparticles against these pathogenic strains, the results of which suggested that the nanoparticles produced damage in several bacterial cell structures.

Keywords: antimicrobial, biogenic nanoparticles, *Salmonella* Typhimurium, multi-resistance, Confocal Raman Microscopy

OPEN ACCESS

Edited by:
Maria Gabriela Paraje, National University of Córdoba, Argentina

Reviewed by:
Nanasaheb D. Thorat, University of Oxford, United Kingdom
Saji George, McGill University, Macdonald Campus, Canada

****Correspondence:***
Ricardo Faccio
rfaccio@fq.edu.uy
Silvana Alborés
salbores@fq.edu.uy

Specialty section:
This article was submitted to Nanobiotechnology, a section of the journal Frontiers in Bioengineering and Biotechnology

Received: *19 December 2020*
Accepted: *31 March 2021*
Published: *26 April 2021*

Citation:
Estevez MB, Casaux ML, Fraga M, Faccio R and Alborés S (2021) Biogenic Silver Nanoparticles as a Strategy in the Fight Against Multi-Resistant Salmonella enterica Isolated From Dairy Calves. Front. Bioeng. Biotechnol. 9:644014. doi: 10.3389/fbioe.2021.644014

INTRODUCTION

Salmonella enterica is a causal agent of foodborne diseases with a significant impact on public health, affecting both humans and a wide range of animal species. Foodborne diseases cause 33 million deaths a year, affecting 10% of the world's population. In particular, the pathogenic bacterium *Salmonella enterica* serovar Typhimurium represents a significant threat worldwide, both for food safety and for public health, due to the emergence of multidrug-resistant strains (Wang et al., 2019).

Although more than 2,500 serotypes of *Salmonella* spp. have been reported, only a few affect livestock. In this species, *Salmonella* Typhimurium is one of the most frequent serotypes and etiological agent of enteritis, diarrhea and septicemia (Casaux et al., 2019). In calves, salmonellosis is treated with antibiotics, recommending ß-lactams and sulfonamides in cases of septicemia. Quinolones are used as an alternative treatment when resistance to these antibiotics is confirmed or suspected (Wang et al., 2019). However, the emergence of resistance to quinolones has also been documented (Pribul et al., 2017). In addition, the indiscriminate use of antibiotics, even as food additives for animals, has promoted the appearance and selection of resistant and multi-resistant microorganisms, affecting the efficacy of antibiotic therapy in both humans and animals (Tang et al., 2017). Multi-drug resistance is an emerging problem throughout the world. The misuse of antibiotics is one of the factors responsible for multi-drug resistance in several pathogenic bacteria, such as *Salmonella* Typhimurium (Wang et al., 2019). In South America, this serotype has been isolated from foodborne cases and resistance to beta-lactams has been reported (Cordeiro et al., 2013). In Uruguay, it was shown that *Salmonella* Typhimurium was the most frequent serotype isolated from samples obtained from calves in commercial dairy farms (Casaux et al., 2019). This report included fecal samples from diarrheal calves and organ samples from calves that had succumbed to salmonellosis. This serotype presented the highest resistance patterns and has also been reported in humans, highlighting its zoonotic potential (Casaux et al., 2019).

The appearance of multi-resistance to antibiotics and the periodic outbreaks of salmonellosis are promoting an intense search for new alternative therapeutic developments against pathogenic bacteria. In particular, an important part of this effort is focused on discovering new antimicrobial drugs and new potential alternative strategies to control animal and human diseases (Schäberle and Hack, 2014), such as the use of nanotechnology.

It has been reported that the development of antimicrobials in nanoparticle systems allows to increase the therapeutic effect and overcome side effects, therefore they are considered excellent alternative delivery systems for the treatment of microbial diseases (Youssef et al., 2019). Thus, in recent years the application of nanoparticles for the microbial control has expanded considerably in the area of human and animal health. Different nanoparticles have been effective for the treatment of infectious diseases against antibiotic-resistant bacteria, both in vitro studies and in animal models (Hajipour et al., 2012; Shanthi et al., 2016; George et al., 2019; Thorat et al., 2021). In the area of infection control of veterinary medicine, nanotechnology has a promising role in the prevention or treatment of infections (Youssef et al., 2019).

The mechanisms of antimicrobial action of nanoparticles depend on several factors, including the type of microorganism and the physicochemical characteristics of the nanoparticles (Hajipour et al., 2012). The small size is an important property that influences the nanoparticles uptake and their antimicrobial effect. In particular, the potential application of silver nanoparticles in the treatment of microbial diseases has been reported (Otari et al., 2016). Some silver nanoparticles synthesized by fungi, such as those previously synthesized by our group, presented broad antimicrobial activity against bacteria (Gram negative and Gram positive) and fungi (Rodrigues et al., 2013; Sanguiñedo et al., 2018).

The objective of this work was the extracellular production of biogenic silver nanoparticles using fungal extracts and the evaluation of the antimicrobial activity against resistant and multi-resistant strains of *Salmonella* Typhimurium. In addition, the morphological changes produced in bacterial cells after treatment with nanoparticles and in the phenotypic profile (changes in cellular components) were studied through Atomic Force Microscopy and Raman Confocal Microscopy, as an approach to advance in the knowledge of the antimicrobial mechanism of the biogenic nanoparticles against multi-resistant bacteria.

MATERIALS AND METHODS

Biological Material

For the synthesis of nanoparticles (NPs) the strain of the fungus *Phanerochaete chrysosporium* CCMG 12G from the Cátedra de Microbiología General Collection CCMG, Facultad de Química, Montevideo, Uruguay was used. Previous studies carried out by the group showed the production of stable and high-yield NPs using this strain (Sanguiñedo et al., 2018).

The *Salmonella* Tiphymurium strains used in the evaluation of antimicrobial activity were previously isolated from calves with diarrhea, septicemia and mortality in Uruguay and characterized for their antibiotic-resistance profile (**Table 1**; Casaux et al., 2019).

Biological Synthesis of NPs

Cultures were performed by inoculating two plugs of 0.9 cm in diameter of mycelium (grown in Potato Dextrose Agar medium, BD Difco) in flasks with 100 mL of Potato Dextrose Broth liquid medium (BD Difco). Fermentation was carried out at 28 °C with agitation on an orbital shaker operating at 150 rpm for 72 h. The fungal mycelium from cultures was filtered and then washed extensively with sterilized distilled water to remove any remaining media components.

The NPs biosynthesis assay was performed as previously described (Sanguiñedo et al., 2018). Incubation of wet mycelium in sterile distilled water (0.1 g / mL) was carried out with agitation on an orbital shaker (150 rpm). Then, the cell-free filtrate was collected by filtration through membrane filter with

TABLE 1 | Antibiotic-resistance profile of *Salmonella* Typhimurium strains.

Strain	Resistance	Intermediate susceptibility
16-025M4	Cefotaxime, streptomycin, tetracycline	–
16-045M5	Ciprofloxacin, enrofloxacin, streptomycin, tetracycline	–
16-058M4	Ampicillin, amoxicillin- clavulanic acid, trimethoprim-sulfamethoxazole streptomycin, tetracycline	–
16-078M4	Amoxicillin- clavulanic acid, streptomycin, tetracycline	Ampicillin
17-032M21A	Enrofloxacin, gentamicin, streptomycin, tetracycline	Ciprofloxacin
17081M3A	Ampicillin, nalidixic acid, ciprofloxacin, streptomycin, tetracycline	Clavulanic acid
17-197M1	Nalidixic acid, streptomycin, tetracycline	Gentamicin, nitrofurantoin, ciprofloxacin
17-210M7B	Cefotaxime, streptomycin, gentamicin, tetracycline, azithromycin	Trimethoprim-sulfamethoxazole, ciprofloxacin
19-027M2A	Ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, clavulanic acid, streptomycin, tetracycline, azithromycin	Amoxicillin- clavulanic acid, ciprofloxacin
16-073M11	Tetracycline	–

0.45 μm pore size and 50 mL of a 5 mM $AgNO_3$ solution were added to 50 ml of filtered solution. After incubation in dark the absorbance spectrum was measured in the range of 250–800 nm and the maximum peak was determined until no increase in the maximum absorption peak of silver nanoparticles was detected. The remaining cell-free filtrate was used as control.

Purification of NPs

The synthesized NPs were centrifuged, washed and resuspended in sterile distilled water. Then, the absorption spectroscopy was performed. The absorbance band corresponding to the purified NPs was measured and their concentration was estimated as described by Paramelle et al. (2014).

Characterization of NPs

Transmission Electron Microscopy (TEM)

An aliquot of NPs was placed onto a copper grid coated with a carbon film and dried for several hours at room temperature. TEM analysis was carried out in a TECNAI T20 electron microscope (FEI) working at 200 kV. Several micrographs using an automatic image analyzer (Image J Software) were analyzed to determine the average size of the NPs.

Confocal Raman Microscopy

For analysis by Confocal Raman Microscopy an aliquot of NPs was deposited on an aluminum support and dried at room temperature. An Alpha 300 RA WITec Raman Microscope using a 532 nm excitation laser focused through a 100 X objective was used for measurements.

Dynamic Light Scattering (DLS) and ζ Potential

The hydrodynamic diameter by Dynamic Light Scattering (DLS) and the measurement of the ζ potential of the NPs were determined using a Zetasizer from Malvern Instruments. The samples were prepared in Milli-Q water at pH 6. For the determination of DLS, each sample was measured 10 times, combining 5 runs per measurement, at 25°C. In the case of potential ζ, each sample was measured 3 times, combining 10 runs per measurement, at 25°C. Malvern's Zetasizer software was used for processing the results.

Antimicrobial Activity

Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

Both MIC and MBC were determined by standardized methods, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015). The initial solutions of the NPs were prepared in sterilized distilled water. MIC of the nanoparticles was determined by the broth microdilution method in a 96-well plate (300 μL capacity, sterilized, MicroWell, NUNC, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA), against *Salmonella* Typhimurium strains (**Table 1**). The MIC was determined as the lowest concentration of NPs that inhibited the visible bacterial growth after 24 h of incubation. Then, the broths used for MIC determination were subcultured onto fresh agar plates. After incubation, the number of viable cells was estimated by determining the number of colony-forming units (cfu). Based on this, the MBC was determined as the concentration of antimicrobial agent that causes the death of 99.9% of the initial inoculum, as previously reported (Díaz-García et al., 2020).

Confocal Raman Microscopy

The comparison of the phenotypic profiles of bacterial cells before and after treatment with NPs were performed using

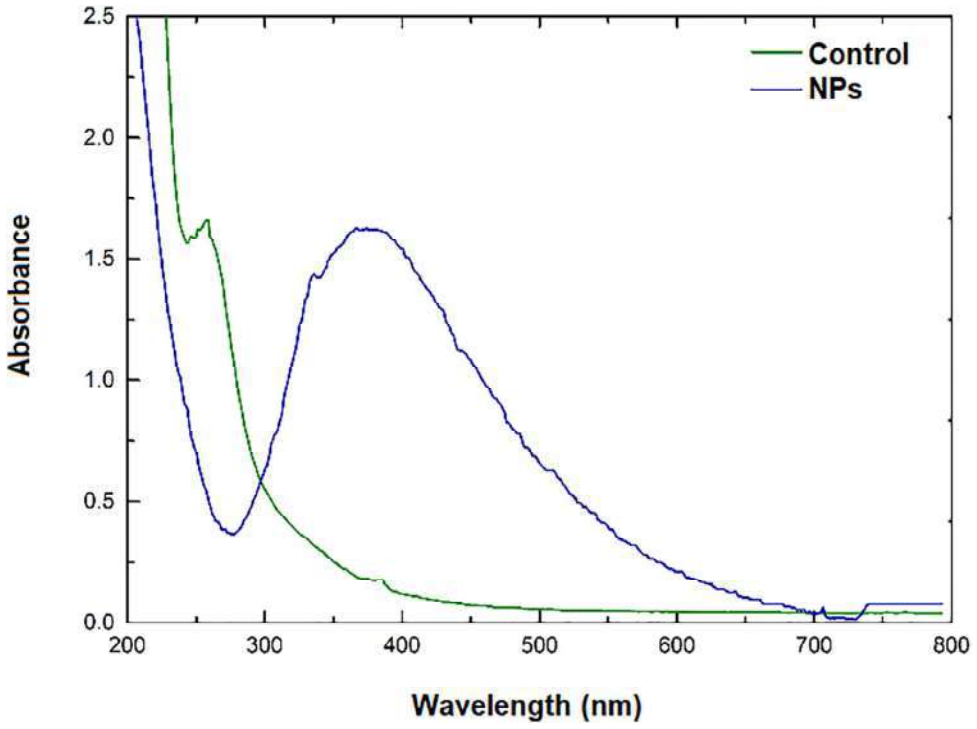


FIGURE 1 | UV-Vis absorption spectrum after 24 h reaction.

Confocal Raman Microscopy, according to the methodology previously reported for antibiotics by Athamneh et al. (2014). The bacterial cell suspensions were deposited on an aluminum support, dried at room temperature, and then measured using a 532 nm laser focused through a 100 X objective. The data processing and statistical analysis were performed, using a script of the research group, by principal component analysis (PCA) (Estevez et al., 2019). The phenotypic profiles (Raman spectra) of the bacterial cells treated with the NPs were compared to those of the untreated cells (control).

Atomic Force Microscopy

Bacterial Cells without treatment (control) and treated with NPs were observed by Atomic Force Microscopy (AFM), based on Borowik et al. (2018). Samples were analyzed using a WITec Alpha 300-RA AFM Microscope (WITec GmbH, Ulm, Germany), in the AC (tapping) mode. AFM measurements were obtained by placing a droplet of the bacterial suspensions on a silicon wafer substrate, dried at room temperature. AFM sensors had a force constant of $k = 42$ N/m, nominal resonance frequency of 285 kHz, mean width 45 μm, length 160 μm and thickness of 4.6 μm.

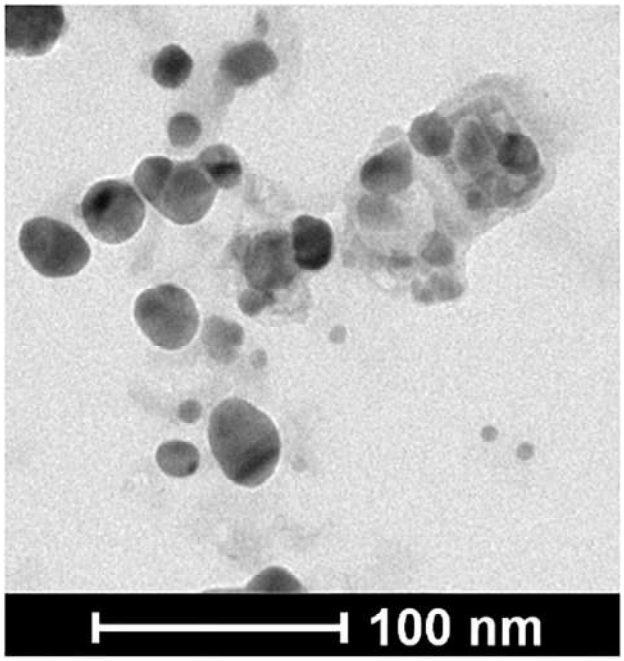


FIGURE 2 | TEM image of the NPs.

RESULTS

Biological Synthesis of NPs

After *Phanerochaete chrysosporium* biomass was harvested, incubated in water, and filtered, the cell-free filtrate was added to a silver nitrate solution and the mixture was incubated in dark. The synthesis of the silver NPs was monitored through changes in the absorbance spectra over time in the range of

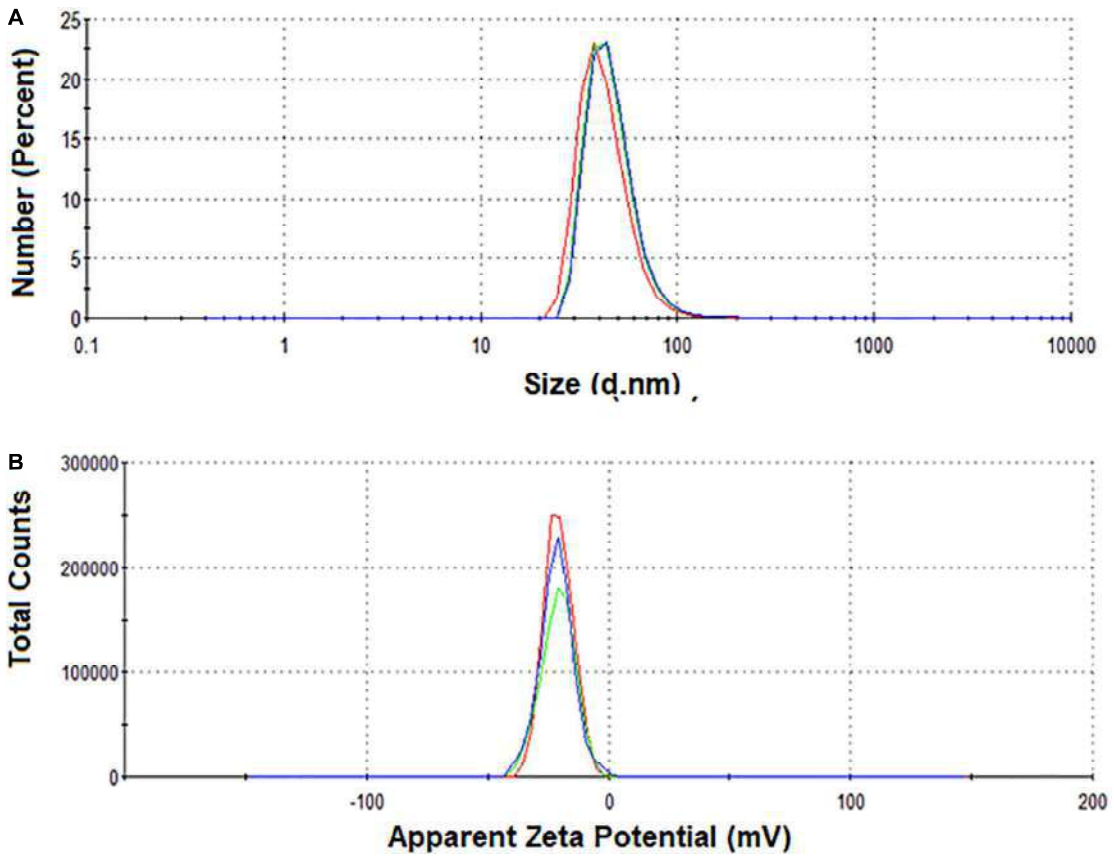


FIGURE 3 | (A) DLS and **(B)** ζ-potential measurements of NPs in solution.

250–800 nm, as well as color change in the reaction mixture. The appearance of an absorption band (maximum peak) at 400 nm corresponding to the surface plasmon resonance (SPR) and visible color change were indicative of the formation of NPs (**Figure 1**).

After a 24 h period the reaction mixture was centrifuged and the pellet containing NPs was washed with and resuspended in water. The UV-vis spectra after centrifugation showed an absorption band at 400 nm, corresponding to the SPR band of the purified NPs.

Characterization of NPs

Transmission Electron Microscopy (TEM)

The TEM characterization showed that the NPs were spherical and the image analysis using the Image J program resulted in an average size of NPs of 22 ± 6 nm (**Figure 2**).

Dynamic Light Scattering (DLS) and ζ Potential

Size characterization of NPs by DLS showed a single population with a hydrodynamic diameter of 47.64 ± 17.42, PDI 0.264, showing a slightly polydisperse distribution (<0.4), consistent with previously reported by Sanguiñedo et al. (2018).

Measurements of ζ-potential showed that NPs had a high net negative surface charge, −20.7 ± 5.89 mV (**Figure 3**).

Antimicrobial Activity

Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

Table 2 shows the MIC values obtained for the NPs and the $AgNO_3$ solution against the different strains of *Salmonella* Typhimurium. Although the strains were sensitive to the $AgNO_3$ solution (39–78 μM), the MIC values obtained for the NPs were much lower (8–16 picomolar, pM). This difference is even greater when comparing the MBC values of the nanoparticles and the silver nitrate solution. The MBC values of the $AgNO_3$ solution were greater than or equal to 830 μM, compared to the MBC values (16 pM) of the NPs.

NPs-Bacterial Interactions

The strains with the highest antimicrobial activity (the lowest MIC and MBC) were used for the Confocal Raman Microscopy studies (strains 16-045M5, 16-058M4, and 17-197M1). Raman band profiles previously reported for *Salmonella* spp. were compared to those obtained for the three strains. The presence of 11 coincident bands was observed. These bands were assigned to the corresponding biological molecules, as previously reported by other authors (Assaf et al., 2014; Witkowska et al., 2017; **Table 3**). Phenotypic changes in *Salmonella* Typhimurium cells treated with NPs were analyzed. Differences in Raman spectra due to phenotypic changes of cells treated with NPs versus

TABLE 2 | Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentration of NPs and $AgNO_3$ solution against *Salmonella* Typhimurium strains.

STRAIN	MIC NPs	MBC NPs	MIC $AgNO_3$	MBC $AgNO_3$
16-025M4	7.8 pM (0.3 ppm)	>15.6 pM	39 μM	>830 μM
16-045M5	7.8 pM (0.3 ppm)	15.6 pM (0.6 ppm)	39 μM	830 μM
16-058M4	15.6 pM (0.6 ppm)	15.6 pM (0.6 ppm)	39 μM	830 μM
16-078M4	7.8 pM (0.3 ppm)	>15.6 pM	39 μM	830 μM
17-032M21A	15.6 pM (0.6 ppm)	>15.6 pM	78 μM	>1,250 μM
17081M3A	15.6 pM (0.6 ppm)	>15.6 pM	78 μM	1,250 μM
17-197M1	15.6 pM (0.6 ppm)	15.6 pM (0.6 ppm)	39 μM	1,250 μM
17-210M7B	15.6 pM (0.6 ppm)	>15.6 pM	39μM	>830 μM
19-027M2A	15.6 pM (0.6 ppm)	>15.6 pM	78 μM	1,250 μM
16-073M11	15.6 pM (0.6 ppm)	>15.6 pM	78 μM	>1,250 μM

TABLE 3 | Raman band assignment of bacterial cells (control).

RAMAN SHIFT (cm^{-1})			ASSIGNMENT
16-045M5	16-058M4	17-197M1	
557	556	545	Carbohydrates
709	745	713	DNA, RNA
757	761	796	DNA, RNA
800	810	807	RNA
935	970	934	Lipids
1,098	1,079	1,092	Carbohydrates
1,234	1,248	1,243	RNA
1,350	1,353	1,354	Proteins
1,444	1,448	1,462	Lipids
1,554	1,512	1,510	Proteins
1,594	1,575	1,579	DNA, RNA

The band assignment was made based on previously published spectral data for strains of Salmonella spp. (Assaf et al., 2014; Witkowska et al., 2017).

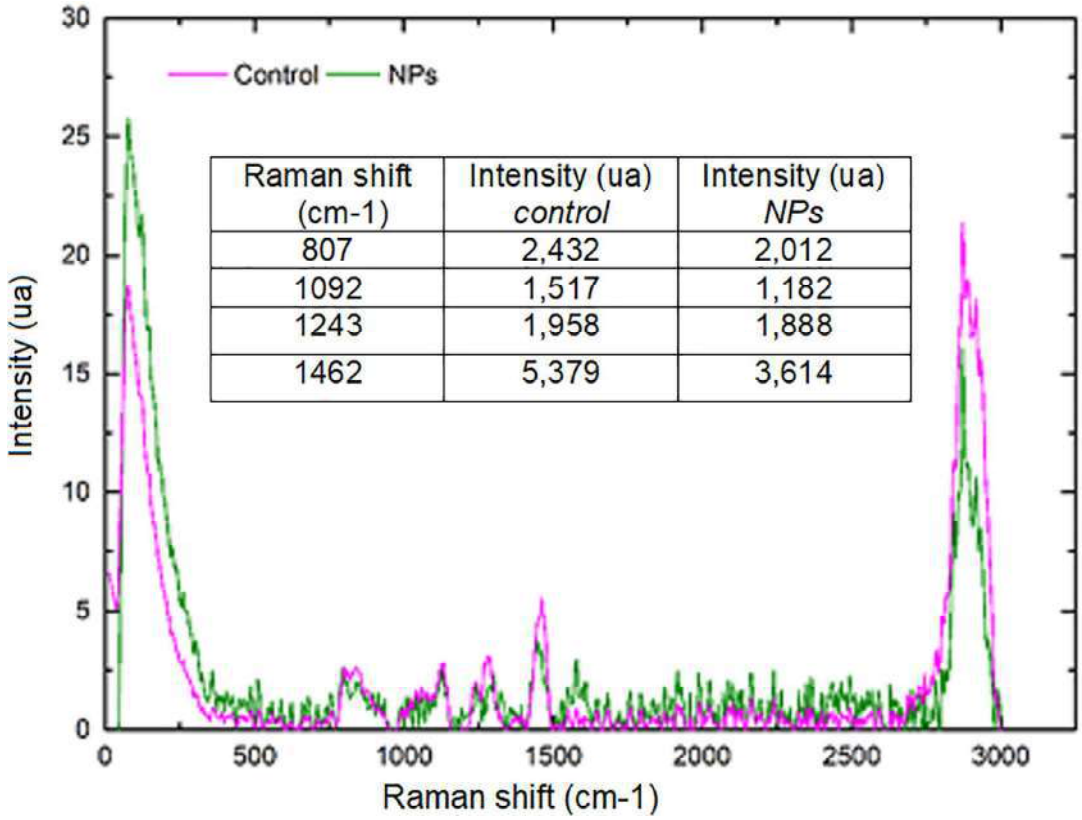
untreated cells were determined (**Figure 4**), mainly based in the change of the intensity of the Raman bands. The data processing and statistical analysis were performed by principal component analysis (PCA). In all cases, it was observed that the interaction of NPs with *Salmonella* Typhimurium cells generates changes in the bands (particularly in their intensities), which were previously assigned to proteins, lipids, carbohydrates and nucleic acids. In addition, in order to offer a complementary study based on Raman, hyperspectral images were obtained with the purpose of visualizing the main characteristics of the interaction between the bacteria and NPs (**Figure 5**). For that reason we selected one characteristic Raman band from the bacterial cells and one from the NPs, these correspond to the C-H stretching and Ag-N stretching modes, respectively. Then we obtained an image in which the intensity of the C-H and Ag-N bands are integrated (total number of counts), then showing the more representative regions (topography) of the bacterial cells (in pink, **Figures 5a,b**) and NPs (in green, **Figure 5b**). Thus, we are providing a chemical image based in the chemical signature of both bacterial cells and NPs. Additionally, the Atomic Force Microscopy images indicate changes to cell morphology and loss of integrity of the cell envelope and of cytoplasmic content after exposure to the NPs (indicated by arrows) (**Figure 6**).

DISCUSSION

The silver nanoparticles synthesized with *Phanerochaete chrysosporium* extracts were stable after their purification by centrifugation, as previously reported by our group (Sanguiñedo et al., 2018).

The size of the NPs was determined by Transmission Electron Microscopy (TEM) and Dynamic Light Scattering (DLS). The average size of the NPs by Transmission Electron Microscopy (TEM) was 22 ± 6 nm. In addition, the characterization by DLS showed a larger average size (47.64 ± 17.42 nm), which is expected since the DLS measures the hydrodynamic diameter of the particles. Dispersity Parameter (PDI) showed a moderate polydisperse distribution (<0.4) from DLS results, consistent with that previously reported (Sanguiñedo et al., 2018). ζ-potential measurements demonstrate the colloidal stability of the NPs since they had a high net negative surface charge. The electrostatic repulsive forces between surface charges of NPs play an important role in the stability. Nanoparticle suspensions that show net potential close to zero, thus close to neutrality, probably add, losing their properties as nanomaterials due to the possibility of precipitation or aggregation (Joseph and Singhvi, 2019). Furthermore, the NPs used here were stable for at least 6 months at 4°C. The surface functional groups, capping of the silver nanoparticles, were characterized by Confocal Raman Microscopy. As previously reported, the presence of the band positioned at 230 cm^{-1} and Raman bands positioned at the fingerprint region can be attributed to the Ag-N stretching mode and to the presence of amino acids, respectively, suggesting that proteins from the fungal extract are part of the capping (Estevez et al., 2020).

The application of biogenic NPs as antimicrobial agents against resistant and multi-resistant *Salmonella* Typhimurium strains previously isolated from calves with diarrhea, septicaemia, and mortality was evaluated. The *in vitro* antimicrobial activity assays showed interesting results. In the MIC determination test, in addition to the strains under study, a reference strain *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 was used. However, no growth inhibition of this strain was observed at the concentrations evaluated. Therefore, we did not include it in subsequent trials where our objective was to evaluate the strains where growth inhibition was observed at these low



Raman shift (cm-1)	Intensity (ua) *control*	Intensity (ua) *NPs*
807	2,432	2,012
1092	1,517	1,182
1243	1,958	1,888
1462	5,379	3,614

FIGURE 4 | Comparison of average Raman spectra corresponding to *Salmonella* Typhimurium 17–197 M1 cells without treatment (pink) and treated with NPs (green). The intensity (in arbitrary units, AU) was normalized with respect to the signal intensity of the C-H band (2,900 cm^{-1} region). The decrease in the bands corresponding to RNA, carbohydrates and lipids after NPs treatment is shown.

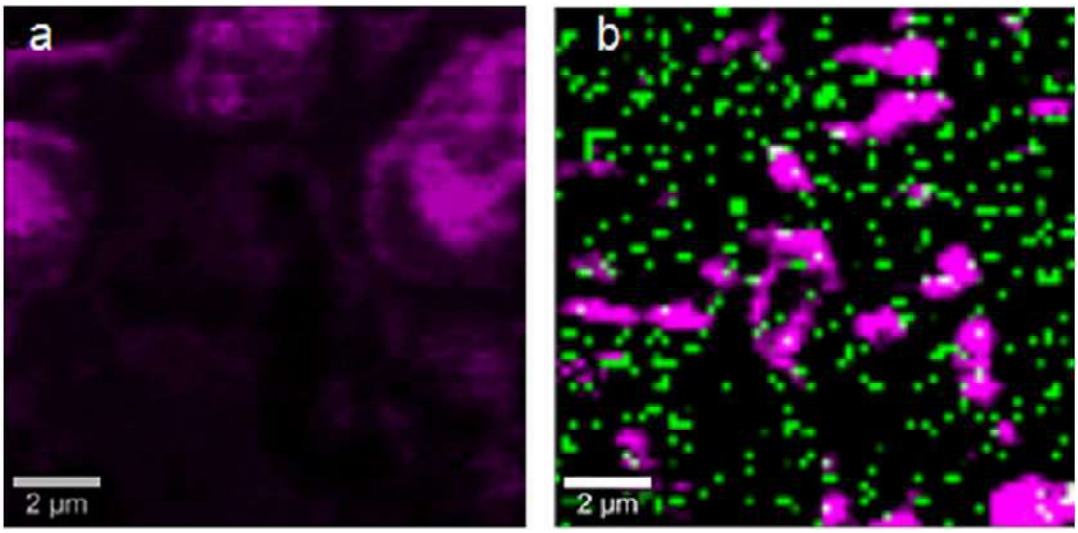


FIGURE 5 | Confocal Raman images obtained by selecting the stretching C-H bands from the bacterial cells (pink) and the stretching Ag-N bands from the NPs (green). **(a)** Untreated cells. **(b)** NPs treated cells.

concentrations. Perhaps this strain was sensitive to higher concentrations or it could have some particular resistance mechanism, as reported in other studies carried out with *Salmonella* spp. (Losasso et al., 2014). Results of antimicrobial activity against resistant *Salmonella* Typhimurium bacteria showed MIC and MBC values lower than silver nitrate solution.

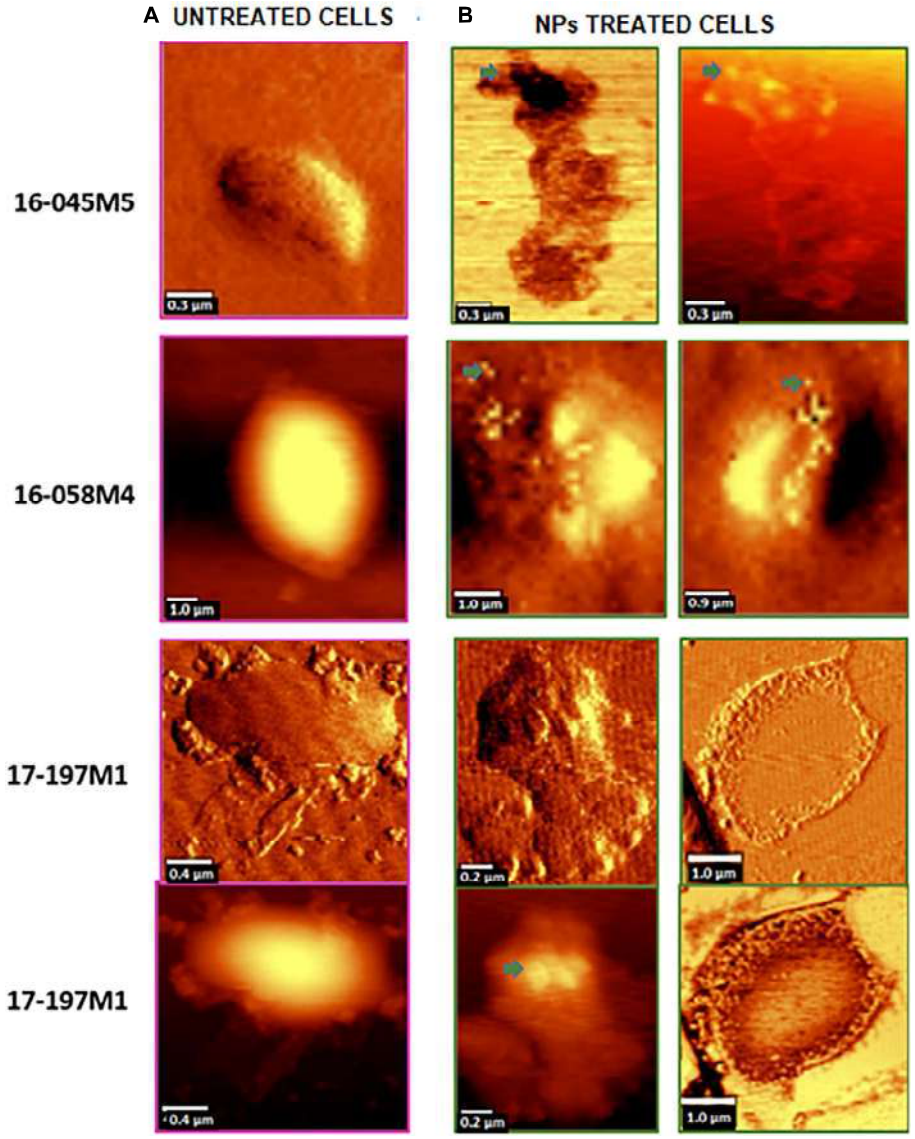


FIGURE 6 | Topographic and phase contrast AFM images of changes in the cell morphology after exposure of *Salmonella* Typhimurium to NPs (indicated by arrows). **(A)** Untreated cells (control). **(B)** NPs treated cells.

Although the resistance of *Salmonella* Typhimurium to silver ions has been reported (Randall et al., 2015), the properties of the biogenic silver NPs evaluated here would provide new antimicrobial advantages. Antibacterial activity of silver ions has been recognized since ancient times and although the antimicrobial action mechanism of silver ions is known, in the case of nanoparticles these mechanisms depend on the characteristics of the nanoparticles (Hamad et al., 2020). The intrinsic properties of metal nanostructures depend on their size, shape, composition, crystallite which is strongly correlated to their synthesis conditions (Hamad et al., 2020). In addition to the properties of the nanometric scale, that can confer higher penetration and larger surface area, capping agent of biogenic nanoparticles used here could provide stability and new antimicrobial properties. Although all strains are resistant to at least one antibiotic, all were sensitive to biogenic silver NPs. These results are particularly promising for the application of nanoparticles as an alternative treatment for fluoroquinolone resistant strains. Despite the use of fluoroquinolones was recommended for *Salmonella* Typhimurium in a recent work carried out with more than 11,000 strains (Wang et al., 2019), it would not be effective for the treatment of some strains isolated in Uruguay (Casaux et al., 2019). Furthermore, the nanoparticles showed high bactericidal activity (MBC 16 pM) against three multi-resistant *Salmonella* Typhimurium strains. Then, these strains were used for Confocal Raman Microscopy and Atomic Force Microscopy studies.

Raman spectroscopy is a powerful vibrational spectroscopic tool that can provide information on complex systems such as microbial cultures, through the determination of molecular

fingerprints on various chemical and biochemical components in that systems. Compared to other methods that do not require culture such as the use of fluorescent or magnetic probes, Confocal Raman Microscopy has the unique potential of being a technique for phenotypic identification that does not require any particular treatment of cells (Ho et al., 2019). In this work, the previously reported Raman band profiles for *Salmonella* spp. were compared to those obtained for the three multi-resistant strains, showing 11 coincident bands, which were assigned to the corresponding biological molecules.

Moreover, Confocal Raman images of treated cells showed the colocalization of the NPs and the bacterial cell, by combination of stretching Ag-N bands assigned to the NPs and C-H stretching bands assigned to the bacterial cells. This imaging technique combined with principal component analysis showed that there are significant changes in the phenotypic profile of the NPs treated cells compared to the untreated cells (control). These results suggest that NPs cause changes in cellular composition, in carbohydrates, lipids, proteins and nucleic acids. These changes in the profile of the Raman spectra in *Salmonella* Typhimurium strains could be associated with damage at the protein, lipid and nucleic acid level produced by the generation of reactive oxygen species (ROS) and intermediate nitrogen species (RNI), since they are extremely toxic, and may be responsible for the death of bacterial cells (Durán et al., 2016). These results were complemented by Atomic Force Microscopy. AFM images showed changes in the cell morphology, loss of integrity of the cell envelope and of cytoplasmic content. Similar results using electron microscopy (TEM and ESEM) were recently reported for Gram negative bacterial cells (*E. coli*), after exposure to biogenic silver nanoparticles (Estevez et al., 2020). The properties of silver nanoparticles are strongly influenced by their size, distribution, morphological shape, and surface properties which can be modified by diverse synthetic methods, reducing agents and stabilizers. In spite of several hypotheses available, the antibacterial mechanisms of silver nanoparticles so far have not been established clearly (Lee and Jun, 2019). Some proposed cytotoxic mechanisms can be: adhesion of silver nanoparticles onto the membrane surface of microbial cells, modifying the lipid bilayer or increasing the membrane permeability; intracellular penetration of silver nanoparticles; nanoparticles-induced cellular toxicity triggered by the generation of reactive oxygen species (ROS) and free radicals, damaging the intracellular micro-organelles (i.e., mitochondria, ribosomes, and vacuoles) and biomolecules including DNA, protein, and lipids; modulation of intracellular signal transduction pathways toward apoptosis (Lee and Jun, 2019). According to our results in this work we think there would be more than one of the previously proposed mechanisms involved since we observe several morphological and structural changes in bacteria and that nanoparticles not only inhibit microbial growth but also kill them. With these promising results it would be interesting in future studies to deepen these mechanisms of action.

In conclusion, the results obtained in this work show the promising application of biogenic silver nanoparticles as a potential alternative treatment to fight against multi-resistant bacteria, relevant to human and animal health.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ME: methodology. MC: performing most of the experiments, selecting resistant *Salmonella* Typhimurium strains, and performing bacterial cultures. SA: writing—original draft preparation, supervision, and project administration. RF, MF, and ME: writing—review and editing. RF: supervising most of the experiments, supervising the nanoparticles characterization and Raman Confocal, and Atomic Force Microscopy studies. MF: supervising the selection and culture of the *Salmonella* strains. SA and RF: funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

FUNDING

This work was supported by the Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Espacio Interdisciplinario (EI) y Comisión Académica de Posgrado (CAP) (Universidad de la República, Uruguay), Program for the Development of Basic Sciences (PEDECIBA-Química), and Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII)—Uruguay.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge use of the Advanced Microscopy Laboratory at The University of Zaragoza.

REFERENCES

Assaf, A., Cordella, C. B., and Thouand, G. (2014). Raman spectroscopy applied to the horizontal methods ISO 6579: 2002 to identify *Salmonella* spp. in the food industry. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 4899–4910.

Athamneh, A. I. M., Alajlouni, R. A., Wallace, R. S., Seleem, M. N., and Sengera, R. S. (2014). Phenotypic profiling of antibiotic response signatures in *Escherichia coli* using raman spectroscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 1302–1314. doi: 10.1128/aac.02098-13

Borowik, A., Prylutskyy, Y., Kawelski, Ł, Kyzyma, O., Bulavin, L., Ivankov, O., et al. (2018). Does C60 fullerene act as a transporter of small aromatic molecules? *Colloids Surf. B Biointerfaces* 164, 134–143. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.01.026

Casaux, M. L., Caffarena, R. D., Schild, C. O., Giannitti, F., Riet-Correa, F., and Fraga, M. (2019). Antibiotic-resistance in *Salmonella enterica* isolated from dairy calves in Uruguay. *Braz. J. Microbiol.* 50, 1139–1144. doi: 10.1007/s42770-019-00151-w

CLSI (2015). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard*, 10th Edn, Vol. 35. Wayne, PA: CLSI.

Cordeiro, N. F., Yim, L., Betancor, L., Cejas, D., García-Fulgueiras, V., Mota, M. I., et al. (2013). Identification of the first bla(CMY-2) gene in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates obtained from cases of paediatric diarrhoea illness detected in South America. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 1, 143–148. doi: 10.1016/j.jgar.2013.04.003

Díaz-García, D., Ardiles, P. R., Díaz-Sánchez, M., Mena-Palomo, I., del Hierro, I., Prashar, S., et al. (2020). Copper-functionalized nanostructured silica-based systems: study of the antimicrobial applications and ROS generation against gram positive and gram negative bacteria. *J. Inorg. Biochem.* 203:110912. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2019.110912

Durán, N., Durán, M., de Jesus, M. B., Seabra, A. B., Fávaro, W. J., and Nakazato, G. (2016). Silver nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine* 12, 789–799. doi: 10.1016/j.nano.2015.11.016

Estevez, M. B., Mitchell, S. G., Faccio, R., and Alborés, S. (2019). Biogenic silver nanoparticles: understanding the antimicrobial mechanism using Confocal Raman Microscopy. *Mater. Res. Express* 6:1250f1255. doi: 10.1088/2053-1591/ab6636

Estevez, M. B., Raffaelli, S., Mitchell, S. G., Faccio, R., and Alborés, S. (2020). Biofilm eradication using biogenic silver nanoparticles. *Molecules* 25:2023. doi: 10.3390/molecules25092023

George, S., Tay, I., Phue, W. H., Gardner, H., and Sukumaran, B. (2019). Enhancing the bioavailability of silver through nanotechnology approaches could overcome efflux pump mediated silver resistance in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed. Nanotechnol.* 15, 2216–2228. doi: 10.1166/jbn.2019.2858

Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Akbar Ashkarran, A., Jimenez de Aberasturi, D., Larramendi, I.R.d, Rojo, T., et al. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol.* 30, 499–511. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.06.004

Hamad, A., Khashan, K. S., and Hadi, A. (2020). Silver nanoparticles and silver ions as potential antibacterial agents. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* 30, 4811–4828. doi: 10.1007/s10904-020-01744-x

Ho, C.-S., Jean, N., Hogan, C. A., Blackmon, L., Jeffrey, S. S., Holodniy, M., et al. (2019). Rapid identification of pathogenic bacteria using Raman spectroscopy and deep learning. *Nat. Commun.* 10:4927.

Joseph, E., and Singhvi, G. (2019). "Chapter 4–Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: a potential nanocarrier," in *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy*, ed. A. M. Grumezescu (Norwich, NY: William Andrew Publishing), 91–116. doi: 10.1016/b978-0-12-816505-8.00007-2

Lee, S. H., and Jun, B.-H. (2019). Silver nanoparticles: synthesis and application for nanomedicine. *Int. J. Mol. Sci.* 20:865. doi: 10.3390/ijms20040865

Losasso, C., Belluco, S., Cibin, V., Zavagnin, P., Mičetić, I., Gallocchio, F., et al. (2014). Antibacterial activity of silver nanoparticles: sensitivity of different *Salmonella* serovars. *Front. Microbiol.* 5:227. doi: 10.3389/fmicb.2014.00227

Otari, S. V., Yadav, H. M., Thorat, N. D., Patil, R. M., Lee, J. K., and Pawar, S. H. (2016). Facile one pot synthesis of core shell Ag@SiO2 nanoparticles for catalytic and antimicrobial activity. *Mater. Lett.* 167, 179–182. doi: 10.1016/j.matlet.2015.12.134

Paramelle, D., Sadovoy, A., Gorelik, S., Free, P., Hobley, J., and Fernig, D. G. (2014). A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. *Analyst* 139, 4855–4861. doi: 10.1039/c4an00978a

Pribul, B. R., Festivo, M. L., Rodrigues, M. S., Costa, R. G., Rodrigues, E.C.d.P, de Souza, M., et al. (2017). Characteristics of quinolone resistance in *Salmonella* spp. isolates from the food chain in Brazil. *Front. Microbiol.* 8:299. doi: 10.3389/fmicb.2017.00299

Randall, C. P., Gupta, A., Jackson, N., Busse, D., and O'Neill, A. J. (2015). Silver resistance in Gram-negative bacteria: a dissection of endogenous and exogenous mechanisms. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 1037–1046. doi: 10.1093/jac/dku523

Rodrigues, A. G., Ping, L. Y., Marcato, P. D., Alves, O. L., Silva, M. C. P., Ruiz, R. C., et al. (2013). Biogenic antimicrobial silver nanoparticles produced by fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 775–782. doi: 10.1007/s00253-012-4209-7

Sanguiñedo, P., Fratila, R. M., Estevez, M. B., Martínez de la Fuente, J., Grazú, V., and Alborés, S. (2018). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using fungi and their antibacterial activity. *Nano Biomed. Eng.* 10, 156–164. doi: 10.5101/nbe.v10i2.p156-164

Schäberle, T. F., and Hack, I. M. (2014). Overcoming the current deadlock in antibiotic research. *Trends Microbiol.* 22, 165–167. doi: 10.1016/j.tim.2013.12.007

Shanthi, S., David Jayaseelan, B., Velusamy, P., Vijayakumar, S., Chih, C. T., and Vaseeharan, B. (2016). Biosynthesis of silver nanoparticles using a probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 and their antibiofilm activity and toxicity effects in *Ceriodaphnia cornuta*. *Microb. Pathog.* 93, 70–77. doi: 10.1016/j.micpath.2016.01.014

Tang, K. L., Caffrey, N. P., Nóbrega, D. B., Cork, S. C., Ronksley, P. E., Barkema, H. W., et al. (2017). Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic-resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Planet. Health* 1, e316–e327.

Thorat, N. D., Dworniczek, E., Brennan, G., Chodaczek, G., Mouras, R., Gascón Pérez, V., et al. (2021). Photo-responsive functional gold nanocapsules for inactivation of community-acquired, highly virulent, multidrug-resistant MRSA. *J. Mater. Chem. B* 9, 846–856. doi: 10.1039/D0TB02047H

Wang, X., Biswas, S., Paudyal, N., Pan, H., Li, X., Fang, W., et al. (2019). Antibiotic-resistance in *Salmonella* Typhimurium isolates recovered from the food chain through national antimicrobial resistance monitoring system between 1996 and 2016. *Front. Microbiol.* 10:985. doi: 10.3389/fmicb.2019.00985

Witkowska, E., Korsak, D., Kowalska, A., Księżopolska-Gocalska, M., Niedziˇłka-Jönsson, J., Roźniecka, E., et al. (2017). Surface-enhanced Raman spectroscopy introduced into the international standard organization (ISO) regulations as an alternative method for detection and identification of pathogens in the food industry. *Anal. Bioanal. Chem.* 409, 1555–1567. doi: 10.1007/s00216-016-0090-z

Youssef, F. S., El-Banna, H. A., Elzorba, H. Y., and Galal, A. M. (2019). Application of some nanoparticles in the field of veterinary medicine. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 7, 78–93. doi: 10.1080/23144599.2019.1691379

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Estevez, Casaux, Fraga, Faccio and Alborés. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.