UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLÓGICAS - CIEP

"EFECTO ANTIMICROBIANO, CITOTÓXICO Y POTENCIAL ANDAMIO DE COBERTURAS POLIMÉRICAS NANOESTRUCTURADAS COMO ALTERNATIVA DE TRATAMIENTO EN HERIDAS DE LA PIEL"

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS FARMACOBIOLÓGICAS

PRESENTA

López Carrizales Montserrat

Director de tesis
Dr. Fidel Martínez Gutiérrez

Co-directora de tesis
Dra. Esmeralda Mendoza Mendoza

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

San Luis Potosí, S.L.P., México
Octubre 2023

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Este proyecto se realizó en el “Laboratorio de Antimicrobianos, Biopelículas y Microbiota” y en el “Laboratorio de Materiales Avanzados” adscritos a la Facultad de Ciencias Químicas, en el periodo comprendido entre agosto del 2019 y agosto del 2023, bajo la dirección del Dr. Fidel Martínez Gutiérrez y la Dra. Esmeralda Mendoza Mendoza, y fue apoyado por el Fondo de Apoyo de Investigación (FAI) de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), clave del proyecto: C18-FAI-05-40.40 y el financiamiento parcial se realizó a través del proyecto CONAHCyT con referencia CB-2016-285350, además del apoyo para “Acciones de Mantenimiento de Infraestructura Científica”, Laboratorio Nacional de Micro y Nanofluídica, LNMyNF”, proyecto 314907.

El programa de Doctorado en Ciencias Farmacobiológicas de la UASLP pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de Calidad (SNP) del CONHACyT, registro 003383; nivel: en desarrollo. Número de registro de la beca otorgada por CONAHCyT: 755524.



Efecto antimicrobiano, citotóxico y potencial andamio de coberturas poliméricas nanoestructuradas como alternativa de tratamiento en heridas de la piel © 2023 by Montserrat López Carrizales is licensed under CC BY-NC-ND 4.0.

REPORTE DE SIMILITUD

El presente trabajo fue sometido a análisis de similitud en la plataforma "turnitin" (https://www.turnitin.com/es). El informe de originalidad reportó un 16 % de similitud.

EFECTO ANTIMICROBIANO, CITOTÓXICO Y POTENCIAL ANDAMIO DE COBERTURAS POLIMÉRICAS NANOESTRUCTURADAS COMO ALTERNATIVA DE TRATAMIENTO EN HERIDAS DE LA PIEL

INFORME DE ORIGINALIDAD

16%

ÍNDICE DE SIMILITUD

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLÓGICAS - CIEP

"EFECTO ANTIMICROBIANO, CITOTÓXICO Y POTENCIAL ANDAMIO DE COBERTURAS POLIMÉRICAS NANOESTRUCTURADAS COMO ALTERNATIVA DE TRATAMIENTO EN HERIDAS DE LA PIEL"

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS FARMACOBIOLÓGICAS

PRESENTA

López Carrizales Montserrat

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR: DR. FIDEL MARTÍNEZ GUTIÉRREZ _____

CO-DIRECTORA: DRA. ESMERALDA MENDOZA MENDOZA _____

ASESORA: DRA. DIANA PATRICIA PORTALES PÉREZ _____

ASESOR: DR. ROBERTO SÁNCHEZ SÁNCHEZ _____

ASESOR: DR. RENÉ DARÍO PERALTA RODRÍGUEZ _____

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

San Luis Potosí, S.L.P., México
Octubre 2023

San Luis Potosí, S.L.P. a 11 de octubre del 2023

Comité Académico
Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas
Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP

Por medio de la presente comunicamos a ustedes que la tesis llevada a cabo por la alumna de Doctorado **Montserrat López Carrizales**, titulada ***"Efecto antimicrobiano, citotóxico y potencial andamio de coberturas poliméricas nanoestructuradas como alternativa de tratamiento en heridas de la piel"*,** ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para iniciar los trámites correspondientes para su titulación. El examen de grado tendrá lugar el 23 de octubre del 2023 a las 17:00 h, en el auditorio chico (G203) de la facultad.

Atentamente

_____

Dr. Fidel Martínez Gutiérrez
Director de tesis
Facultad de Ciencias Químicas
UASLP

_____

Dra. Esmeralda Mendoza Mendoza
Co-directora de tesis
Facultad de Ciencias Químicas
UASLP

_____

Dra. Diana Patricia Portales Pérez
Asesora
Facultad de Ciencias Químicas
UASLP

_____

Dr. Roberto Sánchez Sánchez
Asesor
Instituto Nacional de Rehabilitación
"Luis Guillermo Ibarra Ibarra"

_____

Dr. René Darío Peralta Rodríguez
Asesor
Centro de Investigación en Química Aplicada

RESTRICCIONES DE USO

DERECHOS RESERVADOS

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en este trabajo de tesis está protegido por la Ley Federal de Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos.

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo, mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto o con fines de lucro, reproducción, edición o modificación será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por la beca y financiamiento otorgados para el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Fidel Martínez Gutiérrez por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación y apoyarme constantemente con asesorías y evaluaciones, así como vincularme con otros grupos de investigación para crecer profesionalmente.

A la Dra. Esmeralda Mendoza Mendoza por recibirme en su grupo de investigación, y apoyarme con el diseño y desarrollo de la parte experimental del proyecto, así como asesorarme en la discusión de resultados.

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 siempre mostrar interés en el proyecto, y por su disponibilidad de tiempo para reunirnos por videoconferencia para discutir la metodología y resultados durante las diferentes etapas del proyecto.

Al Dr. René Darío Peralta Rodríguez por estar siempre al pendiente de mi trabajo y brindarme su asesoría durante todos estos años. Asimismo, le agradezco que haya concretado mi estancia de investigación en el Centro de Investigación en Química Aplicada en la unidad Apodaca con la Dra. Mayeli Estrada Villegas.

A la Dra. Mayeli Estrada Villegas por haberme recibido en su laboratorio y permitirme elaborar mis coberturas poliméricas electrohiladas.

Al Dr. Hiram Joazet Ojeda Galván por el tiempo invertido en el asesoramiento y apoyo con la técnica de espectroscopía Raman, espectroscopía de infrarrojo y microscopía electrónica de transmisión.

A la Dra. Sonia por asesorarme con las técnicas de espectrofotometría UV-Visible.

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”.

Asimismo, agradezco a las siguientes personas por haberme brindado apoyo técnico durante la elaboración de mi proyecto de tesis.

- Laura Guadalupe Hernández de la Rosa, absorción atómica, FCQ.
- Gloria Korina Loredo Martínez, absorción atómica, FCQ.
- Gladis Yakeline Cortez Mazatán, CIQA.
- Jesús Alfonso Cepeda, microscopía de barrido, CIQA.
- Dr. Joelis Rodríguez Hernández, difracción de rayos-X, CIQA.
- Dr. Mario Alberto Pérez Díaz, ensayos de citotoxicidad, INR.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Dios, por permitirme concluir exitosamente una etapa más en mi vida.

A mis padres Martín López y Leticia Carrizales, por su amor incondicional, por creer en mí y apoyar cada una de mis decisiones.

A mis hermanos menores Diana, Gustavo y Benjamín, por apoyarme siempre y amarme incondicionalmente.

Al Dr. Fidel, por todos estos años de aprendizaje, por haberme abierto las puertas de su laboratorio y mostrarme lo hermosa que es la investigación, asimismo, le agradezco que haya confiado en mi trabajo y que constantemente me impulse a superarme personal y profesionalmente.

Al Dr. René, por contagiarme su entusiasmo por la investigación, por ser un ejemplo de fortaleza y disciplina, y por haberme brindado excelentes consejos que llevaré conmigo durante el resto de mi vida.

Al Dr. Mario Pérez, por haberme enseñado y apoyado con las técnicas de citotoxicidad, asimismo, por siempre estar en la mejor disposición para reunirnos y discutir los resultados de los experimentos.

A mis amigos Camila y Abraham, quienes me hicieron sentir como en casa durante mi estancia en Monterrey.

Resumen

Las coberturas electrohiladas de alcohol polivinílico (PVA) son materiales prometedores para su aplicación en curación de heridas e ingeniería de tejidos, debido a que son biocompatibles con células humanas. Sin embargo, la baja estabilidad en agua de estas coberturas ha limitado su uso en el área biomédica. En este estudio se prepararon novedosas coberturas electrohiladas de PVA las cuales fueron reticuladas térmicamente (150 °C por 24 h) y caracterizadas por diferentes técnicas analíticas y cargadas con nanopartículas de óxido de plata (Ag_2ONPs) e hidrocloruro de ciprofloxacina (CIP) de manera independiente y en combinación. El comportamiento de liberación de las Ag_2ONPs y CIP se estudió por espectroscopía de absorción atómica y espectrofotometría UV-Visible, respectivamente. La actividad antimicrobiana de las coberturas se evaluó por el ensayo de curvas de letalidad contra cepas de referencia y bacterias multidrogorresistentes (MDR). La biocompatibilidad se determinó sobre fibroblastos dérmicos humanos (FDH) por el método de calceína/homodímero de etidio y el ensayo de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Los resultados mostraron que el tratamiento de reticulación incrementó la temperatura de fusión y la cristalinidad de los materiales, así como su estabilidad en agua. Se encontró que el diámetro promedio de fibra de la cobertura de PVA sin agentes antimicrobianos fue de 412.50 nm y que la adición de CIP incrementó el diámetro. El análisis por difracción de rayos X confirmó la presencia de Ag_2ONPs en las coberturas poliméricas, y los espectros de infrarrojo sugirieron que los agentes antimicrobianos interactúan con el PVA mediante fuerzas de Van der Waals. Las cinéticas de liberación mostraron que el CIP tiene una liberación tipo ráfaga durante los primeros 30 min, seguido de una liberación sostenida, mientras que la concentración máxima de Ag en buffer de fosfatos se alcanzó a las 2 h de inmersión. Se encontró que la cobertura cargada con la combinación de Ag_2ONPs y CIP tiene un efecto sinérgico al requerirse menores concentraciones de los agentes antimicrobianos, así como menor tiempo para inhibir el crecimiento de bacterias MDR en comparación con sus similares cargadas únicamente con Ag_2ONPs o CIP. Además, las coberturas son biocompatibles con los FDH al no alterar su morfología ni metabolismo mitocondrial, lo cual sugiere que estos materiales podrían ser utilizados como andamios celularizados para el tratamiento de heridas abiertas de la piel.

Palabras clave:

Actividad antimicrobiana, citotoxicidad, electrohilado, nanopartículas de óxido de plata, síntesis de química verde.

Abstract

Polyvinyl alcohol (PVA) electrospun membranes are promising materials for application in wound healing and tissue engineering because they are biocompatible with human cells. However, the poor stability in aqueous medium of these membranes has limited their use in the biomedical area. In this study, novel electrospun PVA membranes thermally crosslinked (150 °C for 24 h) and characterized by different analytical techniques were loaded with silver oxide nanoparticles (Ag_2ONPs) and ciprofloxacin hydrochloride (CIP) prepared independently and in combination. The release behavior of Ag_2ONPs and CIP was studied by atomic absorption spectroscopy and UV-Visible spectrophotometry, respectively. The antimicrobial activity of the membranes was evaluated by the time-kill assay against reference strains and multidrug resistant (MDR) bacteria. Biocompatibility was determined on human dermal fibroblasts (HDF) by the calcein/ethidium homodimer method and the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazole bromide (MTT) assay. The results showed that the crosslinking treatment increased the melting temperature and crystallinity of the materials, as well as their stability in water. It was found that the average fiber diameter of the PVA membrane without antimicrobial agents was 412.50 nm, and that the addition of CIP increased the diameter. X-ray diffraction analysis confirmed the presence of Ag_2ONPs in the polymeric membranes, and infrared spectra suggested that antimicrobial agents interact with PVA through Van der Waals forces. The release kinetics of CIP from the electrospun membranes showed a burst release during the first 30 min followed by a sustained release, while the maximum Ag concentration in phosphate buffer was reached after 2 h of immersion. It was found that the PVA electrospun membranes loaded with the combination of Ag_2ONPs and CIP, have a synergistic effect since lower concentrations of antimicrobial agents are required, as well as shorter time to inhibit the growth of MDR bacteria compared to their counterparts loaded only with Ag_2ONPs or CIP. Furthermore, the membranes are biocompatible with HDF since they do not alter neither morphology nor mitochondrial metabolism, suggesting that these materials could be used as cellularized scaffolds for wounds treatment.

Keywords:

Antimicrobial activity, cytotoxicity, electrospinning, silver oxide nanoparticles, green synthesis.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 1

2. ANTECEDENTES 3

3. JUSTIFICACIÓN 8

4. HIPÓTESIS 8

5. OBJETIVO GENERAL 8

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 8

7. MATERIALES Y MÉTODOS 9

7.1 Síntesis de las Ag_2ONPs. 9

7.2 Caracterización de las Ag_2ONPs. 10

7.3 Cepas de referencia y aislados clínicos para la evaluación de las Ag_2ONPs y antibióticos comerciales. 11

7.4 Estudio de la actividad antimicrobiana de las Ag_2ONPs y antibióticos comerciales. 12

7.4.1 Estandarización de la técnica. 12

7.4.2 Ensayo de CMI. 12

7.5 Estudio de la combinación de Ag_2ONPs con antibióticos comerciales. 13

7.6 Evaluación del efecto citotóxico de las Ag_2ONPs de forma independiente y en combinación con antibióticos comerciales. 14

7.6.1 Ensayo de calceína/EthD-1. 14

7.6.2 Ensayo de MTT 15

7.7 Coberturas poliméricas nanoestructuradas. 15

7.7.1 Preparación de las soluciones y dispersiones de electrohilado. 15

7.7.2 Electrohilado. 16

7.7.3 Técnica de reticulación. 17

7.8 Caracterización de las coberturas poliméricas. 17
7.9 Liberación *in vitro* de los agentes antimicrobianos de las coberturas poliméricas nanoestructuradas. 18
7.9.1 Eficiencia de carga y perfil de liberación de CIP. 18
7.9.2 Liberación *in vitro* de Ag..... 19
7.10 Análisis de las cinéticas de liberación y modelado. 20
7.11 Aislados clínicos utilizados para la evaluación de las coberturas poliméricas nanoestructuradas. 20
7.12 Estudio de la actividad antimicrobiana de las coberturas poliméricas nanoestructuradas. 21
7.13 Estudio del efecto citotóxico de las coberturas poliméricas nanoestructuradas. . 22
7.13.1 Evaluación indirecta de la citotoxicidad. 22
7.13.2 Ensayo de biocompatibilidad. 22
7.14 Análisis estadístico. 23
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 23
8.1 Síntesis y caracterización de las Ag_2ONPs. 23
8.1.1 Potencial zeta. 23
8.1.2 XRD. 23
8.1.3 TEM. 24
8.1.4 Espectroscopia Raman. 26
8.1.5 Espectroscopia FT-IR. 26
8.2 Aislados clínicos. 28
8.3 Actividad antimicrobiana de los agentes antimicrobianos en suspensión. 30
8.4 Actividad sinérgica entre las Ag_2ONPs y antibióticos comerciales. 33
8.5 Efecto citotóxico de los agentes antimicrobianos en suspensión. 40
8.5.1 Ensayo de calceína/EthD-1. 40

8.5.2 Ensayo de MTT..... 43
8.6 Preparación y caracterización de las coberturas poliméricas nanoestructuradas.. 45
8.6.1 DSC. 45
8.6.2 SEM y EDS. 47
8.6.3 XRD. 50
8.6.4 FT-IR..... 51
8.7 Liberación de agentes antimicrobianos de las coberturas poliméricas nanoestructuradas. 53
8.7.1 Eficiencia de carga y perfil de liberación de CIP. 53
8.7.2 Liberación *in vitro* de Ag..... 55
8.8 Cinéticas de liberación de CIP y ajustes a modelos cinéticos de liberación. 56
8.9 Actividad antimicrobiana de las coberturas poliméricas nanoestructuradas. 57
8.10 Biocompatibilidad de las coberturas poliméricas nanoestructuradas. 60
8.10.1 Evaluación indirecta del efecto citotóxico. 60
8.10.2 Ensayo de biocompatibilidad. 63
9. CONCLUSIONES 65
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 67
11. ANEXOS..... 77
11.1 Productividad académica. 77
11.1.1 Publicación de artículo científico. 77
11.1.2 Divulgación científica. 77
12. GLOSARIO 78

1. INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y su función principal es proteger al organismo de factores externos. La pérdida de la integridad de la piel causa heridas abiertas [1], las cuales pueden ser clasificadas con base en la duración del proceso de cicatrización en agudas y crónicas. Las heridas agudas ocurren después de un trauma o cirugía y su proceso de curación oscila entre cinco y diez días, mientras que las heridas que no cicatrizan en un periodo de treinta días son denominadas crónicas [2]. Las heridas abiertas pueden ser contaminadas por patógenos o microorganismos oportunistas, los cuales impiden el proceso de cicatrización y comprometen la salud de los pacientes al incrementar el riesgo de infección sistémica e incluso la muerte [3]. Se estima que cada año alrededor de 11 millones de personas en el mundo mueren a causa de sepsis, lo que representa aproximadamente el 20 % de las muertes globales [4]. El tratamiento clásico de las heridas crónicas incluye el debridamiento de la herida y la aplicación tópica de agentes antimicrobianos [5, 6]. Sin embargo, el primer procedimiento está asociado con complicaciones como sangrado y dolor, mientras que la principal desventaja del uso de antibióticos, en el contexto de la cicatrización tardía de la herida, es el aumento del riesgo de la resistencia bacteriana [7], la cual causa aproximadamente 700,000 muertes al año a nivel mundial y se estima que para 2050 la cifra incrementará a 10 millones de muertes por año [8, 9]. Otra estrategia empleada para la curación de heridas crónicas es el uso de apósitos, los cuales sirven para cubrir y proteger la herida de la contaminación por patógenos y prevenir el proceso infeccioso. En la actualidad, existe una amplia gama de productos disponibles en el mercado; sin embargo, la mayoría de estos apósitos siguen teniendo limitaciones como propiedades mecánicas inadecuadas, debilidad en términos de adherencia y elasticidad, así como escasa actividad antimicrobiana [10]. En este contexto, los materiales elaborados a base de nanofibras (incluyendo membranas, películas, coberturas y andamios) han ganado interés por su gran área superficial específica y alta porosidad, además de sus propiedades mecánicas mejoradas y posibilidad de administración de fármacos. Se definen como nanofibras aquellas estructuras

cilíndricas cuyo diámetro exterior es inferior a 1000 nm y relación de aspecto (largo – ancho) superior a 50 [2]; esta definición se utilizará en este trabajo. Existen diferentes métodos para preparar nanofibras: soplado en fusión, separación de fases, autoensamblaje, síntesis por plantilla y electrohilado [11]. Este último, es el método empleado principalmente, debido a que permite el control de morfología, el diámetro y la porosidad, a través de la modificación de los parámetros de solución, proceso y ambientales [10, 11]. Para la elaboración de las nanofibras pueden utilizarse polímeros naturales o sintéticos, solos o en mezclas [12]. Algunas aplicaciones biomédicas que han sido propuestas para estos materiales incluyen la elaboración de gasas para heridas, sistemas de liberación y regeneración de tejidos [13].

El alcohol polivinílico (PVA) es uno de los polímeros sintéticos más utilizados en la fabricación de nanofibras, debido a sus propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad. Sin embargo, su solubilidad en agua limita su aplicación como apósito para heridas, por lo que suele recurrirse a alguna técnica de reticulación [14, 15], por ejemplo, el tratamiento térmico, el cual mejora la integridad de su estructura [16, 17]. Además, las nanofibras pueden ser cargadas con diferentes agentes bioactivos para mejorar sus resultados terapéuticos [11]. Algunos ejemplos de moléculas que han sido incorporadas en estos materiales son antimicrobianos de amplio espectro como CIP [18, 19], y nanopartículas (NPs) metálicas [11] y de óxidos metálicos [20].

En este estudio, se reporta la preparación de novedosas coberturas poliméricas nanoestructuradas de doble capa, las cuales inhiben el crecimiento de bacterias multidrogorresistentes (MDR) y son biocompatibles con células humanas. Las coberturas fueron elaboradas por la técnica de electrohilado utilizando como matriz polimérica el PVA. Los materiales cargados con las nanopartículas de óxido de plata (Ag_2ONPs) y/o hidrocloruro de ciprofloxacina (CIP) se prepararon en dos etapas para obtener coberturas de doble capa; la primera de ellas (capa inferior) está compuesta únicamente de PVA, mientras que la segunda capa de PVA (o capa superior) está cargada con los agentes antimicrobianos de forma independiente o en combinación. Las coberturas fueron reticuladas mediante tratamiento térmico y, posteriormente,

caracterizadas por calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés), microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés), difracción de rayos X (XRD, por sus siglas en inglés) y espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés). Asimismo, se estudió la liberación *in vitro* de las Ag_2ONPs y CIP por espectroscopia de absorción atómica (AAS, por sus siglas en inglés) y espectrofotometría UV-visible, respectivamente. El efecto antibacteriano de los materiales se evaluó contra cepas de referencia y aislados clínicos MDR mediante el ensayo de curvas de letalidad. Además, se estudió la biocompatibilidad de las coberturas sobre fibroblastos dérmicos humanos (FDH) por el método de calceína/homodímero de etidio (EthD-1, por sus siglas en inglés) y el ensayo de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).

2. ANTECEDENTES

En la actualidad, el tratamiento de los procesos infecciosos representa un desafío, debido al incremento de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos, la cual incluye cepas aisladas de pacientes hospitalizados, así como aislamientos de pacientes atendidos en la comunidad. En ambos escenarios, las infecciones de heridas de la piel tienen una prevalencia importante [21]. Por esta razón, se han propuesto alternativas de terapias antimicrobianas, entre las cuales se encuentran el estudio de extractos naturales, productos de síntesis química, péptidos antimicrobianos, bacteriófagos y el uso de la nanotecnología [22-24]. Esta última es una herramienta de interés para el desarrollo de materiales con aplicaciones biomédicas, debido a las propiedades antimicrobianas intrínsecas que poseen algunas NPs o por su función como vehículos para el transporte de fármacos [24-26].

Los principales métodos utilizados para la síntesis de NPs incluyen métodos físicos y químicos; sin embargo, el uso de estos enfoques tiene múltiples desventajas al ser procesos costosos, generar subproductos tóxicos, requerir un alto consumo de energía y tener bajo rendimiento químico [27, 28]. Por ello, una alternativa es el uso de rutas de síntesis de química verde, las cuales han mostrado ser simples, fáciles de escalar y amigables con el medio ambiente, debido a que no generan subproductos químicos

tóxicos ni requieren alto consumo de energía [29, 30]. La metátesis activada por molienda mecánica es una técnica que cumple con los principios de la química verde y es utilizada para la síntesis de NPs de óxidos metálicos [31]. En los últimos años, las Ag_2ONPs han ganado interés en el área biomédica por sus efectos antimicrobianos [32-40] y cicatrizantes [33]. Se ha reportado la síntesis de Ag_2ONPs empleando métodos químicos [32, 34] y físicos [35]. En 2020, Khandan y cols. sintetizaron una mezcla de NPs de Ag y Ag_2O (Ag/Ag_2O-NPs), empleando el método sol-gel y el uso de gelatina como agente estabilizador. La actividad antibacteriana se estudió sobre cepas de referencia por el método de difusión en agar, y los resultados mostraron que las Ag/Ag_2O-NPs tienen mejor actividad contra las bacterias Gram negativas [32]. Sin embargo, la ventaja de usar métodos verdes para la síntesis de las Ag_2ONPs es porque incluye diferentes agentes estabilizantes y reductores de fuentes biológicas como plantas medicinales tales como *Lippia citriodora* [33], hoja de amaranto verde [36], *Ficus benghalensis* [37], *Artocarpus heterophyllus* [38], *Centella asiática* y Tridax [39], así como diferentes microorganismos tales como *Kitasatospora albolonga* [40] y *Xanthomonas* sp [41]. De manera interesante, se ha reportado que las Ag_2ONPs sintetizadas por métodos verdes además de inhibir el desarrollo de bacterias tienen actividad antifúngica [38]. En este contexto, Rashmi y cols. demostraron que las Ag_2ONPs preparadas a partir de un método de combustión utilizando *Centella asiática* y Tridax, son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis*) y algunos hongos como *Aspergillus aureus* y *A. fumigatus* [39]. Asimismo, Li y cols. encontraron que las Ag_2ONPs sintetizadas a partir del extracto de *Lippia citriodora* tienen actividad antibacteriana y antifúngica, además de favorecer la cicatrización en modelos de rata Wistar [33]. Por otra parte, la combinación de antibióticos con Ag_2ONPs se ha propuesto con la finalidad de potenciar su efecto contra bacterias MDR, rescatar antibióticos que estaban en desuso (debido a la creciente resistencia bacteriana), así como reducir la dosis y duración del tratamiento [42, 43]. Otra ventaja que ofrece el uso de la terapia combinada es que se requiere la acumulación de múltiples mutaciones para que las bacterias desarrollen resistencia a las NPs, debido a los diversos mecanismos de acción que poseen [44,

45]. En 2018, Haq y cols. demostraron que la combinación de Ag_2ONPs con moxifloxacino potencia el efecto antimicrobiano contra bacterias y hongos susceptibles [34]. Haq y cols. evaluaron el efecto de la combinación por el método de difusión del pozo en agar, el cual tiene como desventaja el uso de concentraciones fijas de NPs y antibiótico y no se estudió un intervalo de concentraciones como en el ensayo de tablero de ajedrez. Este último método fue utilizado recientemente por D' Lima y cols. para evaluar el efecto de la combinación de NPs híbridas de Ag y Ag_2O con carbenicilina, y encontraron un efecto sinérgico contra *Pseudomonas aeruginosa* MDR [40]. No obstante, pocos estudios han evaluado el efecto citotóxico de las Ag_2ONPs en células humanas no cancerosas. Lo anterior, limita el uso de agentes antimicrobianos potenciales y, por ello, surge la necesidad de promover los ensayos de citotoxicidad en células sanas, con la finalidad de desarrollar nanoantimicrobianos más eficientes y biocompatibles con células humanas [46]. Una alternativa que ha sido propuesta para disminuir la toxicidad de las NPs es su incorporación en matrices poliméricas, ya sea en forma de hidrogeles, películas o nanofibras [10, 47].

El método más utilizado para la elaboración de nanofibras es el electrohilado, en el cual se utiliza un campo eléctrico que tira de las fibras de la gota que se produce en la punta de una aguja. La generación de nanofibras por esta técnica se ve influenciada por parámetros de solución (viscosidad, conductividad y tensión superficial), proceso (velocidad de flujo, voltaje y distancia entre la punta de la aguja y el colector) y ambientales (humedad y temperatura) [11]. Para la elaboración de nanofibras pueden utilizarse polímeros naturales o sintéticos. Los primeros de ellos tienen la característica de ser biocompatibles con células humanas, mientras que los polímeros sintéticos poseen excelentes propiedades mecánicas, por ello a menudo se prefiere el uso de mezclas de polímeros [12]. El PVA es un polímero sintético que ha sido ampliamente utilizado en la preparación de nanofibras, debido a que es biocompatible, biodegradable e hidrofílico. Sin embargo, esta última característica dificulta su aplicación en el desarrollo de apósitos para heridas [13, 14]. Con la finalidad de mejorar su estabilidad en agua, las nanofibras de PVA son reticuladas mediante métodos químicos (formaldehído, vapor de glutaraldehído, ácido maléico, etc.) o físicos

(irradiación con luz UV, tratamiento térmico, etc.) [15]. Vashisth y cols. prepararon nanofibras de gellan con PVA y evaluaron diferentes métodos de reticulación. Los autores concluyen que el tratamiento térmico a 150 °C genera nanofibras estables en agua y biocompatibles con FDH, mientras que los materiales reticulados con vapor de glutaraldehído tienen efectos tóxicos en estas células, lo cual podría estar asociado con la presencia de residuos químicos sobre la superficie de las nanofibras [16]. Para la reticulación de las nanofibras por tratamiento térmico es importante la elección de la temperatura y el tiempo, con la finalidad de no afectar las propiedades deseadas de los materiales. En 2016, López-Córdoba y cols. prepararon membranas electrohiladas de PVA cargadas con tetraciclina, que fueron reticuladas agregando ácido cítrico y tratamiento térmico a 150 o 190 °C durante 3 min. Los resultados mostraron que el tratamiento térmico a 150 °C mejoró la resistencia al agua de las membranas y mantuvo la actividad antibacteriana de la tetraciclina contra *Escherichia coli* y *S. aureus*, en tanto que las membranas tratadas a 190 °C perdieron su efecto antimicrobiano [48]. Otra de las ventajas que ofrece la técnica de electrohilado es la preparación de membranas o andamios de varias capas [49], las cuales pueden ser diseñadas para cumplir una función en específico; por ejemplo, en el caso del tratamiento de heridas lo ideal sería contar con un material cuya capa superior prevenga la deshidratación de la herida, así como la penetración de patógenos, y la capa inferior tenga alta capacidad de absorción. En este contexto, Aragón y cols. elaboraron membranas asimétricas de doble capa compuestas de policaprolactona y poliacetato de vinilo cargadas con carvacrol, cuya actividad antimicrobiana y citotoxicidad se evaluaron *in vitro*. Los resultados mostraron que los materiales inhiben el desarrollo de cepas de referencia (*E. coli* S17 y *S. aureus* ATCC 25923) y son biocompatibles con FDH al permitir la migración de las células [50]. Asimismo, Federico y cols. prepararon una membrana electrohilada asimétrica compuesta por dos capas, la primera de ellas con naturaleza hidrofóbica, constituida por una mezcla de poliuretano y policaprolactona cargada con CIP, y la segunda capa con naturaleza hidrofílica elaborada a base del derivado octílico de la goma gellan y PVA cargada con

el factor de crecimiento FGF-2. Los autores reportaron que la membrana inhibió el crecimiento de *S. aureus* y favoreció el reclutamiento de fibroblastos NIH/3T3 [18].

Adicionalmente a la incorporación de diferentes agentes antimicrobianos a las nanofibras, los científicos han optado por cargar NPs a estos materiales para prevenir el proceso infeccioso. Las NPs de plata (AgNPs) son frecuentemente utilizadas, debido a que poseen actividad antibacteriana de amplio espectro y se ha demostrado que son capaces de inhibir el desarrollo de bacterias MDR. Mohseni y cols. compararon la actividad antibacteriana y la biocompatibilidad *in vitro* e *in vivo* de membranas electrohiladas preparadas a base de una combinación de polímeros (policaprolactona/PVA) cargadas con AgNPs y sulfadiazina de plata. Los resultados mostraron que las membranas cargadas con AgNPs tienen alta biocompatibilidad con FDH y regulan el proceso de cicatrización de forma más eficiente en comparación con la sulfadiazina de plata [51]. Además, Alipour y cols. demostraron que membranas electrohiladas de PVA/polivinilpirrolidona/pectina/acetato de mefenida cargadas con AgNPs (0.7 % p/p) favorecen el proceso de cicatrización en conejos blancos de Nueva Zelanda [52]. Por otra parte, algunos estudios han propuesto la incorporación de AgNPs en combinación con antibióticos en nanofibras para potenciar su efecto antimicrobiano. En 2016, Ganesh y cols. prepararon compuestos electrohilados de PVA y quitosán decorados con AgNPs y cargados con sulfanilamida. Los resultados del método de difusión del pozo en agar mostraron que las membranas cargadas con los agentes antimicrobianos incrementan de manera significativa el halo de inhibición, lo cual sugiere que existe un efecto sinérgico entre las AgNPs y el antibiótico [53]. Asimismo, Yang y cols. reportaron la elaboración de apósitos para heridas con actividad sinérgica mediante el proceso de electrohilado lado a lado, el cual genera materiales compuestos por dos capas. Los apósitos fueron preparados con una capa de polivinilpirrolidona cargada con CIP (8 mg/mL) y una capa de etil celulosa cargada con AgNPs (5 mg/mL). Los resultados mostraron que los apósitos que fueron cargados con ambos agentes antimicrobianos (es decir, el CIP en una capa y las AgNPs en la otra capa) generaron halos de inhibición de mayor tamaño contra cepas de referencia (*S. aureus* ATCC 27853 y *E. coli* ATCC 25922) en comparación con los materiales que

contenían únicamente un agente antimicrobiano en una de sus capas, lo cual sugiere actividad sinérgica entre los componentes [54].

Hasta el día de hoy, no existen reportes de nanofibras de PVA cargadas con Ag_2ONPs, por lo que, este trabajo es el primero en estudiar la combinación de estas NPs con CIP y evaluar su actividad antimicrobiana contra bacterias MDR, así como investigar su biocompatibilidad con FDH.

3. JUSTIFICACIÓN

Las heridas abiertas de la piel generalmente son infectadas por diferentes especies bacterianas, las cuales dificultan el proceso de cicatrización. Debido a lo anterior, el tratamiento de las heridas es un desafío clínico significativo y existe una creciente necesidad por el diseño y desarrollo de nuevos materiales para apósitos, que además de cubrir la herida, sean capaces de prevenir el desarrollo del proceso infeccioso y no sean tóxicos para las células humanas. Este estudio propone la preparación de coberturas de PVA de doble capa cargadas con Ag_2ONPs y antibióticos comerciales, las cuales poseen propiedades antimicrobianas y son biocompatibles con FDH, diseñadas para la prevención y tratamiento de infecciones de heridas de la piel.

4. HIPÓTESIS

Las coberturas biocompatibles de PVA de doble capa cargadas con una combinación sinérgica de Ag_2ONPs y antibióticos comerciales inhiben el crecimiento *in vitro* de bacterias MDR y no dañan células humanas.

5. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar coberturas flexibles de PVA biocompatibles con células humanas, cargadas con Ag_2ONPs y antibióticos comerciales con actividad antimicrobiana sinérgica, para la prevención y tratamiento de infecciones de heridas de la piel de evolución crónica.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

6.1 Sintetizar y caracterizar Ag_2ONPs obtenidas por síntesis de química verde.

6.2 Evaluar la actividad antimicrobiana de las Ag_2ONPs y antibióticos comerciales mediante la técnica estandarizada de concentración mínima inhibitoria (CMI) sobre cepas de referencia y microorganismos representativos aislados de pacientes con heridas de piel de evolución crónica.

6.3 Estudiar el efecto de la combinación de Ag_2ONPs con ampicilina (AMP) y CIP mediante el ensayo de tablero de ajedrez.

6.4 Determinar el efecto citotóxico de las Ag_2ONPs y de los antibióticos comerciales (AMP y CIP) de manera independiente y en combinación al ser expuestos sobre FDH por el ensayo de calceína/ EthD-1 y MTT.

6.5 Preparar y caracterizar coberturas poliméricas nanoestructuradas de PVA cargadas con Ag_2ONPs y CIP obtenidas por la técnica de electrohilado.

6.6 Analizar la liberación *in vitro* de los agentes antimicrobianos (Ag_2ONPs y CIP) de las coberturas poliméricas nanoestructuradas por AAS y espectrofotometría UV-Visible.

6.7 Evaluar la actividad antimicrobiana de las coberturas poliméricas nanoestructuradas sobre cepas de referencia y bacterias MDR mediante el ensayo de curvas de letalidad.

6.8 Estudiar el efecto citotóxico de las coberturas poliméricas nanoestructuradas sobre FDH por el ensayo de MTT y calceína/EthD-1.

6.9 Valorar el uso de las coberturas poliméricas nanoestructuradas como andamios celularizados mediante un ensayo de biocompatibilidad.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Síntesis de las Ag_2ONPs.

Las Ag_2ONPs se sintetizaron a temperatura ambiente mediante un novedoso método de química verde basado en una reacción de metátesis inducida por molienda mecánica de alta energía. Para la preparación de las Ag_2ONPs se utilizaron como

reactivos de partida el nitrato de plata ($AgNO_3$), hidróxido de litio monohidratado ($LiOH \cdot H_2O$) e hidróxido de sodio (NaOH). Los reactivos se pesaron en las cantidades apropiadas y se depositaron en un mortero de zirconia estabilizada con itria (YSZ, por sus siglas en inglés) junto con el medio de molienda (bolas de YSZ de 12.7 mm de diámetro). Posteriormente, el mortero se colocó en un molino SPEX (8000 M) durante 30 min (3 ciclos de 10 min) a una velocidad de 1750 rpm. La relación de reactivos y bolas utilizadas fue de 1:10. La cantidad de reactivos utilizados se equilibró para que no hubiera exceso de $AgNO_3$, LiOH o NaOH de acuerdo con la siguiente ecuación que describe el proceso general (1):

$$2\mathrm{AgNO_3} + \mathrm{LiOH \cdot H_2O} + \mathrm{NaOH} \rightarrow Ag_2O + \mathrm{LiNO_3} + \mathrm{NaNO_3} + \mathrm{xH_2O} \quad (1)$$

donde "*x*" corresponde al número de moles de H_2O y la relación molar de LiOH/NaOH es igual a 0.54/0.46. El precursor molido se transfirió a una caja de teflón y se sometió a un proceso de secado a 80 °C durante 48 h. Finalmente, se realizaron cuatro lavados con agua desionizada y un lavado con etanol con agitación para eliminar los nitratos solubles ($LiNO_3$ y $NaNO_3$), mientras que las Ag_2ONPs insolubles en agua se recuperaron por centrifugación (12000 rpm durante 5 min) y se secaron a 80 °C por 24 h. Las Ag_2ONPs se almacenaron en viales de vidrio a resguardo de la humedad, y para su evaluación se dispersaron en agua destilada para obtener las concentraciones deseadas y se colocaron en un baño de ultrasonido durante 3 min con la finalidad de obtener una dispersión homogénea.

7.2 Caracterización de las Ag_2ONPs.

El potencial zeta de las Ag_2ONPs se determinó empleando el analizador Microtrac Nanotrac Wave II. La morfología y el tamaño de las Ag_2ONPs se observó por microscopía electrónica de transmisión (TEM) en un microscopio JEM-2100 JEOL TEM operado a 200 kV y 100 mA. Se utilizaron micrografías representativas para determinar el tamaño promedio de las Ag_2ONPs (n = 1533) con el programa ImageJ. Las técnicas de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) y difracción de electrones de área selecta (SAED) se utilizaron para observar las características estructurales de las Ag_2ONPs sintetizadas. Las Ag_2ONPs se

caracterizaron también por XRD utilizando un difractómetro Rigaku Ultima IV operado a 40 kV y 44 mA con radiación CuKα (λ = 1.5418Å). Los patrones de XRD se registraron de 10 a 80° (2θ) a una velocidad de escaneo de 0.02° y 10 s como tiempo de conteo. La identificación de las fases cristalinas se realizó mediante la comparación de los difractogramas experimentales con los estándares cristalográficos en la base de datos del Centro Internacional de Datos de Difracción (ICDD). El tamaño de cristalita se obtuvo por el método Halder-Wagner implementado en el programa PDXL2 del difractómetro. La espectroscopia Raman se llevó a cabo utilizando un espectrómetro Horiba Xplora Plus en el intervalo de 1200 a 100 cm^{-1} con una longitud de onda de excitación de 532 nm y una salida de láser de 10 mW. Las Ag_2ONPs y sus combinaciones con antibióticos (AMP y CIP) se estudiaron por espectroscopía FT-IR empleando un espectrómetro VERTEX 70v - Bruker en el intervalo de medición de 4000 a 400 cm^{-1} con una resolución de 2 cm^{-1} y 64 escaneos, utilizando el método de reflexión total atenuada (ATR) que utiliza un cristal de diamante.

7.3 Cepas de referencia y aislados clínicos para la evaluación de las Ag_2ONPs y antibióticos comerciales.

En el estudio se incluyeron cepas de referencia obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC), las cuales fueron *S. aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, así como bacterias MDR aisladas de muestras clínicas de pacientes con heridas de piel de evolución crónica, las cuales fueron *S. aureus*, *E. faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*. Previamente, el protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” (número de registro: 18-21), y registrado ante el Comité de Ética en Investigación y Docencia de la Facultad de Ciencias Químicas (CEID2021-03-S). La recolección y el procesamiento de las muestras clínicas se realizó siguiendo los lineamientos de la American Society for Microbiology. Los microorganismos se aislaron en un medio de cultivo sólido convencional (agar Mueller Hinton, AMH) y, posteriormente, se realizó la identificación y determinación del perfil de susceptibilidad

con el equipo automatizado VITEK®2. Todas las cepas se cultivaron en caldo Mueller Hinton y se almacenaron a -20 °C con glicerol.

7.4 Estudio de la actividad antimicrobiana de las Ag_2ONPs y antibióticos comerciales.

7.4.1 Estandarización de la técnica.

La actividad antimicrobiana se evaluó mediante la técnica de microdilución en caldo para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) siguiendo los lineamientos del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [55]. El método se estandarizó empleando cepas de referencia (*S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922) y antibióticos comerciales (oxacilina 64 µg/mL y ceftazidima 32 µg/mL). Los puntos finales se determinaron cuando no se observó turbidez en el pozo y los resultados se compararon con los valores establecidos por CLSI. Los experimentos se realizaron por triplicado durante tres días diferentes.

7.4.2 Ensayo de CMI.

La CMI de los agentes antimicrobianos (Ag_2ONPs, AMP y CIP) se evaluó sobre las cepas de referencia y los aislados clínicos previamente mencionados (*sección 7.3*). Las Ag_2ONPs y los antibióticos se dispersaron con agua destilada a una concentración de 1000 y 128 µg/mL, respectivamente, y diluciones en serie con caldo Mueller Hinton se llevaron a cabo en microplacas de 96 pozos. El intervalo de concentraciones estudiado para las Ag_2ONPs fue de 1000 a 0.97 µg/mL, mientras que para los antibióticos fue de 128 a 0.125 µg/mL. De manera independiente, se preparó una suspensión bacteriana a la escala 0.5 de McFarland (DO_{600nm} = 0.08, que equivale a 1.5 X 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL aproximadamente), la cual se diluyó 1000 veces (1.5 X 10^5 UFC/mL) y, posteriormente, se agregaron 50 µL a cada pozo. Las microplacas se incubaron a 37 °C durante 24 h en condiciones aeróbicas en una cámara húmeda. Los puntos finales se determinaron cuando no se observó turbidez en el pozo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado en tres días diferentes.

7.5 Estudio de la combinación de Ag_2ONPs con antibióticos comerciales.

El efecto antimicrobiano de las Ag_2ONPs independientes y en combinación con AMP y CIP se determinó mediante un método de microdilución en caldo siguiendo los lineamientos del CLSI [56]. Las Ag_2ONPs y los antibióticos se dispersaron con agua destilada a una concentración de 125 y 128 µg/mL, respectivamente. La actividad de las Ag_2ONPs se evaluó dentro del intervalo de 125 a 0.97 µg/mL, mientras que para los antibióticos el intervalo estudiado fue entre 128 y 0.125 µg/mL. Para el doble tratamiento, se utilizó el método del tablero de ajedrez con diluciones seriadas de cada agente antimicrobiano para probar las diferentes combinaciones. Las diluciones de las Ag_2ONPs se realizaron del pozo A1 hacia el pozo H1 y, posteriormente, se llevaron a cabo diluciones seriadas hacia la derecha. Para los antibióticos, las diluciones seriadas se realizaron del pozo A2 hacia el pozo A12 y, consecutivamente, se llevaron a cabo diluciones seriadas hacia abajo. De manera independiente se preparó una suspensión bacteriana a la escala 0.5 de McFarland (DO_{600nm} = 0.08, 1.5 $X10^8$ UFC/mL aproximadamente), la cual se diluyó 1000 veces (1.5 X 10^5 UFC/mL) y, enseguida, se agregaron 50 µL a cada pozo. Las microplacas se incubaron a 37 °C durante 24 h en condiciones aeróbicas en una cámara húmeda. El índice de concentración fraccional inhibitorio (ICFI) se calculó para evaluar el efecto antimicrobiano combinado de las Ag_2ONPs con los antibióticos mediante la siguiente ecuación (2):

$$ICFI = \frac{CMI_{Ag_2ONPs\ en\ combinación}}{CMI_{Ag_2ONPs\ solas}} + \frac{CMI_{antibiótico\ (AMP\ o\ CIP)\ en\ combinación}}{CMI_{antibiótico\ (AMP\ o\ CIP)\ solo}} \qquad (2)$$

Los resultados se interpretaron de la siguiente forma: ICFI < 0.50, efecto sinérgico; 0.50 ≤ ICFI < 1, efecto parcialmente sinérgico; ICFI = 1, efecto aditivo; 2 ≤ ICFI < 4, efecto indiferente; y 4 < ICFI, efecto antagónico [57].

7.6 Evaluación del efecto citotóxico de las Ag_2ONPs de forma independiente y en combinación con antibióticos comerciales.

7.6.1 Ensayo de calceína/EthD-1.

La biocompatibilidad de los tratamientos (Ag_2ONPs, AMP, CIP, Ag_2ONPs-AMP y Ag_2ONPs-CIP) se evaluó mediante el ensayo de calceína/EthD-1 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” (INR 20/19 AC). 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 durante 8 h; la dermis se trató durante 4 h con colagenasa I para obtener los FDH. Finalmente, las células se cultivaron en DMEM-F12 (Dulbecco’s Modified Eagle Medium) suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10 % y 1 % de penicilina/estreptomicina y se mantuvieron en una incubadora a 37 °C y 5 % CO_2; para este ensayo se utilizaron FDH pase 3. La viabilidad de los FDH se evalúo mediante la detección de calceína/EthD-1 utilizando un kit de LIVE/DEAD® Viabilidad/Citotoxicidad para células de mamíferos siguiendo el protocolo del fabricante. Para ello, se sembraron FDH en placas de cultivo de 48 pozos a una densidad de 5000 células/cm^2 y, posteriormente, las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de los tratamientos durante 24 h. Se utilizaron FDH tratados con 200 µL de etanol al 70 % como control negativo (células negativas a calceína), y FDH no tratados como control positivo (células positivas a calceína). Después de la exposición a los tratamientos las células se incubaron durante 40 min a 37 °C con 2 µM de calceína AM y 2 µM de EthD-1 (0.3 µL por cada mililitro de DMEM-F12). La señal fluorescente de calceína se observó con un filtro de paso de banda de fluoresceína y el EthD-1 con un filtro Texas red. Las imágenes se capturaron y analizaron utilizando un microscopio Axio Observer.A1 y el programa AxioVision versión 4.8.2. Las células positivas a calceína/EthD-1 (vivas/muertas) y el número total de células se contaron con el programa ImageJ [58].

7.6.2 Ensayo de MTT.

Para evaluar la proliferación celular en presencia de los agentes antimicrobianos de forma independiente (Ag_2ONPs, AMP y CIP) o en combinación (Ag_2ONPs-AMP y Ag_2ONPs-CIP), se sembraron FDH en microplacas de 96 pozos a una densidad de 5000 células/cm^2 en DMEM-F12 suplementado con SBF al 10 % y 1 % de penicilina/estreptomicina a 37 °C y 5 % de CO_2 (este paso se consideró como día 0). Después de 24 h, los FDH se incubaron con dispersiones de diferentes concentraciones de los tratamientos (Ag_2ONPs, AMP, CIP, Ag_2ONPs-AMP y Ag_2ONPs-CIP) durante 1, 4 y 7 días a 37 °C y 5 % CO_2. La citotoxicidad de los tratamientos se evaluó en los puntos de tiempo previamente especificados por el ensayo de MTT. Para ello, después de la exposición a los sobrenadantes, los FDH se lavaron con buffer de fosfatos y se incubaron con una solución de MTT:DMEM-F12 (1:10) durante 3 h. A continuación, las células metabolizadoras de cristales de formazán se solubilizaron en una solución de 2-propanol:dimetilsulfóxido (1:1) y se midió la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro Synergy HTX. Los experimentos se realizaron de forma independiente por triplicado para cada período de tiempo especificado.

7.7 Coberturas poliméricas nanoestructuradas.

Se prepararon cuatro novedosas coberturas de PVA (peso molecular = 118 – 124 kDa, 86 – 89 % hidrolizado) utilizando la técnica de electrohilado con las siguientes características: i) sin agentes antimicrobianos (PVA); ii) cargada únicamente con Ag_2ONPs (PVA-Ag_2ONPs); iii) cargada solo con antibiótico (PVA-CIP); iv) cargada con ambos agentes antimicrobianos (PVA-Ag_2ONPs-CIP).

7.7.1 Preparación de las soluciones y dispersiones de electrohilado.

Para la elaboración de la cobertura sin agentes antimicrobianos se preparó una solución de PVA al 10 % p/v, disolviendo 1.5 g de PVA en 15 mL de agua destilada a 60 °C con agitación constante durante 4 h. La solución se dejó reposar por aproximadamente 16 h antes de someterla al electrohilado. Para la cobertura de PVA-Ag_2ONPs se preparó una solución de PVA al 10 % p/v, la cual se dejó enfriar a

temperatura ambiente y, posteriormente, se agregaron 0.12 g de Ag_2ONPs (8 % p/p con respecto al polímero) con agitación constante durante toda la noche para favorecer su dispersión. Por otra parte, se disolvieron 0.03 g de CIP en 1 mL de agua destilada; esta solución se incorporó en 14 mL de una solución de PVA al 10 % p/v y se agitó durante toda la noche. Dicha solución se utilizó para preparar la cobertura de PVA-CIP (2 % p/p con respecto al polímero). Además, se elaboró una cobertura de PVA-Ag_2ONPs-CIP, manteniendo constante la concentración del antibiótico (2 % p/p con respecto al polímero) y disminuyendo diez veces la concentración de Ag_2ONPs (0.8 % p/p con respecto al polímero). Para ello, se preparó una solución de PVA 10 % p/v a la cual se le incorporó la solución de CIP (preparada como se describió anteriormente) y 0.012 g de Ag_2ONPs. La dispersión se dejó en agitación durante toda la noche para favorecer la distribución homogénea de los agentes antimicrobianos.

7.7.2 Electrohilado.

Para el electrohilado de las coberturas poliméricas nanoestructuradas se utilizó el equipo Innovenso NS24, cuyos parámetros fueron optimizados para obtener fibras continuas y uniformes. En la elaboración de la cobertura polimérica sin agentes antimicrobianos la solución de PVA al 10 % p/v se cargó en una jeringa de plástico de 20 mL con un diámetro interno de 21 mm, la cual se conectó a dos agujas de calibre 22. La solución se dispensó a una velocidad de flujo de 1 mL/h. Se utilizó un colector giratorio recubierto con hoja de aluminio, el cual se colocó a una distancia de 15 cm de la punta de las agujas y su velocidad se ajustó a 100 rpm. La colección de las fibras poliméricas se realizó durante 20 h empleando un voltaje de 25 kV y una temperatura de 35 °C.

Las coberturas de PVA cargadas con agentes antimicrobianos están constituidas de dos capas, por lo que su preparación se realizó en dos etapas. En la primera etapa, se produjo una capa de PVA como se describió previamente para la cobertura sin agentes antimicrobianos, modificando únicamente el tiempo de colección de 20 a 10 h. En la segunda etapa, las dispersiones poliméricas con Ag_2ONPs, CIP o ambos agentes

antimicrobianos fueron electrohiladas durante 10 h sobre la capa de PVA en el caso de las coberturas PVA-Ag_2ONPs, PVA-CIP y PVA-Ag_2ONPs-CIP, respectivamente.

7.7.3 Técnica de reticulación.

Debido a que las fibras de PVA electrohiladas se disuelven con facilidad en agua se realizó la reticulación de las coberturas poliméricas empleando un tratamiento térmico. Para ello, las cuatro coberturas poliméricas fueron colocadas en una estufa a 150 °C durante 24 h [16].

7.8 Caracterización de las coberturas poliméricas.

El comportamiento térmico de las coberturas de PVA sin reticular (control) y reticulada con tratamiento térmico se estudió empleando un calorímetro diferencial de barrido marca TA Instruments modelo DSC 2500. Las muestras (3 – 5 mg) se colocaron en bandejas de aluminio herméticamente selladas y se calentaron de 0 a 225 °C a una taza de calentamiento de 10 °C/min. Posteriormente, se realizó un gráfico de calor de fusión (ΔH) frente a la temperatura. El grado de cristalinidad de las coberturas poliméricas se calculó utilizando la siguiente ecuación (3):

$$Grado\ de\ cristalinidad\ (\%) = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_r} \times 100 \qquad (3)$$

donde ΔH_m es el cambio en el calor de fusión de la muestra, el cual se obtiene directamente del gráfico, y ΔH_r es el calor necesario para fundir una muestra de PVA 100 % cristalino, cuyo valor es igual a 138.6 J/g [17]. Las características morfológicas de las coberturas poliméricas nanoestructuradas reticuladas se estudiaron empleando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE-SEM) marca JEOL modelo JSM-7401F con detector EDS marca EDAX, utilizando un voltaje de aceleración de 10 – 15 kV. Las muestras (0.16 cm^2) fueron recubiertas por pulverización con oro-paladio antes de la observación. Las micrografías fueron adquiridas con el detector de electrones retrodispersados (BEC). El diámetro promedio de fibra se determinó a partir de micrografías representativas, para cada muestra se midieron 25 diámetros en cuatro regiones diferentes (n = 100), utilizando el programa imageJ y se realizaron histogramas de distribución en Origin. Para investigar las

interacciones intermoleculares entre los componentes de las coberturas poliméricas nanoestructuradas se utilizó un espectrómetro Nicolet iS10 FT-IR. Se colocaron muestras de 1 cm^2 en el equipo y los espectros se tomaron en el intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} y 32 escaneos, utilizando el método de ATR. Las coberturas poliméricas fueron estudiadas por XRD en un difractómetro Rigaku Ultima IV usando radiación CuKα (λ = 1.5428 Å) operado a 40 kV y 44 mA utilizando una geometría asimétrica de Bragg (incidencia rasante). Los patrones de XRD se registraron de 10 a 60° (2θ) en pasos de 0.02° y 10 s de tiempo de conteo. La identificación de las fases cristalinas existentes en las coberturas se realizó por comparación con los estándares cristalográficos reportados en el ICDD.

7.9 Liberación in vitro de los agentes antimicrobianos de las coberturas poliméricas nanoestructuradas.

7.9.1 Eficiencia de carga y perfil de liberación de CIP.

La concentración de antibiótico liberada de las coberturas de PVA-CIP y PVA-Ag_2ONPs-CIP se estudió por espectrofotometría UV-Vis empleando un espectrofotómetro Shimadzu, modelo UV-1800 y una curva de calibración de CIP (0.05 – 15 ppm) a 271 nm en buffer de fosfatos (NaH_2PO_4/KH_2PO_4 60 mM, pH = 7.5) (Figura 1).

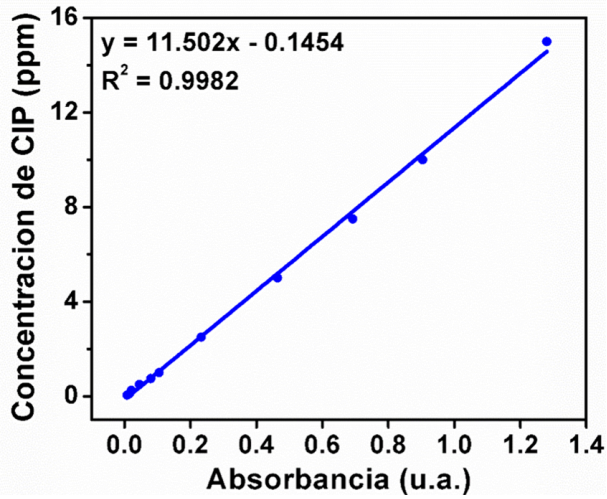


Figura 1. Curva de calibración de CIP.

El porcentaje de eficiencia de carga (*% LE*, por sus siglas en inglés) del antibiótico en la cobertura de PVA-CIP (sin reticular) se determinó disolviendo 1 cm^2 (1.37 ± 0.06 mg) en 1 mL de buffer de fosfatos, la absorbancia de la solución se midió a 271 nm y la concentración de CIP se calculó utilizando la curva de calibración (R^2 = 0.99). Finalmente, el *% LE* se calculó empleando la ecuación (4):

$$\% LE = \frac{C_e}{C_t} \times 100 \qquad (4)$$

donde C_e es la concentración de CIP encapsulado y C_t es la concentración de CIP en el tiempo "t" [59].

El comportamiento de liberación del antibiótico de las coberturas poliméricas se estudió mediante el método de inmersión total. Para ello, se utilizaron muestras de PVA-CIP de 25 cm^2 (33.13 ± 0.55 mg), las cuales fueron sumergidas en 25 mL de buffer de fosfatos e incubadas a 37 °C con una agitación de 100 rpm. Se tomaron alícuotas de 200 µL a diferentes tiempos (0, 2, 4, 6, 10, 15, 30, 60, 120, 240, 360 y 1440 min), que fueron almacenadas y protegidas de la luz para medir posteriormente su absorbancia. Para la cinética de liberación de la cobertura de PVA-Ag_2ONPS-CIP se utilizaron muestras de 121 cm^2 (0.1585 ± 0.0007 g), las cuales fueron sumergidas en 121 mL de buffer de fosfatos e incubadas a las condiciones previamente mencionadas. Los tiempos de muestreo fueron los mismos: sin embargo, se tomaron alícuotas de 1 mL, ya que fue necesario realizar dos ciclos de centrifugado (15000 rpm durante 10 min) para retirar las NPs antes de leer la absorbancia de las soluciones. La concentración de CIP liberada de ambas coberturas se calculó a partir de la curva de calibración elaborada en buffer de fosfatos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

7.9.2 Liberación *in vitro* de Ag.

La cantidad de Ag liberada de la cobertura de PVA-Ag_2ONPs-CIP se determinó mediante espectrometría de absorción atómica en un equipo SpectrAA 220. Para el análisis se utilizaron muestras de 125 cm^2 (0.1535 ± 0.0028 g), las cuales se colocaron en 125 mL de buffer de fosfatos y se incubó a 37 °C con agitación constante de 100

rpm. Se tomaron alícuotas de 2.5 mL a diferentes tiempos (0, 2, 4, 6 y 24 h), y se almacenaron y protegieron de la luz para su posterior análisis.

7.10 Análisis de las cinéticas de liberación y modelado.

Para describir la cinética de liberación del antibiótico de las coberturas de PVA-CIP y PVA-Ag_2ONPs-CIP los datos se ajustaron a tres modelos matemáticos diferentes (orden cero, primer orden y Korsmeyer-Peppas) y se comparó el valor del coeficiente de determinación (R^2). Los modelos matemáticos empleados están representados por las siguientes ecuaciones (5, 6 y 7):

$$Orden\ cero: \frac{M_t}{M_\infty} = k_0 t \qquad (5)$$

$$Primer\ orden: ln\frac{M_t}{M_\infty} = -k_1 t \qquad (6)$$

$$Korsmeyer - Peppas: \frac{M_t}{M_\infty} = k_p t^n \qquad (7)$$

donde, $M_t/M\infty$ es la fracción de fármaco liberado a cualquier tiempo *t*; k_0, k_1 y k_p son las constantes de liberación y *n* (ecuación 7) es el exponente de difusión que sugiere la naturaleza del mecanismo de liberación. Dependiendo del valor que tome *n* los mecanismos de liberación pueden ser definidos de la siguiente manera: $n \leq 0.5$ difusión Fickiana (caso I); $0.5 < n < 1$ transporte anómalo; $n = 1$ transporte caso II, y $n > 1$ transporte supercaso II (orden cero) [60].

7.11 Aislados clínicos utilizados para la evaluación de las coberturas poliméricas nanoestructuradas.

Para la determinación de la actividad antibacteriana de las coberturas se seleccionaron dos microorganismos aislados de pacientes con heridas crónicas, previamente utilizados en la evaluación de los agentes antimicrobianos en suspensión (*sección 7.3*), los cuales fueron *S. aureus* y *A. baumannii*. Asimismo, en el estudio se incluyeron dos microorganismos más, *E. faecium* y *E. coli* resistentes a CIP, los cuales se aislaron de muestras clínicas de pacientes con catéter venoso central y sonda de Foley, respectivamente. Los números de registro de los protocolos de investigación

aprobados por el Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” para estos microorganismos son 29-18 y 102-16.

7.12 Estudio de la actividad antimicrobiana de las coberturas poliméricas nanoestructuradas.

El efecto antibacteriano de los materiales se estudió a partir de curvas de letalidad contra cepas de referencia (*S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922) y aislados clínicos MDR (*sección 7.11*). Se utilizaron coberturas poliméricas nanoestructuradas de 1 cm^2, las cuales fueron esterilizadas con luz UV durante 15 min por lado. De manera independiente se preparó una suspensión bacteriana a la escala 0.5 de McFarland (DO_{600nm} = 0.08, equivalente a aproximadamente 1.5 X 10^8 UFC/mL), y 10 µL de ésta se colocaron en un tubo que contenía 9.99 mL de una solución con una proporción de 9.5:0.5 de buffer de fosfatos y caldo Mueller Hinton, para obtener una densidad bacteriana de 1.5 X 10^5 UFC/mL. Posteriormente, cada cobertura polimérica nanoestructurada (PVA, PVA-CIP, PVA-Ag_2ONPs y PVA-Ag_2ONPs-CIP) se colocó de forma independiente en un tubo eppendorf y se inocularon con 1 mL de la suspensión bacteriana diluida (1.5 X 10^5 UFC/mL). Asimismo, se incluyó un control positivo de crecimiento, el cual contenía únicamente la suspensión bacteriana diluida. Los tubos eppendorf se incubaron durante 24 h a 37 °C con agitación de 100 rpm, y se tomaron alícuotas de 10 µL a diferentes tiempos. Los tiempos de muestreo fueron diferentes para las bacterias Gram positivas y Gram negativas, debido a que se encontró que las Ag_2ONPs son más efectivas contra este último grupo de microorganismos. Por lo que, en el caso de las bacterias Gram positivas las alícuotas fueron tomadas en 0, 2, 3, 4, 6 y 24 h, mientras que para las Gram negativas las alícuotas fueron extraídas en 0, 0.5, 1, 2, 4 y 24 h. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas con solución estéril de NaCl al 0.85 %, las cuales fueron sembradas por cuadruplicado en cajas de AMH e incubadas durante 24 h a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, se contaron las UFC y se transformaron a su forma logarítmica (log_{10}). La disminución de tres o más ciclos logarítmicos del recuento de UFC con respecto al inoculo original se consideró

actividad bactericida (reducción del 99.9 % de UFC) [61]. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y de manera independiente para cada microorganismo.

7.13 Estudio del efecto citotóxico de las coberturas poliméricas nanoestructuradas.

7.13.1 Evaluación indirecta de la citotoxicidad.

Para determinar el efecto citotóxico de los agentes antimicrobianos (Ag_2ONPs y CIP) liberados de las coberturas poliméricas reticuladas se realizaron los ensayos de MTT y calceína/EthD-1 sobre FDH. Se utilizaron coberturas poliméricas de 0.25 cm^2, las cuales fueron esterilizadas con luz UV durante 1 h por cada lado y, posteriormente, colocadas en placas de 48 pozos con 250 µL de DMEM-F12 durante 24 h para permitir la liberación de los agentes antimicrobianos. Por otra parte, los FDH fueron cultivados en microplacas de 96 pozos a una densidad de 8000 células/cm^2 en DMEM-F12 suplementado con SBF al 10 % y 1 % de penicilina/estreptomicina, a 37 °C y 5 % de CO_2 durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, los FDH fueron expuestos a los diferentes sobrenadantes por 24 h y, posteriormente, las células se lavaron con buffer de fosfatos y se incubaron con una solución de MTT:DMEM-F12 (1:10) durante 3 h. Los cristales de formazán metabolizados por los FDH se solubilizaron en 2-propanol:dimetilsulfóxido (1:1) y se midió la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro Synergy HTX. En paralelo, se realizaron réplicas del ensayo con la finalidad de analizar la viabilidad y morfología celular mediante calceína/EthD-1; en estas placas, después de que las células fueron expuestas a los sobrenadantes, las células se incubaron por 40 min a 37 °C con 2 µM de calceína AM y 2 µM de EthD-1 (0.3 µL por cada mililitro de DMEM-F12). La señal fluorescente de calceína se observó con un filtro de paso de banda de fluoresceína y el EthD-1 con un filtro Texas red. Las imágenes se capturaron y analizaron utilizando un microscopio Axio Observer.A1 y el programa AxioVision versión 4.8.2.

7.13.2 Ensayo de biocompatibilidad.

La biocompatibilidad de las coberturas poliméricas reticuladas con y sin agentes antimicrobianos se estudió mediante el ensayo de adhesión celular. Se utilizaron coberturas poliméricas de 0.25 cm^2, las cuales fueron esterilizadas con luz UV durante

1 h por cada lado y, posteriormente, colocadas en placas de 24 pozos. Sobre la superficie de cada cobertura polimérica se sembraron 30000 FDH, y las placas se incubaron por 1 h a 37 °C para permitir la adhesión de las células. Transcurrido ese tiempo, se agregó a cada pozo 1 mL de DMEM-F12 suplementado con 10 % de SBF y 1 % de penicilina/estreptomicina, y las placas se incubaron durante 24 h. La viabilidad de los FDH se evalúo mediante la detección de calceína/EthD-1 utilizando un kit de LIVE/DEAD® Viabilidad/Citotoxicidad para células de mamíferos siguiendo el protocolo del fabricante. Para ello, los constructos (células sobre los materiales) fueron lavados con buffer de fosfatos y luego se incubaron con 2 µM de calceína AM y 2 µM de EthD-1 (0.3 µL por cada mililitro de DMEM-F12) durante 1 h. Por último, las células se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Axio Observer.A1) y se tomaron fotografías utilizando el programa AxioVision versión 4.8.2.

7.14 Análisis estadístico.

Todos los experimentos fueron repetidos al menos tres veces. Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar. Los datos se analizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba de Tukey, previa comprobación de normalidad utilizando el programa GraphPad Prism8. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Síntesis y caracterización de las Ag_2ONPs.

8.1.1 Potencial zeta.

Se determinó el potencial zeta de las Ag_2ONPs sintetizadas. Los resultados mostraron un valor de -63.68 ± 7.54 mV, lo que indica la existencia de repulsión electrostática negativa entre las partículas y confirma la síntesis de NPs estables [62].

8.1.2 XRD.

La Figura 2 muestra el difractograma de rayos-X de las Ag_2ONPs. El difractograma mostró reflexiones cristalinas en valores 2θ relacionados con los planos cristalográficos (hkl) siguientes: 26.83° (110), 32.84° (111), 38.20° (200), 55.05° (220),

65.49° (311) y 68.90° (222). Estos planos cristalinos son característicos de la estructura cúbica simple (CS) del Ag_2O. Los picos de difracción mostraron correspondencia con un estándar de Ag_2O (ICDD 75-1532), incluido en la parte inferior de la figura para facilitar la comparación. Por otra parte, los planos cristalográficos (111), (200), (220) y (311) se identificaron y asociaron con la estructura cúbica centrada en las caras (CCC) de Ag^0 (ICDD 87-0718), lo que sugiere la coexistencia de las fases Ag_2O y Ag^0 en las Ag_2ONPs preparadas [40]. El análisis semicuantitativo de las fases presentes realizado por el método RIR estimó 91 y 9 % de las fases Ag_2O y Ag^0, respectivamente. Además, mediante el método de Halder-Wagner se determinó un tamaño de cristalita de 7 y 20 nm para Ag_2O y Ag^0, respectivamente.

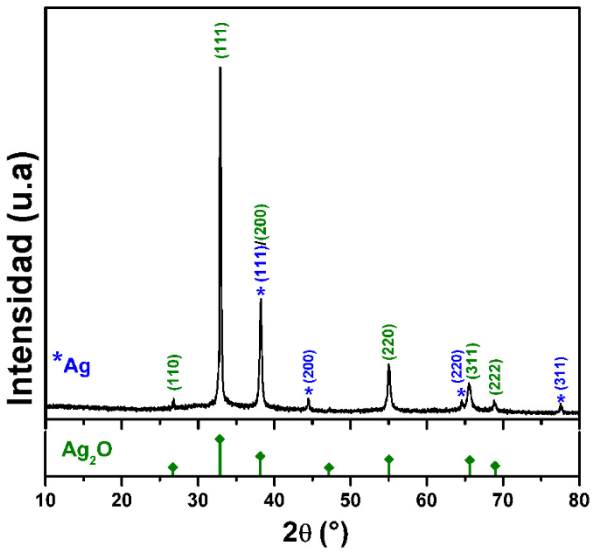


Figura 2. Difractogramas de rayos-X de las Ag_2ONPs. Los planos cristalinos de Ag^0 están señalados con asteriscos de color azul, y en la parte inferior de la figura se presenta el estándar de Ag_2O mediante rombos de color verde.

8.1.3 TEM.

Los estudios de TEM de las Ag_2ONPs se muestran en la Figura 3. En general, las micrografías revelaron que las Ag_2ONPs están bien dispersas y tienen formas

esféricas de tamaño pequeño (Figura 3a, b). A mayor aumento sobre el área seleccionada por la línea discontinua amarilla en la Figura 3b, se observan formas esféricas con tamaños inferiores a 10 nm y partículas de morfología irregular de tamaños mayores. Si bien algunas partículas forman aglomerados, la mayoría son aglomerados blandos (Figura 3b-d). Las micrografías de HR-TEM y las mediciones del espacio d en partículas pequeñas y grandes confirmaron la coexistencia de Ag^0 y Ag_2O en la muestra. Los espacios d obtenidos fueron de 0.27 y 0.24 nm, asociados con el plano cristalino (111) de Ag_2O y Ag^0, respectivamente (Figura 3e). El histograma de las Ag_2ONPs obtenido después de medir 1533 partículas de varias imágenes de TEM, mostró una distribución unimodal y un diámetro promedio de 8.72 ± 2.76 nm (Figura 3f). El diámetro promedio concuerda con el valor de tamaño de cristalita (7 nm) del Ag_2O obtenido por XRD, correspondiente a la fase cristalina principal (91 %) de las NPs preparadas.

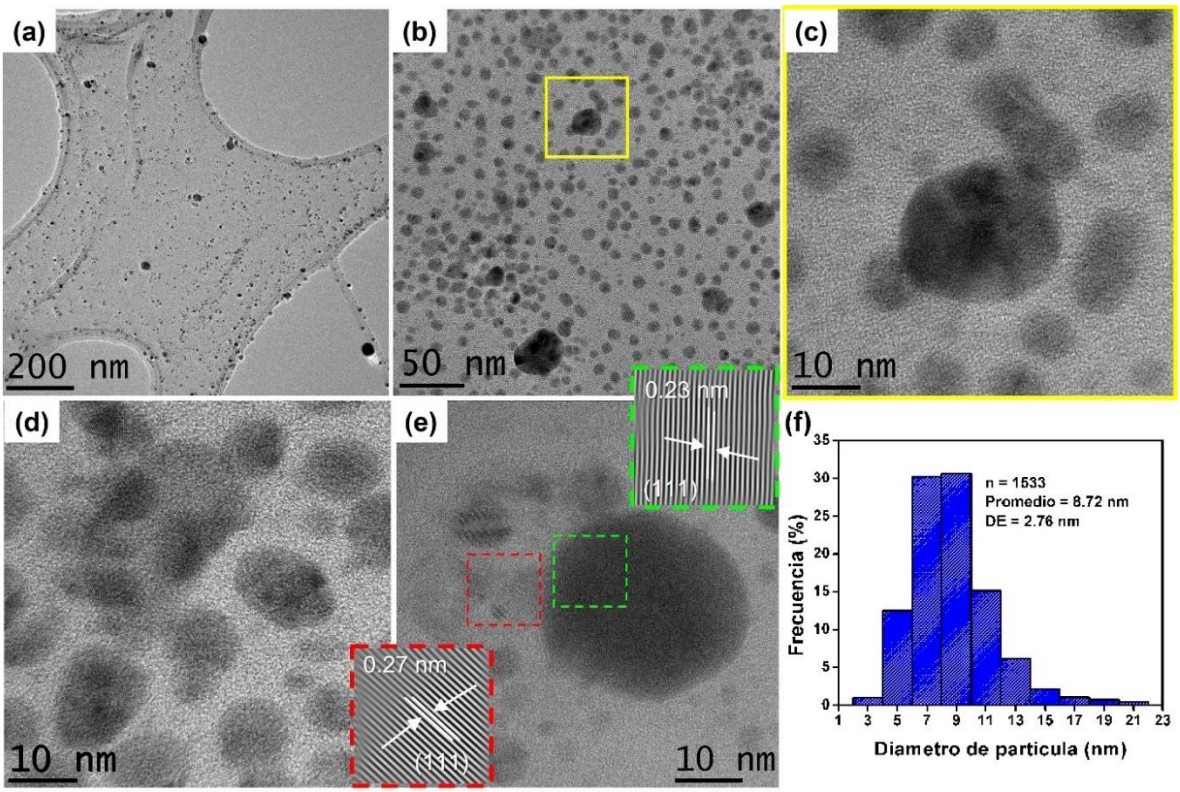


Figura 3. Caracterización morfológica de las Ag_2ONPs: (a y b) Micrografías de TEM; (c – e) Imágenes HR-TEM; (f) Histograma de la distribución del tamaño de partículas.

8.1.4 Espectroscopia Raman.

La Figura 4 muestra el espectro Raman de las Ag_2ONPs. En la figura, la línea roja ilustra el resultado del ajuste usando funciones Lorentzianas (líneas grises) para deconvolucionar la presencia de siete fonones ubicados en 232, 280, 358, 414, 464, 916 y 1046 cm^{-1}, que corresponden a la fase de Ag_2O. El fonón observado en 232 cm^{-1} fue atribuido a la vibración de la red de Ag – O, mientras que el fonón en 916 cm^{-1} se asoció con especies de oxígeno atómico/molecular quimisorbidas [63]. Además, las bandas en 358, 464 y 1046 cm^{-1} están relacionadas con los modos de estiramiento y flexión de Ag – O [64]. El cambio de posición de los modos de vibración se atribuye a la presencia de las Ag_2ONPs y confirman la coexistencia de las fases Ag^0 y Ag_2O, lo que concuerda con los resultados de XRD y TEM.

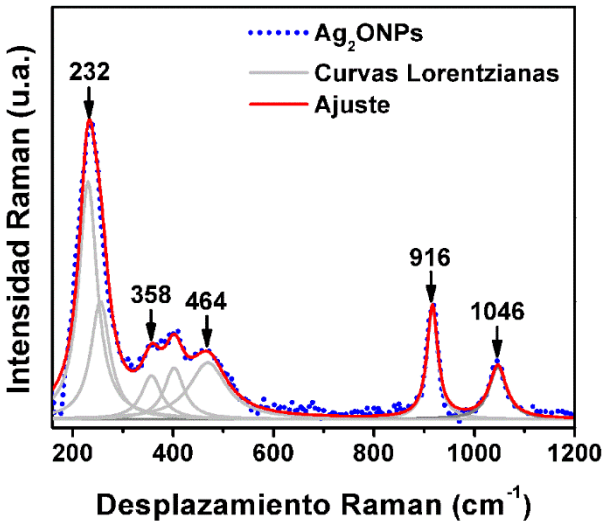


Figura 4. Espectroscopia Raman. El espectro Raman experimental de las Ag_2ONPs está representado con puntos de color azul, las líneas de color gris representan las bandas Raman existentes determinadas a partir del proceso de deconvolución, y la línea de color rojo es el resultado de todos los modos Raman presentes.

8.1.5 Espectroscopia FT-IR.

La Figura 5 muestra los espectros FT-IR de los antibióticos (AMP y CIP) y de las Ag_2ONPs de manera independiente y en combinación. El espectro de las Ag_2ONPs

mostró una banda en 1071 cm^{-1}, la cual fue atribuida al enlace O-Ag-O, mientras que la señal en 811 cm^{-1} fue asignada a las vibraciones de estiramiento del enlace Ag-O-Ag [34]. Para AMP, su espectro mostró bandas en 3403 y 3332 cm^{-1} correspondientes a vibraciones de estiramiento de las aminas primarias y secundarias. La señal en 3058 cm^{-1} se relaciona con el enlace =C-H. Las bandas en 2977 y 2930 cm^{-1} se atribuyeron al grupo $-CH_3$. La banda en 1785 cm^{-1} se asignó al estiramiento del grupo carbonilo (C=O). Además, las señales en 1592 y 1450 cm^{-1} fueron asignadas al estiramiento C=C [65, 66]. Para CIP, su espectro mostró una banda prominente en 3533 cm^{-1} correspondiente a la vibración de estiramiento O-H del ácido carboxílico. La banda en 3381 cm^{-1} se asignó al estiramiento N-H del grupo piperazina. La señal en 3012 cm^{-1} se atribuyó a dobles enlaces C-C alifáticos y al estiramiento C-H aromático, principalmente =C-H. La banda en 1715 cm^{-1} se debió al estiramiento C=O, mientras que aquellas en 1638 y 1606 cm^{-1} fueron atribuidas a quinolonas. Las bandas en 1450 y 1418 cm^{-1} se atribuyeron a C-O y la situada en 1278 cm^{-1} se asignó a la vibración de flexión del grupo O-H que indicó la presencia de ácido carboxílico. Además, la banda en 1107 cm^{-1} se debió al grupo C-F [67]. Por otra parte, el espectro de la combinación de las Ag_2ONPs con AMP mostró una banda ancha alrededor de los 3378 cm^{-1}, la cual fue atribuida a la fusión de las bandas correspondientes a la amina primaria y secundaria del antibiótico. Esto sugiere que las Ag_2ONPs podrían estar interactuando con los grupos amino de la AMP. Además, la formación de una nueva banda en 668 cm^{-1} fue asignada al enlace Ag-O, lo cual indica la incorporación de Ag a la molécula del antibiótico. Resultados similares fueron reportados por Hur y cols. quienes sintetizaron AgNPs utilizando AMP como agente reductor, y encontraron que el grupo amino está involucrado en la reducción de la Ag [66]. Recientemente, Khatoon y cols. informaron que, estando dispersas en una fase acuosa, las AgNPs interactúan con el grupo amino del anillo de benceno de la AMP [45]. Por último, el espectro de la combinación de Ag_2ONPs con CIP mostró en general una disminución drástica en las señales, lo cual podría deberse a la interacción electrostática entre los componentes. La banda ancha alrededor de los 3453 cm^{-1} fue atribuida a la fusión de las bandas correspondientes a los grupos O-H (3533 cm^{-1}) y N-H (3381 cm^{-1}). Además, se observó

un desplazamiento de la banda del grupo carbonilo, desde 1715 a 1636 cm^{-1}. Estudios previos sugieren que el grupo carboxilo del CIP actúa como agente quelante de iones metálicos [68].

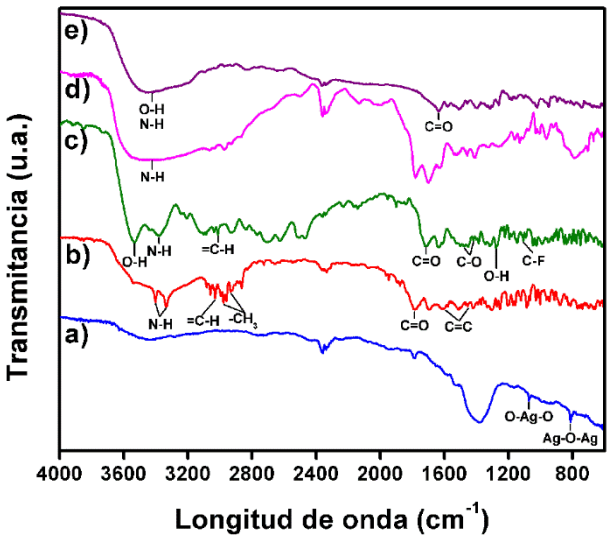


Figura 5. Espectros FT-IR de los agentes antimicrobianos solos y en combinación: (a) Ag_2ONPs; (b) ampicilina (AMP); (c) hidrocloruro de ciprofloxacina (CIP); (d) Ag_2ONPs – AMP; (e) Ag_2ONPs – CIP.

8.2 Aislados clínicos.

En el estudio se incluyeron cinco microorganismos aislados de pacientes con infecciones de heridas de piel, los cuales fueron elegidos con base a la lista de "patógenos prioritarios" resistentes a los antibióticos publicada por la OMS [69]. De la categoría de prioridad crítica se incluyeron los siguientes microorganismos: *K. pneumoniae* y *P. mirabilis* productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), y *A. baumannii* resistente a carbapenémicos. Asimismo, *S. aureus* resistente a meticilina se seleccionó de la categoría de prioridad elevada. El antibiograma de los microorganismos se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Perfil de resistencia de microorganismos aislados de pacientes con infecciones de heridas de piel.

Antibiótico	CMI (µg/mL)				
	CGP		BGN		
	S. aureus	***E. faecalis***	***A. baumannii***	***K. pneumoniae***	***P. mirabilis***
Amikacina	-	-	-	4 (S)	≤ 2 (S)
Ampicilina	-	≤ 2 (S)	-	≥ 32 (R)	≥ 32 (R)
Ampicilina/Sulbactam	-	-	16 (R)	≥ 32 (R)	8 (S)
Bencilpenicilina	≥ 0.50 (R)	-	-		
Cefalotina	-	-	-	≥ 64 (R)	≥ 64 (R)
Cefepima	-	-	≥ 64 (R)	2 (R)	≤ 1 (R)
Cefotaxima	-	-	≥ 64 (R)	≥ 64 (R)	≤ 1 (R)
Ceftazidima	-	-	≥ 64 (R)	8 (R)	≤ 1 (R)
Ceftriaxona	-	-	≥ 64 (R)	≥ 64 (R)	(R)
Cefuroxima	-	-	-	≥ 64 (R)	≥ 64 (R)
Ciprofloxacina	≥ 8 (R)	≤ 0.50 (S)	≥ 4 (R)	≤ 0.25 (S)	≤ 0.25 (S)
Clindamicina	≥ 8 (R)	-	-	-	-
Daptomicina	-	4 (S)	-	-	-
Doxiciclina	-	8 (I)	-	-	-
Ertapenem	-	-	-	≤ 0.50 (S)	≤ 0.50 (S)
Eritromicina	≥ 8 (R)	4 (I)	-	-	-
Gentamicina	≥ 16 (R)	-	≤ 1 (S)	≥ 16 (R)	≤ 1 (S)
Levofloxacina	≥ 8 (R)	1 (S)	-	-	-
Linezolida	1 (S)	2 (S)	-	-	-
Meropenem	-	-	≥ 16 (R)	≤ 0.25 (S)	≤ 0.25 (S)

Moxifloxacino	4 (R)	-	-	-	-
Nitrofurantoína	32 (S)	-	-		
Oxacilina	≥ 4 (R)	-	-	-	-
Quinupristina/Dalfopristina	0.50 (S)	-	-		
Rifampicina	≥ 32 (R)	-	-	-	-
Tetraciclina	≤ 1 (S)	≥ 16 (R)	-	-	-
Tigeciclina	≤ 0.12 (S)	≤ 0.12 (S)	-	-	-
Trimetoprima/Sulfametoxazol	≤ 10 (S)	-	≤ 20 (S)	≤ 20 (S)	≤ 20 (S)
Vancomicina	≤ 0.50 (S)	1 (S)	-	-	-

BGN: bacilos Gram negativos, CGP: cocos Gram positivos, CMI: concentración mínima inhibitoria, S: susceptible, I: intermedio, R: resistente.

8.3 Actividad antimicrobiana de los agentes antimicrobianos en suspensión.

Los resultados de la estandarización del método de CMI se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Estandarización del método de CMI.

Cepas de referencia	**Intervalo de CMI reportado por el CLSI (µg/mL)**		**CMI experimental (µg/mL)**	
	Oxacilina	**Ceftazidima**	**Oxacilina**	**Ceftazidima**
S. aureus ATCC 25923	0.12 – 0.50	**-**	0.50 ± 0	**-**
E.coli ATCC 25922	**-**	0.06 – 0.50	**-**	0.50 ± 0

ATCC: American Type Culture Collection, CMI: concentración mínima inhibitoria, CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute.

La actividad antibacteriana de las Ag_2ONPs y antibióticos se evaluó contra cepas de referencia y aislados clínicos, incluyendo bacterias MDR (Tabla 3). La CMI de AMP para las cepas de referencia resultó entre 1.33 y 5.33 µg/mL, mientras que para los aislados clínicos fue de 2.67 a > 128 µg/mL (*A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. mirabilis* fueron resistentes a AMP). En el caso de CIP, la CMI para las cepas de referencia se determinó entre 0.02 y 2 µg/mL, mientras que para los aislados clínicos fue de 0.13 a > 128 µg/mL (*S. aureus* y *A. baumannii* fueron resistentes a CIP). Por otra parte, las Ag_2ONPs poseen actividad antibacteriana de amplio espectro contra bacterias Gram positivas y Gram negativas con valores de CMI de 0.97 a 7.81 µg/mL. De manera interesante, se encontró que concentraciones menores a 8 µg/mL Ag_2ONPs son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias MDR. Las cepas de referencia Gram negativas (*E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853) fueron más susceptibles a las Ag_2ONPs como se ha reportado en estudios previos [70].

Tabla 3. Actividad antimicrobiana de las Ag_2ONPs y antibióticos comerciales.

Microorganismos	**CMI (µg/mL)**		
	Ag_2ONPs	**AMP**	**CIP**
Cepas de referencia			
S. aureus ATCC 25923	7.81 ± 0	1.33 ± 0.58	0.50 ± 0
E. faecalis ATCC 29212	3.91 ± 0	2.00 ± 0	2.00 ± 0
E. coli ATCC 25922	1.95 ± 0	5.33 ± 2.31	0.02 ± 0
P. aeruginosa ATCC 27853	0.97 ± 0	4.00 ± 0	0.13 ± 0
Aislados clínicos			
S. aureus	7.81 ± 0	2.67 ± 1.15	0.50 ± 0
E. faecalis	7.81 ± 0	4.00 ± 0	2.00 ± 0
A. baumannii	3.91 ± 0	> 128 ± 0	> 128 ± 0
K. pneumoniae	7.81 ± 0	> 128 ± 0	0.13 ± 0
P. mirabilis	7.81 ± 0	> 128 ± 0	0.50 ± 0

AMP: ampicilina, CIP: hidrocloruro de ciprofloxacina, CMI: concentración mínima inhibitoria.

Estos resultados pueden ser atribuidos a la composición de la pared celular, ya que las bacterias Gram negativas tienen una mayor cantidad de fosfolípidos y lipopolisacáridos, los cuales les otorgan una fuerte carga negativa, misma que podría favorecer la acción de las Ag_2ONPs mediante la interacción entre los iones plata (Ag^+) y la superficie bacteriana [44]. Yoo y cols. demostraron que los nanocristales de Ag_2O ocasionan cambios morfológicos en *E. coli* y *S. aureus*, que están asociados con la lisis de la membrana y pérdida del material intracelular [41]. Previamente se ha reportado la síntesis de Ag_2ONPs por métodos químicos con tamaños alrededor de 40 – 50 nm, con actividad antimicrobiana contra cepas de referencia (susceptibles) [32, 34]. Asimismo, se ha reportado que, Ag_2ONPs sintetizadas por rutas verdes utilizando extractos de plantas, han presentado efecto antibacteriano y antifúngico contra microorganismos susceptibles [33, 37-39]. Sin embargo, la principal desventaja de estos estudios es que la evaluación del efecto antimicrobiano se realizó mediante el método de difusión en pozo, el cual brinda solamente información cualitativa. Por otra parte, Muthukumar y cols. informaron que Ag_2ONPs sintetizadas con extracto de hoja de amaranto verde exhiben valores de CMI de 30, 35 y 45 µg/mL contra *E. coli* MTCC 7410, *P. aeruginosa* MTCC 2488 y *S. aureus* MTCC 424, respectivamente [36]. En 2020, Khan y cols., prepararon Ag_2ONPs por un método físico (sonicación) y evaluaron su actividad antimicrobiana contra bacterias MDR. Los autores reportaron que la CMI fue de 250 µg/mL para *S. aureus* y 125 µg/mL para tres cepas Gram negativas: *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* [35]. Es importante enfatizar que los valores de CMI encontrados en este estudio frente a cepas de referencia y aislados clínicos resistentes y MDR son significativamente inferiores a los intervalos reportados en estudios previos con Ag_2ONPs obtenidas por métodos físicos y biológicos [35, 36, 40]. De la comparación con datos de la literatura se puede observar como las cepas Gram negativas son más sensibles que las cepas Gram positivas, lo cual coincide con lo reportado por este estudio.

8.4 Actividad sinérgica entre las Ag_2ONPs y antibióticos comerciales.

Previamente en el grupo de investigación se demostró que antibióticos comerciales como AMP y amikacina potencian el efecto antibacteriano de AgNPs contra uropatógenos MDR [71]. Por ello, se decidió estudiar el efecto de la combinación de las Ag_2ONPs sintetizadas por una novedosa ruta de química verde con CIP y AMP, ya que este último antibiótico ha demostrado que favorece la dispersión y estabilidad de las NPs [45]. Los resultados del ensayo de tablero de ajedrez se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Efecto de la combinación entre las Ag_2ONPs y antibióticos comerciales contra cepas de referencia y aislados clínicos.

Microorganismos	CMI de agentes antimicrobianos en combinación (µg/mL)		ICIF	Efecto	CMI de agentes antimicrobianos en combinación (µg/mL)		ICIF	Efecto
	Ag_2ONPs	AMP			Ag_2ONPs	CIP		
Cepas de referencia								
S. aureus ATCC 25923	0.24 ± 0	0.50 ± 0	0.45 ± 0.14	S	0.12 ± 0	0.25 ± 0	0.52 ± 0	PS
E. faecalis ATCC 29212	0.97 ± 0	2.00 ± 0	1.25 ± 0	AD	0.48 ± 0	1.00 ± 0	0.62 ± 0	PS
E. coli ATCC 25922	1.95 ± 0	4.00 ± 0	1.83 ± 0.29	I	0.01 ± 0	0.02 ± 0	1.01 ± 0	AD
P. aeruginosa ATCC 27853	1.95 ± 0	4.00 ± 0	3.01 ± 0	I	0.01 ± 0	0.02 ± 0	0.17 ± 0	S
Aislados clínicos								
S. aureus	0.97 ± 0	2.00 ± 0	0.96 ± 0.29	PS	0.12 ± 0	0.25 ± 0	0.52 ± 0	PS
E. faecalis	0.97 ± 0	2.00 ± 0	0.62 ± 0	PS	0.97 ± 0	2.00 ± 0	1.12 ± 0	AD
A. baumannii	3.26 ± 1.13	6.67 ± 2.31	0.88 ± 0.31	PS	7.81 ± 0	16 ± 0	2.13 ± 0	I
K. pneumoniae	15.63 ± 0	32 ± 0	2.25 ± 0	I	0.06 ± 0	0.13 ± 0	1.01 ± 0	AD
P. mirabilis	15.63 ± 0	32 ± 0	2.25 ± 0	I	0.24 ± 0	0.50 ± 0	1.03 ± 0	AD

ICIF: índice de concentración inhibitoria fraccionada, CMI: concentración mínima inhibitoria, AMP: ampicilina, CIP: hidrocloruro de ciprofloxacina.

S: sinérgico; PS: parcialmente sinérgico; AD: aditivo; I: indiferente.

Este ensayo se utiliza comúnmente en los laboratorios clínicos como una estrategia que presenta alternativas ante el mecanismo de la resistencia bacteriana, el cual utiliza mezclas binarias de antimicrobianos, y la forma de medir su eficacia es mediante el índice de concentración inhibitoria fraccionada (ICIF). Dicho índice es una expresión matemática utilizada para determinar el efecto de la combinación de los antimicrobianos. El efecto de la combinación de las Ag_2ONPs con AMP fue sinérgico (ICIF < 0.5) contra *S. aureus* ATCC 25923, parcialmente sinérgico ($0.5 \leq$ ICIF < 1) contra *S. aureus*, *E. faecalis* y *A. baumannii*, aditivo (ICIF = 1) contra *E. faecalis* ATCC 29212 e indiferente ($2 \leq$ ICIF < 4) contra *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K.peumoniae* y *Proteus mirabilis*. El efecto sinérgico se encontró cuando se combinaron 0.24 µg/mL Ag_2ONPs con 0.50 µg/mL AMP, mientras que los efectos parcialmente sinérgicos fueron observados en las bacterias Gram positivas cuando se combinaron 0.97 µg/mL Ag_2ONPs con 2 µg/mL AMP. Además, los resultados mostraron que la combinación con AMP reduce la CMI de las Ag_2ONPs hasta 8 veces para los aislados clínicos y hasta 32 veces en el caso de las cepas de referencia (Tabla 5).

Tabla 5. CMI de las Ag_2ONPs solas y en combinación con antibióticos comerciales.

Microorganismos	CMI Ag_2ONPs (µg/mL)	CMI Ag_2ONPs*-AMP (µg/mL)	No. de veces que disminuyó la CMI	CMI Ag_2ONPs**-CIP (µg/mL)	No. de veces que disminuyó la CMI
Cepas de referencia					
S. aureus ATCC 25923	7.81 ± 0	0.24 ± 0	32.54 ± 0	0.12 ± 0	65.08 ± 0
E. faecalis ATCC 29212	3.91 ± 0	0.97 ± 0	4.03 ± 0	0.48 ± 0	8.14 ± 0
E. coli ATCC 25922	1.95 ± 0	1.95 ± 0	-	0.01 ± 0	195 ± 0
P. aeruginosa ATCC 27853	0.97 ± 0	1.95 ± 0	-	0.01 ± 0	97 ± 0
Aislados clínicos					
S. aureus	7.81 ± 0	0.97 ± 0	8.05 ± 0	0.12 ± 0	65.08 ± 0
E. faecalis	7.81 ± 0	0.97 ± 0	8.05 ± 0	0.97 ± 0	8.05 ± 0
A. baumannii	3.91 ± 0	3.26 ± 1.13	1.34 ±0.58	7.81 ± 0	-
K. pneumoniae	7.81 ± 0	15.63 ± 0	-	0.06 ± 0	130.16 ± 0
P. mirabilis	7.81 ± 0	15.63 ± 0	-	0.24 ± 0	32.54 ± 0

AMP: ampicilina, CIP: hidrocloruro de ciprofloxacina, CMI: concentración mínima inhibitoria.

*CMI de las Ag_2ONPs en combinación con AMP.

**CMI de las Ag_2ONPs en combinación con CIP.

Por otra parte, el efecto de la combinación de las Ag_2ONPs con CIP fue sinérgico contra *P. aeruginosa* ATCC 27853, parcialmente sinérgico contra *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* 29212 y *S. aureus*, aditivo contra *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* y *P. mirabilis* e indiferente contra *A. baumannii*. El efecto sinérgico se encontró cuando se combinaron 0.01 µg/mL Ag_2ONPs con 0.02 µg/mL CIP, mientras

que los efectos parcialmente sinérgicos se observaron en las bacterias Gram positivas cuando se combinaron concentraciones menores a 0.50 µg/mL Ag_2ONPs con concentraciones menores o iguales a 1 µg/mL CIP. Asimismo, los resultados mostraron que la combinación con CIP reduce la CMI de las Ag_2ONPs hasta 130 y 195 veces contra los aislados clínicos y las cepas de referencia, respectivamente (Tabla 5). De manera general, la combinación de Ag_2ONPs con CIP mostró mejores efectos antibacterianos que la combinación con AMP, al requerirse menores concentraciones de Ag_2ONPs para inhibir el crecimiento de los microorganismos estudiados. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Sharma y cols., quienes informaron que la combinación de NPs de óxido de zinc (ZnONPs) con CIP ofrece un mejor efecto antimicrobiano en comparación con AMP [72], lo cual podría estar asociado con el mecanismo de acción de los antibióticos y la resistencia intrínseca a AMP de los patógenos incluidos en este estudio. Otro hallazgo importante fue la disminución de la CMI de los antibióticos en combinación con las Ag_2ONPs (Tabla 6).

Tabla 6. CMI de los antibióticos comerciales solos y en combinación con Ag_2ONPs.

Microorganismos	CMI (µg/mL)		No. de veces que disminuyó la CMI	CMI (µg/mL)		No. de veces que disminuyó la CMI
	AMP	Ag_2ONPs-AMP*		CIP	Ag_2ONPs-CIP**	
Cepas de referencia						
S. aureus ATCC 25923	1.33 ± 0.58	0.50 ± 0	2.67 ± 1.15	0.50 ± 0	0.25 ± 0	2.00 ± 0
E. faecalis ATCC 29212	2.00 ± 0	2.00 ± 0	-	2.00 ± 0	1.00 ± 0	2.00 ± 0
E. coli ATCC 25922	5.33 ± 2.31	4.00 ± 0	1.33 ± 0.58	0.02 ± 0	0.02 ± 0	-
P. aeruginosa ATCC 27853	4.00 ± 0	4.00 ± 0	-	0.13 ± 0	0.02 ± 0	6.50 ± 0
Aislados clínicos						
S. aureus	2.67 ± 1.15	2.00 ± 0	1.33 ± 0.58	0.50 ± 0	0.25 ± 0	2.00 ± 0
E. faecalis	4.00 ± 0	2.00 ± 0	2.00 ± 0	2.00 ± 0	2.00 ± 0	-
A. baumannii	> 128 ± 0	6.67 ± 2.31	21.33 ± 9.24	> 128 ± 0	16 ± 0	8.00 ± 0
K. pneumoniae	> 128 ± 0	32 ± 0	4.00 ± 0	0.13 ± 0	0.13 ± 0	-
P. mirabilis	> 128 ± 0	32 ± 0	4.00 ± 0	0.50 ± 0	0.50 ± 0	-

AMP: ampicilina, CIP: hidrocloruro de ciprofloxacina, CMI: concentración mínima inhibitoria.

*CMI de AMP en combinación con las Ag_2ONPs.

**CMI de CIP en combinación con las Ag_2ONPs.

En el caso de *A. baumannii* (resistente a AMP y CIP) se encontró que la CMI disminuyó de 128 µg/mL a 6.67 y 16 µg/mL para AMP y CIP, respectivamente. Los resultados sugieren que las bacterias resistentes y MDR se vuelven susceptibles a los antibióticos en combinación con las Ag_2ONPs, lo cual está acorde con lo reportado por Jasim y cols., quienes encontraron que la combinación de AgNPs (4 mg/L) con polimixina B (2 mg/L) induce sensibilidad al antibiótico en aislados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a polimixina B [73]. Resultados similares han sido encontrados en patógenos de interés veterinario (*Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida*), donde bacterias resistentes a amoxicilina, gentamicina y colistina fueron susceptibles a estos antibióticos cuando se combinaron con AgNPs [42]. Recientemente, D'Lima y cols. informaron que la combinación de 62.5 mg/mL de NPs hibridas de Ag/Ag_2O con 800 µg/mL de carbenicilina ofrece un efecto sinérgico (ICFI = 0.13) contra *P. aeruginosa* MDR. Sin embargo, los autores no realizaron ensayos de biocompatibilidad con células humanas, lo cual sería interesante ya que los valores de CMI de las Ag/Ag_2ONPs de manera independiente (CMI = 500 mg/mL) y en combinación con carbenicilina (CMI = 62.5 mg/mL) son concentraciones altas [40]. Diferentes estudios han hipotetizado que el efecto sinérgico entre las AgNPs y distintas clases de antibióticos es debido a la formación de complejos [74, 75]. En este sentido, Deng y cols. proponen que el efecto antibacteriano involucra tres rutas, las cuales incluyen el mecanismo de acción de los antibióticos y de las NPs de forma independiente, así como la formación de complejos, los cuales son los principales responsables de la muerte bacteriana. Por lo tanto, los efectos sinérgicos y parcialmente sinérgicos encontrados en este estudio para la combinación de Ag_2ONPs con AMP y CIP podrían estar asociados principalmente con la formación de complejos, cuyo mecanismo de acción consiste en la interacción y unión con la superficie bacteriana, lo cual favorece la liberación de Ag^+ que se unen a grupos sulfhidrilo presentes en diferentes biomoléculas como proteínas y ácidos nucleicos. Asimismo, la ruptura de la membrana favorece la internalización de las Ag_2ONPs y la acción de los antibióticos que actúan a nivel del ADN [74], lo cual podría explicar el aumento de la efectividad de CIP. En el caso de los antibióticos betalactámicos como AMP, el

incremento de la actividad antibacteriana ha sido asociado con la inhibición de las BLEE por las NPs, lo cual favorece la acción del antibiótico sobre el microorganismo [42].

8.5 Efecto citotóxico de los agentes antimicrobianos en suspensión.

8.5.1 Ensayo de calceína/EthD-1.

Las concentraciones de Ag_2ONPs, AMP y CIP de manera independiente y en combinación y que presentaron actividad antibacteriana fueron las que se evaluaron sobre los FDH. La Figura 6 muestra los resultados del ensayo de calceína/EthD-1 a las 24 h de exposición a los tratamientos. Los resultados revelaron que concentraciones iguales o menores a 1 µg/mL de Ag_2ONPs no afectan la viabilidad celular de los FDH; sin embargo, las concentraciones de 2, 4 y 8 µg/mL de Ag_2ONPs mostraron diferencias significativas ($p < 0.0001$) cuando se compararon con el control (células no tratadas). En el caso de los antibióticos (AMP y CIP), se encontró que todas las concentraciones evaluadas de manera independiente (0.125 a 16 µg/mL) presentaron porcentajes de viabilidad celular del 100 % (Figura 7). Por otra parte, la combinación de Ag_2ONPs con AMP mostró que concentraciones iguales o menores en las cuales se encontró el efecto sinérgico (0.24 µg/mL Ag_2ONPs/0.50 µg/mL AMP) no afectan la viabilidad celular. Asimismo, los resultados mostraron que la combinación que ofrece el efecto parcialmente sinérgico (0.97 µg/mL Ag_2ONPs/2 µg/mL AMP) presenta porcentajes de viabilidad celular mayores al 60 % (Figura 7). De manera interesante, se encontró que la combinación de Ag_2ONPs con CIP no afecta la viabilidad celular de los FDH para las concentraciones que presentan efectos sinérgicos (0.01 µg/mL Ag_2ONPs/0.02 µg/mL CIP) y parcialmente sinérgicos (0.48 µg/mL Ag_2ONPs/1 µg/mL CIP).

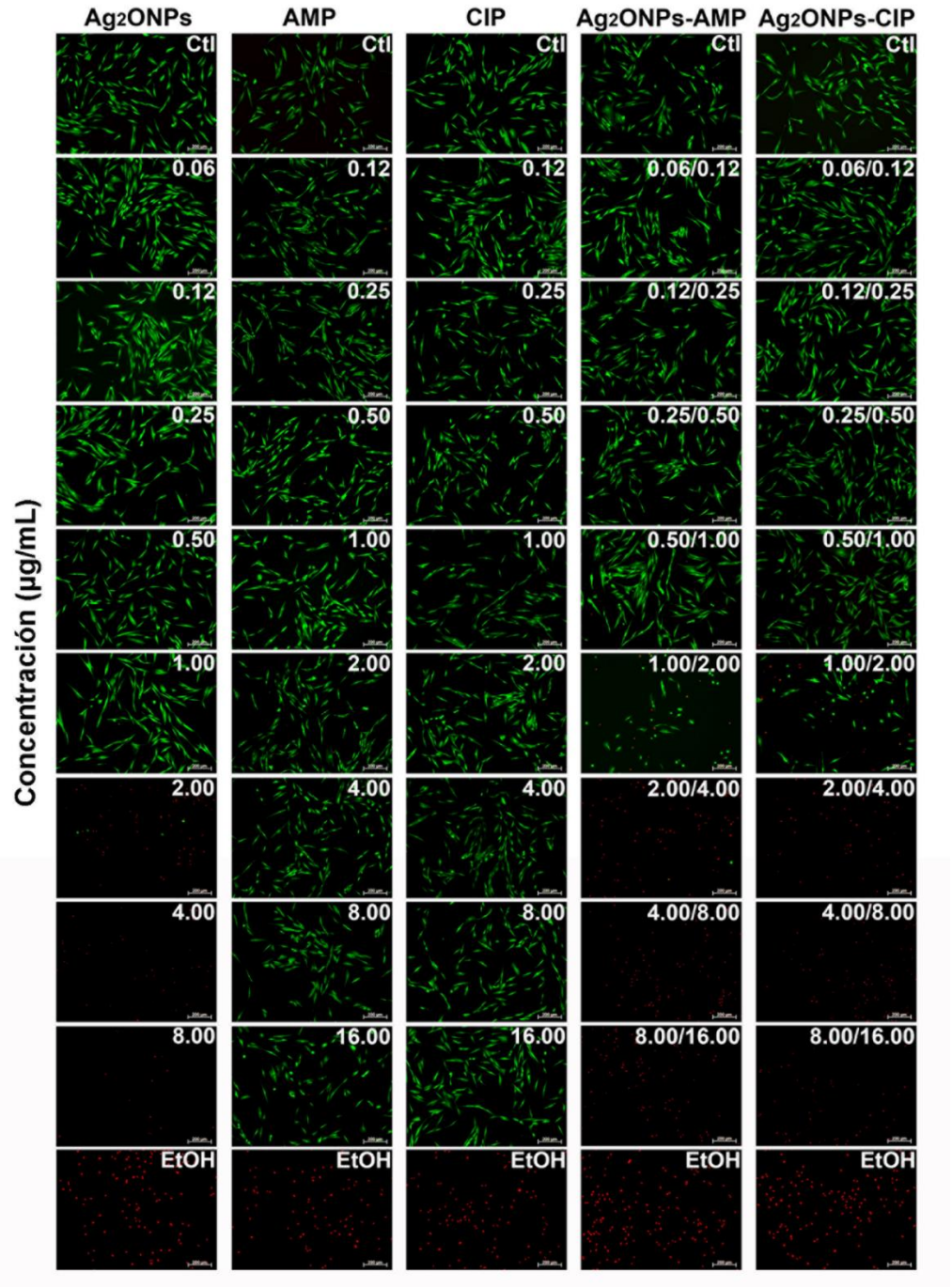


Figura 6. Ensayo de calceína/EthD-1. Micrografías representativas del ensayo de viabilidad celular a las 24 h de cultivo, las células vivas (células positivas a calceína) están marcadas en color verde y las células muertas (células positivas a EthD-1) están marcadas en color rojo. AMP: ampicilina, CIP: hidrocloruro de ciprofloxacina, Ctl: control (células sin tratar), EtOH: etanol al 70 %.

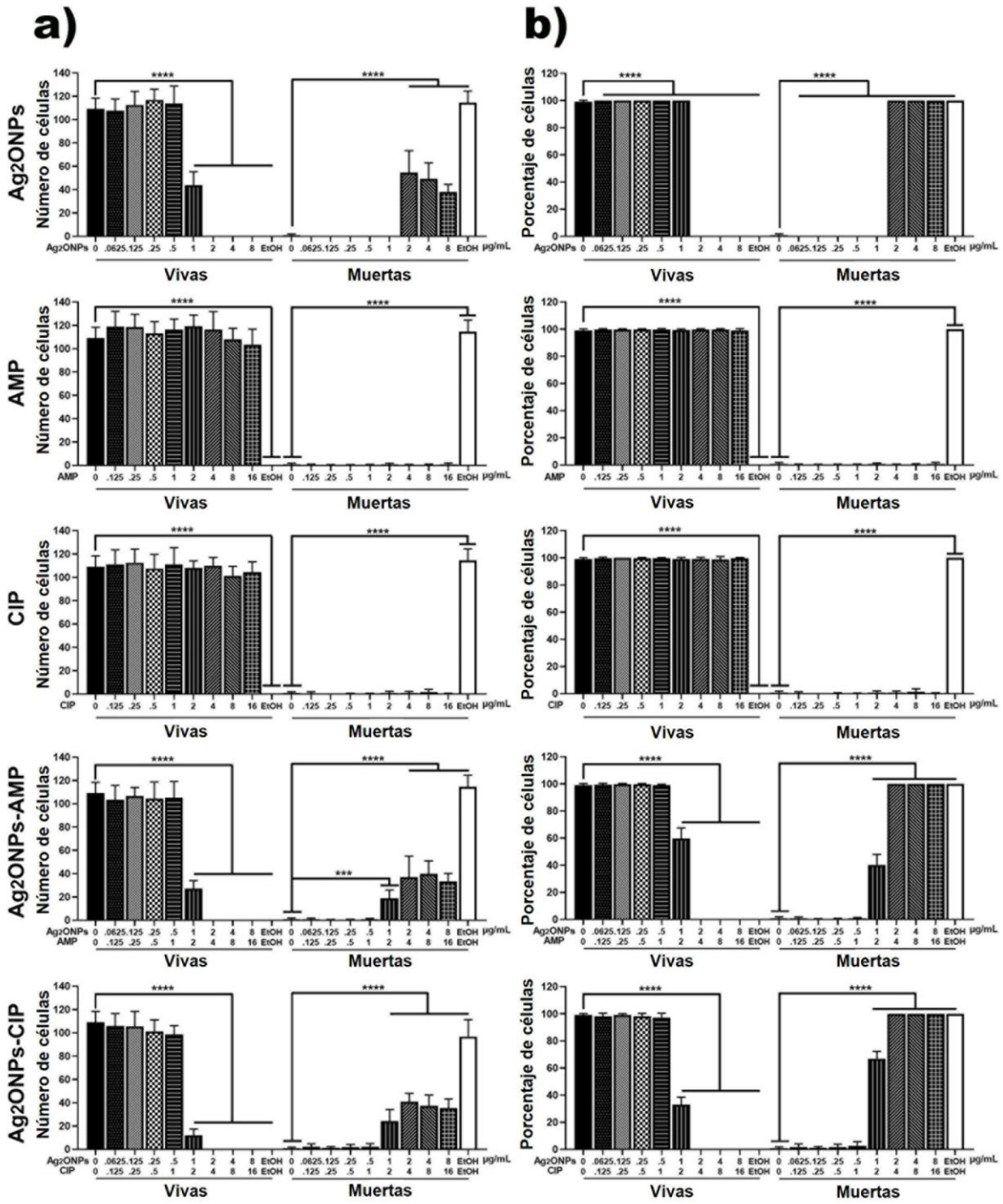


Figura 7. Viabilidad celular de FDH expuestos a diferentes tratamientos. Número y porcentaje de células vivas y muertas. ***$p < 0.001$, ****$p < 0.0001$ *vs.* control (células sin tratar), ANOVA, Tukey *post hoc*. FDH: fibroblastos dérmicos humanos, AMP: ampicilina, CIP: hidrocloruro de ciprofloxacina, EtOH: etanol al 70 %.

Resultados similares fueron reportados por Castro-Gamboa y cols. quienes evaluaron el efecto citotóxico de una formulación comercial de AgNPs (Argovit®) sobre células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón, utilizando concentraciones en el intervalo entre 0.06 y 1 µg/mL. Los autores informaron que después de 12 h de exposición a las AgNPs, las concentraciones más bajas (0.06, 0.125, 0.25 y 0.50 µg/mL) mantuvieron la integridad de la membrana y la actividad metabólica de las células; sin embargo, la concentración más alta (1 µg/mL) disminuyó de forma significativa la viabilidad celular [76]. Asimismo, Kang y cols. encontraron que concentraciones de 1 µg AgNPs/mL inducen citotoxicidad en células dendríticas (línea celular DC2.4) a las 24 h de exposición [77]. Otros estudios también han reportado que el efecto citotóxico de las AgNPs es dependiente de la concentración [78-80].

8.5.2 Ensayo de MTT.

El efecto citotóxico de los antibióticos y Ag_2ONPs se evaluó de manera independiente y en combinación sobre FDH, mediante el ensayo de MTT durante 7 días (Figura 8). Las concentraciones de agentes antimicrobianos que se evaluaron sobre los FDH fueron las que presentaron los efectos antibacterianos sinérgicos y parcialmente sinérgicos. Los resultados revelaron que AMP y CIP de manera independiente no afectan la proliferación celular en el intervalo de concentraciones estudiado (0.125 a 1 µg/mL), lo cual puede comprobarse con el incremento del número de células desde el primer día de cultivo. Asimismo, se encontró que las concentraciones de 0.0625, 0.125 y 0.25 µg/mL Ag_2ONPs de forma independiente y en combinación con los antibióticos no afectan la proliferación celular y ni la cantidad de células metabólicamente activas durante los 7 días del experimento. Además, la concentración más alta de Ag_2ONPs (0.50 µg/mL) en presencia y ausencia de AMP y CIP no afectó significativamente los parámetros antes mencionados hasta el cuarto día de cultivo; sin embargo, al séptimo día se observó una disminución significativa de células metabólicamente activas (Figura 9).

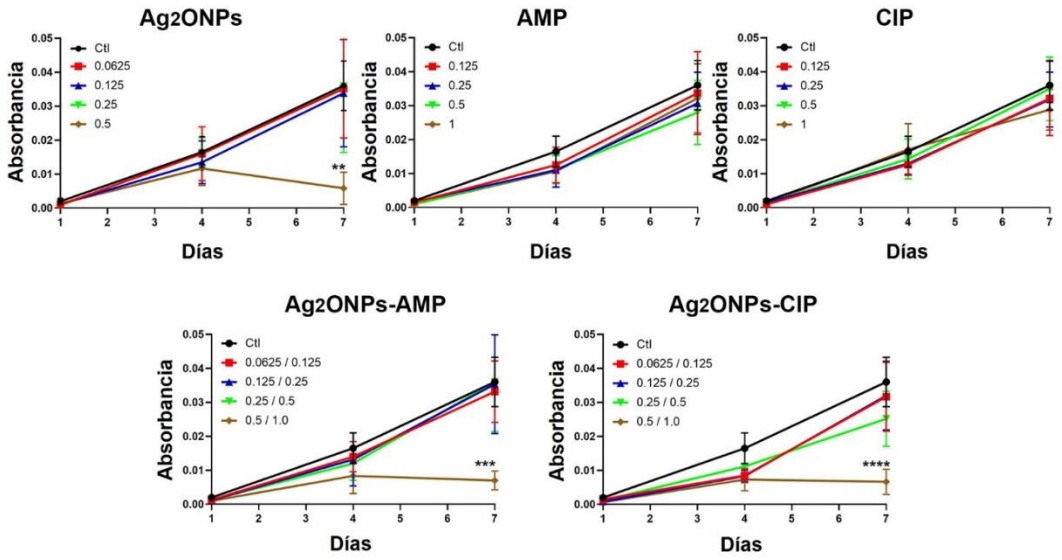


Figura 8. Curvas de proliferación celular. Las gráficas muestran la cantidad de células metabólicamente activas después de ser expuestas a diferentes tratamientos. ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001 vs Ctl, ANOVA, Tukey *post hoc*. AMP: ampicilina, CIP: hidrocloruro de ciprofloxacina, Ctl: control (células sin tratar).

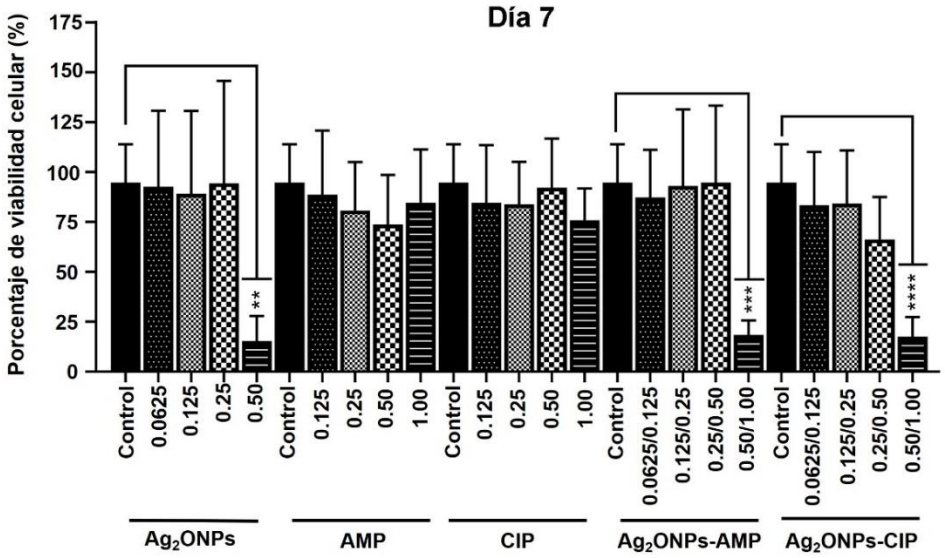


Figura 9. Porcentaje de viabilidad celular al día 7. La gráfica muestra el porcentaje de células viables para cada condición experimental al séptimo día de cultivo. ***p* < 0.01, ****p* <

0.001, ****p < 0.0001 vs Ctl, ANOVA, Tukey *post hoc*. AMP: ampicilina, CIP: hidrocloruro de ciprofloxacina, Ctl: control (células sin tartar).

Yoo y cols. evaluaron el efecto citotóxico de nanocristales de Ag_2O sobre la línea celular de fibroblastos murinos L929 mediante el ensayo de MTT. Los autores reportaron que concentraciones de 50 y 100 µg/mL no afectan la viabilidad de las células durante 24 h [41]. Sin embargo, Muthukumar y cols. sugieren que para aplicaciones biomédicas se utilicen concentraciones menores a 30 µg/mL Ag_2ONPs, ya que concentraciones mayores serían peligrosas para células no cancerosas [36].

En resumen, los estudios citotóxicos demostraron que la combinación de las concentraciones de 0.5 µg Ag_2ONPs/mL y 1.0 µg antibiótico/mL no afectan la viabilidad celular de los FDH (Figura 7). Asimismo, se encontró que estas concentraciones son toleradas por las células hasta las 96 h de cultivo (Figura 8), mientras que, a las 168 h la viabilidad celular se redujo al 25 % (Figura 9). De manera interesante, la viabilidad celular de la combinación de las concentraciones de 0.025 µg Ag_2ONPs/mL y 0.05 µg antibiótico/mL fue mayor al 75 y 90 % estimado para CIP y AMP, respectivamente; concentraciones a las cuales la combinación de Ag_2ONPs y CIP mostraron actividad antimicrobiana frente a cepas clínicas y de referencia.

8.6 Preparación y caracterización de las coberturas poliméricas nanoestructuradas.

8.6.1 DSC.

Las transiciones térmicas (temperatura de transición vítrea (T_g) y de fusión (T_m)) de las coberturas de PVA sin reticular (control) y reticulada con tratamiento térmico fueron determinadas por DSC (Figura 10). Los termogramas muestran que la T_g es de 74.99 y 76.25 °C para el control y la cobertura de PVA reticulada, respectivamente. Por otra parte, las curvas revelaron que el inicio de la T_m del control ocurre a los 149.82 °C, mientras que la cobertura de PVA reticulada mostró un ligero incremento a 153.77 °C. Asimismo, la T_m de la cobertura de PVA reticulada incrementó a 174.32 °C en comparación con el control que fue de 167.66 °C, lo cual sugiere que la estabilidad

térmica de la cobertura reticulada es mayor [81]. Además, se encontró que el ΔH del control es de 6.06 J/g, mientras que la cobertura de PVA reticulada mostró un importante incremento (17.47 J/g). De manera interesante, el grado de cristalinidad de la cobertura reticulada (12 %) es mayor al de la cobertura que no fue tratada térmicamente (4 %). Los resultados sugieren que el incremento en la cristalinidad de la muestra podría estar asociado con la formación de pequeñas regiones cristalinas en que se favorece la orientación y alineación de las cadenas del polímero, debido al proceso de reticulación (tratamiento térmico a 150 °C), el cual favorece que los grupos hidroxilo del PVA formen puentes de hidrógeno que conducen a la generación de estos pequeños cristales que sirven como enlaces cruzados que originan y mantienen unida la estructura tridimensional (red entrecruzada) [82]. Debido a lo anterior, mayor esfuerzo o calor serían requeridos para fracturar o fundir estas fibras poliméricas [81]. Previamente, Miraftab y Naser evaluaron tres métodos de reticulación (metanol, tratamiento térmico a 180 °C y su combinación) en nanofibras de PVA. Los autores reportaron que el tratamiento térmico incrementa la cristalinidad de las muestras en comparación con las nanofibras de PVA no reticuladas y reticuladas con metanol. Asimismo, los resultados revelaron que la cristalinidad de las nanofibras de PVA aumenta cuando son tratadas térmicamente durante más tiempo [17].

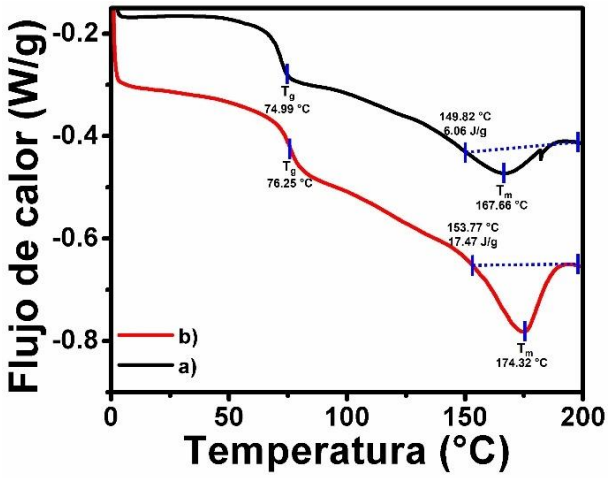


Figura 10. Termogramas de DSC. La temperatura de transición vítrea (T_g) y la temperatura de fusión (T_m) fueron determinadas para la a) cobertura de PVA sin reticular (control) y la b) cobertura de PVA reticulada mediante tratamiento térmico a 150 °C durante 24 h.

8.6.2 SEM y EDS.

Las características morfológicas superficiales y la distribución del diámetro de las fibras se muestran en la Figura 11. En general, los resultados mostraron que la morfología de la mayoría de las fibras es cilíndrica libre de perlas y que están orientadas de forma aleatoria. No obstante, las coberturas poliméricas cargadas con CIP y/o Ag_2ONPs mostraron algunas fibras con forma de listón, lo cual podría estar asociado con cambios en la viscosidad y conductividad eléctrica de las soluciones poliméricas, los cuales son parámetros que influyen en el tamaño de diámetro y morfología de las fibras [11, 19]. El diámetro promedio de las fibras (n = 100) fue de 412.50, 436.27, 502.28 y 606.53 nm para las coberturas PVA, PVA-Ag_2ONPs, PVA-CIP y PVA-Ag_2ONPs-CIP, respectivamente.

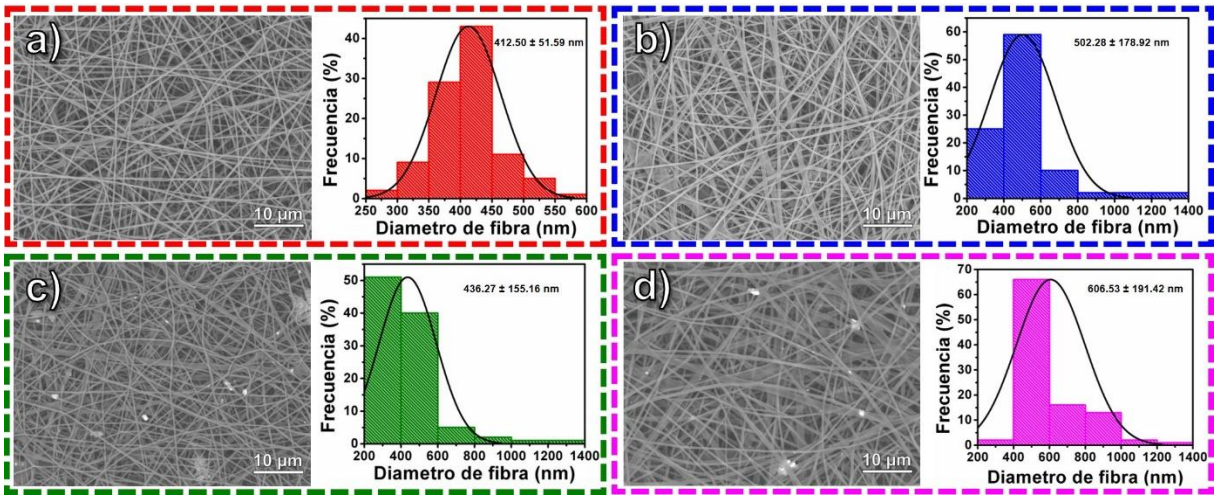


Figura 11. Micrografías de SEM y distribución de diámetro de fibras de las coberturas poliméricas reticuladas: a) PVA; b) PVA-CIP; c) PVA-Ag_2ONPs; d) PVA-Ag_2ONPS-CIP.

Por otra parte, se seleccionaron algunas regiones en las coberturas poliméricas cargadas con agentes antimicrobianos en que se observó acumulación densa de partículas para realizar el análisis EDS y confirmar la composición elemental (Figura 12a-c). Los espectros revelaron picos elementales de carbono (C) y oxígeno (O) en PVA-CIP, PVA-Ag_2ONPs y PVA-Ag_2ONPs-CIP, lo que confirma la presencia del PVA como matriz. Además, se encontraron picos elementales de nitrógeno (N) y flúor (F) en PVA-CIP, que ratifica la existencia del antibiótico, y señales asociadas a plata (Ag) se identificaron en PVA-Ag_2ONPs y PVA-Ag_2ONPs-CIP (Figura 12d-f).

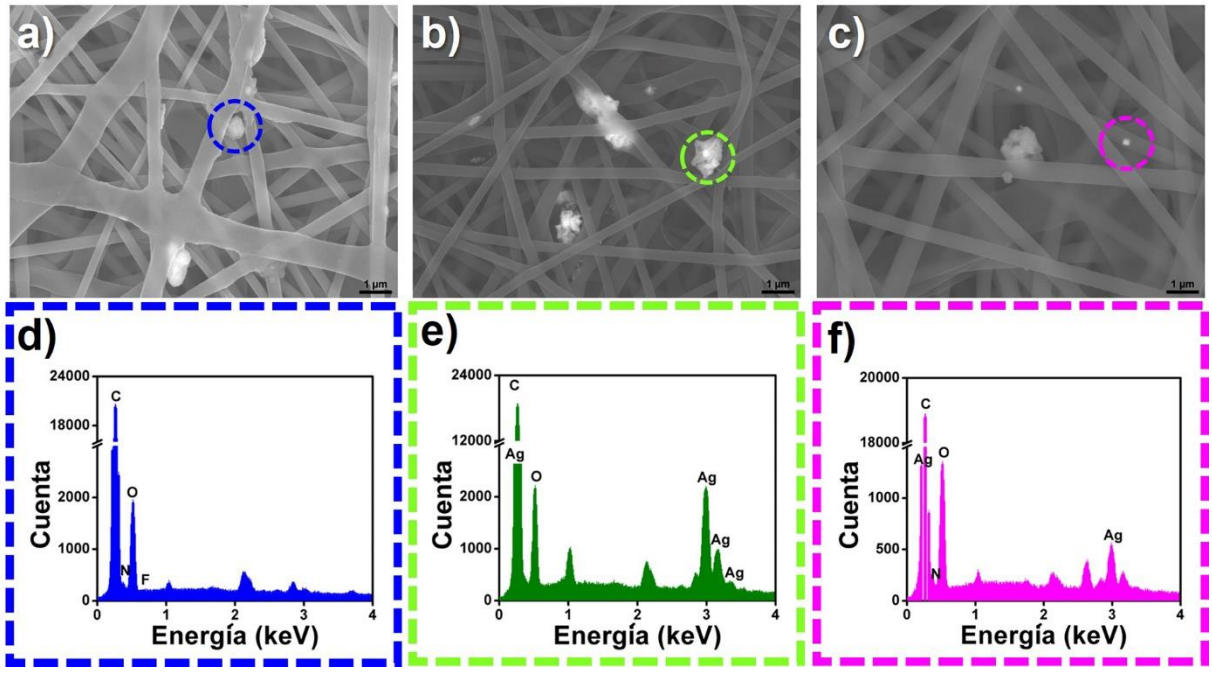


Figura 12. Caracterización morfológica superficial y química de las coberturas poliméricas reticuladas cargadas con agentes antimicrobianos por SEM y EDS. En la parte superior se muestran las micrografías de SEM y en la inferior los espectros de EDS de las coberturas a y d) PVA-CIP, b y e) PVA-Ag_2ONPs, c y f) PVA-Ag_2ONPs-CIP.

Además, la composición de doble capa de las coberturas poliméricas se confirmó mediante observaciones en el corte transversal de las coberturas. Las imágenes de SEM mostraron la capa inferior constituida únicamente por PVA y la capa superior constituida por PVA cargada con agentes antimicrobianos. En la segunda capa y a mayores aumentos fue posible observar regiones más brillantes atribuidas a las Ag_2ONPs. El grosor de las capas de la cobertura de PVA-Ag_2ONPs fue de aproximadamente 25 µm cada una, mientras que las capas de la cobertura de PVA-Ag_2ONPs-CIP tuvieron un grosor aproximado de 40 µm cada una (Figura 13a y e). Las regiones más brillantes de las micrografías fueron seleccionadas para estudiar la composición elemental de las partículas (Figura 13b y f). El análisis EDS reveló señales de Ag en la cobertura PVA-Ag_2ONPs, además de la existencia de Ag y N en PVA-Ag_2ONPs-CIP, confirmando así la incorporación de las Ag_2ONPs y del antibiótico

al PVA (Figura 13c y g). Asimismo, las micrografías muestran que las fibras de la cobertura PVA-Ag_2ONPs-CIP son más rugosas que las de PVA-Ag_2ONPs (Figura 13d y h), lo cual podría estar asociado con cambios en la estructura de las fibras ocasionado durante la reacción de reticulación.

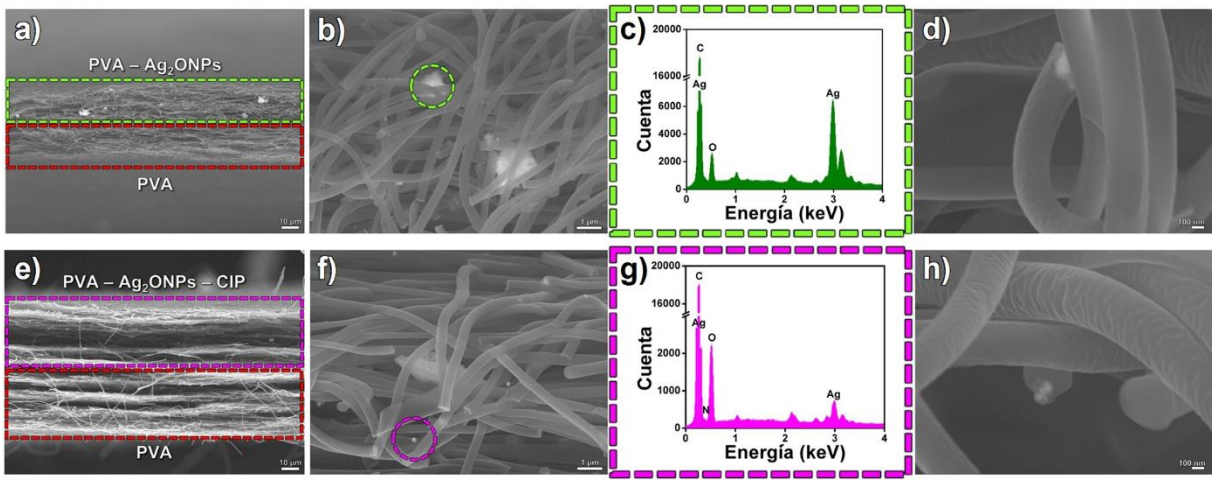


Figura 13. Caracterización del corte transversal por SEM y espectros EDS de las coberturas de PVA-Ag_2ONPs y PVA-Ag_2ONPs-CIP. En la parte superior se presentan micrografías de SEM representativas y análisis por EDS de PVA-Ag_2ONPs y en la inferior las de PVA-Ag_2ONPs-CIP.

8.6.3 XRD.

Los difractogramas de rayos-X de las coberturas poliméricas con y sin agentes antimicrobianos se muestran en la Figura 14. Todos los difractogramas mostraron un pico de difracción definido e intenso localizado en 19.76° (2θ), además de otros menos intensos en 22.74° y 11.25° (2θ), los cuales son atribuidos a la estructura semicristalina del PVA [47, 52, 83, 84]. Por otra parte, el difractograma de la cobertura de PVA-Ag_2ONPs exhibió un pico en 38.35° (2θ) correspondiente al plano cristalográfico (200) de Ag_2O (ICDD 75-1532) con simetría cúbica simple (CS), mientras que en PVA-Ag_2ONPs-CIP el pico en 32.54° (2θ) está asociado al plano (111) de Ag_2O. [85]. Si bien, la intensidad del plano (111) es baja en PVA-Ag_2ONPs-CIP corresponde al plano principal de la estructura de Ag_2O, además de que la limitada intensidad en el pico de

difracción mostrado se atribuye al bajo contenido de Ag_2ONPs (0.8 % p/p) en la cobertura. Este comportamiento ha sido reportado en otros estudios sobre nanofibras electrohiladas de PVA cargadas con bajas cantidades de AgNPs [47, 86]. Por último, la cobertura de PVA-CIP solo mostró las señales características del PVA, debido a la baja concentración de CIP en la cobertura y su característica amorfa, que limita su identificación por esta técnica analítica [18, 19].

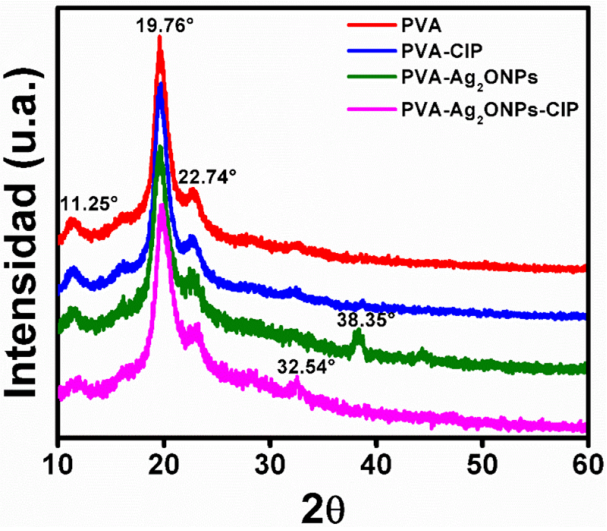


Figura 14. Difractogramas de rayos-X de las coberturas poliméricas reticuladas.

8.6.4 FT-IR.

La espectroscopia FT-IR se utilizó para confirmar los principales grupos funcionales de los componentes de las coberturas poliméricas, así como para predecir las posibles interacciones entre los agentes antimicrobianos (Ag_2ONPs y CIP) con la matriz polimérica. La Figura 15 muestra los espectros FT-IR de la cobertura de PVA sin reticular y las coberturas reticuladas con y sin agentes antimicrobianos. El espectro de la cobertura de PVA sin reticular mostró una amplia banda en 3317 cm^{-1}, la cual fue atribuida a las vibraciones de estiramiento del enlace O-H. Las señales en 2940 y 2912 cm^{-1} fueron asignadas a las vibraciones de estiramiento simétricas y asimétricas de C-H, respectivamente. La banda en 1733 cm^{-1} fue atribuida a las vibraciones de estiramiento de C=O. La señal en 1426 cm^{-1} está relacionada con las vibraciones de

flexión de CH_2. La banda en 1251 cm^{-1} fue asignada a las vibraciones de estiramiento de C-OH. El pico en 1094 cm^{-1} se debe a las vibraciones de estiramiento de C-O. Por último, la pequeña banda en 1140 cm^{-1} se atribuye a las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-C y C-O [48, 87, 88]. Debido a que el PVA es el componente mayoritario en las coberturas, los espectros de PVA-CIP, PVA-Ag_2ONPs, PVA-Ag_2ONPs-CIP y PVA mostraron bandas con forma y frecuencias similares a las del espectro de la cobertura de PVA sin reticular. Sin embargo, el pico atribuido al enlace C=O (~1700 cm^{-1}) fue más prominente en las coberturas reticuladas, debido a la exposición a una alta temperatura (150 °C) y la subsecuente reacción de reticulación [81]. Se observó un incremento en la intensidad de las bandas en ~1650 y 1094 cm^{-1} asociadas al enlace C-O [52], además de un aumento en la intensidad del pico en ~1140 cm^{-1} correspondiente al enlace C-C, lo cual está relacionado con la cristalinidad del polímero [17]. De manera interesante, la cobertura de PVA-Ag_2ONPs mostró una disminución de la intensidad y un ligero ensanchamiento en el pico atribuido al enlace O-H (~3300 cm^{-1}), lo cual sugiere que las Ag_2ONPs podrían estar interactuando con los grupos hidroxilo del PVA mediante fuerzas de Van der Waals. Sin embargo, este comportamiento no se observa en la cobertura que contiene ambos agentes antimicrobianos (PVA-Ag_2ONPs-CIP), ya que las Ag_2ONPs podrían tener mayor afinidad por el grupo hidroxilo del antibiótico, y por lo tanto la interacción de estos conjugados (Ag_2ONPs-CIP) con la matriz polimérica es menor. Por otra parte, se observó un incremento en la intensidad de todas las bandas de la cobertura de PVA-Ag_2ONPs-CIP.

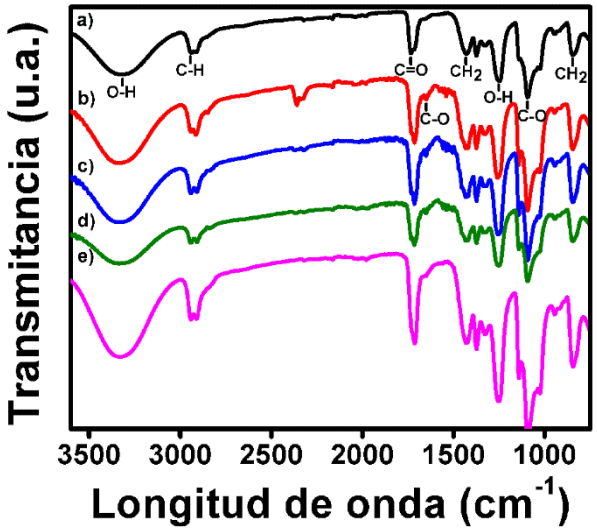


Figura 15. Espectros FT-IR de las coberturas poliméricas sin reticular y reticuladas con tratamiento térmico. a) Control (cobertura de PVA sin reticular); b) PVA; c) PVA-CIP; d) PVA-Ag_2ONPs; e) PVA-Ag_2ONPs-CIP.

8.7 Liberación de agentes antimicrobianos de las coberturas poliméricas nanoestructuradas.

8.7.1 Eficiencia de carga y perfil de liberación de CIP.

El *% LE* de CIP en la cobertura de PVA-CIP fue de 29.05 ± 1.80 %. La Figura 16 muestra las curvas de liberación del antibiótico de las coberturas de PVA-CIP y PVA-Ag_2ONPs-CIP hasta las 24 h. El comportamiento de liberación de CIP en ambas coberturas fue similar, observándose un efecto de liberación en ráfaga durante los primeros 30 min con una liberación del 98.39 % para la cobertura de PVA-CIP y del 86.94 % para la cobertura de PVA-Ag_2ONPs-CIP. Posteriormente, la liberación del antibiótico fue lineal y lenta, mostrando un perfil de liberación típico de doble etapa que está conformado por una etapa inicial de liberación rápida seguido de una liberación constante. La máxima concentración de CIP liberada a las 24 h por las coberturas de PVA-CIP y PVA-Ag_2ONPs-CIP fue de 9.63 ± 1.48 y 8.90 ± 0.33 ppm, respectivamente. Resultados similares fueron reportados por Thairin y Wutticharoenmongkol quienes prepararon membranas electrohiladas de alginato/PVA/gelatina cargadas con CIP, y

encontraron que el antibiótico tiene una liberación en ráfaga durante los primeros 45 min de inmersión en buffer de fosfatos seguido de una liberación sostenida [89]. Estrada-Villegas y cols. estudiaron el comportamiento de liberación de CIP de nanofibras electrohiladas de ácido poliláctico. Los autores reportaron que el *% LE* de sus materiales fue de aproximadamente 37 %, y que la liberación del 100 % del antibiótico ocurre a los 120 min [59]. Asimismo, Uhljar y cols. encontraron que el 94 % de CIP es liberado de nanofibras electrohiladas de polivinilpirrolidona durante los primeros 5 min de inmersión en buffer de fosfatos [90]. Estudios previos han propuesto que la liberación rápida de CIP en la primera etapa del perfil de liberación está asociada con su naturaleza hidrofílica y con la distribución del antibiótico en la superficie de las fibras [59], de forma que, cuando la matriz polimérica está en contacto con el medio acuoso es solvatada y se favorece la difusión de las moléculas superficiales fuera de la matriz polimérica [19, 89]. Este comportamiento es útil en sistemas de liberación de fármacos para el tratamiento de heridas, ya que la alta concentración inicial del antibiótico previene la proliferación bacteriana, además de que la liberación sostenida inhibe el crecimiento de las pocas bacterias que lograron proliferar [19].

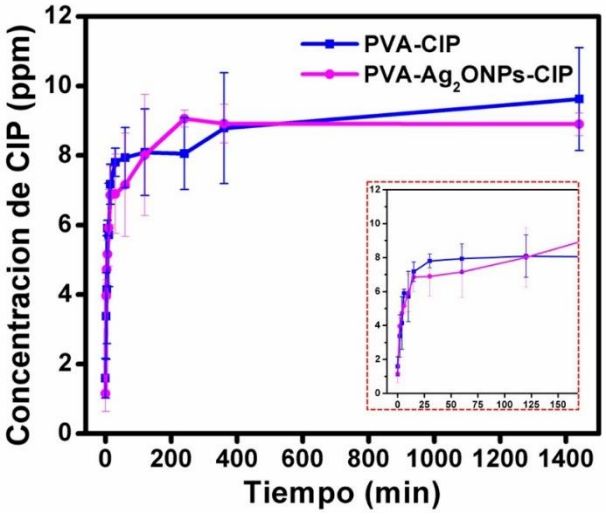


Figura 16. Perfiles de liberación de CIP de las coberturas poliméricas reticuladas cargadas con el antibiótico. La liberación *in vitro* de CIP se determinó por el método de inmersión total en buffer de fosfatos (pH 7.5) durante 24 h.

8.7.2 Liberación *in vitro* de Ag.

La Figura 17 muestra el perfil de liberación de Ag de la cobertura de PVA-Ag_2ONPs-CIP, el cual se determinó utilizando el método de inmersión total en buffer de fosfatos (pH = 7.5) durante 24 h. Se encontró que la liberación de Ag fue rápida durante las primeras 2 h de inmersión, alcanzando una concentración máxima de 1.31 ± 0.24 ppm Ag. Además, los resultados sugieren que la liberación de Ag de la matriz polimérica sigue un mecanismo de difusión [52]. Los resultados concuerdan con el efecto bactericida de la cobertura, la cual inhibió el crecimiento de las bacterias MDR a partir de las 2 h de exposición (Figura 19). Además, los ensayos de citotoxicidad revelaron que esta concentración de Ag no es tóxica para los FDH (Figura 20). Este mecanismo de liberación rápida de Ag podría ser útil para prevenir la contaminación y/o reinfección de las heridas y favorecer su cicatrización [86, 91]. Por otra parte, los resultados sugieren que el CIP favorece la liberación de Ag, ya que cuando se intentó cuantificar la liberación en la cobertura de PVA-Ag_2ONPs no fue posible, debido a que las concentraciones de Ag se encontraron por debajo del límite de cuantificación del equipo. Resultados similares fueron reportados por Alipour y cols. quienes estudiaron la liberación de Ag de nanofibras de PVA/polivinilpirrolidona/pectina/acetato de mafenida cargadas con AgNPs (0.7 % p/p) y encontraron que a las 24 h de inmersión la concentración máxima de Ag liberada fue de 1.195 ppm [52].

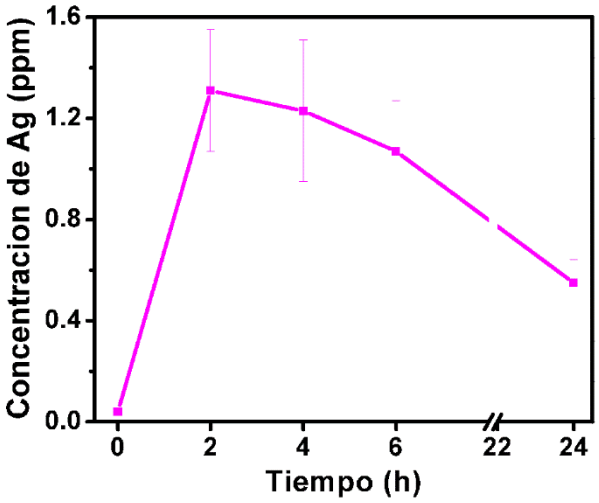


Figura 17. Perfil de liberación de Ag de la cobertura reticulada de PVA-Ag_2ONPs-CIP. La liberación *in vitro* de Ag se determinó por el método de inmersión total en buffer de fosfatos (pH 7.5) durante 24 h.

8.8 Cinéticas de liberación de CIP y ajustes a modelos cinéticos de liberación.

Para describir el mecanismo de liberación del antibiótico de las coberturas de PVA-CIP y PVA-Ag_2ONPs-CIP los datos se ajustaron a tres modelos matemáticos diferentes (Figura 18) y se calculó el R^2 (Tabla 7), como criterio de ajuste del modelo a los datos experimentales. Se encontró que el mejor coeficiente de determinación (R^2) para CIP en ambas coberturas se obtiene con el modelo de Korsmeyer-Peppas (0.83 y 0.90 para PVA-CIP y PVA-Ag_2ONPs-CIP, respectivamente). El ajuste de los datos experimentales a este modelo cinético indica que la liberación del antibiótico sigue un mecanismo de liberación de difusión Fickiana ($n < 0.5$), el cual es independiente de la cantidad de antibiótico cargado, el tipo de polímero utilizado y el espesor del material [19]. Asimismo, los resultados sugieren que las Ag_2ONPs no modifican el mecanismo de liberación del CIP, ni tienen gran influencia en el tiempo de liberación.

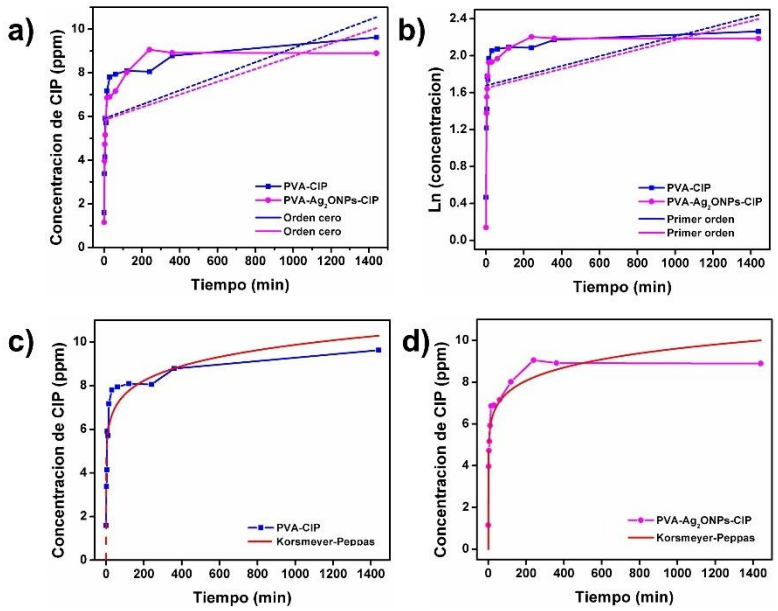


Figura 18. Perfiles de liberación de CIP de las coberturas poliméricas reticuladas cargadas con el antibiótico ajustados a tres modelos matemáticos diferentes. a) Orden cero, b) Primer orden, c) y d) Korsmeyer-Peppas.

Tabla 7. Parámetros de los modelos matemáticos ajustados a la liberación de CIP para las coberturas reticuladas de PVA-CIP y PVA-Ag$_2$ONPs-CIP.

Modelo matemático	Parámetro	PVA-CIP	PVA-Ag$_2$ONPs-CIP
Orden cero	R^2	0.2280	0.1828
	k_0 (ppm/min)	0.0032	0.0029
Primer orden	R^2	0.0943	0.0525
	k_1 (min^{-1})	0.0005	0.0005
Korsmeyer-Peppas	R^2	0.8302	0.9019
	k_p (min^{-n})	4.5196	4.5354
	n	0.1131	0.1087

R^2: coeficiente de regresión; k_0, k_1 y k_p: constantes de velocidad de liberación; n: exponente de difusión.

8.9 Actividad antimicrobiana de las coberturas poliméricas nanoestructuradas.

El efecto antibacteriano de las coberturas poliméricas reticuladas con y sin agentes antimicrobianos se estudió mediante curvas de letalidad contra un panel de

microorganismos, incluyendo dos cepas de referencia (*S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922) y cuatro aislados clínicos MDR (Figura 19), de los cuales *A. baumannii*, *E. coli* y *E. faecium* fueron además resistentes a CIP (CMI: ≥ 4, 4 y ≥ 8 µg/mL, respectivamente). Debido a que previamente se demostró que las Ag_2ONPs tienen mayor actividad contra las bacterias Gram negativas en comparación con las Gram positivas [85], los tiempos de muestreo para la elaboración de las cinéticas fueron distintos para cada grupo de microorganismos. De manera general, los resultados mostraron que la cobertura de PVA no tiene actividad antimicrobiana. En cuanto a las cepas de referencia, se encontró que la cobertura de PVA-Ag_2ONPs-CIP tiene un efecto sinérgico contra *S. aureus* ATCC 25923 al inhibir su crecimiento (reducción logarítmica = 5) en menor tiempo (3 h) en comparación con las coberturas que contienen a los agentes antimicrobianos de forma independiente (PVA-CIP = 4h y PVA-Ag_2ONPs = 6h). De manera interesante, las curvas de letalidad revelaron que las coberturas de PVA-Ag_2ONPs y PVA-Ag_2ONPs-CIP inhiben el desarrollo de *E. coli* ATCC 25923 en solo 30 min, mientras que el efecto bactericida de la cobertura de PVA-CIP se observó hasta las 2 h. Estos resultados sugieren que existe un efecto sinérgico entre las Ag_2ONPs y CIP, ya que la concentración de las Ag_2ONPs en la cobertura cargada con ambos agentes antimicrobianos es 10 veces menor a la que contiene la monoterapia con Ag_2ONPs (0.8 y 8 % p/p, respectivamente). Un comportamiento similar se encontró contra *S. aureus* resistente a oxacilina, en donde ambas coberturas (PVA-Ag_2ONPs y PVA-Ag_2ONPs-CIP) mostraron efecto bactericida a las 6 h, mientras que la cobertura de PVA-CIP inhibió su crecimiento hasta las 24 h. Por otra parte, las curvas de letalidad mostraron que la cobertura de PVA-CIP no tiene actividad antimicrobiana contra *E. faecium*, *E. coli* y *A. baumannii*, lo cual concuerda con los resultados de susceptibilidad del equipo automatizado VITEK®2 que indicaron que estos microorganismos son resistentes a CIP. Sin embargo, la cobertura que contiene la combinación de agentes antimicrobianos (PVA-Ag_2ONPs-CIP) fue capaz de inhibir el desarrollo de estos microorganismos en pocas horas, observándose el efecto bactericida contra *E. coli* y *A. baumannii* a las 2 h, y contra *E. faecium* a las 3 h. Asimismo, la cobertura de PVA-Ag_2ONPs-CIP demostró su efecto sinérgico contra *E.*

coli y *E. faecium* al tener mejor actividad antimicrobiana que la cobertura de PVA-Ag_2ONPs, la cual requirió el doble de tiempo (4 y 6 h, correspondientemente) para inhibir el desarrollo de estas bacterias.

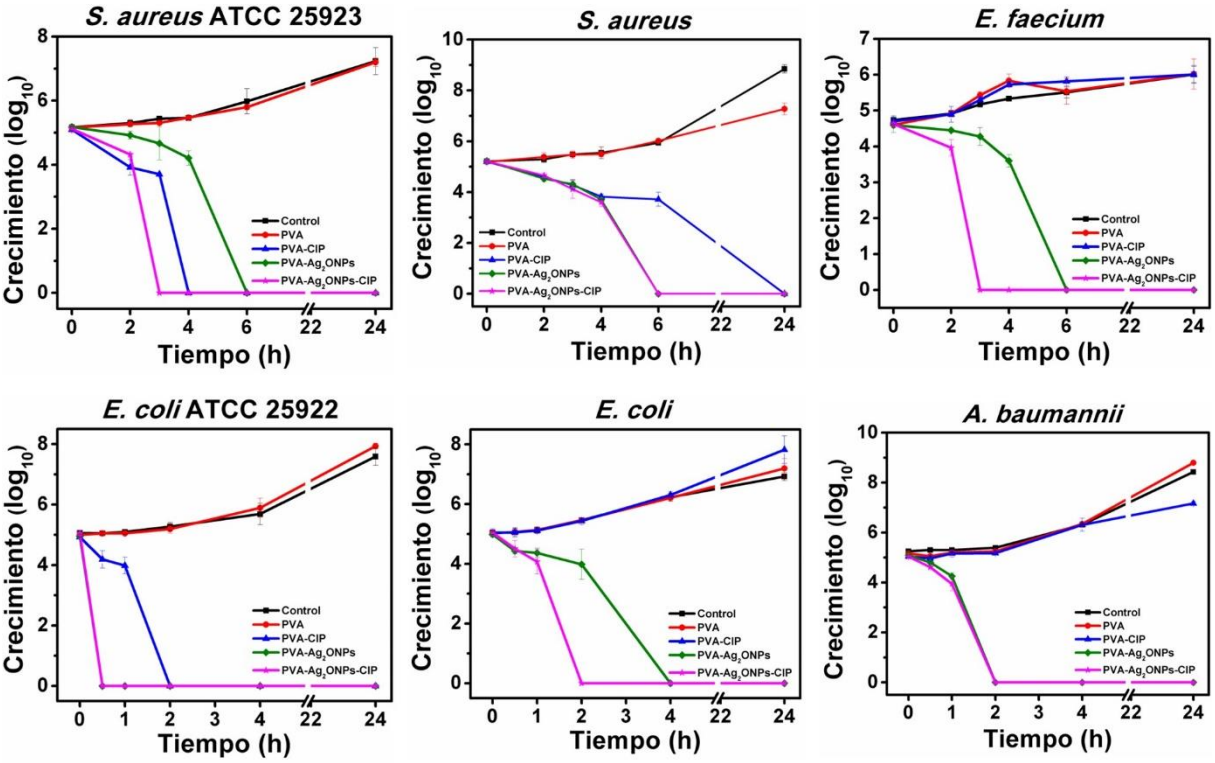


Figura 19. Curvas de letalidad de diferentes tratamientos contra cepas de referencia y aislados clínicos multidrogorresistentes. El panel superior corresponde a los resultados de las bacterias Gram positivas y el inferior a las bacterias Gram negativas.

La actividad antimicrobiana de materiales electrohilados cargados con AgNPs ha sido estudiada previamente en cepas de referencia. En este contexto, Li y cols. prepararon membranas electrohiladas de una mezcla de PVA y oligosacáridos de quitosán cargadas con diferentes concentraciones de $AgNO_3$ (1, 3 y 5 % p/p con respecto al polímero) y AgNPs (3 % p/p con respecto al polímero). Los resultados del ensayo cinético bactericida mostraron que la membrana decorada con AgNPs inhibe el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli* (~99.99 y ~90 %, respectivamente) en 5 h, mientras que el efecto bactericida de las membranas cargadas con $AgNO_3$ se presenta hasta

las 12 h [86]. Recientemente, Do y cols. reportaron el efecto bactericida de un vendaje electrohilado de policaprolactona recubierto con múltiples capas de gelatina y cargado con AgNPs (6.7 µg) por técnica de inmersión contra *P. aeruginosa* ATCC 9027 y *S. aureus* ATCC 25923. El efecto bactericida contra *P. aeruginosa* se encontró a partir de la primera hora de incubación (reducción logarítmica = 3.8), mientras que la reducción del 99.99 % de *S. aureus* se observó después de 12 h [92]. De manera general, los resultados sugieren que la cobertura PVA-Ag_2ONPs-CIP diseñada en esta investigación tiene mejor actividad antibacteriana que los materiales electrohilados reportados previamente, al inhibir el crecimiento de cepas de referencia en menor tiempo y con menores concentraciones de Ag. Por otra parte, se ha demostrado que el grado de reticulación de los materiales influye en la liberación de los agentes antimicrobianos y a su vez en el efecto bactericida. Wei y cols. evaluaron la actividad antibacteriana de nanofibras electrohiladas de PVA con diferentes grados de reticulación (sin reticular, parcialmente reticuladas y reticuladas con glutaraldehído) y cargadas con AgNPs (1 % p/p $AgNO_3$ con respecto al polímero), contra *S. aureus* ATCC 6538. Las curvas de muerte bacteriana revelaron que a los 120 min de incubación la actividad antimicrobiana fue del 99.9, 68.2 y 48.3 % para las nanofibras de PVA dopadas con AgNPs sin reticular, parcialmente reticuladas y reticuladas, respectivamente; lo cual estuvo asociado con la cantidad de Ag liberada [93]. Estos datos sugieren que el tratamiento térmico a 150 °C es un procedimiento efectivo y viable de reticulación para materiales de PVA electrohilados en comparación con el glutaraldehído, ya que las coberturas poliméricas nanoestructuradas obtenidas en este trabajo tuvieron mejor efecto bactericida al permitir la liberación de los agentes antimicrobianos (Ag_2ONPs y CIP) de la red entrecruzada.

8.10 Biocompatibilidad de las coberturas poliméricas nanoestructuradas.

8.10.1 Evaluación indirecta del efecto citotóxico.

Para evaluar el efecto citotóxico de los agentes antimicrobianos (Ag_2ONPs y CIP) liberados de las coberturas poliméricas reticuladas, los FDH fueron expuestos a los sobrenadantes generados por las coberturas poliméricas reticuladas durante 24 h y,

posteriormente, se estudió la viabilidad celular por el ensayo de MTT (Figura 20). Los resultados mostraron que a las 24 h los tratamientos no disminuyen de forma significativa la actividad metabólica de los FDH en comparación con el grupo control. Sin embargo, los FDH que fueron expuestos a los sobrenadantes de las coberturas cargadas con agentes antimicrobianos muestran una ligera disminución de la absorbancia.

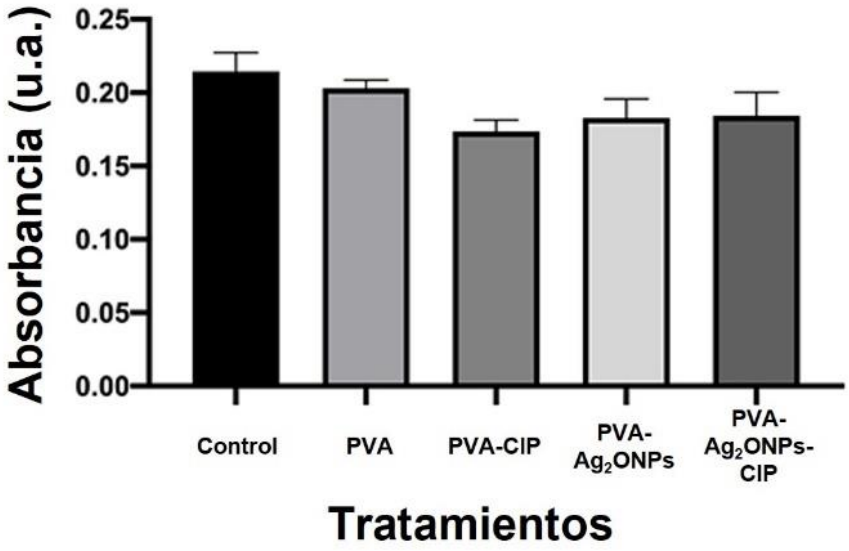


Figura 20. Evaluación indirecta del efecto citotóxico por el ensayo de MTT. El efecto tóxico de los sobrenadantes generados a las 24 h por las coberturas poliméricas reticuladas se evaluó sobre FDH.

Debido a lo anterior, se decidió estudiar el efecto de los sobrenadantes de las coberturas poliméricas reticuladas sobre la morfología de los FDH mediante el ensayo de calceína/EthD-1 (Figura 21). En todas las condiciones experimentales se observó la morfología espiculada clásica de los FDH. Asimismo, se encontró que los FDH tratados con el sobrenadante de la cobertura de PVA-Ag_2ONPs mantienen su morfología y la mayoría de las células se encuentran viables (células positivas a calceína), lo cual concuerda con el ensayo de MTT. En general, los datos sugieren que

las coberturas poliméricas reticuladas con y sin agentes antimicrobianos son biocompatibles con los FDH. Resultados similares fueron reportados por Li y cols. quienes encontraron que sobrenadantes generados durante 24 h por membranas electrohiladas de PVA y oligosacáridos de quitosán decoradas con AgNPs no afectan la viabilidad celular de FDH (> 90 %) en el intervalo de concentraciones estudiado (0.2 -1 mg/mL) [86]. Asimismo, Wei y cols. demostraron que los sobrenadantes de nanofibras de PVA cargadas con AgNPs son biocompatibles con diferentes líneas celulares (fibroblastos embrionarios de ratón (NIH3T3), células embrionarias de riñón humano (293T) y células de linfoma histiocítico humano (U937)) dado que no afectan su metabolismo mitocondrial ni causan alteraciones en su morfología [93].

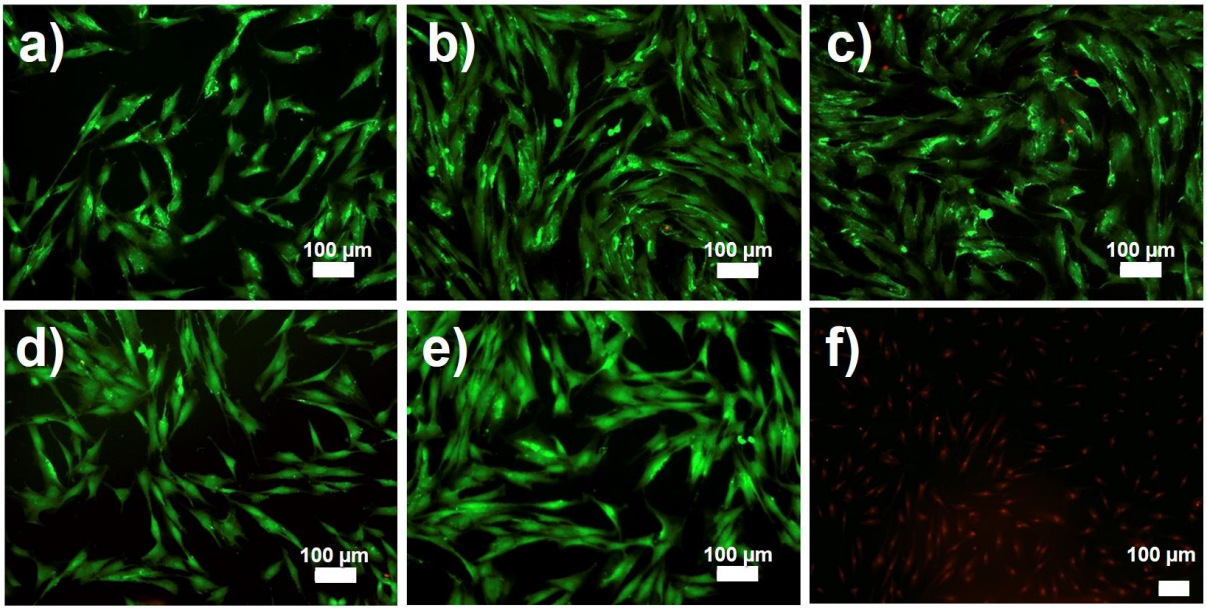


Figura 21. Evaluación indirecta del efecto citotóxico por el ensayo de calceína/EthD-1. Micrografías representativas del ensayo de viabilidad celular a las 24 h de exposición a los sobrenadantes generados por las coberturas poliméricas reticuladas. Las células vivas (células positivas a calceína) están marcadas en color verde y las células muertas (células positivas a EthD-1) están marcadas en color rojo: a) Control (células sin tratar); b) PVA; c) PVA-CIP; d) PVA-Ag_2ONPs; e) PVA-Ag_2ONPs-CIP; f) etanol al 70 %.

8.10.2 Ensayo de biocompatibilidad.

Para explorar la posible aplicación de estas novedosas coberturas poliméricas como andamios, los FDH fueron sembrados directamente sobre los materiales y, posteriormente, se realizaron ensayos de viabilidad celular empleando el método de calceína/EthD-1 y el ensayo de MTT (Figura 22). Los resultados mostraron que los FDH fueron capaces de adherirse y sobrevivir, así como conservar su forma espiculada cuando fueron sembrados sobre la cobertura de PVA. En el caso de las células sembradas sobre las coberturas poliméricas cargadas con agentes antimicrobianos de forma independiente y en combinación mostraron cambios en su morfología (Figura 22a), sin embargo, las células aún se encuentran viables (Figura 22a y c). Para determinar si las células permanecieron en el fondo de las placas de cultivo en lugar de permanecer sobre los materiales, se analizó el fondo de los pozos mediante microscopía de fluorescencia (ensayo de calceína/EthD-1). Las micrografías mostraron que pocas células se encuentran en el fondo de la placa de cultivo (Figura 22b), lo cual sugiere que la mayoría están sembradas sobre las coberturas poliméricas. Estos resultados concuerdan con lo que se encontró en los estudios de citotoxicidad de los sobrenadantes de las coberturas poliméricas, por lo que es posible concluir que las Ag_2ONPs y CIP, así como su combinación, no afectan la viabilidad de los FDH. Además, la cobertura de PVA podría ser utilizada como un andamio celularizado al ser biocompatible y no modificar la morfología de las células.

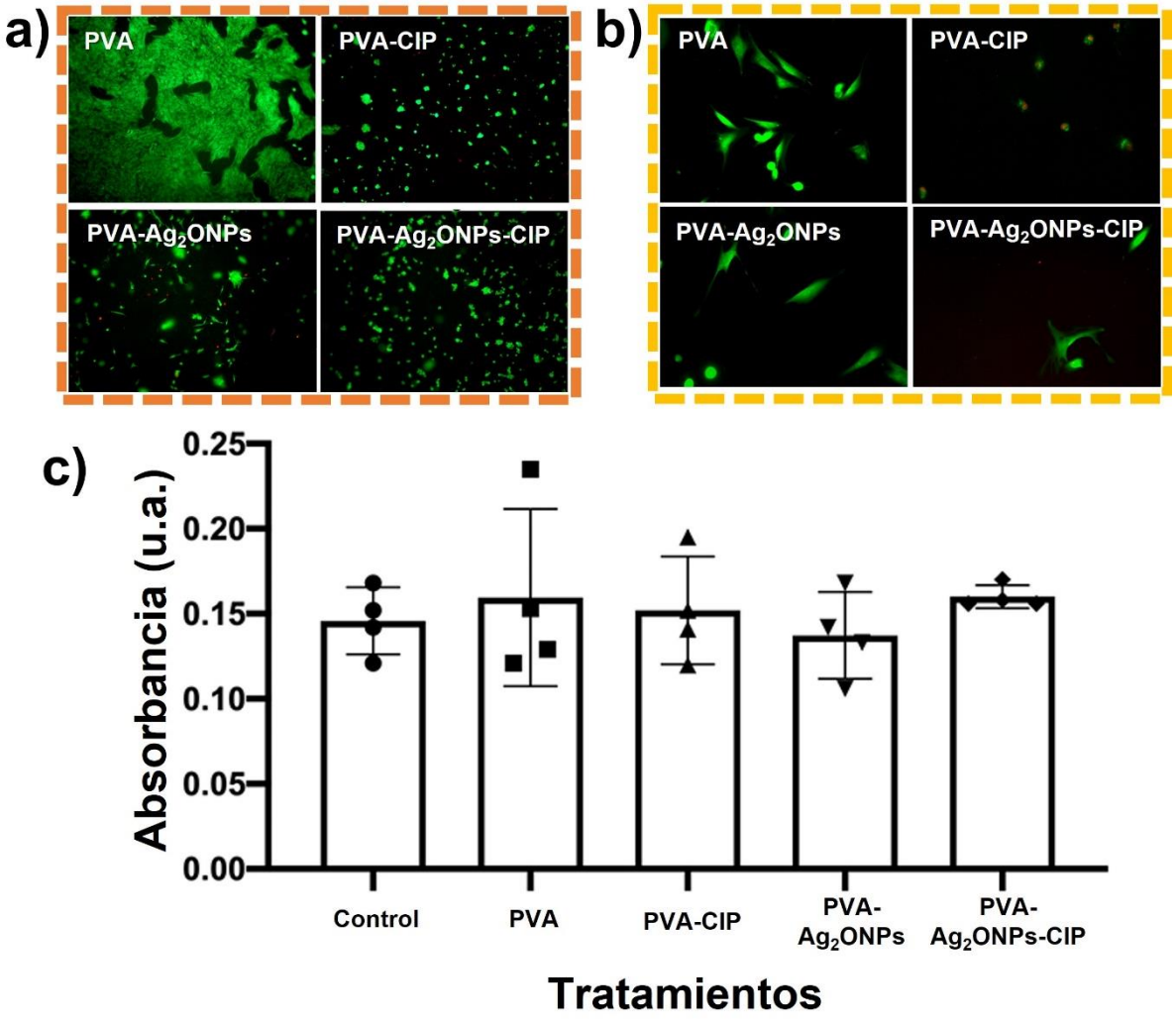


Figura 22. Estudio de biocompatibilidad. La biocompatibilidad de las coberturas poliméricas reticuladas con FDH se estudió mediante la siembra directa de las células sobre los materiales. El panel a) muestra las células viables adheridas a las coberturas poliméricas reticuladas, mientras que el panel b) ilustra las células viables que se encontraron en el pozo de la placa. El panel c) corresponde al ensayo de MTT.

Previamente Vashisth y cols. reportaron que el tratamiento térmico a 150 °C como método de reticulación para nanofibras electrohiladas de PVA y gellan no afecta la viabilidad celular de FDH cuando son sembrados directamente sobre estos materiales

[16]. Además, estudios recientes han propuesto el uso de nanofibras electrohiladas cargadas con AgNPs para el tratamiento de heridas [52]. Eghbalifam y cols. demostraron que la incorporación de AgNPs a membranas electrohiladas de goma arábiga y PVA recubiertas con policaprolactona no influye en la biocompatibilidad de estos materiales al permitir la proliferación de fibroblastos embrionarios de ratón en la superficie de las membranas [83].

9. CONCLUSIONES

En este estudio se reporta un novedoso método de química verde basado en una reacción de metátesis activada por molienda mecánica para la síntesis de Ag_2ONPs, el cual es eficiente, económico, de alto rendimiento químico y de un solo paso. Este método no requiere calor ni el uso de reactivos tóxicos para producir Ag_2ONPs, las cuales fueron preparadas utilizando la mezcla eutéctica de $LiNO_3/NaNO_3$ como subproductos de la reacción de metátesis y representa un medio de reacción inorgánico que no tiene precedentes. Las Ag_2ONPs sintetizadas presentaron formas esféricas con un diámetro promedio de 8.72 ± 2.76 nm, y mostraron excelente actividad antibacteriana contra aislados clínicos MDR (CMI < 8 µg Ag_2ONPs/mL). Además, se encontró que la combinación de Ag_2ONPs con AMP y CIP ofrecen efectos antibacterianos sinérgicos y parcialmente sinérgicos, siendo mejor la combinación con CIP al requerirse menores concentraciones de Ag_2ONPs para inhibir a los patógenos estudiados. El análisis por espectroscopia FT-IR sugiere que las Ag_2ONPs interactúan con el grupo amino y carboxilo presentes en AMP y CIP, respectivamente. Además, los ensayos toxicológicos mostraron que concentraciones menores a 1 µg Ag_2ONPs/mL son toleradas por los FDH hasta por 96 h. Debido a que la combinación de Ag_2ONPs con CIP mostró mejores resultados contra los aislados clínicos en comparación con AMP, se prepararon coberturas electrohiladas compuestas por una capa inferior de PVA y una capa superior de PVA cargada con estos agentes antimicrobianos de forma independiente (PVA-Ag_2ONPs y PVA-CIP) y en combinación (PVA-Ag_2ONPs-CIP). Se encontró que el método de reticulación (tratamiento térmico

a 150 °C durante 24 h) les proporciona a las coberturas resistencia al agua y no impide la liberación de las Ag_2ONPs y el CIP. Las micrografías del corte transversal de las coberturas mostraron que algunas Ag_2ONPs se encuentran dentro de las fibras, mientras que otras se sitúan sobre la superficie. Los estudios de liberación *in vitro* sugieren que el antibiótico se libera de las coberturas por difusión fickiana (modelo Korsmeyer-Peppas), teniendo una liberación en ráfaga durante los primeros 30 min seguido de una liberación sostenida, mientras que la máxima concentración de Ag se alcanzó a las 2 h de inmersión en buffer de fosfatos. Este comportamiento de liberación de los agentes antimicrobianos podría ser de utilidad en el tratamiento de heridas, ya que la liberación rápida del antibiótico y de las Ag_2ONPs evitaría la contaminación de la herida al inhibir el crecimiento de los microorganismos, en tanto que la liberación sostenida evitaría el desarrollo del proceso infeccioso. Además, los resultados del estudio de liberación *in vitro* estuvieron acordes con lo que se encontró en los ensayos de actividad antibacteriana, los cuales mostraron que la cobertura cargada con ambos agentes antimicrobianos (PVA-Ag_2ONPs-CIP) tiene mejor efecto bactericida al inhibir el crecimiento de bacterias MDR en menor tiempo y con menores concentraciones de agentes antimicrobianos en comparación con las coberturas cargadas con la monoterapia (PVA-CIP y PVA-Ag_2ONPs). Estos resultados sugieren que existe un efecto sinérgico entre los componentes de la cobertura de PVA-Ag_2ONPs-CIP al inhibir el desarrollo de bacterias resistentes a CIP, lo cual es una propiedad relevante de estos materiales, ya que una de las principales desventajas de los apósitos convencionales es que son inefectivos contra las bacterias MDR. Por otra parte, los ensayos de citotoxicidad revelaron que la superficie de las coberturas y la cantidad de agentes antimicrobianos (Ag_2ONPs y CIP) que se liberan a las 24 h de inmersión no son tóxicas para los FDH, estas características podrían ser benéficas para el desarrollo de andamios celularizados, ya que podrían favorecer la cicatrización de las heridas. Se comprobó la viabilidad de la técnica de electrohilado en la elaboración de nanofibras con propiedades de interés para el tratamiento de las heridas. En un futuro, dentro del grupo de investigación, podrían elaborarse coberturas en las cuales ambas capas sean cargadas con diferentes agentes antimicrobianos. Asimismo, podría

estudiarse la biodegradabilidad de estos materiales para que se biodegraden con el transcurso del tiempo y no sea necesario retirar la cobertura de la herida, haciendo ensayos en un modelo animal inicialmente.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Khatami M, Varma RS, Zafarnia N, Yaghoobi H, Sarani M, Kumar VG. Applications of green synthesized Ag, ZnO and Ag/ZnO nanoparticles for making clinical antimicrobial wound-healing bandages. Sustainable Chemistry and Pharmacy. 2018;10:9-15.
2. Ruggeri M, Bianchi E, Rossi S, Vigani B, Bonferoni MC, Caramella C, et al. Nanotechnology-Based Medical Devices for the Treatment of Chronic Skin Lesions: From Research to the Clinic. Pharmaceutics. 2020;12(9):815.
3. Ward RS, Saffle JR. Topical agents in burn and wound care. Physical Therapy. 1995;75(6):526-38.
4. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. Lancet. 2020;395(10219):200-11.
5. Wu YK, Cheng NC, Cheng CM. Biofilms in Chronic Wounds: Pathogenesis and Diagnosis. Trends Biotechnol. 2019;37(5):505-17.
6. Goldberg SR, Diegelmann RF. What Makes Wounds Chronic. Surg Clin North Am. 2020;100(4):681-93.
7. Mihai MM, Preda M, Lungu I, Gestal MC, Popa MI, Holban AM. Nanocoatings for Chronic Wound Repair-Modulation of Microbial Colonization and Biofilm Formation. Int J Mol Sci. 2018;19(4):1179.
8. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016.
9. Sugden R, Kelly R, Davies S. Combatting antimicrobial resistance globally. Nat Microbiol. 2016;1(10):1-2.

10. Mihai MM, Dima MB, Dima B, Holban AM. Nanomaterials for Wound Healing and Infection Control. Materials (Basel). 2019;12(13):2176.
11. Alven S, Buyana B, Feketshane Z, Aderibigbe BA. Electrospun Nanofibers/Nanofibrous Scaffolds Loaded with Silver Nanoparticles as Effective Antibacterial Wound Dressing Materials. Pharmaceutics. 2021;13(7):964.
12. Zarekhalili Z, Bahrami SH, Ranjbar-Mohammadi M, Milan PB. Fabrication and characterization of PVA/Gum tragacanth/PCL hybrid nanofibrous scaffolds for skin substitutes. Int J Biol Macromol. 2017;94(Pt A):679-90.
13. Qin X-H, Wang SY. Electrospun nanofibers from crosslinked poly(vinyl alcohol) and its filtration efficiency. Journal of Applied Polymer Science. 2008;109:951-6.
14. Yang E, Qin X, Wang S. Electrospun crosslinked polyvinyl alcohol membrane. Materials Letters. 2008;62(20):3555-7.
15. Pathan SG, Fitzgerald LM, Ali SM, Damrauer SM, Bide MJ, Nelson DW, et al. Cytotoxicity associated with electrospun polyvinyl alcohol. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2015;103(8):1652-62.
16. Vashisth P, Pruthi V. Synthesis and characterization of crosslinked gellan/PVA nanofibers for tissue engineering application. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2016;67:304-12.
17. Miraftab M, Saifullah AN, Çay A. Physical stabilisation of electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibres: comparative study on methanol and heat-based crosslinking. Journal of Materials Science. 2015;50(4):1943-57.
18. Federico S, Pitarresi G, Palumbo FS, Fiorica C, Catania V, Schillaci D, et al. An asymmetric electrospun membrane for the controlled release of ciprofloxacin and FGF-2: Evaluation of antimicrobial and chemoattractant properties. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2021;123:112001.
19. Jannesari M, Varshosaz J, Morshed M, Zamani M. Composite poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl acetate) electrospun nanofibrous mats as a novel wound dressing matrix for controlled release of drugs. Int J Nanomedicine. 2011;6:993-1003.
20. Chen SJ, Yu HY, Yang BC. Bioactive TiO2 fiber films prepared by electrospinning method. J Biomed Mater Res A. 2013;101(1):64-74.

21. Serbezeanu D, Vlad-Bubulac T, Rusu D, Pircalabioru GG, Samoilă I, Dinescu S, et al. Functional Polyimide-Based Electrospun Fibers for Biomedical Application. Materials (Basel). 2019;12(19):3201.
22. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. Nat Rev Drug Discov. 2013;12(5):371-87.
23. 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.
24. Rajendran NK, Kumar SSD, Houreld NN, Abrahamse H. A review on nanoparticle based treatment for wound healing. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2018;44:421-30.
25. Rai M, dos Santos CA. Nanotechnology applied to pharmaceutical technology: Springer; 2017.
26. Seil JT, Webster TJ. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. Int J Nanomedicine. 2012;7:2767-81.
27. Aabed K, Mohammed AE. Synergistic and Antagonistic Effects of Biogenic Silver Nanoparticles in Combination With Antibiotics Against Some Pathogenic Microbes. Front Bioeng Biotechnol. 2021;9:652362.
28. Shume WM, Murthy H, Zereffa EA. A review on synthesis and characterization of Ag2O nanoparticles for photocatalytic applications. Journal of Chemistry. 2020;2020:1-15.
29. Hassan KT, Ibraheem IJ, Hassan OM, Obaid A, Ali HH, Salih TA, et al. Facile green synthesis of Ag/AgCl nanoparticles derived from Chara algae extract and evaluating their antibacterial activity and synergistic effect with antibiotics. Journal of Environmental Chemical Engineering. 2021;9(4):105359.
30. Haghighi Pak Z, Abbaspour H, Karimi N, Fattahi A. Eco-friendly synthesis and antimicrobial activity of silver nanoparticles using Dracocephalum moldavica seed extract. Applied sciences. 2016;6(3):69.
31. Tsuzuki T. Mechanochemical synthesis of metal oxide nanoparticles. Communications Chemistry. 2021;4(1):1-11.

32. Khandan Nasab N, Sabouri Z, Ghazal S, Darroudi M. Green-based synthesis of mixed-phase silver nanoparticles as an effective photocatalyst and investigation of their antibacterial properties. Journal of Molecular Structure. 2020;1203:127411.
33. Li R, Chen Z, Ren N, Wang Y, Yu F. Biosynthesis of silver oxide nanoparticles and their photocatalytic and antimicrobial activity evaluation for wound healing applications in nursing care. J Photochem Photobiol B. 2019;199:111593.
34. Haq S, Rehman W, Waseem M, Meynen V, Awan SU, Saeed S, et al. Fabrication of pure and moxifloxacin functionalized silver oxide nanoparticles for photocatalytic and antimicrobial activity. J Photochem Photobiol B. 2018;186:116-24.
35. Khan A, Ameen F, Khan F, Al-Arfaj A, Ahmed B. Fabrication and antibacterial activity of nanoenhanced conjugate of silver (I) oxide with graphene oxide. Materials Today Communications. 2020;25:101667.
36. Muthukumar H, Palanirajan SK, Shanmugam MK, Arivalagan P, Gummadi SN. Photocatalytic degradation of caffeine and E. coli inactivation using silver oxide nanoparticles obtained by a facile green co-reduction method. Clean Technologies and Environmental Policy. 2021:1-12.
37. Manikandan V, Velmurugan P, Park JH, Chang WS, Park YJ, Jayanthi P, et al. Green synthesis of silver oxide nanoparticles and its antibacterial activity against dental pathogens. 3 Biotech. 2017;7(1):72.
38. Manikandan V, Yi P-I, Velmurugan P, Jayanthi P, Hong S-C, Jang S-H, et al. Production, optimization and characterization of silver oxide nanoparticles using Artocarpus heterophyllus rind extract and their antifungal activity. African Journal of Biotechnology. 2017;16(36):1819-25.
39. Rashmi BN, Harlapur SF, Avinash B, Ravikumar CR, Nagaswarupa HP, Anil Kumar MR, et al. Facile green synthesis of silver oxide nanoparticles and their electrochemical, photocatalytic and biological studies. Inorganic Chemistry Communications. 2020;111:107580.
40. D'Lima L, Phadke M, Ashok VD. Biogenic silver and silver oxide hybrid nanoparticles: a potential antimicrobial against multi drug-resistant Pseudomonas aeruginosa. New Journal of Chemistry. 2020;44(12):4935-41.

41. Yoo J-Y, Jang E-Y, Jeong S-Y, Hwang D-Y, Son H-J. Bacterial indoleacetic acid-induced synthesis of colloidal Ag2O nanocrystals and their biological activities. Bioprocess and biosystems engineering. 2019;42(3):401-14.
42. Smekalova M, Aragon V, Panacek A, Prucek R, Zboril R, Kvitek L. Enhanced antibacterial effect of antibiotics in combination with silver nanoparticles against animal pathogens. Vet J. 2016;209:174-9.
43. Mba IE, Nweze EI. Nanoparticles as therapeutic options for treating multidrug-resistant bacteria: research progress, challenges, and prospects. World J Microbiol Biotechnol. 2021;37(6):108.
44. Slavin YN, Asnis J, Häfeli UO, Bach H. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. J Nanobiotechnology. 2017;15(1):65.
45. Khatoon N, Alam H, Khan A, Raza K, Sardar M. Ampicillin Silver Nanoformulations against Multidrug resistant bacteria. Sci Rep. 2019;9(1):6848.
46. Sukhanova A, Bozrova S, Sokolov P, Berestovoy M, Karaulov A, Nabiev I. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. Nanoscale Res Lett. 2018;13(1):44.
47. Lin S, Wang RZ, Yi Y, Wang Z, Hao LM, Wu JH, et al. Facile and green fabrication of electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibrous mats doped with narrowly dispersed silver nanoparticles. Int J Nanomedicine. 2014;9:3937-47.
48. López-Córdoba A, Castro GR, Goyanes S. A simple green route to obtain poly(vinyl alcohol) electrospun mats with improved water stability for use as potential carriers of drugs. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2016;69:726-32.
49. Chen Q, Sinha TK, Li H, Li W, Kim JK. A Facile Approach towards Fabrication of Electrospun Nanofibrous Mats based Multicompartment Wound Dressing Fabric. Macromolecular Research. 2018;26(13):1265-72.
50. Aragón J, Costa C, Coelhoso I, Mendoza G, Aguiar-Ricardo A, Irusta S. Electrospun asymmetric membranes for wound dressing applications. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2019;103:109822.

51. Mohseni M, Shamloo A, Aghababaie Z, Afjoul H, Abdi S, Moravvej H, et al. A comparative study of wound dressings loaded with silver sulfadiazine and silver nanoparticles: *in vitro* and in vivo evaluation. Int J Pharm. 2019;564:350-8.

52. Alipour R, Khorshidi A, Shojaei AF, Mashayekhi F, Moghaddam MJM. Skin wound healing acceleration by Ag nanoparticles embedded in PVA/PVP/Pectin/Mafenide acetate composite nanofibers. Polymer testing. 2019;79:106022.

53. Ganesh M, Aziz AS, Ubaidulla U, Hemalatha P, Saravanakumar A, Ravikumar R, et al. Sulfanilamide and silver nanoparticles-loaded polyvinyl alcohol-chitosan composite electrospun nanofibers: Synthesis and evaluation on synergism in wound healing. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 2016;39:127-35.

54. Yang J, Wang K, Yu DG, Yang Y, Bligh SWA, Williams GR. Electrospun Janus nanofibers loaded with a drug and inorganic nanoparticles as an effective antibacterial wound dressing. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2020;111:110805.

55. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100. Wayne, PA:: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

56. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. CLSI supplement M07. Wayne, PA:: Clnical and Laboratory Syandards Institute; 2018.

57. Hwang IS, Hwang JH, Choi H, Kim KJ, Lee DG. Synergistic effects between silver nanoparticles and antibiotics and the mechanisms involved. J Med Microbiol. 2012;61(Pt 12):1719-26.

58. Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, et al. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. BMC Bioinformatics. 2017;18(1):529.

59. Estrada-Villegas GM, Martinez-Hernandez RC, Morales JGV, Olayo R, editors. Incorporation of ciprofloxacin/beta cyclodextrin inclusion complex to polylactic acid electrospun fibers and modeling of the release behavior. Revista Mexicana de Ingeniería Química.2019;18(2):737-47.

60. Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. Eur J Pharm Sci. 2001;13(2):123-33.
61. Noviello S, Ianniello F, Leone S, Fiore M, Esposito S. *In vitro* activity of tigecycline: MICs, MBCs, time-kill curves and post-antibiotic effect. J Chemother. 2008;20(5):577-80.
62. Lin PC, Lin S, Wang PC, Sridhar R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. Biotechnol Adv. 2014;32(4):711-26.
63. De AK, Majumdar S, Pal S, Kumar S, Sinha I. Zn doping induced band gap widening of Ag2O nanoparticles. Journal of Alloys and Compounds. 2020;832:154127.
64. Martina I, Wiesinger R, Jembrih-Simbürger D, Schreiner M. Micro-Raman characterisation of silver corrosion products: instrumental set up and reference database. E-Preserv Sci. 2012;9:1-8.
65. Gandolpho Tótoli E, Nunes Salgado HR. Development and Validation of the Quantitative Analysis of Ampicillin Sodium in Powder for Injection by Fourier-transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). Physical Chemistry. 2012;2(6):103-8.
66. 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.
67. Sahoo S, Chakraborti C, Naik S, Mishra S, Nanda U. Structural analysis of ciprofloxacin-carbopol polymeric composites by X-Ray diffraction and Fourier transform infra-red spectroscopy. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2011;10(3).
68. Banoee M, Seif S, Nazari ZE, Jafari-Fesharaki P, Shahverdi HR, Moballegh A, et al. ZnO nanoparticles enhanced antibacterial activity of ciprofloxacin against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. 2010;93(2):557-61.
69. Organization WH. Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis. World Health Organization; 2017.

70. Negi H, Saravanan PR, Agarwal T, Zaidi MGH, Goel R. *In vitro* assessment of Ag_2O nanoparticles toxicity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The Journal of general and applied microbiology. 2013;59(1):83-8.
71. 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):50.
72. Sharma N, Jandaik S, Kumar S. Synergistic activity of doped zinc oxide nanoparticles with antibiotics: ciprofloxacin, ampicillin, fluconazole and amphotericin B against pathogenic microorganisms. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 2016;88:1689-98.
73. Jasim R, Schneider EK, Han M, Azad MA, Hussein M, Nowell C, et al. A fresh shine on cystic fibrosis inhalation therapy: antimicrobial synergy of polymyxin B in combination with silver nanoparticles. Journal of biomedical nanotechnology. 2017;13(4):447-57.
74. 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.
75. Anush K, Shushanik K, Susanna T, Ashkhen H. Antibacterial effect of silver and iron oxide nanoparticles in combination with antibiotics on E. coli K12. BioNanoScience. 2019;9(3):587-96.
76. Castro-Gamboa S, Garcia-Garcia MR, Piñon-Zarate G, Rojas-Lemus M, Jarquin-Yañez K, Angel Herrera-Enriquez M, et al. Toxicity of silver nanoparticles in mouse bone marrow-derived dendritic cells: Implications for phenotype. Journal of Immunotoxicology. 2019;16(1):54-62.
77. Kang K, Jung H, Lim J-S. Cell death by polyvinylpyrrolidine-coated silver nanoparticles is mediated by ROS-dependent signaling. Biomolecules & therapeutics. 2012;20(4):399.
78. Liao C, Li Y, Tjong SC. Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. Int J Mol Sci. 2019;20(2):449.

79. Sánchez-Navarro MdC, Ruiz-Torres CA, Niño-Martínez N, Sánchez-Sánchez R, Martínez-Castañón GA, DeAlba-Montero I, et al. Cytotoxic and bactericidal effect of silver nanoparticles obtained by green synthesis method using annona muricata aqueous extract and functionalized with 5-fluorouracil. Bioinorganic chemistry and applications. 2018;2018.
80. Helmlinger J, Sengstock C, Groß-Heitfeld C, Mayer C, Schildhauer T, Köller M, et al. Silver nanoparticles with different size and shape: equal cytotoxicity, but different antibacterial effects. RSC advances. 2016;6(22):18490-501.
81. Nataraj D, Reddy R, Reddy N. Crosslinking electrospun poly (vinyl) alcohol fibers with citric acid to impart aqueous stability for medical applications. European Polymer Journal. 2020;124:109484.
82. Wong KKH, Zinke-Allmang M, Wan W. Effect of annealing on aqueous stability and elastic modulus of electrospun poly(vinyl alcohol) fibers. Journal of Materials Science. 2010;45(9):2456-65.
83. Eghbalifam N, Shojaosadati SA, Hashemi-Najafabadi S, Khorasani AC. Synthesis and characterization of antimicrobial wound dressing material based on silver nanoparticles loaded gum Arabic nanofibers. Int J Biol Macromol. 2020;155:119-30.
84. He M, Chen M, Dou Y, Ding J, Yue H, Yin G, et al. Electrospun Silver Nanoparticles-Embedded Feather Keratin/Poly(vinyl alcohol)/Poly(ethylene oxide) Antibacterial Composite Nanofibers. Polymers (Basel). 2020;12(2):305.
85. Lopez-Carrizales M, Pérez-Díaz MA, Mendoza-Mendoza E, Peralta-Rodríguez RD, Ojeda-Galván HJ, Portales-Pérez D, et al. Green, novel, and one-step synthesis of silver oxide nanoparticles: antimicrobial activity, synergism with antibiotics, and cytotoxic studies. New Journal of Chemistry. 2022;46(37):17841-53.
86. Li C, Fu R, Yu C, Li Z, Guan H, Hu D, et al. Silver nanoparticle/chitosan oligosaccharide/poly(vinyl alcohol) nanofibers as wound dressings: a preclinical study. Int J Nanomedicine. 2013;8:4131-45.
87. Felgueiras HP, Teixeira MA, Tavares TD, Homem NC, Zille A, Amorim MTP. Antimicrobial action and clotting time of thin, hydrated poly(vinyl alcohol)/cellulose

acetate films functionalized with LL37 for prospective wound-healing applications. Journal of Applied Polymer Science. 2020;137(18):48626.

88. Amer S, Attia N, Nouh S, El-Kammar M, Korittum A, Abu-Ahmed H. Fabrication of sliver nanoparticles/polyvinyl alcohol/gelatin ternary nanofiber mats for wound healing application. J Biomater Appl. 2020;35(2):287-98.

89. Thairin T, Wutticharoenmongkol P. Ciprofloxacin-loaded alginate/poly (vinyl alcohol)/gelatin electrospun nanofiber mats as antibacterial wound dressings. Journal of Industrial Textiles. 2021;51(1_suppl):1296S-322S.

90. Uhljar L, Kan SY, Radacsi N, Koutsos V, Szabó-Révész P, Ambrus R. *In vitro* Drug Release, Permeability, and Structural Test of Ciprofloxacin-Loaded Nanofibers. Pharmaceutics. 2021;13(4):556.

91. GhavamiNejad A, Rajan Unnithan A, Ramachandra Kurup Sasikala A, Samarikhalaj M, Thomas RG, Jeong YY, et al. Mussel-Inspired Electrospun Nanofibers Functionalized with Size-Controlled Silver Nanoparticles for Wound Dressing Application. ACS Appl Mater Interfaces. 2015;7(22):12176-83.

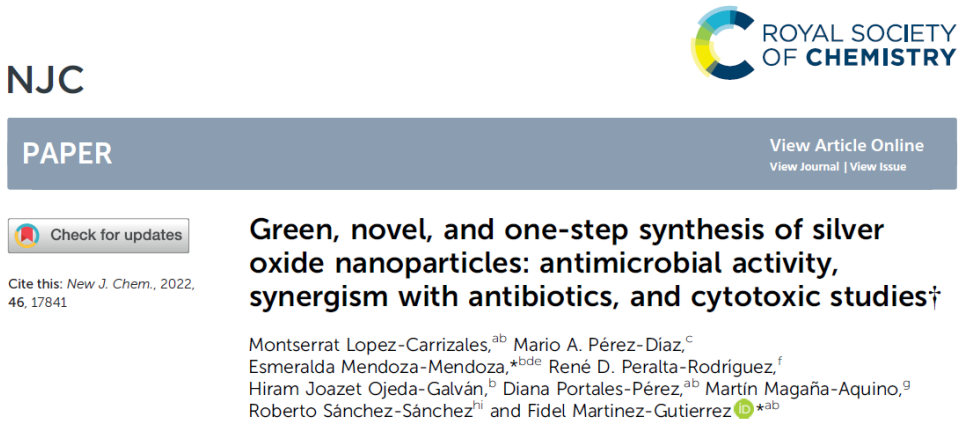
92. Do TB, Nguyen TN, Ho MH, Nguyen NT, Do TM, Vo DT, et al. The Efficacy of Silver-Based Electrospun Antimicrobial Dressing in Accelerating the Regeneration of Partial Thickness Burn Wounds Using a Porcine Model. Polymers (Basel). 2021;13(18):3116.

93. Wei X, Cai J, Lin S, Li F, Tian F. Controlled release of monodisperse silver nanoparticles via in situ cross-linked polyvinyl alcohol as benign and antibacterial electrospun nanofibers. Colloids Surf B Biointerfaces. 2021;197:111370.

11. ANEXOS

11.1 Productividad académica.

11.1.1 Publicación de artículo científico.



NJC

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY

PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue

Check for updates

Cite this: *New J. Chem.*, 2022, **46**, 17841

Green, novel, and one-step synthesis of silver oxide nanoparticles: antimicrobial activity, synergism with antibiotics, and cytotoxic studies†

Montserrat Lopez-Carrizales,[ab] Mario A. Pérez-Díaz,[c] Esmeralda Mendoza-Mendoza,*[bde] René D. Peralta-Rodríguez,[f] Hiram Joazet Ojeda-Galván,[b] Diana Portales-Pérez,[ab] Martín Magaña-Aquino,[g] Roberto Sánchez-Sánchez[hi] and Fidel Martinez-Gutierrez *[ab]

11.1.2 Divulgación científica.



12. GLOSARIO

Apósito: Producto sanitario utilizado para cubrir y proteger una herida. Algunas de sus funciones: son aliviar el dolor, actuar como barrera frente a una infección, absorber el exudado y favorecer el proceso de cicatrización.

Bacterias multidrogorresistentes: Cepa bacteriana resistente a tres familias diferentes de antibióticos.

Biocompatibilidad: Cualidad que tiene un material de generar una respuesta biológica aceptable durante el tiempo y modo de contacto de una aplicación específica.

Concentración mínima inhibitoria: Concentración más baja de un antibiótico que inhibe el crecimiento de una cepa bacteriana en específico.

Constructo: Estructura tridimensional formada por un material biocompatible que sirve de soporte para el cultivo de células vivas.

Electrohilado: Método utilizado para la fabricación de fibras poliméricas a escalas micro y nanométricas.

Ensayo de tablero de ajedrez: Técnica empleada para determinar *in vitro* las interacciones entre mezclas binarias de agentes antimicrobianos.

Fuerzas de Van der Waals: Son fuerzas de estabilización molecular las cuales forman un enlace químico no covalente, en el que participan fuerzas de dispersión y de repulsión entre las capas electrónicas de dos átomos contiguos.

Nanotecnología: Uso de la materia en escala nanométrica con aplicación en áreas como la medicina, genómica, ingeniería y ciencia de la computación.

Potencial zeta: Medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática entre partículas.

Química verde: Dirigida hacia el diseño de productos y procesos químicos para reducir o eliminar el uso y/o la generación de sustancias peligrosas.

Reacción de metátesis: Son también denominadas reacciones de sustitución doble y suceden cuando las partes de dos componentes iónicos se intercambian, produciendo dos compuestos nuevos.

Reticulación: Reacción química por la que los polímeros se unen en cadenas tridimensionales formando una especie de red.

Temperatura de transición vítrea: Temperatura a la cual un polímero pasa del estado cristalino al estado de flujo viscoso.