



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
FARMACOBIOLOGICAS**

TÍTULO:

**“EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD
ANTIBIOPELÍCULA DE NANOCOMPOSITOS CON Y SIN
ANTIBIÓTICO EN BIOPELÍCULAS MONOESPECIE DE
AISLADOS CLÍNICOS”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS**

PRESENTA

QFB. Montserrat López Carrizales

**Director de tesis
Dr. Fidel Martínez Gutiérrez**

**Co-Director:
Dr. Gabriel Alejandro Martínez Castañón**

**Asesores:
Dra. Diana Patricia Portales Pérez
Dr. Roberto Sánchez Sánchez**

**ESTE PROYECTO SE REALIZÓ CON APOYO DEL
FONDO DE APOYO DE INVESTIGACIÓN (FAI) DE LA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

Clave del Proyecto: C18-FAI-05-40.40

REALIZADO EN:

Laboratorio de Antimicrobianos, Biopelículas y Microbiota de la Facultad de
Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí



El programa de Maestría en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT registro 003382, nivel en desarrollo.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 628347.

Agradecimientos académicos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca y financiamiento otorgados para el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Fidel Martínez Gutiérrez por su confianza al recibirme en su equipo de trabajo y brindarme apoyo con asesorías y evaluaciones, así como vincularme con otros grupos de investigación para crecer profesionalmente.

Al Dr. Gabriel Alejandro Martínez Castañón por el apoyo brindado durante estos últimos años, al recibirme en su laboratorio y permitirme hacer uso del equipo, material y reactivos, así como trasmitirme sus conocimientos en el área de nanobiomateriales.

A la Dra. Diana Patricia Portales Pérez por haber aceptado formar parte de mi comité tutorial y asesorarme durante el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Roberto Sánchez Sánchez por recibirme en su laboratorio ubicado en el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR), y a su equipo de trabajo por trasmitirme los conocimientos necesarios en el área de cultivo celular para cumplir exitosamente con los objetivos planteados en este proyecto.

Al Dr. René Darío Peralta Rodríguez quién sin formar parte directamente de mi comité tutorial me recibió en su laboratorio ubicado en el Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), y me apoyó en la caracterización de los hidrogeles, así como en la revisión del artículo de investigación. Además, agradecimientos especiales a la Dra. Esmeralda Mendoza Mendoza por contactarme con el Dr. Peralta y apoyarme para realizar mi estancia de investigación. Asimismo, a la M.C. Sandra Vaillant por recibirme en su departamento durante mi estancia en Saltillo.

Al Dr. Antonio Aragón Piña por el tiempo invertido en el asesoramiento y apoyo con la técnica de microscopía electrónica de barrido.

Al Dr. Martín Magaña Aquino y al Q.F.B. Andrés Flores Santos por las facilidades brindadas para el desarrollo de este proyecto en el Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”.

Agradecimientos personales

A Dios, por permitirme ser y estar.

A mis padres: Martín López y Leticia Carrizales, por su amor y apoyo incondicional, por guiar mi camino, por ser mi fortaleza y mi inspiración, así como mi ejemplo de disciplina y perseverancia. En resumen, a ellos debo todo lo que soy.

A mis hermanos: Diana, Gustavo y Benjamín, por apoyarme durante la preparación de mis seminarios, al medir el tiempo y escuchar atentamente cada una de mis exposiciones, aunque hubiera términos desconocidos para ellos. Asimismo, por el amor y apoyo que siempre me han brindado.

A mi amigo Miguel Álvarez, por cuestionarme constantemente sobre la metodología y resultados de mi proyecto, porque gracias a eso aprendí más de lo que esperaba. Asimismo, por hacer mis días en el laboratorio más alegres con su música y con sus chistes, por escucharme y compartir juntos alegrías, frustraciones y muchos éxitos.

A mis compañeros y amigos de generación: Selene Velázquez y Abraham De Loera, por su amistad y por los grandes momentos compartidos.

A Cecilia Villareal y Kevin Palacios, por apoyarme todos los viernes con la preparación del material para que cada semana pudiera iniciar oportunamente mis experimentos.

A mis amigos Misael Martínez y Diego Ayala, por los consejos y apoyo brindado durante estos años.

Al Dr. Fidel Martínez Gutiérrez, por creer en mí y motivarme a ser cada día mejor. Asimismo, por ser un ejemplo de que se puede ser un gran investigador y excelente ser humano a la vez.

ÍNDICE

Resumen.....	v
Summary.....	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVO.....	3
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	3
3.1 Síntesis de las AgNPs.....	3
3.2 Caracterización de las AgNPs	3
3.3 Formulación de los hidrogeles de quitosán.....	3
3.3.1 Hidrogel de quitosán	4
3.3.2 Hidrogeles de quitosán cargados con AgNPs y AMP	4
3.4 Caracterización de los hidrogeles de quitosán.....	4
3.5 Prevalencia de infecciones del torrente sanguíneo relacionadas con CVC y cepas clínicas	5
3.6 Evaluación del efecto antibiopelícula	6
3.7 Ensayo de viabilidad celular.....	6
3.8 Análisis estadístico.....	7
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
5. CONCLUSIONES.....	12
BIBLIOGRAFÍA	12
6. ARTÍCULO CIENTÍFICO	13

Resumen

El tratamiento de infecciones en pacientes con catéter venoso central (CVC) se ha convertido en un desafío para el sector salud, debido a su asociación con agentes patógenos formadores de biopelículas, las cuales son definidas como un consorcio de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos. Estas estructuras les proporcionan a los microorganismos resistencia contra los antibióticos y el sistema inmune del huésped, además de conferirles la capacidad de diseminarse a otros sitios del cuerpo. Con la finalidad de evitar la formación de biopelículas en sus etapas tempranas, se han propuesto estrategias como el recubrimiento antimicrobiano y modificaciones superficiales de los dispositivos médicos. El uso de nanopartículas de plata (AgNPs) y polímeros naturales como el quitosán, son de gran interés por su actividad antimicrobiana y biocompatibilidad, respectivamente. El propósito de este estudio fue formular hidrogeles de quitosán cargados con diferentes concentraciones de AgNPs y ampicilina (AMP), antimicrobianos que previamente mostraron acción sinérgica, para prevenir la formación temprana de biopelículas de microorganismos multirresistentes de aislamientos clínicos. Los hidrogeles de quitosán se caracterizaron utilizando diferentes técnicas analíticas: reometría, espectroscopía infrarroja por transformada de fourier (FTIR), espectroscopía Raman y microscopía electrónica de barrido (MEB). El efecto antibiopelícula se estudió contra cuatro aislados clínicos multirresistentes (*Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus epidermidis*) por el modelo de colonia. Además, el efecto citotóxico de los hidrogeles se evaluó sobre fibroblastos dérmicos humanos (FDH). Se encontró que los hidrogeles formulados fueron biocompatibles con los FDH y capaces de inhibir la formación de biopelículas de microorganismos multirresistentes. Los resultados sugieren que los hidrogeles de quitosán cargados con agentes antimicrobianos (AgNPs y AMP) podrían ser utilizados como tratamiento profiláctico en pacientes con CVC, al inhibir la formación de biopelículas en etapas tempranas.

Palabras clave: Biopelícula, catéter venoso central, citotoxicidad, nanopartículas de plata, quitosán.

Summary

The treatment of infections in patients with central venous catheter (CVC) has become a challenge for the healthcare services, due to its association with biofilm-forming of pathogen agents, which is defined as a consortium of microorganisms that grow embedded in an exopolysaccharide matrix. These structures provide resistance against antibiotics and the host's immune system, as well as the ability to spread to other sites in the body. In order to avoid the formation of biofilms in their early stages, strategies such as antimicrobial coating and surface modifications of medical devices have been proposed. The use of silver nanoparticles (AgNPs) and natural polymers such as chitosan, are of great interest for their antimicrobial activity and biocompatibility, respectively. The purpose of this study was to generate chitosan hydrogels loaded with different concentrations of AgNPs and ampicillin (AMP) to prevent early biofilm formation of multi-resistant microorganisms isolated from patients with medical devices. Chitosan hydrogels were characterized using different analytical techniques such as rheological test, fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, Raman spectroscopy and scanning electron microscopy (SEM). The antibiofilm effect of the different formulations was studied against four representative multi-resistant clinical isolates (*Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus epidermidis*) using the colony biofilm model. Moreover, the cytotoxic effect of chitosan hydrogels was evaluated on human dermal fibroblasts (HDF). It was found that the formulated chitosan hydrogels were biocompatible with HDF and able of inhibiting the formation of biofilms of multi-resistant microorganisms. The results suggest that chitosan hydrogels loaded with antimicrobial agents (AgNPs and AMP) could be used as prophylactic treatment in patients with CVC, by inhibiting the formation of biofilms in early stages.

Keywords: Biofilm, central venous catheter, cytotoxicity, silver nanoparticles, chitosan.

1. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos son un ejemplo de la capacidad de adaptación a las condiciones adversas, entre ellos, las bacterias se caracterizan por desarrollar mecanismos de resistencia a los antibióticos de forma intrínseca (métodos enzimáticos, bombas de eflujo y modificación del sitio blanco del antibiótico) y extrínseca conocidos como mecanismos adaptativos. El conocimiento de éstos últimos ha cobrado gran importancia en la actualidad, pues las bacterias pueden realizar formación de biopelículas, definidas como un consorcio de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de polímeros extracelulares, los cuales les confieren la capacidad de soportar el efecto de diversos agentes antimicrobianos y la acción del sistema inmune. Se ha detectado la formación de biopelículas en las superficies de tejidos del cuerpo humano, y en diferentes dispositivos médicos como: ventiladores mecánicos, marcapasos, sondas urinarias, prótesis y catéteres venosos centrales (CVCs). El CVC es un dispositivo médico utilizado para la administración de medicamentos, así como para la monitorización hemodinámica del paciente. Sin embargo, su uso está asociado con complicaciones, principalmente trombosis y sepsis debido a la colonización microbiana del dispositivo. En Estados Unidos, aproximadamente cada año 80000 infecciones del torrente sanguíneo relacionadas a CVC ocurren en la unidad de cuidados intensivos⁽¹⁾. La contaminación del CVC puede ser intraluminal, asociada con la administración de soluciones y medicamentos contaminados, o extraluminal, debida principalmente a la colonización por microorganismos de la piel. Dependiendo del origen de contaminación del dispositivo, los patógenos más frecuentemente aislados son: cocos Gram positivos como *Staphylococcus coagulasa negativa*, *S. aureus* y *Enterococcus spp* y, en menor proporción, bacilos Gram negativos y *Candida spp*⁽²⁾. El tratamiento de las infecciones asociadas a biopelículas representa un reto para el sector salud, debido a que se requieren altas dosis de antibióticos por tiempos prolongados. Con la finalidad de evitar la formación de biopelículas en sus etapas tempranas (adhesión bacteriana), se han propuesto estrategias como el recubrimiento antimicrobiano y modificaciones superficiales de los dispositivos médicos. En este

contexto, los hidrogeles son materiales sintetizados a partir de polímeros naturales (quitosán, gelatina, alginato, etc.) o sintéticos (polietilenglicol, poliacrilamida, polivinilalcohol, etc.)⁽³⁾, cuya principal característica es su naturaleza hidrofílica, la cual permite el desarrollo de novedosos materiales con propiedades antimicrobianas, al cargar en su estructura moléculas como antibióticos, antifúngicos y nanopartículas metálicas. Uno de los polímeros más utilizados para la elaboración de hidrogeles es el quitosán por sus propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad. Estudios recientes han incorporado nanopartículas metálicas (oro y plata) en hidrogeles de quitosán para desarrollar materiales con propiedades antibacterianas y antibiopelículas. Las nanopartículas de plata (AgNPs) son bien conocidas por su actividad antibacteriana de amplio espectro, sin embargo, su mecanismo de acción es desconocido. Diferentes estudios han descrito que las AgNPs tienen la capacidad de interactuar con la pared celular y desestabilizarla, generar especies reactivas de oxígeno (EROs) y unirse a grupos sulfhidrilo presentes en biomoléculas como proteínas y ácidos nucleicos⁽⁴⁾. La incorporación de las AgNPs en hidrogeles presenta ventajas como el aumento de su biocompatibilidad y la disminución de su toxicidad. Además, varios estudios han propuesto la combinación sinérgica de AgNPs y antibióticos convencionales para combatir bacterias multirresistentes. Algunas ventajas de utilizar combinaciones sinérgicas son la potenciación de la actividad antibacteriana de antibióticos viejos, la disminución de efectos tóxicos al utilizar dosis bajas de agentes antimicrobianos y la prevención de cepas multirresistentes. Recientemente se ha reportado el efecto sinérgico entre AgNPs y dos antibióticos convencionales, ampicilina (AMP) y amikacina. Los resultados mostraron que ambas combinaciones ofrecen efectos sinérgicos y parcialmente sinérgicos contra uropatógenos multirresistentes, sin embargo, AMP favorece la distribución de las AgNPs generando nanopartículas más estables⁽⁵⁾.

En este estudio formulamos hidrogeles de quitosán cargados con AgNPs y AMP para prevenir la formación temprana de biopelículas de patógenos multirresistentes. Los hidrogeles se caracterizaron utilizando diferentes técnicas analíticas: reometría, espectroscopía infrarroja por transformada de fourier (FTIR), espectroscopía Raman y

microscopía electrónica de barrido (MEB). El efecto antibiopelícula se estudió contra cuatro aislados clínicos multirresistentes, y su efecto citotóxico se evaluó sobre fibroblastos dérmicos humanos (FDH).

2. OBJETIVO

Evaluar la actividad antibiopelícula de hidrogeles de quitosán cargados con diferentes concentraciones de AgNPs y AMP, sobre microorganismos representativos multirresistentes aislados de pacientes con proceso infeccioso relacionado a CVC.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Síntesis de las AgNPs

En un vaso de precipitado de 250 mL se colocaron 90 mL de agua desionizada y se disolvieron 0.169 g de AgNO₃ (Sigma-Aldrich). Posteriormente, bajo agitación magnética se agregaron 10 mL de una solución de ácido gálico al 1 % (Sigma-Aldrich). El valor de pH de la solución se ajustó a 11 con NaOH 3 M (Baker). Para purificar las AgNPs, la dispersión obtenida se dializó utilizando una membrana de nitrocelulosa (peso molecular de 12 kDa) durante 24 h.

3.2 Caracterización de las AgNPs

Las AgNPs se caracterizaron por espectroscopía ultravioleta-visible (UV-vis) usando un espectrómetro S2000 UV-vis de Ocean Optics Inc. (Dunedin, FL, EUA). El diámetro hidrodinámico de las AgNPs se determinó por dispersión de luz dinámica (DLS) en un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, Reino Unido) que opera con un láser He-Ne a una longitud de onda de 633 nm y un ángulo de detección de 90 °, todas las muestras se analizaron durante 60 s a 25 °C.

3.3 Formulación de los hidrogeles de quitosán

Se prepararon siete hidrogeles de quitosán: un hidrogel de quitosán sin agentes antimicrobianos (CH), un hidrogel de quitosán cargado solamente con AgNPs (H 250) y otro cargado solamente con AMP (H 500), así como cuatro hidrogeles de quitosán

cargados con diferentes concentraciones de AgNPs y AMP. Las formulaciones H 250 y H 500 se utilizaron para la caracterización de los hidrogeles de quitosán. Todas las formulaciones fueron almacenadas a 4 °C y protegidas de la luz. La AMP fue elegida debido a su amplio espectro de acción. Además, estudios previos han reportado que su combinación con AgNPs proporciona una actividad antibacteriana sinérgica e inhibe la formación de biopelículas.

3.3.1 Hidrogel de quitosán

En un vaso de precipitado de 100 mL se colocaron 49.8 mL de agua desionizada. Posteriormente, se agregaron 2 mL de ácido acético (J.T. Baker) y 1.75 g de quitosán (alto peso molecular, 85 % DD, Sigma-Aldrich) y se mezcló hasta formar el hidrogel. Por último, se agregaron 0.2 mL de glicerol (Sigma-Aldrich) y se agitó hasta disolver todos los grumos.

3.3.2 Hidrogeles de quitosán cargados con AgNPs y AMP

Para la preparación de los hidrogeles de quitosán con agentes antimicrobianos, la cantidad de quitosán (1.75 g) y los volúmenes de glicerol (0.2 mL) y ácido acético (2 mL) fueron los mismos, mientras que los volúmenes (mL) de la solución de AgNPs (1070 ppm) y AMP (1000 ppm) representados por AgNPs/AMP, fueron los siguientes: 1.2/2.5, 2.3/5, 4.7/10, 11.7/25, 11.7/0 y 0/25 mL, reemplazando el volumen de agua desionizada para las formulaciones: H 25/50, H 50/100, H 100/200, H 250/500, H 250 y H 500 respectivamente.

3.4 Caracterización de los hidrogeles de quitosán

Para evaluar el efecto de la temperatura y la presencia de agentes antimicrobianos (AgNPs y AMP) sobre la viscosidad de los hidrogeles de quitosán, se realizaron mediciones reológicas a dos temperaturas (25 y 37 °C) en un reómetro Anton Paar Physica MCR 501 (Anton Paar, Austria). La determinación se realizó utilizando una geometría CP50-2 (50 mm de diámetro, cono de 2 °) y la velocidad de corte aumentó de 0.001 a 1000 s⁻¹. Los datos se obtuvieron a través del software RheoPlus Rheometer. Los hidrogeles de quitosán se liofilizaron para el análisis espectroscópico

y microscópico. La espectroscopía de FTIR se llevó a cabo utilizando un espectrómetro Nicolet iS50 FT-IR (Thermo Scientific, EUA) para investigar las interacciones intermoleculares entre los componentes de las formulaciones. Se colocó una muestra delgada de película de hidrogel en el equipo y el espectro se tomó en el rango de 4000 a 400 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} y 25 escaneos, utilizando el método de reflexión total atenuada que utiliza un cristal de diamante. La espectroscopía Raman se empleó para estudiar las diferencias estructurales entre el CH y las formulaciones cargadas con AgNPs y AMP. El análisis se llevó a cabo utilizando un analizador Raman portátil TruScan RM (Thermo Fisher Scientific, EUA), en el rango de 3000 a 250 cm^{-1} con una longitud de onda de excitación de 785 nm y una salida de láser de 350 mW. Las características morfológicas superficiales de los hidrogeles de quitosán y la distribución de las AgNPs en éstos se investigaron mediante el uso de un microscopio electrónico de barrido JSM-6610LV (Jeol Ltd., Tokio, Japón) acoplado a un espectrómetro de dispersión de energía de rayos X (EDS) OXFORD XMax (Oxford Instruments Ltd., Reino Unido) con los siguientes detectores: un detector superior (imagen electrónica secundaria; SEI) y un detector de electrones de retrodispersión (BEC). La tensión de aceleración fue de 8 – 12 kV. Las muestras (películas delgadas de los hidrogeles de quitosán) se recubrieron por pulverización con oro. Las micrografías se tomaron a un nivel de ampliación de 1500, 6000 y 10000X.

3.5 Prevalencia de infecciones del torrente sanguíneo relacionadas con CVC y cepas clínicas

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” con el número 29-18. Se realizó un estudio retrospectivo para determinar la frecuencia de los principales microorganismos relacionados con proceso infeccioso en pacientes hospitalizados con CVC, en el periodo comprendido entre enero del 2017 y junio del 2018. En el estudio se incluyeron cuatro microorganismos multirresistentes aislados de muestras clínicas de pacientes con CVC. La recolección y el procesamiento de las muestras se realizó siguiendo los lineamientos de la American Society for Microbiology. Las cepas se aislaron en un

medio de cultivo sólido convencional, posteriormente se realizó la identificación y determinación del perfil de susceptibilidad con el equipo VITEK®2. Todas las cepas se cultivaron en caldo Mueller Hinton (BD Difco) y se almacenaron a -20 °C con glicerol.

3.6 Evaluación del efecto antibiopelícula

El efecto antibiopelícula de los hidrogeles de quitosán se evaluó contra cuatro aislados clínicos multirresistentes (*Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus epidermidis*) mediante el modelo de colonia. En este estudio se incluyó una crema comercial de sulfadiazina de plata al 1 % (SP; Argentafil®, Valeant®) como control positivo de inhibición. Brevemente, las membranas de nylon (47 mm de diámetro, 0.22 µm de tamaño de poro; Thermo Scientific) se esterilizaron mediante irradiación UV (15 min por lado) y luego se colocaron en cajas de Petri con agar tripticasa de soya (BD Difco). Posteriormente, las membranas se inocularon con 10 µL de una suspensión bacteriana diluida 1:1000 (DO₆₀₀ de 0.08). Para determinar el efecto antibiopelícula de los hidrogeles de quitosán y la SP, se colocaron 60 µL de los tratamientos sobre el inóculo del microorganismo y se incubó a 37 °C durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, cada membrana se colocó en un tubo de ensayo que contenía 9 mL de solución estéril de NaCl al 0.85 % y se agitó en vórtex (Thermolyne Maxi-Mix II; Marshall Scientific) durante 90 s. Las suspensiones bacterianas obtenidas de la disgregación de las biopelículas se diluyeron en serie en solución estéril de NaCl al 0.85 % en diez diluciones consecutivas. Las diluciones se sembraron por triplicado en cajas de Petri con agar tripticasa de soya y se incubaron en las condiciones mencionadas anteriormente. Las unidades formadoras de colonias (UFC) se contaron después de 24 h de incubación. Todos los experimentos se realizaron por triplicado de manera independiente para cada microorganismo.

3.7 Ensayo de viabilidad celular

En este estudio, la biocompatibilidad de las formulaciones se evaluó mediante el ensayo de calceína – homodímero de etidio sobre FDH. El protocolo experimental para el aislamiento de las células fue revisado y aprobado por el Comité de Ética del Instituto

Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra” en el proyecto número 26/13. Los FDH se obtuvieron de cirugías estéticas con la firma previa de la carta de consentimiento informado. La epidermis se separó de la dermis utilizando dispasa (SIGMA) durante 8 h; la dermis se trató durante 4 h con colagenasa I (Worthington Biochemical) para obtener los FDH. Finalmente, las células se cultivaron en DMEM-F12 (Dulbecco’s Modified Eagle Medium; GIBCO) suplementado con SBF al 10 % (suero bovino fetal; GIBCO) y 1 % de penicilina/estreptomicina (GIBCO) y se mantuvieron en una incubadora a 37 °C y 5 % CO₂. Para este ensayo se utilizaron FDH pase 10. La viabilidad de los FDH se evaluó mediante la detección de calceína - homodímero de etidio utilizando un kit de LIVE/DEAD® Viabilidad/Citotoxicidad para células de mamíferos (Thermo) siguiendo el protocolo del fabricante. Las placas de cultivo de 48 pozos se impregnaron por triplicado con una capa homogénea de los diferentes tratamientos (30 µL de CH, H 25/50, H 50/100, H 100/200, H 250/500, H 250, H 500 o SP) y se secaron en un gabinete de seguridad tipo II durante 12 h. Después del tratamiento previo de las placas de cultivo, se sembraron 20000 células por pozo durante 24 h a 37 °C y 5 % CO₂. Los FDH tratados con 100 µL de etanol se utilizaron como control negativo (células negativas a calceína) y los FDH no tratados se utilizaron como control positivo (células positivas a calceína). Después de 24 h, las células se incubaron durante 30 min a 37 °C con 2 µM de calceína AM y 2 µM de homodímero de etidio. La señal fluorescente de calceína se observó con un filtro de paso de banda de fluoresceína y el homodímero de etidio con un filtro Texas red. Las imágenes se capturaron y analizaron utilizando un microscopio Axio Observer.A1 (Carl Zeiss, EUA) y el software AxioVision versión 4.8.2. Las células positivas a calceína – homodímero de etidio (vivas - muertas) y el número total de células se contaron con el software ImageJ.

3.8 Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron repetidos al menos tres veces. Las UFC registradas para cada tratamiento se transformaron a su forma logarítmica (Log₁₀). Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar (DE). Todos los datos se analizaron

mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de T3 de Dunnett, utilizando SPSS 23.0 (IBM, Nueva York, NY, EUA). Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tratamiento de infecciones relacionadas con dispositivos médicos representa un reto a nivel mundial debido a su asociación con bacterias que poseen mecanismos de resistencia contra múltiples antibióticos y/o estrategias de supervivencia como la formación de biopelículas. Con la finalidad de prevenir la colonización microbiana de los dispositivos médicos varios estudios han propuesto el desarrollo de materiales con propiedades antimicrobianas y antiadhesivas. En este contexto, los hidrogeles podrían ser utilizados como sistemas de transporte de agentes antimicrobianos y servir como materiales de recubrimiento debido a sus características de biocompatibilidad.

En este estudio proponemos el uso de hidrogeles de quitosán cargados con AgNPs y AMP para prevenir la formación de biopelículas en sus etapas tempranas. Ambos agentes antimicrobianos han sido estudiados previamente de manera independiente y en combinación, sin embargo, este es el primer estudio que incorpora AgNPs y AMP en un hidrogel de quitosán con potencial actividad antibiopelícula.

Las AgNPs se sintetizaron mediante un método de reducción química, obteniendo partículas con un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 5 nm y un plasmón de superficie de 413 nm, característico de la plata nanométrica. Diferentes concentraciones de AgNPs y AMP se utilizaron para la preparación de los hidrogeles. Las características morfológicas superficiales de los hidrogeles y la distribución de las AgNPs en éstos, se estudió utilizando MEB. En general, las micrografías muestran que los hidrogeles son transparentes y agrietados, y que los hidrogeles que contienen en su estructura AgNPs se encuentran bien distribuidas en la red del polímero. El análisis EDS se utilizó para definir la composición elemental de las partículas observadas, para ello se seleccionaron algunas porciones de la muestra que mostraban acumulación densa de partículas. Los espectros revelaron la presencia de picos elementales de carbono (C), oxígeno (O) y plata (Ag). Los picos de C y O confirman la presencia del

quitosán como matriz, mientras que el pico de plata asegura la incorporación de AgNPs en la red del polímero. El análisis reológico mostró que la viscosidad de los hidrogeles disminuye con el aumento de la velocidad de corte, indicando un comportamiento pseudoplástico no Newtoniano, el cual es característico de soluciones de polisacáridos con alto peso molecular. Este comportamiento podría ser de interés para su uso sobre las superficies de dispositivos médicos, al facilitar su aplicación y evitar que el hidrogel fluya desde el sitio de aplicación. Además, los reogramas mostraron que la incorporación de agentes antimicrobianos y el aumento de temperatura no influyen en la viscosidad de los hidrogeles. Por otra parte, el análisis espectroscópico (espectroscopía de FTIR y Raman) se realizó para estudiar las interacciones intermoleculares entre los componentes de las formulaciones. Al comparar los espectros, no se observó formación de nuevas bandas ni ausencia de picos. Por lo tanto, los resultados sugieren que no existen enlaces covalentes entre los agentes antimicrobianos y la red del quitosán. Sin embargo, las AgNPs y la AMP podrían estar interaccionando con los grupos funcionales hidroxilo (OH) y amino (NH₂) del polímero mediante puentes de hidrógeno, los cuales no alteran drásticamente la estructura del quitosán. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado en estudios previos, donde el análisis espectroscópico reveló que las nanopartículas metálicas (Au y Ag) no forman enlaces covalentes con la red del polímero (quitosán-siloxano) ni afectan su estructura.

La actividad antibiopelícula de los hidrogeles se estudió contra un panel de aislados clínicos multirresistentes por el modelo de colonia. La SP se eligió como control positivo de inhibición al ser uno de los principales antisépticos utilizados en el recubrimiento de CVCs. Los resultados mostraron que el CH posee mayor efecto antimicrobiano que la SP sobre las biopelículas de *A. baumannii* ($p = 0.07$), *E. faecium* ($p < 0.05$) y *E. cloacae* ($p < 0.05$). Por otra parte, los hidrogeles formulados con AgNPs y AMP fueron capaces de inhibir drásticamente la formación de biopelículas de *A. baumannii* (Log_{10} reduction de 10 ± 0.01), *E. faecium* (Log_{10} reduction de 8.9 ± 0.02) y *S. epidermidis* (Log_{10} reduction de 7.8 ± 0.13). Sin embargo, para inhibir el desarrollo de *E. cloacae* (Log_{10} reduction de 9.9 ± 0.11) fue crucial el aumento en la concentración

de los agentes antimicrobianos. Estudios previos han reportado la síntesis de geles de quitosán cargados con diferentes concentraciones de mononitrato de isosorbida (precursor del óxido nítrico) y con una concentración constante de ciprofloxacino (CIP, 5 ppm). Su actividad antibiopelícula se estudió por el modelo de colonia contra *S. aureus* ATCC 25923. Los resultados de este estudio mostraron que los geles cargados únicamente con mononitrato de isosorbida (10 o 60 ppm) tenían mejores efectos antimicrobianos que el gel de quitosán sin fármacos (Log_{10} reduction ~ 2.0). Además, un efecto sinérgico fue encontrado con el gel de quitosán que contenía mononitrato de isosorbida (60 ppm) y CIP contra la biopelícula de *S. aureus* ATCC 25923 (Log_{10} reduction ~ 4.0). Otros estudios han descrito la síntesis de geles de quitosán cargados con deferiprona (Def, 20 mM) y galio protoporfirina IX (GaPP, 100 o 500 ppm), solos y en combinación con CIP (5 ppm). La actividad antibiopelícula se estudió por el modelo de colonia contra un panel de bacterias Gram positivas (*S. aureus* ATCC 25923, un aislado clínico de *S. aureus* resistente a meticilina y *S. epidermidis* ATCC 12228) y Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1, un aislado clínico de *P. aeruginosa* y *A. johnsonii* ATCC 17946). En general, los resultados mostraron que el gel que contenía únicamente Def tenía baja actividad antibiopelícula contra todos los microorganismos, mientras que el gel que contenía únicamente GaPP fue concentración y muestra dependiente. Por otro lado, la combinación Def-GaPP fue necesaria para inhibir el crecimiento de manera significativa de *P. aeruginosa* (Log_{10} reduction de 3.3). La triple combinación (Def-GaPP-CIP) supero la actividad antibiopelícula de los compuestos individuales.

Las diferencias en la actividad antibiopelícula podrían estar relacionadas con el tipo de microorganismo, el volumen del inóculo, los agentes embebidos en la matriz del polímero, así como, el volumen de gel utilizado para el tratamiento de la biopelícula. Sin embargo, los resultados sugieren que nuestras formulaciones poseen mejor actividad antibiopelícula y son biocompatibles con FDH.

El uso de otras nanopartículas metálicas para inhibir el desarrollo de biopelículas también ha sido investigado. Bermúdez-Jiménez y cols. embebieron nanobarras de oro (AuNRs) en un hidrogel de quitosán y probaron su actividad antimicrobiana contra

una biopelícula multiespecie de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Streptococcus oralis* ATCC 25175. Los resultados mostraron que su formulación es capaz de inhibir drásticamente la biopelícula multiespecie (Log_{10} reduction de 10) cuando el consorcio microbiano en presencia del hidrogel es irradiado con un láser ajustado en el espectro infrarrojo cercano. En este caso, las diferencias en la actividad antibiopelícula podrían estar asociadas con el tipo de metal, la forma de las nanopartículas y el uso de fototerapia.

En este estudio, la biocompatibilidad de las formulaciones se evaluó mediante el ensayo de calceína – homodímero de etidio sobre FDH. Los resultados a las 24 h mostraron que todos los hidrogeles exhibían valores de viabilidad celular mayores al 95%, mientras que con la SP menos del 1 % de las células se encontraron viables. Estudios previos han reportado el efecto citotóxico de la SP sobre células eucariotas. Alvarado-Gómez y cols. compararon la biocompatibilidad de geles elaborados a base de pluronic F-127 cargados con diferentes concentraciones de AgNPs (62.5, 125 y 250 ppm) contra la SP. A las 4 h de cultivo, la viabilidad de los FDH con los geles fue mayor al 95 %, en contraste con la SP la cual mostró un alto efecto citotóxico (18%). Pérez-Díaz y cols. también compararon el efecto citotóxico de sus geles de quitosán cargados con diferentes concentraciones de AgNPs (100, 250, 500 y 1000 ppm) contra la SP. Los resultados mostraron que la citotoxicidad de los geles sobre los FDH fue dependiente de la concentración de AgNPs. Sin embargo, todos los geles proporcionaron menores efectos citotóxicos que la SP. En nuestro estudio, el incremento en las concentraciones de los agentes antimicrobianos (AgNPs y AMP) no afectó la viabilidad de los fibroblastos. Sin embargo, la morfología celular se vio alterada con el incremento de la concentración de AgNPs. Lo anterior ha sido descrito en otros estudios, por ejemplo, Hernández-Rangel y cols. evaluaron la biocompatibilidad de películas de quitosán con diferentes concentraciones de AgNPs sobre FDH durante 2 y 8 días. Los autores concluyen que altas concentraciones de AgNPs (0.136 y 0.573 % p/v) afectan la forma fusiforme de los fibroblastos y sus propiedades de adhesión.

5. CONCLUSIONES

Los hidrogeles formulados fueron biocompatibles con FDH y capaces de inhibir la formación de biopelículas de microorganismos multirresistentes. Los resultados sugieren que el hidrogel con menores concentraciones de agentes antimicrobianos (H 25/50) podría ser utilizado como profiláctico en pacientes con CVC, debido a su actividad antimicrobiana de amplio espectro y biocompatibilidad con células eucariotas. Sin embargo, más estudios son necesarios para evaluar si el cambio en la morfología de los fibroblastos no afecta su proliferación celular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gominet M, Compain F, Beloin C, Lebeaux D. Central venous catheters and biofilms: where do we stand in 2017? *APMIS*. 2017;125(4):365-75.
2. Esposito S, Purrello SM, Bonnet E, Novelli A, Tripodi F, Pascale R, et al. Central venous catheter-related biofilm infections: An up-to-date focus on meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Glob Antimicrob Resist*. 2013;1(2):71-8.
3. Veiga AS, Schneider JP. Antimicrobial hydrogels for the treatment of infection. *Biopolymers*. 2013;100(6):637-44.
4. Slavin YN, Asnis J, Häfeli UO, Bach H. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J Nanobiotechnology*. 2017;15(1):65.
5. Lopez-Carrizales M, Velasco KI, Castillo C, Flores A, Magaña M, Martinez-Castanon GA, et al. *In Vitro* Synergism of Silver Nanoparticles with Antibiotics as an Alternative Treatment in Multiresistant Uropathogens. *Antibiotics (Basel)*. 2018;7(2).

6. ARTÍCULO CIENTÍFICO

Evaluation of antibiofilm and cytotoxic effect of chitosan hydrogels loaded with silver nanoparticles and ampicillin as alternative treatment of multi-resistant and extensively drug-resistant pathogens

Montserrat Lopez-Carrizales^a, Mario Alberto Pérez-Díaz^{b,9}, Andrés Flores Santos^c, Diana Portales-Pérez^a, Martín Magaña-Aquino^c, Antonio Aragón-Piña^d, Ramiro Infante-Martínez^e, René Darío Peralta-Rodríguez^e, Roberto Sanchez-Sanchez^b, Gabriel Alejandro Martinez-Castañón^f, Fidel Martinez-Gutierrez^{a*}.

^a Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava No. 6 Zona Universitaria, CP 78210, San Luis Potosí, S.L.P., México.

^b Unidad de Ingeniería de Tejidos Terapia Celular y Medicina Regenerativa, Instituto Nacional de Rehabilitación, Calz. México-Xochimilco 289, Arenal Tepepan, CP 14389, Ciudad de México, México.

^c Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto, Av. Venustiano Carranza No. 2395, CP 78290, San Luis Potosí, S.L.P., México.

^d Instituto de Metalurgia, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Sierra Leona No. 550, Lomas 2^a sección, CP 78210, San Luis Potosí, S.L.P., México.

^e Departamento de Procesos de Polimerización, Centro de Investigación en Química Aplicada, Blvd. Enrique Reyna Herosillo No. 140, CP 25294, Saltillo, Coahuila, México.

^f Laboratorio de Nanobiomateriales, Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava No.2 Zona Universitaria, CP 78290, San Luis Potosí, S.L.P., México.

⁹ Laboratorio de Biomembranas, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomas, CP 11340, Ciudad de México, México.

*Correspondence: Fidel Martinez-Gutierrez, PhD
Laboratorio de Antimicrobianos Biopelículas y Microbiota, Facultad de Ciencias Químicas, UASLP, Av. Dr. Manuel Nava No. 6 Zona Universitaria, CP 78210, San Luis Potosí, S.L.P., México.
E-mail address: fidel@uaslp.mx; fidelmicro@gmail.com
Phone: +52-(444)-826-2300 (ext. 6591).

Abstract

The treatment of infections in patients with central venous catheter (CVC) has become a challenge for the healthcare services due to its association with biofilm-forming bacteria. In order to avoid the biofilm formation in their early stages, strategies such as antimicrobial coating and surface modifications of medical devices have been proposed. The combination of silver nanoparticles (AgNPs) with natural polymers, such as chitosan, are of great interest for their antimicrobial activity and biocompatibility, respectively. The purpose of this study was to generate chitosan hydrogels loaded with different concentrations of AgNPs and ampicillin (AMP) to prevent the early formation of biofilms. Chitosan hydrogels were characterized using different analytical techniques such as rheological test, fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, Raman spectroscopy and scanning electron microscopy (SEM). The antibiofilm effect of the different formulations was investigated against four representative multi-resistant clinical isolates using the colony biofilm model. Furthermore, their cytotoxic effect was evaluated on human dermal fibroblasts (HDF). The chitosan hydrogels proposed in this work were able to inhibit the formation of biofilms of *Acinetobacter baumannii* (Log₁₀ reduction of 10 ± 0.01), *Enterococcus faecium* (Log₁₀ reduction of 8.9 ± 0.02) and *Staphylococcus epidermidis* (Log₁₀ reduction of 7.8 ± 0.13), while that of the increased concentration of antimicrobial agents (250 ppm AgNPs and 500 ppm AMP) was crucial to inhibit the biofilm of *Enterobacter cloacae* dramatically: Log₁₀ reduction of 9.9 ± 0.11 . On the other hand, the cell viability assay showed that all formulations were biocompatible with HDF. The results suggest that chitosan hydrogels loaded with AgNPs and AMP could be used as a prophylactic treatment in patients with CVC by inhibiting the formation of biofilms in the early stages of treatment.

Keywords: Biofilm; Central venous catheter; Chitosan; Cytotoxicity; Silver nanoparticles.

1. Introduction

Microorganisms can adapt to adverse conditions, an example are the bacteria which are characterized by developing antimicrobial resistance mechanisms in both ways, an intrinsic (i.e., enzymatic inactivation or modification, increased efflux of the antibiotic and target modification)⁽¹⁾ and an extrinsic one, such as biofilms formation. These structures are defined as a consortium of microorganisms that grow in a matrix of extracellular polymers⁽²⁾, which give them the ability to resist the host immune response and antibiotic therapies⁽³⁾. The formation of biofilms has been detected on the human body tissue surfaces and medical devices, such as ventilators, pacemakers, prosthesis, urinary catheters and central venous catheters (CVC)^(4, 5). The CVC are medical devices used to inject nutritional solutions, blood products and medications^(6, 7), as well as for hemodynamic monitoring of patients⁽⁸⁾. However, their use is associated with complications, mainly thrombosis and sepsis⁽⁹⁾ due to microbial colonization of the device. Each year, approximately 80000 CVC-related bloodstream infections occur in the intensive care units of the USA⁽⁶⁾, which has the consequence of an unfavorable evolution of the patient, as well as an economic impact. The contamination of the CVC can be intraluminal, associated with the administration of solutions and medications contaminated, or extraluminal, due mainly to the colonization by skin microorganisms^(3, 7). Depending on the origin of contamination of the device, the most frequently isolated pathogens are Gram-positive cocci (GPC), such as coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS), *S. aureus* and *Enterococcus* spp, and less commonly, Gram-negative bacilli (GNB) and *Candida* spp⁽¹⁰⁾. The treatment of biofilm-associated infections is a challenge for the healthcare services worldwide because high antibiotic doses are required for a prolonged time⁽¹¹⁾. In order to avoid the formation of biofilms in their early stages (bacterial adhesion), strategies such as antimicrobial coating and surface modifications of medical devices have been proposed⁽³⁾. In this context, hydrogels are materials synthesized from natural and biocompatible polymers (e.g. chitosan, gelatin and alginate) or synthetic polymers (e.g. polyethylene glycol, polyacrylamide and polyvinyl alcohol)⁽¹²⁾, whose main feature is its hydrophilic nature⁽¹³⁾, which allows the development of novel materials with antimicrobial properties

by loading into its structure molecules, such as antibiotics, antifungals and metal nanoparticles⁽¹⁴⁾. One of the most used polymers for preparing hydrogels is chitosan because of its biocompatibility and biodegradability properties^(15, 16). Recent studies have incorporated metal nanoparticles (gold and silver) in chitosan hydrogels to develop materials with antibacterial^(17, 18) and antibiofilm⁽¹⁹⁾ properties. Silver nanoparticles (AgNPs) are well known for their broad-spectrum antimicrobial activity, however, their mechanism of action is not completely understood. Different studies suggest that AgNPs can interact with the microbial cell wall and destabilize it, generating reactive oxygen species (ROS) and binding to sulfhydryl groups of biomolecules such as proteins and nucleic acids^(20, 21). The incorporation of AgNPs in hydrogels have benefits such as the increase of their biocompatibility and the decrease of their toxicity⁽¹⁴⁾. Furthermore, several studies have proposed the synergistic combination of AgNPs and conventional antibiotics to combat multi-resistant bacteria⁽²²⁻²⁴⁾. Some advantages of using synergistic combinations include the potentiation of the antibacterial activity of old antibiotics, the reduction of toxic effects by using low doses of antimicrobial agents and the prevention of the emergence of multi-resistant strains⁽¹¹⁾. The recently studied synergistic effect between AgNPs and two conventional antibiotics, ampicillin (AMP) and amikacin, showed interesting results. The results showed that both combinations provide synergistic and partially synergistic effects against multi-resistant uropathogens. However, AMP contributes to the distribution of the AgNPs, generating more stable nanoparticles⁽²⁵⁾.

In this study, we formulated chitosan hydrogels loaded with AgNPs and AMP to evaluate the antimicrobial effect to prevent the early formation of biofilms of multi-resistant pathogens. Firstly, the chitosan hydrogels were characterized by different analytical techniques: rheological test, fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, Raman spectroscopy and scanning electron microscopy (SEM). Then, the antibiofilm effect of the chitosan hydrogels against four multi-resistant clinical isolates was studied, and finally, the cytotoxic effects of these formulations on human dermal fibroblasts (HDF) were evaluated.

2. Material and methods

2.1 Synthesis of AgNPs

AgNPs were synthesized by dissolving 0.169 g of AgNO₃ (Sigma-Aldrich) in 90 mL of deionized water and this solution was placed in a 250 mL reaction vessel. Under magnetic stirring, 10 mL of deionized water containing 0.1g of gallic acid (Sigma-Aldrich) was added to the silver nitrate solution. After the addition of gallic acid, the pH value of the solution was adjusted to 11 with NaOH 3 M (Baker). In order to purify the AgNPs, the obtained dispersion was dialyzed using a dialysis membrane (12 kDa molecular weight cut-off) during 24 h.

2.2 Characterization of AgNPs

AgNPs were characterized by ultraviolet-visible (UV-vis) spectroscopy using a S2000 UV-Vis spectrometer from Ocean Optics Inc. (Dunedin, FL, USA). In order to determine the hydrodynamic diameter of the AgNPs, dynamic light scattering (DLS) was performed in a Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, United Kingdom) operating with a He-Ne laser at a wavelength of 633 nm, and a detection angle of 90°, all samples were analyzed for 60 s at 25 °C.

2.3 Formulation of the chitosan hydrogels

Seven chitosan hydrogels were prepared: a chitosan hydrogel without antimicrobial agents (CH), one chitosan hydrogel loaded only with AgNPs (H 250) and another loaded only with AMP (H 500), and four chitosan hydrogels loaded with different concentrations of AgNPs and AMP. The formulations H 250 and H 500 were used for the characterization of the chitosan hydrogels. All formulations were stored at 4 °C and protected from light. AMP was chosen due to its broad-spectrum of action. Furthermore, its combination with AgNPs provided a synergistic antibacterial activity and inhibited the formation of biofilms.

2.3.1 Chitosan hydrogel

1.75 g of chitosan (high molecular weight, 85% DD, Sigma-Aldrich) and 0.2 mL of glycerol (Sigma-Aldrich) were added to 49.8 mL of 4% acetic acid (J. T. Baker) solution in deionized water.

2.3.2 Chitosan hydrogels loaded with AgNPs and AMP

For the preparation of the chitosan hydrogels with AgNPs and AMP, the amount of chitosan (1.75 g) and the volumes of glycerol (0.2 mL) and acetic acid (2 mL) were the same, while the volumes (mL) of the AgNPs (1070 ppm) and AMP (1000 ppm), represented by AgNPs/AMP, were the following: 1.2/2.5, 2.3/5, 4.7/10, 11.7/25, 11.7/0 and 0/25 mL in the formulation, replacing the volume of deionized water for the formulations: H 25/50, H 50/100, H 100/200, H 250/500, H 250, and H 500, respectively (Table 1).

Table 1. Concentrations of the different reagents used to prepare the chitosan hydrogels.

Sample	Chitosan (% w/v)	AgNPs (ppm)	AMP (ppm)
CH	3.5	0	0
H 25/50	3.5	25	50
H 50/100	3.5	50	100
H 100/200	3.5	100	200
H 250/500	3.5	250	500
H 250	3.5	250	0
H500	3.5	0	500

2.4 Characterization of the chitosan hydrogels

In order to evaluate the effect of temperature and the presence of antimicrobial agents (AgNPs and AMP) on the viscosity of the chitosan hydrogels, rheological measurements were conducted at two temperatures (25 and 37 °C) in an Anton Paar Physica MCR 501 rheometer (Anton Paar, Austria). The determination was carried out using a CP50-2 (50 mm diameter, 2° cone) geometry and the shear rate increased from

0.001 to 1000 s⁻¹. Data was obtained through the RheoPlus Rheometer Software. The chitosan hydrogels were freeze-dried for the spectroscopic and microscopy analysis. The FTIR spectroscopy was carried out by using a Nicolet iS50 FT-IR spectrometer (Thermo Scientific, USA) for investigating the intermolecular interactions between the components of the formulations. A thin film sample was placed in the equipment and the spectrum was recorded in the range of 400 to 4000 cm⁻¹ with a resolution of 4 cm⁻¹ and 25 scans using the attenuated total reflection method which utilizes a diamond crystal. Raman spectroscopy was used for studying the structural differences between the CH and the formulations loaded with AgNPs and AMP. The analysis was carried out by using a Thermo Scientific TruScan RM Handheld Raman Analyzer (Thermo Fisher Scientific, USA) in the range of 3000 to 250 cm⁻¹ with a 785 nm excitation wavelength and a laser output of 350 mW. The surface morphological characteristics of the chitosan hydrogels and the distribution of the AgNPs on these were investigated using a scanning electron microscope JSM-6610LV (Jeol Ltd., Tokyo, Japan) coupled to an energy dispersive X-ray spectrometer (EDS) OXFORD X-Max (Oxford Instruments Ltd., UK) with the following detectors: an upper detector (secondary electron imaging; SEI) and a backscattering electron detector (BEC). The accelerating voltage was 8 - 12 kV. The samples (thin films of the chitosan hydrogels) were sputter-coated with gold. The micrographs were taken at magnification levels of 1500, 6000 and 10000X.

2.5 Prevalence of clinical strains in bloodstream infections associated with CVC

The research protocol was approved by the Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” through the Hospital’s Ethics and Science Committee (approval number 29-18). A retrospective study was conducted to determine the microorganisms related to infections in hospitalized patients with CVC at the Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” in the period from January 2017 to June 2018. The clinical strains used in this study were the four most prevalent isolated from the patients. The sample collection was performed following the guidelines of the American Society for Microbiology standards and according to the ethics guidelines. The strains were

isolated in solid medium conventional cultures and the identification and antimicrobial susceptibility test of the planktonic form were realized using a VITEK®2 system. All strains were cultured in Mueller Hinton Broth (BD Difco), and conserved at -20°C with glycerol.

2.6 Antibiofilm evaluation

The antibiofilm activity of the chitosan hydrogels was evaluated against multi-resistant clinical isolates (*Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus epidermidis*) by the colony biofilm model. A commercial silver sulfadiazine 1 % cream (SSD; Argentafil®, Valeant®) was included in this study as an inhibition positive control. Briefly, nylon membranes (47 mm diameter, 0.22 µm pore size; Thermo Scientific) were sterilized by UV irradiation (15 min per side) and then placed on agar trypticase soy medium (BD Difco). The membranes were inoculated with 10 µL of a diluted 1:1000 stationary-phase planktonic culture suspension (microorganism suspension at an OD₆₀₀ of 0.08). In order to determine the antibiofilm effect of the chitosan hydrogels and the SSD, 60 µL of the treatments were inoculated with the microorganism for 24 h at 37 °C. All experiments were performed by triplicate, independently for each microorganism. After 24 h incubation, each membrane-supported biofilm was placed in 9 mL of NaCl 0.85 % sterile solution and vortexed (Thermolyne Maxi-Mix II; Marshall Scientific) for 90 s. Suspension of bacteria obtained from biofilms disaggregation were serially diluted in NaCl 0.85 % sterile solution in ten consecutive dilutions from 1X10⁻³ to 1X10⁻¹⁰ v/v. Dilutions were plated by triplicate on agar trypticase soy plates and incubated under conditions mentioned above. The number of Colony Forming Units (CFU) were counted after 24 h of incubation.

2.7 Viability evaluation

In order to know the cytotoxic behavior of the chitosan hydrogels, a cell viability assay was performed on human dermal fibroblast (HDF). The consent and experimental protocols for the cells isolation were reviewed and approved by the ethics committee of the Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra in the project

number 26/13. HDF were obtained from aesthetic surgeries with the previous signature of an informed consent. Briefly, the epidermis was separated from the dermis using dispase (SIGMA) during 8 h; the dermis was treated during 4 h with collagenase I (Worthington Biochemical) to obtain the HDF. Finally, the cells were cultured with DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium; GIBCO) supplemented with 10 % FBS (fetal bovine serum; GIBCO) and 1 % penicillin/streptomycin (GIBCO) and maintained in an incubator at 37 °C and 5 % CO₂. Passage 10 was used for this assay. Viability of HDF were evaluated by detection of calcein and ethidium homodimer (EthD-1) using a LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity for mammalian cells kit (Thermo) following manufacturer's protocol. 48 well culture dishes were pretreated by triplicate with a homogeneous layer of the different treatments (30 µL of CH, H 25/50, H 50/100, H 100/200, H 250/500, H 250, H 500 or SSD) and dried inside a security cabinet type II for 12 h. After the pretreatment of the culture dishes, 20000 cells were seeded onto the plates for 24 h at 37 °C and 5 % CO₂. HDF treated with 100 µL of ethanol were used as a negative control (calcein negative cells), and untreated cells were used as positive control (calcein positive cells). After 24 h, cells were incubated for 30 min at 37 °C with 2 µM calcein AM and 2 µM EthD-1. Calcein fluorescent signal was observed with a fluorescein band pass filter and EthD-1 with a Texas red filter. Images were captured and analyzed using an Axio-Observer.A1 microscope (Carl Zeiss, USA) and the software AxioVision Release 4.8.2. Calcein/EthD-1 (alive/dead) positive cells and total number of cells were counted using ImageJ software.

2.8 Statistical analysis

All experiments were repeated at least three times. The CFU recorded for each treatment was Log₁₀-transformed. Results are expressed as the mean ± standard deviation (SD). All data was analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's T3 post-hoc, using SPSS 23.0 (IBM, New York, NY, USA). A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1 Characterization of AgNPs

The UV-vis spectrum revealed a peak at a wavelength of 413 nm corresponding to surface plasmon resonance (SPR) of AgNPs (Fig. 1a). DLS showed AgNPs with an average hydrodynamic diameter of (\pm SD) 5.21 ± 0.65 nm (Fig. 1b).

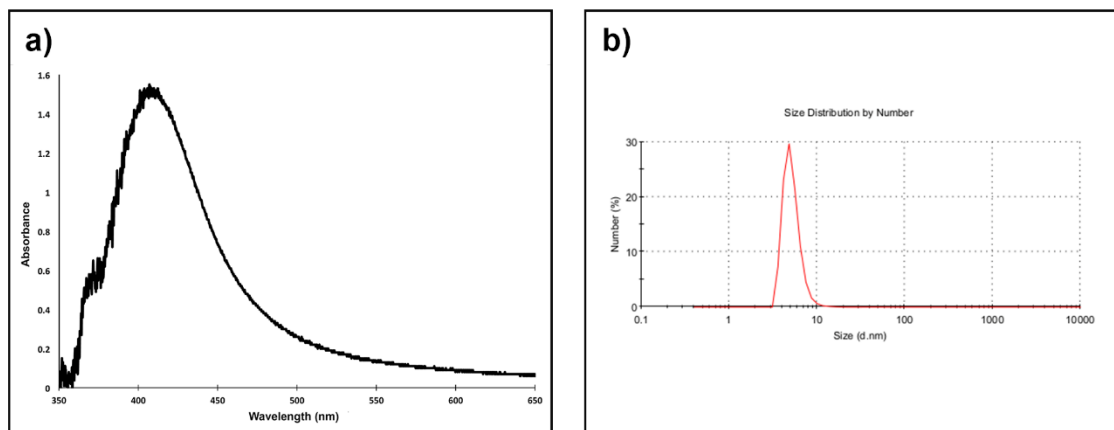


Fig. 1 Characterization of silver nanoparticles (AgNPs).

a) Surface Plasmon Resonance (SPR), **b)** Dynamic Light Scattering graphic.

3.2 Characterization of the chitosan hydrogels

3.2.1 Rheological test

The chitosan hydrogels were characterized by their rheological behavior as a function of temperature and concentration of antimicrobial agents. Fig. 2 shows that the viscosity decreased when the shear rate was increased, which indicates that the hydrogels formulated were typical non-Newtonian fluids with pseudoplastic or shear-thinning behavior. The results revealed that the increase of temperature (Fig. 2b) and the increase of the concentration of antimicrobial agents (AgNPs and AMP) did not change the viscosity of the chitosan hydrogels sharply.

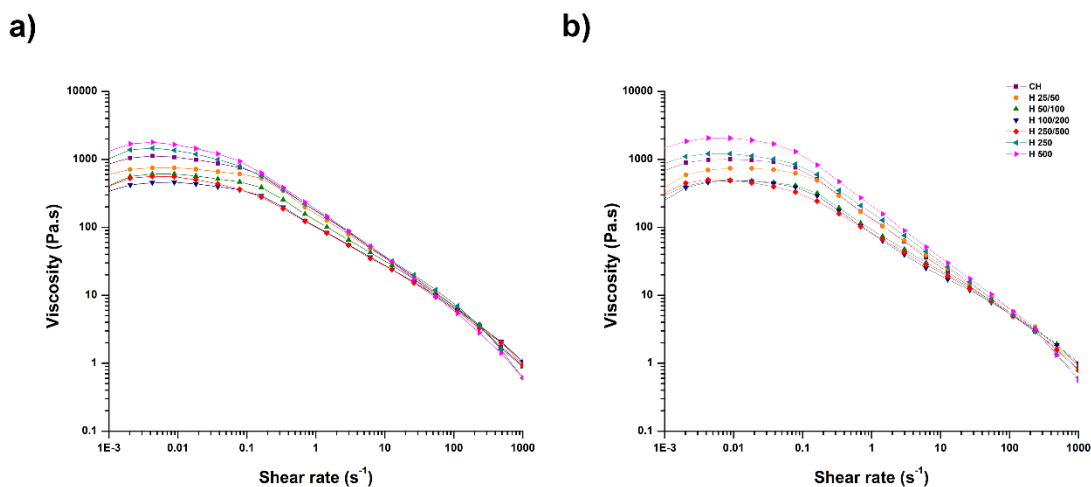


Fig. 2 Rheological behavior of the unloaded and loaded with silver nanoparticles (AgNPs) and ampicillin (AMP) chitosan hydrogels determined at two temperatures. **a)** 25 °C and **b)** 37 °C.

3.2.2 FTIR spectroscopy

Fig. 3 shows the FTIR spectra of the reagents (chitosan and AMP) as well as that of the formulated chitosan hydrogels. The spectrum of chitosan showed a broad band around 3355-3285 cm^{-1} corresponding to O-H and N-H stretching vibrations. The bands at 2897 and 2870 cm^{-1} were attributed to C-H stretching. The peaks at 1648 and 1561 cm^{-1} were due to C=O stretching of the amide I, and N-H in-plane bending vibration of the amide II, respectively. Moreover, the bands at 1420 and 1374 cm^{-1} were assigned to in-plane bending vibrations of the groups -CH₂ and -CH₃. The peak at 1149 cm^{-1} was attributed to the combination of N-H deformation and C-N stretching of the amide III. Furthermore, the bands at 1059, 1025 and 894 cm^{-1} were assigned to asymmetric stretching of C-O-C bridge, C-O stretching vibration and vibration associated to saccharine structure, respectively. On the other hand, the spectrum of AMP exhibited a band at 3294 cm^{-1} corresponding to N-H asymmetric stretching. The peak at 3061 cm^{-1} was attributed to =C-H. The bands at 2965 and 2930 cm^{-1} were due to -CH₃. The peak at 1758 cm^{-1} corresponded to carbonyl group (C=O) stretching. Moreover, the bands at 1592 and 1454 cm^{-1} were attributed to C=C stretching. The spectra of the formulated chitosan hydrogels showed bands with similar frequencies and shapes to

the spectrum of the chitosan. However, all formulations revealed a shift of the band corresponding to stretching vibrations of the functional groups OH and NH₂, from 3355-3285 cm⁻¹ to lower wavenumbers (around 3250-3200 cm⁻¹). This suggests that the AgNPs and AMP interact with the chitosan through these functional groups. Furthermore, the intensity of the peaks rose with the increasing concentration of AgNPs.

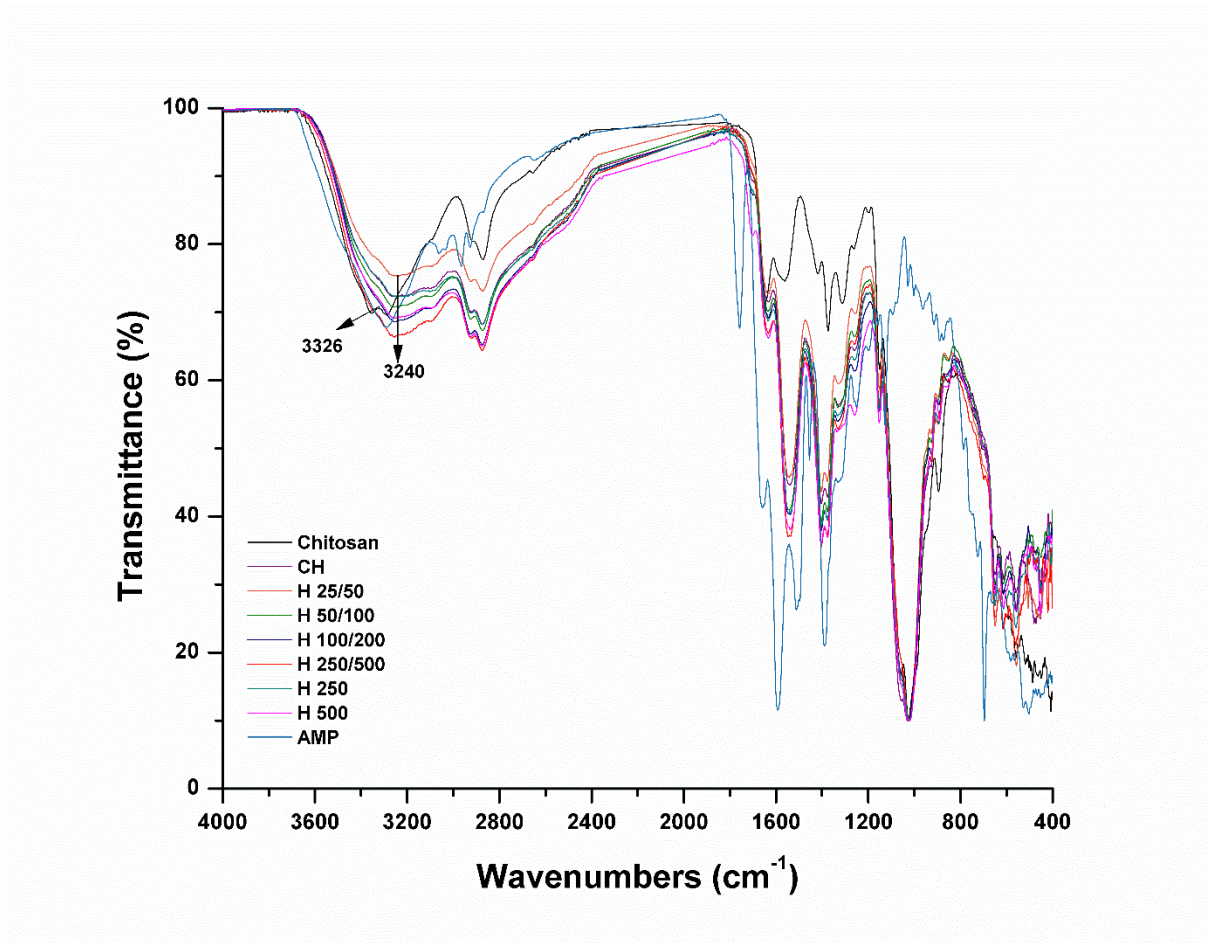


Fig. 3 Fourier transform infrared (FTIR) spectra of chitosan, ampicillin (AMP) and chitosan hydrogels loaded with silver nanoparticles (AgNPs) and AMP.

3.2.3 Raman spectroscopy

The Raman signals were assigned as follows (Fig. 4): the peak at 2850 cm⁻¹ was attributed to -CH₂ stretching vibration; the band at 1461 cm⁻¹ was assigned to in-plane and out-of plane bending combined vibrations of several functional groups: C-H, O-H

and -CH_2 , respectively; the peak at 1327 cm^{-1} was due to C-N stretching vibration and C-H in-plane bending vibration; the band at 1156 cm^{-1} was due to alicyclic chain stretches, the peak at 899 cm^{-1} was attributed to stretching vibration of pyranoid ring; and the band at 458 cm^{-1} was assigned to out-of plane bending vibrations of pyranoid ring and O-H. Again, the Raman spectra of the chitosan hydrogels loaded with antimicrobial agents showed similar signals to the spectrum of the CH, and no new peaks were observed. The results of the spectroscopic analysis suggest that non-covalent linkages were formed between the chitosan network and the antimicrobial agents (AgNPs and AMP).

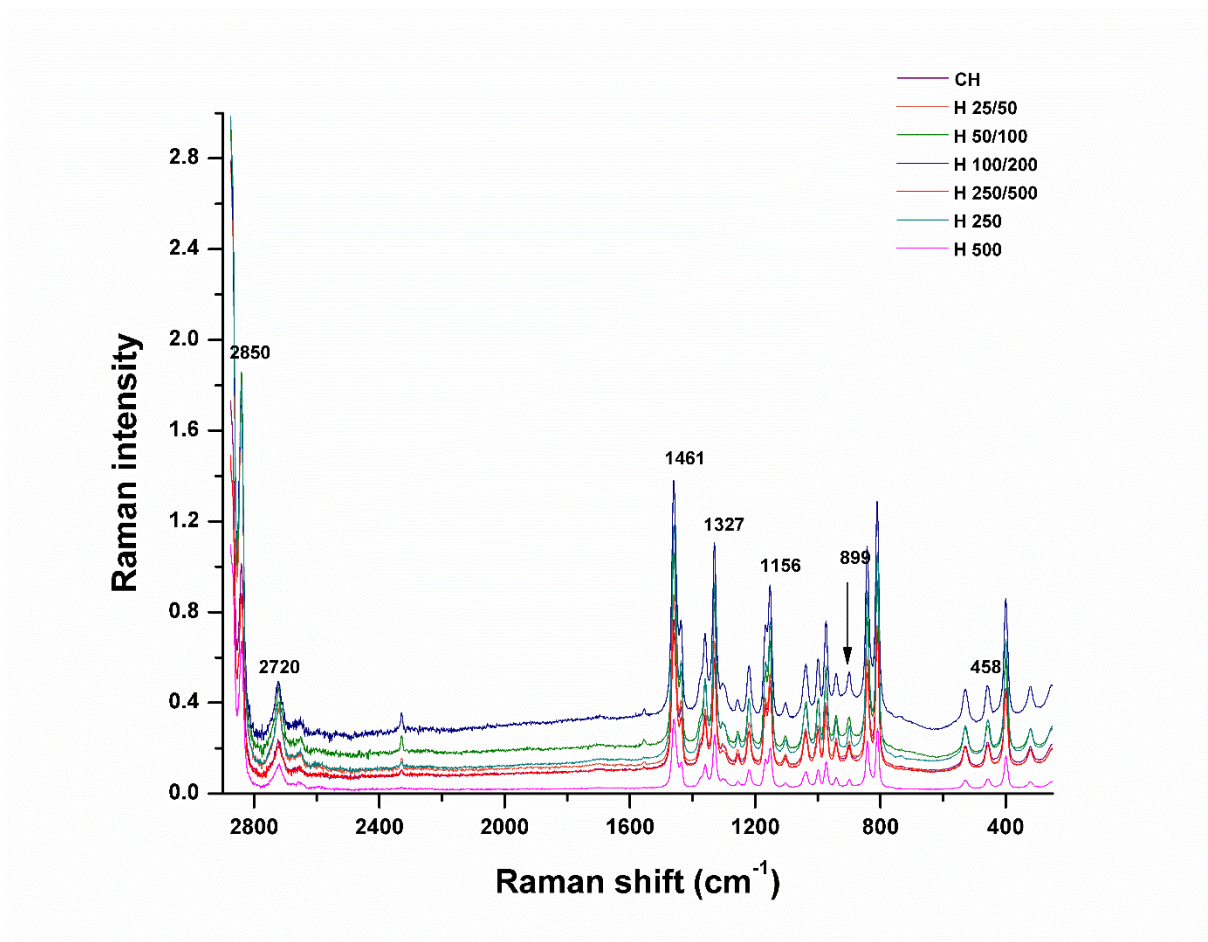


Fig. 4 Raman spectra of the unloaded and loaded with silver nanoparticles (AgNPs) and ampicillin (AMP) chitosan hydrogels.

3.2.4 SEM

SEM micrographs are shown in Fig. 5. The analysis revealed that the surfaces of the CH and H 500 were clear and cracked (Fig. 5a, g). On the other hand, the results showed that the AgNPs (brighter points) were well distributed into the chitosan network (Fig. 5b-f), however, the chitosan hydrogel with the highest AMP concentration showed a dense accumulation of AgNPs (Fig. 6b). EDS analysis was used for confirming that the observed particles consisted of silver (Fig. 6c,d).

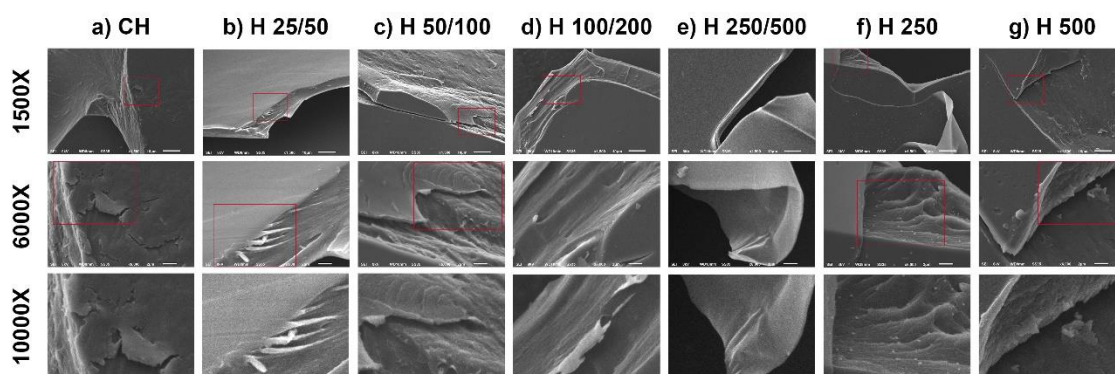


Fig. 5 Characterization of the chitosan hydrogels by Scanning Electron Microscopy (SEM). Figure shows representative micrographs taken in secondary electron imaging (SEI) of **a) CH**, **b) H 25/50**, **c) H 50/100**, **d) H 100/200**, **e) H 250/500**, **f) H 250** and **g) H 500** at magnification level of 1500, 6000 and 10000X.

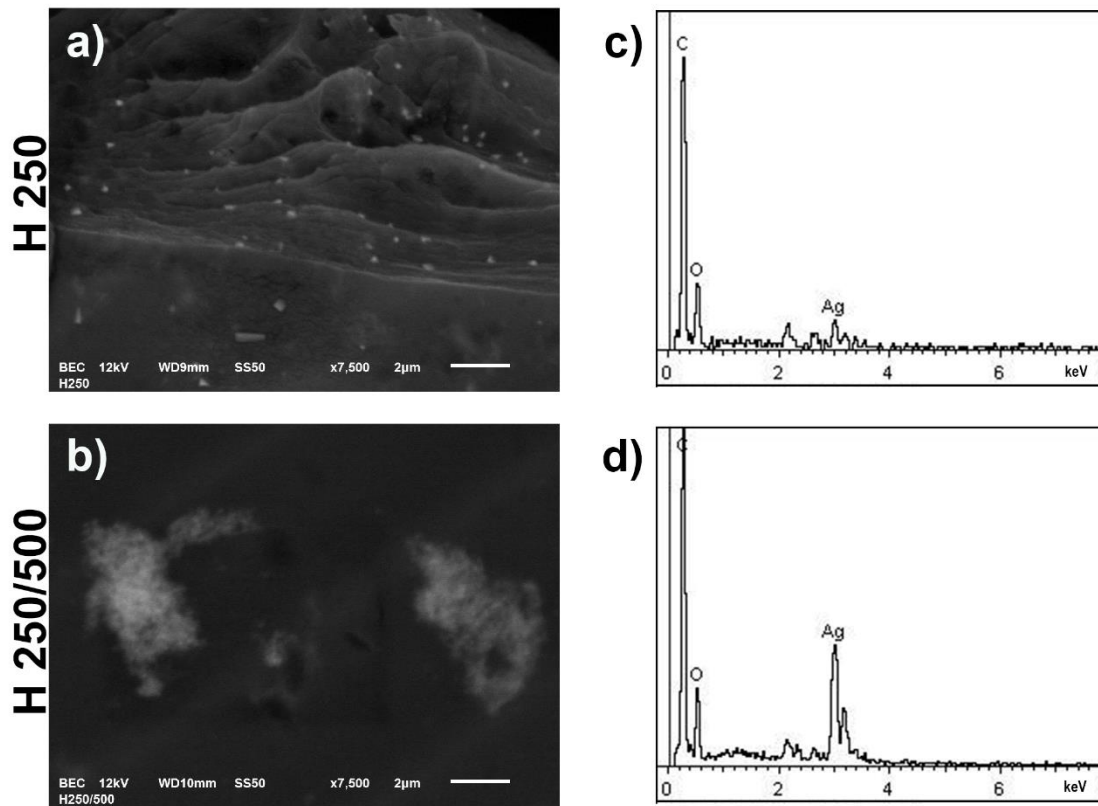


Fig. 6 Analysis by energy dispersive X-ray spectrometry (EDS). Figure shows representative micrographs taken in backscattering electron detector (BEC) of **a)** H 250 and **b)** H 250/500. Graphs show EDS analysis of **c)** H 250 and **d)** H 250/500.

3.3 Prevalence of CVC-related bloodstream infections

The results are shown in Table 2. Briefly, a total of 494 samples of CVC tips were processed, of which 163 (33 %) were positive for microbial growth, from which 131 (80 %) were mono-species microbial cultures. The most prevalent pathogens were coagulase-negative *Staphylococcus* (42 %), followed by *Candida* spp (12 %), *Pseudomonas* spp (11 %) and *Staphylococcus aureus* (11 %). On the other hand, only 20 % of the positive samples were multi-species microbial cultures, and the most frequent microbial consortia was Gram-positive cocci (GPC) with Gram-negative bacillus (GNB).

Table 2. Prevalence of isolated microorganisms from central venous catheter (CVC).

Processed samples	494
Samples with positive growth	163 (33%)
Mono-species	131 (80%)
GPC	
<i>Enterococcus</i> spp	4 (3%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	15 (11%)
CNS	55 (42%)
GNB	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	7 (5%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	2 (2%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4 (3%)
<i>Pseudomonas</i> spp	14 (11%)
Yeasts	
<i>Candida</i> spp	16 (12%)
Other bacteria	14 (11%)
Multi-species	32 (20%)
GPC / GPC	6 (19%)
GNB / GNB	3 (9%)
GPC / GNB	12 (38%)
GPC / Yeast	5 (16%)
GNB / Yeast	4 (13%)
GPC / GNB / Yeast	2 (6%)

CNS: coagulase-negative *Staphylococcus*; GPC: Gram-positive cocci; GNB: Gram-negative bacillus.

3.4 Clinical strains

All bacteria strains used in this study were multi-resistant and extensively drug-resistant microorganisms: carbapenem-resistant *A. baumannii*, *E. cloacae* resistant to beta-lactam antibiotics, vancomycin-resistant *E. faecium* and oxacillin-resistant *S. epidermidis* (Table S1).

3.5 Antibiofilm evaluation

The property of the chitosan hydrogels to inhibit biofilm formation was evaluated by the growth of multi-resistant clinical isolates. The results showed that the formulations have a different antibiofilm activity, depending on the concentration of antimicrobial agents (AgNPs and AMP), as well as bacteria strains tested (Fig. 7). In general, all chitosan hydrogels loaded with AgNPs and AMP were able to inhibit biofilm formation, however,

dramatically eradication of *E. cloacae* was only possible with the chitosan hydrogel that contained the highest concentrations of antimicrobial agents (H 250/500). Moreover, the CH showed a better antibiofilm activity that SSD.

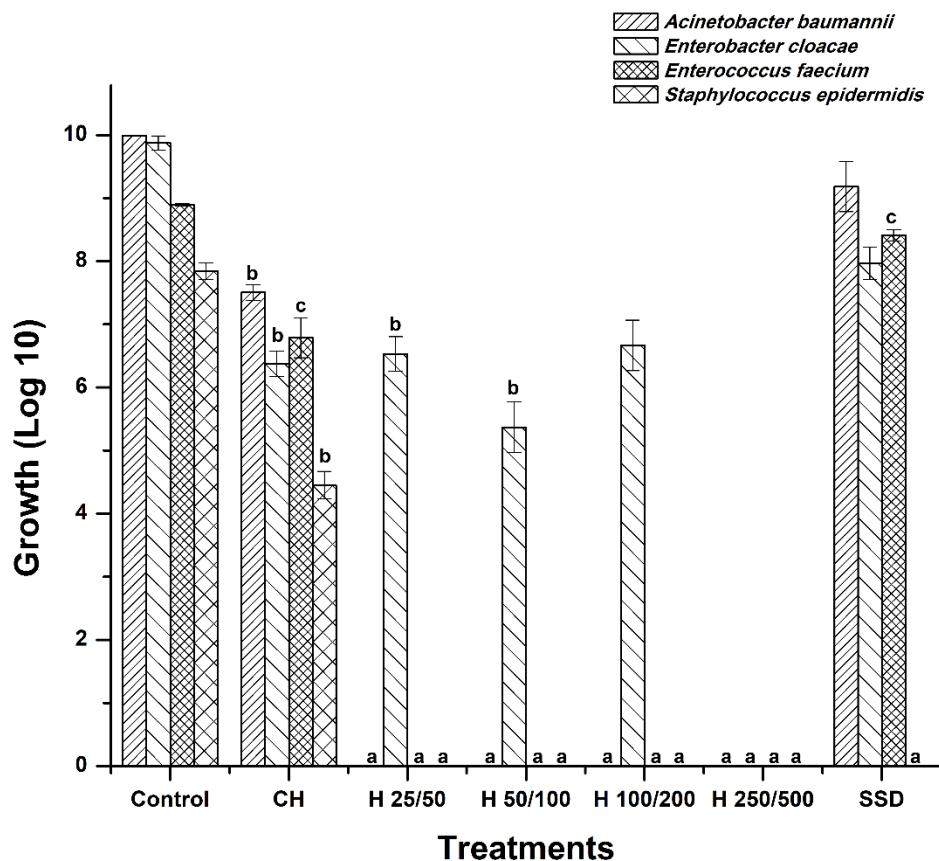


Fig. 7 Antibiofilm effect of different treatments. **a:** $p < 0.0001$, **b:** $p < 0.01$ and **c:** $p < 0.05$ vs control; AVOVA, Dunnett's T3 post-hoc.

3.6 Viability evaluation

The cytotoxic effect of the chitosan hydrogels was evaluated on HDF, using the calcein-EthD-1 assay (Fig. 8). The results revealed that the effect of the formulations on cell viability was independent of the concentration of antimicrobial agents (AgNPs and AMP). However, by increasing the concentration of AgNPs it is possible to see morphological changes in the cells (Fig. 8a). In general, all formulations at the concentration tested showed good biocompatibility with the HDF. At 24 h of culture, all

the formulations showed viability percentages higher than 95 %, while with the SSD, less than 1 % of the cells were viable (Fig. 8b). On the other hand, Fig. 8c shows that there were a higher number of dead cells with the CH than with the chitosan hydrogels containing AgNPs and AMP in their structure.

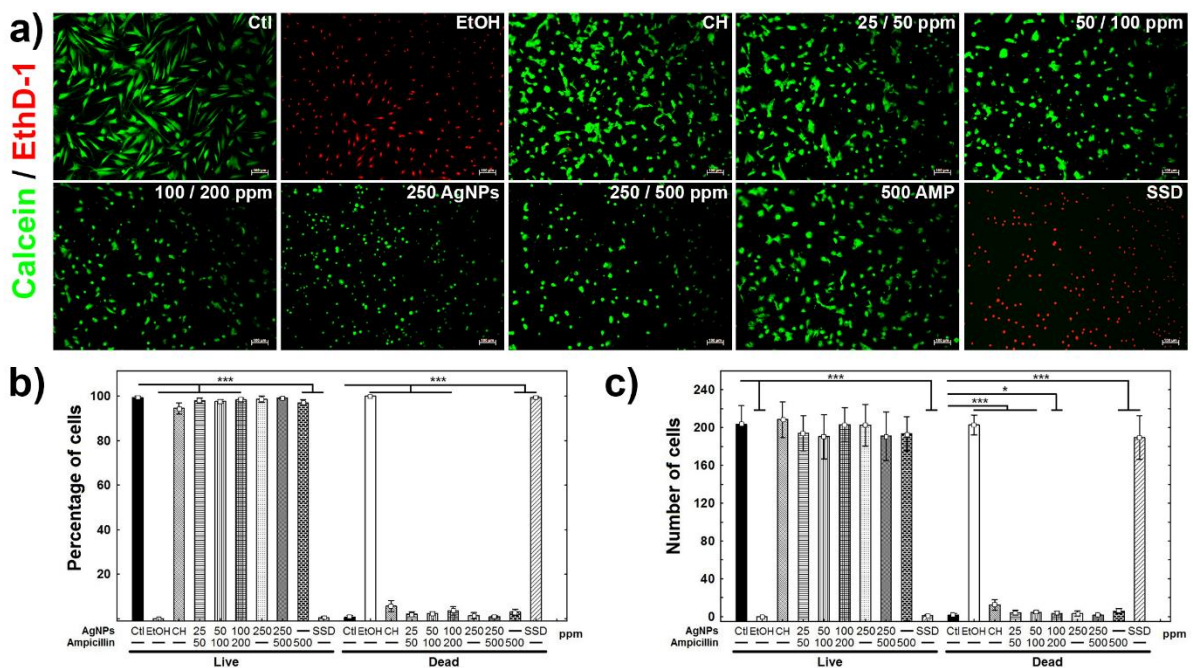


Fig. 8 Cell viability of human dermal fibroblasts (HDF) exposed to different treatments.

a) Representative micrographs of cell viability assays at 24 h of culture; live cells (calcein positive cells) are marked in green and dead cells (EthD-1 positive cells) are marked in red. **b)** Cell viability percentage for each experimental condition. **c)** Total number of cells (live and dead). * $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs control (CTL); AVOVA, Dunnett's T3 post-hoc.

4. Discussion

The treatment of infections related to medical devices represents a worldwide challenge due to its association with multidrug-resistant and biofilm producing bacteria. In order to prevent the microbial colonization of medical devices, several studies have proposed the development of materials with antimicrobial and antiadhesive properties⁽⁹⁾. In this context, hydrogels could be used as carrying systems of

antimicrobial agents⁽¹⁴⁾ and coating materials due to their biocompatibility characteristics⁽¹⁵⁾.

In the present study, the use of chitosan hydrogels loaded with AgNPs and AMP to prevent the formation of biofilms in their early stages was proposed. Both antimicrobial agents have been previously studied independently^(21, 26) and in combination^(24, 25, 27), however, this is the first study that incorporates AgNPs and AMP in a chitosan hydrogel with potential antibiofilm activity.

The AgNPs were synthesized by a chemical reduction method, obtaining particles with a hydrodynamic diameter of approximately 5 nm and a SPR of 413 nm (Fig. 1), characteristic of nanometric silver⁽²⁸⁾. Different concentrations of AgNPs and AMP were used for the preparation of the chitosan hydrogels (Table 1). The surface morphological characteristics of the chitosan hydrogels and the distribution of the AgNPs in these were studied using SEM. In general, the micrographs showed that the formulations were clear and cracked, and that the AgNPs were well distributed in the chitosan network (Fig. 5). EDS analysis was used to define the surface elemental composition of the observed particles, where portions of the sample that showed dense accumulation of particles were selected and magnified. The spectra revealed the presence of elemental peaks for carbon (C), oxygen (O) and silver (Ag) at ~0.2 keV, ~0.5 keV and ~3.0 keV, respectively. The peaks of C and O correspond to the chitosan matrix, whereas the Ag peak ensured the incorporation of AgNPs into the polymer network (Fig. 6). The rheological analysis showed that the viscosity of the chitosan hydrogels decreases with the increase of shear rate (Fig. 2), indicating a non-Newtonian pseudoplastic behavior, which is characteristic of polysaccharide solutions with high molecular weight⁽²⁹⁾. This behavior could be advantageous for its use on the surfaces of medical devices, by facilitating its application and avoiding the hydrogel to flow from the application site^(17, 30, 31). Furthermore, the rheograms showed that the incorporation of antimicrobial agents and the increase in temperature do not influence the viscosity of the chitosan hydrogels (Fig. 2b). On the other hand, the spectroscopic analysis (FTIR and Raman spectroscopy) was carried out to study the intermolecular interactions between the components of the formulations. When comparing the spectra,

no formation of new bands or absence of peaks were observed. Therefore, the results suggest that there are no covalent bonds between the antimicrobial agents and the chitosan network (Fig. 3 and 4). However, the AgNPs and the AMP could be interacting with the hydroxyl (OH) and amino (NH₂) functional groups of the polymer through hydrogen bonds⁽¹⁸⁾, which do not drastically alter the structure of the chitosan. Our results agree with that reported in previous studies, where the spectroscopic analysis revealed that metal nanoparticles (Au and Ag) do not form covalent bonds with the polymer network (chitosan-siloxane) or affect its structure⁽³²⁾.

The antibiofilm activity of chitosan hydrogels was studied against a panel of multi-resistant and extensively drug-resistant clinical isolates by the colony biofilm model. The SSD was chosen as a positive inhibition control, because it is one of the main antiseptics used in the coating of CVC^(6, 9, 10). The results showed that the CH had a greater antibiofilm effect than the SSD on the biofilms of *A. baumannii* ($p = 0.07$), *E. faecium* ($p < 0.05$) and *E. cloacae* ($p < 0.05$). On the other hand, the chitosan hydrogels formulated with AgNPs and AMP were able to dramatically inhibit the biofilm formation of *A. baumannii* (Log₁₀ reduction of 10 ± 0.01), *E. faecium* (Log₁₀ reduction of 8.9 ± 0.02) and *S. epidermidis* (Log₁₀ reduction of 7.8 ± 0.13). However, to inhibit the biofilm of *E. cloacae* (Log₁₀ reduction of 9.9 ± 0.11), the increase in the concentrations of antimicrobial agents was crucial (Fig. 7). Previous studies have reported the synthesis of chitosan gels loaded with different concentrations of isosorbide mononitrate (ISMN) and with a constant concentration of ciprofloxacin (CIP, 5 ppm). Their antibiofilm activity was studied by the colony biofilm model against *S. aureus* ATCC 25923. Results of this study showed that gels loaded only with ISMN (10 or 60 ppm) had better antimicrobial effects than chitosan gel without drugs (Log₁₀ reduction ~ 2.0). Moreover, a synergistic effect was found with the chitosan gel loaded with ISMN (60 ppm) and CIP against the biofilm of *S. aureus* ATCC 25923 (Log₁₀ reduction ~ 4.0)⁽³¹⁾. Other studies have described the synthesis of chitosan gels loaded with deferiprone (Def, 20 mM) and gallium-protoporphyrin IX (GaPP, 100 or 500 ppm), alone and in combination with CIP (5 ppm). Antibiofilm activity was studied by the colony biofilm model against a panel of Gram-positive bacteria (*S. aureus* ATCC 25923, a clinical isolate of *S. aureus* resistant

to methicillin and *S. epidermidis* ATCC 12228) and Gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* PA01, a clinical isolate of *P. aeruginosa* and *A. johnsonii* ATCC 17946). In general, the results showed that the gel loaded only with Def had low activity against all biofilms, while the gel loaded only with GaPP was concentration and sample dependent. On the other hand, the Def-GaPP combination was necessary to inhibit the growth of *P. aeruginosa* significantly (Log_{10} reduction of 3.3). The triple combination (Def-GaPP-CIP) exceeded the antibiofilm effect of the individual compounds⁽³³⁾. The differences in antibiofilm effect could be related to the type of microorganism, the volume of the inoculum, the agents embedded in the polymer matrix, as well as the volume of gel used to treat the biofilm. However, the results suggest that our formulations possess better antibiofilm effect and are biocompatible with HDF.

The use of other metal nanoparticles to inhibit the development of biofilms has also been investigated. Bermúdez-Jiménez *et al.* embedded gold nanorods (AuNRs) in a chitosan hydrogel and tested their antimicrobial activity against a multi-species biofilm of *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Streptococcus oralis* ATCC 25175. The results showed that the formulation was able to completely inhibit the multi-species biofilm (Log_{10} reduction of 10) when the microbial consortium in the presence of the hydrogel was irradiated with a laser adjusted at the near infrared spectrum⁽³⁴⁾. In this case, the differences in antibiofilm effect could be related to the type of metal, the shape of the nanoparticles and the use of photothermia.

In this study, the biocompatibility of the formulations was evaluated by calcein-EthD-1 assay on HDF. The results at 24 h showed that all chitosan hydrogels exhibited cell viability values higher than 95 %, while with SSD less than 1 % of the cells were viable. Previous studies have reported the cytotoxic effect of SSD on eukaryotic cells. Alvarado-Gomez *et al.* compared the biocompatibility of pluronic F-127-based gels loaded with different concentrations of AgNPs (62.5, 125 and 250 ppm) against the SSD. At 4 h of culture, the viability of the HDF with the gels was greater than 95 %, in contrast to the SSD which showed a high cytotoxic effect (18 %)⁽³⁵⁾. Perez-Diaz *et al.* also compared the cytotoxic effect of their chitosan gels loaded with different

concentrations of AgNPs (100, 250, 500 and 1000 ppm) against the SSD. Results of this study showed that the cytotoxicity of the gels on the HDF was dependent on the concentration of AgNPs. However, all the gels provided less cytotoxic effects than the SSD⁽¹⁹⁾. In our study, the increase in the concentrations of antimicrobial agents (AgNPs and AMP) did not affect the viability of the HDF. However, the cell morphology was altered with the increase of the concentration of AgNPs. The above results have been described in other studies, for example, Hernandez-Rangel *et al.* evaluated the biocompatibility of chitosan films with different concentrations of AgNPs on HDF during 2 and 8 days. The authors concluded that high concentrations of AgNPs (0.136 and 0.573 wt %) affect the fusiform shape of the HDF and their adhesion properties⁽³⁶⁾.

5. Conclusion

The formulated chitosan hydrogels were biocompatible with HDF and able to inhibit the formation of biofilms of multi-resistant microorganisms. Results suggest that the chitosan hydrogel with lower concentrations of antimicrobial agents (H 25/50) could be used as a prophylactic in patients with CVC, due to its broad-spectrum antimicrobial activity and biocompatibility with eukaryotic cells. However, more studies are needed to evaluate whether the change in the morphology of the HDF does not affect their cell proliferation.

Funding

This study was funded by the Investigation Support Fund (FAI by its Spanish acronym) of the Autonomous University of San Luis Potosi, Mexico with the code: C18-FAI-05-40.40, as well as the student had the Scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), grants: 628347.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

Supplementary materials

Table S1. Resistance profile of the set of clinical strains.

Antibiotic	MIC Breakpoints ($\mu\text{g/mL}$)			
	GNB		GPC	
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Amikacin	≥ 64 (R)	≤ 2 (S)	-	-
Ampicillin	-	≥ 32 (R)	≥ 32 (R)	-
Ampicillin/Sulbactam	≥ 32 (R)	≥ 32 (R)	-	-
Aztreonam	≥ 64 (R)	≥ 64 (R)	-	-
Cefazolin	-	≥ 64 (R)	-	-
Cefepime	≥ 64 (R)	≤ 1 (S)	-	-
Ceftriaxone	≥ 64 (R)	≥ 64 (R)	-	-
Ciprofloxacin	≥ 4 (R)	≤ 0.25 (S)	≥ 8 (R)	≥ 8 (R)
Clindamycin	-	-	-	≥ 4 (R)
Daptomycin	-	-	-	0.5 (S)
Doxycycline	-	-	1 (I)	2 (S)
Ertapenem	-	≤ 0.5 (S)	-	-
Erythromycin	-	-	≥ 8 (R)	≥ 8 (R)
Gentamicin	≥ 16 (R)	≤ 1 (S)	-	≥ 16 (R)
Levofloxacin	-	-	≥ 8 (R)	≥ 8 (R)
Linezolid	-	-	2 (S)	1 (S)
Meropenem	≥ 16 (R)	≤ 0.25 (S)	-	-
Moxifloxacin	-	-	-	4 (R)
Oxacillin	-	-	-	≥ 4 (R)
Piperacillin/Tazobactam	≥ 128 (R)	≥ 128 (R)	-	-
Rifampicin	-	-	-	≤ 0.5 (S)
Tetracycline	-	-	≥ 16 (R)	4 (S)
Tigecycline	2 (S)	2 (S)	≤ 0.12 (S)	≤ 0.12 (S)
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	160 (R)	≤ 20 (S)	-	80 (R)
Vancomycin	-	-	≥ 32 (R)	1 (S)

GNB: Gram-negative bacillus; GPC: Gram-positive cocci

MIC: Minimal Inhibitory Concentration; S: Susceptible; I: Intermediate; R: Resistant

References

1. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(5):371-87.
2. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(2):167-93.
3. Zhang L, Keogh S, Rickard CM. Reducing the risk of infection associated with vascular access devices through nanotechnology: a perspective. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:4453-66.
4. Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ, De Angelis G, Falcone M, Frank U, et al. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20 Suppl 1:1-55.
5. Roberts CG. The role of biofilms in reprocessing medical devices. *Am J Infect Control.* 2013;41(5 Suppl):S77-80.
6. Gominet M, Compain F, Beloin C, Lebeaux D. Central venous catheters and biofilms: where do we stand in 2017? *APMIS.* 2017;125(4):365-75.
7. Percival SL, Suleman L, Vuotto C, Donelli G. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *J Med Microbiol.* 2015;64(Pt 4):323-34.
8. Chen YM, Dai AP, Shi Y, Liu ZJ, Gong MF, Yin XB. Effectiveness of silver-impregnated central venous catheters for preventing catheter-related blood stream infections: a meta-analysis. *Int J Infect Dis.* 2014;29:279-86.
9. Schulz S, Maitz M, Hänsel S, Renner LD, Werner C. Analyzing the antiseptic capacity of silver-functionalized poly(ethylene glycol)-heparin hydrogels after human whole blood exposure. *Biomater Sci.* 2018;6(5):1129-39.
10. Esposito S, Purrello SM, Bonnet E, Novelli A, Tripodi F, Pascale R, et al. Central venous catheter-related biofilm infections: An up-to-date focus on meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Glob Antimicrob Resist.* 2013;1(2):71-8.

11. Ribeiro SM, Felício MR, Boas EV, Gonçalves S, Costa FF, Samy RP, et al. New frontiers for anti-biofilm drug development. *Pharmacol Ther.* 2016;160:133-44.
12. Veiga AS, Schneider JP. Antimicrobial hydrogels for the treatment of infection. *Biopolymers.* 2013;100(6):637-44.
13. Gaharwar AK, Peppas NA, Khademhosseini A. Nanocomposite hydrogels for biomedical applications. *Biotechnol Bioeng.* 2014;111(3):441-53.
14. González-Henríquez CM, Sarabia-Vallejos MA, Rodríguez-Hernandez J. Advances in the Fabrication of Antimicrobial Hydrogels for Biomedical Applications. *Materials (Basel).* 2017;10(3).
15. Hamedí H, Moradi S, Hudson SM, Tonelli AE. Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. *Carbohydr Polym.* 2018;199:445-60.
16. Jamil B, Imran M. Factors pivotal for designing of nanoantimicrobials: an exposition. *Crit Rev Microbiol.* 2018;44(1):79-94.
17. C. Sámano-Valencia GAM-C, F. Martínez-Gutiérrez, F. Ruiz, J. F. Toro-Vázquez, J. A. Morales-Rueda, L. F. Espinosa-Cristóbal, N. V. Zavala Alonso, and N. Niño Martínez. Characterization and Biocompatibility of Chitosan Gels with Silver and Gold Nanoparticles. *Journal of Nanomaterials.* 2014;2014:11.
18. Xie Y, Liao X, Zhang J, Yang F, Fan Z. Novel chitosan hydrogels reinforced by silver nanoparticles with ultrahigh mechanical and high antibacterial properties for accelerating wound healing. *Int J Biol Macromol.* 2018;119:402-12.
19. Pérez-Díaz M, Alvarado-Gomez E, Magaña-Aquino M, Sánchez-Sánchez R, Velasquillo C, Gonzalez C, et al. Anti-biofilm activity of chitosan gels formulated with silver nanoparticles and their cytotoxic effect on human fibroblasts. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016;60:317-23.
20. Slavin YN, Asnis J, Häfeli UO, Bach H. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J Nanobiotechnology.* 2017;15(1):65.
21. Martínez-Gutierrez F, Thi EP, Silverman JM, de Oliveira CC, Svensson SL, Vanden Hoek A, et al. Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine.* 2012;8(3):328-36.

22. Wan G, Ruan L, Yin Y, Yang T, Ge M, Cheng X. Effects of silver nanoparticles in combination with antibiotics on the resistant bacteria *Acinetobacter baumannii*. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:3789-800.
23. Thomas R, Nair AP, Kr S, Mathew J, Ek R. Antibacterial activity and synergistic effect of biosynthesized AgNPs with antibiotics against multidrug-resistant biofilm-forming coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014;173(2):449-60.
24. Deng H, McShan D, Zhang Y, Sinha SS, Arslan Z, Ray PC, et al. Mechanistic Study of the Synergistic Antibacterial Activity of Combined Silver Nanoparticles and Common Antibiotics. *Environ Sci Technol*. 2016;50(16):8840-8.
25. Lopez-Carrizales M, Velasco KI, Castillo C, Flores A, Magaña M, Martinez-Castanon GA, et al. In Vitro Synergism of Silver Nanoparticles with Antibiotics as an Alternative Treatment in Multiresistant Uropathogens. *Antibiotics (Basel)*. 2018;7(2).
26. Li WR, Xie XB, Shi QS, Zeng HY, Ou-Yang YS, Chen YB. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;85(4):1115-22.
27. Hur YE, Kim S, Kim J-H, Cha S-H, Choi M-J, Cho S, et al. One-step functionalization of gold and silver nanoparticles by ampicillin. *Materials Letters*. 2014;129:185 - 90.
28. Tauran Y, Brioude A, Coleman AW, Rhimi M, Kim B. Molecular recognition by gold, silver and copper nanoparticles. *World J Biol Chem*. 2013;4(3):35-63.
29. Gong J, Wang L, Wu J, Yuan Y, Mu R-J, Du Y, et al. The rheological and physicochemical properties of a novel thermosensitive hydrogel based on konjac glucomannan/gum tragacanth. *LWT-FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY*. 2019;100:271-7.
30. Nascimento EG, Sampaio TB, Medeiros AC, Azevedo EP. Evaluation of chitosan gel with 1% silver sulfadiazine as an alternative for burn wound treatment in rats. *Acta Cir Bras*. 2009;24(6):460-5.

31. Hasan S, Thomas N, Thierry B, Prestidge CA. Controlled and Localized Nitric Oxide Precursor Delivery From Chitosan Gels to Staphylococcus aureus Biofilms. *J Pharm Sci.* 2017;106(12):3556-63.
32. Ryan C, Alcock E, Buttimer F, Schmidt M, Clarke D, Pemble M, et al. Synthesis and characterisation of cross-linked chitosan composites functionalised with silver and gold nanoparticles for antimicrobial applications. *Sci Technol Adv Mater.* 2017;18(1):528-40.
33. Richter K, Thomas N, Claeys J, McGuane J, Prestidge CA, Coenye T, et al. A Topical Hydrogel with Deferiprone and Gallium-Protoporphyrin Targets Bacterial Iron Metabolism and Has Antibiofilm Activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(6).
34. Bermúdez-Jiménez C, Niño-Martínez N, Patiño-Marín N, Martínez-Gutiérrez F, Ruiz F, Bach H, et al. Effective control of biofilms by photothermal therapy using a gold nanorod hydrogel. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2019.
35. Alvarado-Gomez E, Martínez-Castañón G, Sanchez-Sanchez R, Ganem-Rondero A, Yacaman MJ, Martinez-Gutierrez F. Evaluation of anti-biofilm and cytotoxic effect of a gel formulation with Pluronic F-127 and silver nanoparticles as a potential treatment for skin wounds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2018;92:621-30.
36. Hernández-Rangel A, Silva-Bermudez P, España-Sánchez BL, Luna-Hernández E, Almaguer-Flores A, Ibarra C, et al. Fabrication and in vitro behavior of dual-function chitosan/silver nanocomposites for potential wound dressing applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019;94:750-65.