



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**



**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLÓGIA Y BIOTECNOLOGÍA**

**TESIS**

**“Evaluación de la efectividad de las nanopartículas de plata sobre enterobacterias de origen clínico resistentes a antimicrobianos. Cajamarca-2022.”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

Presentado por:

**BACH. FLAVIO SAUCEDO BURGA**

**ASESOR**

Dr. Mblgo. MARCO ANTONIO RIVERA JACINTO

**COASESOR**

M. Sc. HÉCTOR ALMANZOR CHINCHAY ESPINO

**CAJAMARCA – PERÚ**

**2024**

## CONSTANCIA DE INFORME DE ORIGINALIDAD

- Investigador: **Flavio Saucedo Burga**  
DNI: **77153661**  
  
Escuela Profesional/Unidad UNC: **ESCUELA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA**
- Asesor: **Dr. MARCO ANTONIO RIVERA JACINTO**  
Facultad/Unidad UNC: **FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**
- Grado académico o título profesional  
 Bachiller       Título profesional       Segunda especialidad  
 Maestro       Doctor
- Tipo de Investigación:  
 Tesis    Trabajo de investigación       Trabajo de suficiencia profesional  
 Trabajo académico
- Título de Trabajo de Investigación: **Evaluación de la efectividad de las nanopartículas de plata sobre enterobacterias de origen clínico resistentes a antimicrobianos. Cajamarca – 2022.**
- Fecha de evaluación del Software antiplagio: **22/7/2024**
- Software antiplagio:  **TURNITIN**       **URKUND (OURIGINAL) (\*)**
- Porcentaje de Informe de Similitud: **17%**
- Código Documento: **oid:3117:369470740**
- Resultado de la Evaluación de Similitud:  
 **APROBADO**    **PARA LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES O DESAPROBADO**

Cajamarca, 31 de julio del 2024

		<i>Firma y/o Sello Emisor Constancia</i>
<b>Dra. Martha Vicenta Abanto Villar</b> DNI: 26673990		

\* En caso se realizó la evaluación hasta setiembre de 2023

Copyright ©

**FLAVIO SAUCEDO BURGA**

Todos los derechos reservados

## FICHA CATALOGRÁFICA

Saucedo, F. 2024. **Evaluación de la efectividad de las nanopartículas de plata sobre enterobacterias de origen clínico resistentes a antimicrobianos. Cajamarca-2022/**

Flavio Saucedo Burga

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesor: Dr. Mblgo. Marco Antonio Rivera Jacinto

Co-Asesor: M. Sc. Héctor Almanzor Chinchay Espino

Disertación académica para obtener el título profesional de Biólogo Biotecnólogo – UNC  
2024

**EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA  
SOBRE ENTEROBACTERIAS DE ORIGEN CLÍNICO RESISTENTES A  
ANTIMICROBIANOS. CAJAMARCA-2022.**

**AUTOR:** Bach. Flavio Saucedo Burga

**ASESOR:** Dr. Mblgo. Marco Antonio Rivera Jacinto

**CO-ASESOR:** M. Sc. Héctor Almanzor Chinchay Espino

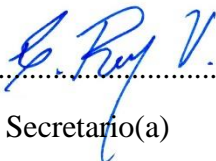
Tesis evaluada y aprobada para la obtención de Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados.

**JURADO EVALUADOR**



.....  
Presidente(a)

Consuelo Belania Plasencia Alvarado



.....  
Secretario(a)

Claudia Carolina Rodríguez Ulloa



.....  
vocal

Néstor Estuardo Carbajal Caballero

Cajamarca, 2024 - Perú



MODALIDAD "A"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las 9:40 am... del 28... de junio..... del 2024, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente 7.I-304 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada: Evaluación de la efectividad de las nanopartículas de plata sobre enterobacterias de origen clínico resistentes a antimicrobianos. Cajamarca - 2022

del (a) Bachiller en Ciencias Biológicas:

Flavio Saucedo Burga

Siendo las 11:02 am... del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: Muy Bueno....., con el calificativo de: 17.0..., con lo cual el (la) Bachiller en Ciencias Biológicas se encuentra Apto..... para la obtención del Título Profesional de: **BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**.

Miembros Jurado Evaluador		Firma
Nombres y Apellidos		
Presidente:	Consuelo Belania Plasencia Alvarado	
Secretario(a):	Claudia Carolina Rodríguez Ulloa	
Vocal:	Nestor Estuardo Carbajal Cabello	
Accesitaria:	—	—
Asesor (a):	Marco Antonio Rivera Sacinto	
Asesor (a):	—	—

Términos de Calificación:  
EXCELENTE (19-20)  
REGULAR (12-13)

MUY BUENO (17-18)  
REGULAR BAJO (11)

BUENO (14-16)  
DESAPROBADO (10 a menos)

**A:**

Mi familia, expreso mi más profundo agradecimiento por su incondicional amor y apoyo, ustedes que han sido mi roca, mi refugio y mi mayor fuente de alegría a lo largo de los años. Cada logro que he alcanzado y cada desafío que he superado ha sido posible gracias a su constante aliento y comprensión.

## **Agradecimiento:**

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a Dios por concederme la vida, la salud y por regalarme la maravillosa familia que tengo. También quiero agradecer a la Universidad Nacional de Cajamarca por darme la oportunidad de formar parte de su comunidad académica y por abrir las puertas de su entorno científico, permitiéndome crecer en conocimiento en esta rama de la ciencia. Además, quiero reconocer el invaluable aporte de los diversos maestros que compartieron sus conocimientos y el apoyo brindado para seguir adelante.

Agradezco a mis asesores el Dr. Mblgo. Marco Antonio Rivera Jacinto y el M. Sc. Héctor Almanzor Chinchay Espino por guiarme adecuadamente con sus conocimientos durante el desarrollo de este trabajo, aportando con sus ideas, conocimientos y experiencia en lo necesario para la culminación de este trabajo.

Agradezco a la Universidad Nacional de Trujillo y al Laboratorio multidisciplinario de investigación en nanociencia y nanotecnología “Mg Oswaldo Roger Sánchez Rosales” (LabMIN) – Departamento Académico de Física, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la UNT. Por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo en sus instalaciones. También expresar un agradecimiento especial al Dr. Segundo Rosalí Jáuregui Rosas por brindarme el permiso y el apoyo necesario para el uso de los equipos y las instalaciones en las que se llevó a cabo parte de esta investigación. Finalmente expresar un profundo agradecimiento a todos los amigos y personas cercanas que fui conociendo durante el desarrollo de este trabajo, por los aportes de ideas, tiempo y conocimiento brindado.



## Tabla de contenido

Título.....	xiii
Resumen.....	xiv
Abstract.....	xv
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II.....	4
MARCO TEÓRICO.....	4
2.1    Antecedentes de la investigación.....	4
2.2    Bases teóricas.....	7
2.2.1    Nanopartículas de plata.....	7
2.2.2    Métodos de síntesis.....	8
2.2.3    Síntesis biológica de nanopartículas de plata.....	8
2.2.4    Extracto vegetal como agente reductor.....	9
2.2.5    Extracto de hoja de <i>Olea Europaea</i> (Olivo).....	10
2.2.6    Factores que influyen en la síntesis.....	11
2.2.7    Métodos de caracterización de las nanopartículas de plata.....	11
2.2.8    AgNPs como agentes antimicrobianos alternativos.....	13
2.2.9    Mecanismos de acción de las nanopartículas de plata.....	13
2.2.10    Factores que influyen en la capacidad bactericida.....	17
2.2.11    Bacterias resistentes a antimicrobianos.....	18
2.2.12    Mecanismos de resistencia a antimicrobianos.....	18
2.2.13    Enterobacterias resistentes a antimicrobianos.....	19
2.2.14    Métodos utilizados para evaluar la actividad antibacteriana.....	20
2.3    Definición de términos.....	22
CAPÍTULO III.....	23
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS.....	23
3.1.    Nivel de investigación.....	23
3.2.    Tipo y diseño de estudio.....	23
3.3.    Material Biológico.....	23
3.4.    Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos.....	23
3.4.1.    Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata.....	23

3.4.2. Evaluación del efecto bactericida de las OLE-AgNPs .....	26
3.4.3. Técnicas de Procesamiento y Análisis estadístico.....	30
CAPÍTULO IV .....	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	31
4.1. Resultados .....	31
4.1.1. Síntesis y caracterización de las OLE-AgNPs.....	31
4.1.2. Evaluación del efecto bactericida de las OLE-AgNPs .....	34
4.2. Discusión.....	43
CAPÍTULO V .....	50
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	50
5.1. Conclusiones .....	50
5.2. Recomendaciones.....	51
LISTA DE REFERENCIAS .....	51
APÉNDICES .....	64
Apéndice N° 1. Lugar de recolección de las hojas de olivo.....	64
Apéndice N° 2. Agitador de placa caliente .....	65
Apéndice N° 3. Ultracentrífuga Hermle Z 36 HK.....	66
Apéndice N° 4. Limpiador Ultrasónico.....	66
Apéndice N° 5. Espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible.....	67
Apéndice N° 6. Difractómetro de rayos X .....	67
Apéndice N° 7. Distribución de los discos para la evaluación del efecto bactericida de las OLE-AgNPs .....	68
Apéndice N° 8. Preparación de las soluciones madre de las AgNPs .....	68
Apéndice N° 9. Diluciones dobles de las soluciones madre de las OLE-AgNPs.....	69
Apéndice N° 10. Caldo Müller-Hinton con Rojo de Fenol Enriquecido con Glucosa (CMHRFEG) y Solución de rojo de fenol.....	69
Apéndice N° 11. Preparación de Inóculos.....	70
Apéndice N° 12. Distribución de las soluciones en microplaca.....	71
Apéndice N° 13. Distribución de los inóculos en placa para determinar la CMB .....	72
Apéndice N° 14. Tabla con los cálculos obtenidos para el tamaño del cristalito de las OLE-AgNPs mediante la fórmula de Debye-Scherrer .....	72
Apéndice N° 15. Tabla con los aislamientos trabajados y los medicamentos a los que presentaron resistencia.....	73
Apéndice N° 16. Medición de los diámetros ZOI para cada cepa.....	74

Apéndice N° 17. Prueba estadística de Kruskal-Wallis para determinar si hubo diferencia entre las medias los grupos de tratamiento.....	75
Apéndice N° 18. Prueba estadística Chi-cuadrado para determinar la diferencia de sensibilidad para cada tratamiento.....	75
Apéndice N° 19. Microplacas antes y después de la incubación; y valores de las CMI para cada cepa.....	76
Apéndice N° 20. Prueba estadística de Mann-Whitney para determinar diferencias entre los tratamientos aplicados en la CMI .....	76
Apéndice N° 21. Valores obtenidos de la CMB para cada cepa .....	77
Apéndice N° 22. Prueba estadística de Mann-Whitney para determinar diferencias entre los tratamientos aplicados en la CMB .....	77
ANEXOS .....	78
Anexo N° 1. Fórmula de Debye-Scherrer utilizada para el cálculo del tamaño de cristalito. ....	78
Anexo N° 2. Tarjeta de identificación para el difractograma correspondiente a la plata en polvo obtenida mediante el software PCPDFWIN.....	78

## **Lista de abreviaciones**

**AgNO<sub>3</sub>:** Nitrato de plata

**AgNPs:** Nanopartículas de plata

**CMB:** Concentración Mínima Bactericida

**CMHRFEG:** Caldo Müller-Hinton con Rojo de Fenol Enriquecido con Glucosa

**CMI:** Concentración Mínima Inhibitoria

**FTIR:** Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

**LabMIN:** Laboratorio Multidisciplinario de Investigación en Nanociencia y Nanotecnología

**MDR:** Multidrogo resistentes

**MNP:** Nanopartículas Metálicas (Metal Nanoparticles)

**NPs:** Nanopartículas

**OLE-AgNPs:** Nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de hojas de olivo (Olive Leaf Extracts)

**RPS:** Resonancia de Plasmón Superficial

**SEM:** Microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy)

**TEM:** Microscopía electrónica de transmisión (Transmission Electron Microscopy)

**UV-Vis:** Espectroscopía UV-Visible

**XRD:** Difracción de Rayos X (X-Ray Diffraction)

**ZOI:** Zona de Inhibición (Zone Of Inhibition)

## **Glosario**

**Dispersión coloidal:** Es un sistema físico-químico compuesto por dos fases, una continua, y otra dispersa en forma de partículas sólidas, el tamaño de las partículas en las dispersiones se sitúa en el intervalo de pocos nanómetros hasta un micrómetro, estas se identifican como dispersiones de partículas finas, más comúnmente conocidas como coloides, partículas que no son apreciables a simple vista, pero son mucho más grandes que cualquier molécula y reflejan la luz (1).

**Extracto acuoso:** Son soluciones hidrosolubles que principalmente contienen principios activos polares. Pueden incluir en menor proporción compuestos de polaridad intermedia o baja. La concentración de principios activos en el extracto está determinada por la cantidad presente en el vegetal y el coeficiente de solubilidad de cada componente en el medio y el tipo de técnica utilizada durante la extracción de los compuestos bioactivos (2).

**Metabolitos secundarios:** Son compuestos de bajo peso molecular que no tienen un papel reconocido en el mantenimiento de los procesos vitales fundamentales en las plantas que los sintetizan, pero tienen un papel importante en la interacción de la planta con su entorno (3).

**Resonancia de plasmón superficial:** Este fenómeno, típicamente observado en partículas metálicas cuando son impactadas por un haz de luz, genera una excitación colectiva de los electrones libres debido a su intensa interacción con la luz incidente. Esto da lugar a una oscilación coherente y deslocalizada de los electrones confinados en la superficie de las nanopartículas metálicas, absorbiendo frecuencias específicas de la luz incidente y transmitiendo las frecuencias no absorbidas que se vinculan con un color particular y pueden ser cuantificada a través de picos de absorción detectados por un espectrofotómetro (4).

**EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA  
SOBRE ENTEROBACTERIAS DE ORIGEN CLÍNICO RESISTENTES A  
ANTIMICROBIANOS. CAJAMARCA-2022.**

## Resumen

En este trabajo se evaluó la efectividad de nanopartículas de plata sintetizadas biológicamente a partir de extracto acuoso de hojas de olivo (OLE-AgNPs) sobre enterobacterias resistentes a antimicrobianos. Las OLE-AgNPs se caracterizaron mediante espectroscopía UV-Vis y difracción de Rayos X en el laboratorio del Departamento Académico de Física, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad Nacional de Trujillo, el cambio de color en la solución y el pico de absorción a 435 nm en el espectro UV-Vis confirmaron la formación de nanopartículas; además, el difractograma de rayos X presentó picos  $2\theta$  en los ángulos 38,10; 44,02; 64,45 y 77,07 correspondientes a las reflexiones de Bragg (111), (200), (220) y (311) lo que confirmó la cristalinidad y estructura cúbica de las nanopartículas sintetizadas, con un tamaño promedio de cristalito de 8,25 nm. La actividad antibacteriana se evaluó por el método de difusión en agar empleando discos embebidos con OLE-AgNPs dispersas en agua o en alcohol. Se encontró que el 100 % de las bacterias evaluadas presentaron una alta sensibilidad, según la escala de Duraffourd, a las OLE-AgNPs dispersas en alcohol, con diámetro de halo promedio de 23,78 mm; mientras que, frente a nanopartículas dispersas en agua, el 40 % presentaron sensibilidad media y el otro 60 % presentaron sensibilidad baja, con una media de diámetros ZOI de 13,32 mm. También se encontraron los valores de la CMI y CMB, con una media de 193,75  $\mu\text{g/mL}$  y 612,5  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Las pruebas estadísticas demostraron que las nanopartículas dispersas en alcohol tuvieron un mejor efecto antibacteriano ( $p \leq 0,05$ ). Se concluye que las OLE-AgNPs son efectivas sobre enterobacterias resistentes a antimicrobianos, en especial las dispersas en alcohol.

**Palabras clave:** Nanopartículas de plata, Extracto de hoja de olivo, Síntesis verde, Enterobacterias, Efecto antibacteriano, CMI, CMB

## Abstract

This work evaluated the effectiveness of biologically synthesized silver nanoparticles from olive leaf aqueous extract (OLE-AgNPs) on antimicrobial-resistant enterobacteria. The OLE-AgNPs were synthesized and characterized in the Academic Department of Physics, Faculty of Physical and Mathematical Sciences laboratory at the National University of Trujillo, using UV-Vis spectroscopy and X-ray diffraction. The color change in the solution and the absorption peak at 435 nm in the UV-Vis spectrum confirmed the formation of nanoparticles. Additionally, the X-ray diffraction pattern showed  $2\theta$  peaks at angles 38,10; 44,02; 64,45; and 77,07 corresponding to the Bragg reflections (111), (200), (220), and (311), confirming the crystallinity and cubic structure of the synthesized nanoparticles, with an average crystallite size of 8,25 nm. The agar diffusion method evaluated the antibacterial activity using discs embedded with OLE-AgNPs dispersed in water or alcohol. It was found that 100 % of the evaluated bacteria showed high sensitivity, according to the Duraffourd scale, to OLE-AgNPs dispersed in alcohol, with an average halo diameter of 23,78 mm. In contrast, against nanoparticles dispersed in water, 40 % showed medium sensitivity, and the other 60 % showed low sensitivity, with an average ZOI diameter of 13,32 mm. Statistical tests demonstrated that the nanoparticles dispersed in alcohol had a better antibacterial effect ( $p \leq 0,05$ ); the mean MIC and MBC were 193,75  $\mu\text{g/mL}$  and 612,5  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. It is concluded the OLE-AgNPs are effective on antimicrobial-resistant *Enterobacteriaceae*, especially those dispersed in alcohol.

**Keywords:** Silver nanoparticles, Olive leaf extract, Green synthesis, Enterobacteria, Antibacterial effect, MIC, MBC



## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana (RAM) se considera uno de los problemas más importantes de salud pública y se estima que podría ocasionar alrededor de 10 millones de muertes por año para el 2050 (5,6), esto debido a la alta capacidad de las bacterias para desarrollar rápidamente mecanismos de resistencia (7). En la región Cajamarca, se han reportado múltiples casos de RAM que han dificultado el tratamiento de las infecciones, provocando una alta tasa de morbilidad y mortalidad (8), especialmente por bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Estas bacterias desarrollan mecanismos de resistencia como la producción de enzimas, modificación de dianas, desarrollo de bombas de eflujo, intercambio de genes de resistencia, entre otros (9), los cuales inactivan antibióticos y los vuelven ineficaces. El fenómeno de RAM hace que el tratamiento de las infecciones causadas por enterobacterias sea cada vez más difícil y limita las opciones terapéuticas disponibles (10).

En la búsqueda de nuevos tratamientos y alternativas farmacológicas eficaces, la nanociencia y nanotecnología han despertado interés en el ámbito investigativo, es así que estructuras a escalas nanométricas como las nanopartículas, desempeñan un papel crucial en el campo de la medicina, y muestran avances significativos en diagnóstico, tratamiento y terapias personalizadas (11). Gracias a su tamaño diminuto les permite interactuar a nivel celular y molecular, esto permite ser utilizadas para la producción de vacunas, desarrollo de biosensores, terapia tumoral y entrega de medicamentos a sitios específicos del cuerpo, pero su principal característica es la actividad antimicrobiana que presenta (12). Diversos trabajos han reportado una alta eficacia frente a diversos tipos de patógenos como hongos, protozoarios, parásitos, virus y bacterias, este potencial presente en las nanopartículas prometen utilizarlas como una herramienta valiosa en la lucha contra aislamientos bacterianos resistentes (13).

Las nanopartículas de plata (AgNPs) han sido estudiadas y han demostrado ser eficaces contra una amplia variedad de bacterias, pero su efecto bactericida depende mucho de factores como forma, tamaño, potencial Z, entre otros, y estas características están ligadas al método empleado durante la síntesis (14). Las nanopartículas obtenidas por métodos físicos y químicos pueden estar ligadas a factores negativos como la toxicidad residual, consumo de energía, impacto ambiental y generación de subproductos no deseados. Estos factores pueden afectar la biocompatibilidad y limitar la aplicación de las nanopartículas en entornos biológicos, especialmente en aplicaciones médicas (15). Por estos motivos, muchos investigadores optan por la aplicación del método de síntesis verde, el cual, no solo destaca por su enfoque ambientalmente sostenible, sino también, por sus notables ventajas en términos de actividad bactericida y compatibilidad biológica (11,16).

Para la síntesis verde de nanopartículas, se pueden utilizar hongos, bacterias y extractos de plantas como agentes reductores y estabilizadores (13). Los extractos en este proceso no solo actúan como agente reductor, sino que introduce compuestos orgánicos que confieren propiedades y características únicas en las nanopartículas resultantes. Estos compuestos, son principalmente polifenoles, terpenoides, flavonoides y otros metabolitos secundarios presentes en muchas especies vegetales (17). Una de las plantas de interés investigativo, con gran presencia de estos compuestos en sus hojas, es el árbol del olivo (*Olea europaea*). Las hojas de este árbol presentan propiedades antimicrobianas gracias a los metabolitos presentes en ellas, propiedades que podrían potenciar la capacidad bactericida de las AgNPs (18).

Los principales metabolitos secundarios presentes en el olivo son la oleuropeína, hidroxitirosol, ácido oleanólico, ácido ursólico, flavonoides, triterpenos pentacíclicos, etc. (18,19). Compuestos que presentan grupos hidroxilo (-OH) en su estructura química, dichos grupos que favorecen la reducción de los iones plata para formar así nanopartículas (20). La extracción y utilización de estos compuestos bioactivos, a menudo, a través de métodos como la síntesis verde, representa un área de interés creciente en la investigación biomédica y de nanotecnología (15). Además, la síntesis verde tiende a producir nanopartículas más

estables y uniformes que favorecen y potencian las propiedades bactericidas de las nanopartículas (17). Sin embargo, la síntesis y caracterización de estas nanopartículas representan un desafío significativo en la investigación científica y nanotecnológica (21).

La complejidad de la síntesis radica en la necesidad de controlar diversos parámetros, como la temperatura, el pH, la concentración de reactivos y el tiempo de reacción, para obtener partículas uniformes en tamaño y forma (14,16). El proceso de síntesis puede ser altamente sensible, y pequeñas variaciones en las condiciones experimentales pueden tener un impacto significativo en las propiedades de las nanopartículas resultantes que pueden afectar directamente en la actividad bactericida (22). Además, la caracterización precisa de estas nanoestructuras requiere técnicas avanzadas y equipos especializados, lo que agrega una capa adicional de complejidad. La preservación de la estabilidad coloidal y la minimización de la aglomeración también son desafíos críticos en la obtención de AgNPs funcionalmente eficientes, por lo que, la síntesis, caracterización y aplicación de estas, es un desafío a superar (23).

El objetivo principal del presente estudio fue evaluar la efectividad de las AgNPs sobre enterobacterias de origen clínico resistentes a antimicrobianos. El proceso se realizó en dos etapas. En la primera, se sintetizaron AgNPs utilizando el método síntesis verde, y posteriormente fueron debidamente caracterizadas, este proceso se realizó en el Laboratorio multidisciplinario de investigación en nanociencia y nanotecnología “Mg Oswaldo Roger Sánchez Rosales” (LabMIN) – Departamento Académico de Física, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad Nacional de Trujillo. En la segunda etapa se evaluó el efecto bactericida de las nanopartículas sobre enterobacterias de origen clínico, utilizando la escala de Duraffourd para determinar el nivel de sensibilidad de los aislamientos mediante método de difusión en disco, Además, también se determinó la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida. Esta etapa se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes de la investigación

En la búsqueda de la optimización de un método de síntesis verde, Rashidipour y Heydari en el año 2014, los autores utilizaron extracto de hojas de olivo para sintetizar AgNPs. Ellos llevaron a cabo una exhaustiva exploración y optimización de parámetros influyentes en la formación de nanopartículas, tales como temperatura, pH, concentración de  $\text{AgNO}_3$  y la relación de muestra vegetal a solvente de extracción. Las condiciones óptimas identificadas incluyeron: concentración de  $\text{AgNO}_3$  de 1 milimolar (mM), concentración de extracto de 8% p/v (relación de muestra vegetal a solvente de extracción respectivamente), pH 7, tiempo de reacción de 4 horas y temperatura de 45 °C. Las AgNPs sintetizadas fueron minuciosamente caracterizadas mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), difracción de rayos X (XDR), dispersión dinámica de luz (DLS), UV-Vis y SEM. El análisis reveló que las AgNPs eran predominantemente esféricas, con un tamaño promedio de 90 nm, y demostraron actividad citotóxica contra células de cáncer de mama humano (24).

En el trabajo realizado por Ramazanli y Ahmadoy en el año 2022, los autores lograron sintetizar exitosamente AgNPs mediante el método de síntesis verde, utilizaron extracto acuoso de hojas de olivo como agente reductor. Obtuvieron AgNPs de entre 7,12 nm y 18,8 nm con un tamaño promedio de 11,35 nm y presentaron una forma esférica y polidispersa según el análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM). La caracterización por espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis) mostró que el pico de absorción se encontraba en la longitud de onda de 405 nm. También determinaron que la relación más óptima entre el extracto y el Nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) fue en una proporción de 1:3 respectivamente. Los resultados de este experimento confirmaron que el extracto acuoso de las hojas de olivo puede utilizarse como un agente reductor eficiente para la síntesis AgNPs (25).

Otro estudio, realizado por Ramazanli en el año 2021, se enfocó en la comprensión del impacto del pH y la temperatura del medio en el proceso de síntesis de las nanopartículas. Obtuvo resultados que revelaron que la síntesis de AgNPs se desarrolla mejor en entornos alcalinos (pH de 7-11) y a temperaturas elevadas (60-90 °C). Este hallazgo sugiere que condiciones específicas de pH y temperatura desempeñan un papel crucial en la modulación de la síntesis de AgNPs, afectando tanto la velocidad del proceso como el tamaño final de las nanopartículas obtenidas. Este trabajo no solo destacó la eficacia del método de síntesis verde, sino también la importancia de ajustar parámetros clave para obtener nanopartículas con propiedades específicas (26).

En el proceso de estandarización de métodos para la síntesis ecológica de AgNPs, utilizando extracto de hojas de olivo como agente reductor, Alhajri *et al.*, 2020, los autores detallaron un procedimiento que facilitó la obtención de estas nanopartículas. En una primera etapa, obtuvieron un extracto vegetal mediante el lavado, secado y molienda de las hojas hasta obtener un polvo. Posteriormente, mezclaron este polvo con un solvente inicial, ya sea alcohol o agua. Luego separaron la disolución resultante mediante centrifugación y filtración obteniendo así un precipitado, el cual se evaporó para obtener un residuo, el cual fue resuspendido en etanol y utilizado como el extracto de hojas de olivo. En el proceso de síntesis, mezclaron 1 mL de este extracto con 10 mL de AgNO<sub>3</sub> a una concentración de 2 mM. Mantuvieron la mezcla a temperatura ambiente hasta que se observó un cambio de color en la solución. Posteriormente, realizaron la caracterización correspondiente mediante UV-Vis y SEM confirmando la formación de AgNPs, las cuales se detectaron como un pico de absorción entre 410 y 470 nm. Además, la SEM reveló que las nanopartículas tenían una forma esférica y un tamaño que varió entre 20 y 40 nm (27).

En el ámbito de las aplicaciones destinadas a aprovechar las propiedades antibacterianas de las AgNPs, Sellami *et al.*, 2021, los autores sintetizaron, caracterizaron y evaluaron la actividad bactericida, capacidad citotóxica, propiedades antioxidantes y biocompatibilidad de este nanomaterial. Para su síntesis utilizaron AgNO<sub>3</sub> como agente precursor y extracto

acuoso de hojas de olivo como agente reductor. Posteriormente, se procedió a su análisis mediante técnicas como UV-vis, FTIR, XRD y TEM. Los análisis revelaron nanopartículas esféricas y uniformes con un tamaño promedio de 8 nm. Su actividad antibacteriana se evaluó contra dos bacterias grampositivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) y dos gramnegativas (*Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*). Los métodos de dilución en serie y ensayos de tinción de vitalidad indicaron que las nanopartículas sintetizadas lograron una destacada reducción logarítmica en el crecimiento de las bacterianas evaluadas, destacándose un efecto bactericida mayor sobre bacterias gramnegativas. Los investigadores sugieren que el excelente desempeño se debe al efecto sinérgico entre las propiedades de las nanopartículas y los metabolitos secundarios absorbidos del extracto de la planta (28).

En la investigación liderada por Halob *et al.*, 2020 para la síntesis y caracterización de AgNPs, fueron utilizadas diversas concentraciones acuosas de AgNO<sub>3</sub> (0,5; 1; 2; 3 mM) y extracto de hojas de olivo como agente reductor. La caracterización reveló que las nanopartículas presentaron un tamaño aproximado de 80-126 nm, junto con valores de potencial zeta en el rango de -17 a -23 mV. Posteriormente, evaluaron su actividad antimicrobiana frente a patógenos bacterianos como *S. aureus* y *Escherichia coli*, mediante el método de difusión en disco. Los resultados fueron significativos en cuanto a la actividad antibacteriana de las nanopartículas, con diámetros de inhibición bacteriana mayores a 13 mm y utilizando nanopartículas sintetizadas a distintas concentraciones. Estos hallazgos indicaron una destacada utilidad de las AgNPs (29).

Otro estudio realizado por Khalil *et al.*, 2014, reveló que la aplicación de nanopartículas sintetizadas utilizando extracto de hojas de olivo como agente reductor resultó en la inhibición significativa del crecimiento de aislados bacterianos resistentes a antimicrobianos. En esta investigación, se ajustó cuidadosamente parámetros clave como la concentración del extracto, el pH y la temperatura, logrando obtener AgNPs con un tamaño promedio de 20-25 nm y una forma esférica. Evaluaron su actividad antibacteriana contra *S. aureus*, *P.*

*aeruginosa* y *E. coli*, obteniendo resultados positivos a una concentración de 30-70 µg/mL. Ellos destacaron que las AgNPs exhibieron una actividad antibacteriana de amplio espectro a concentraciones bajas, sugiriendo que podrían ser una prometedora alternativa terapéutica en el futuro. Aseguraron también que, ajustar meticulosamente los parámetros de síntesis, contribuye a la comprensión de las propiedades antibacterianas de las nanopartículas y abre la puerta a posibles aplicaciones terapéuticas frente a bacterias resistentes, esto representa un avance significativo en la investigación biomédica (22).

En un estudio reciente liderado por Alowaiesh *et al.*, 2023 utilizaron residuos agroindustriales de hojas de olivo ricos en polifenoles y compuestos bioactivos para sintetizar AgNPs. Ellos demostraron que las AgNPs presentan actividad biológica, antioxidante y anticancerígena contra líneas celulares cancerosas, y actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos resistentes a múltiples fármacos (MDR). La caracterización que hicieron reveló nanopartículas esféricas con tamaño promedio de 28 nm. Además, encontraron que las AgNPs contenían compuestos activos como ácido gálico, ácido clorogénico, naringenina, catequina, galato, entre otros, lo que aumentó su actividad antioxidante y bactericida. Encontraron que a concentraciones de 2,5-20 µg/mL, las AgNPs inhiben significativamente el crecimiento de bacterias MDR y hongos patógenos, superando a los antibióticos en diámetro de inhibición (25-37 mm y 26-35 mm, respectivamente). Los investigadores concluyeron que las AgNPs pueden aplicarse de manera segura en tratamientos para mitigar radicales libres, cáncer y patógenos resistentes a múltiples fármacos (30).

## **2.2 Bases teóricas**

### **2.2.1 Nanopartículas de plata**

En un mundo de partículas, las nanopartículas (NPs) han atraído un inmenso interés del mundo científico debido a las propiedades exclusivas que presentan, resaltando con mayor énfasis las nanopartículas metálicas (MNP), las cuales exhiben propiedades físico-químicas novedosas relacionadas con el tamaño significativamente diferente de sus equivalentes a granel. Esto les ha permitido ser aplicadas en una amplia gama de campos como la medicina,

óptica, cosméticos, energías renovables, tintas, microelectrónica, imágenes médicas, remediación ambiental y dispositivos biomédicos (31).

La Organización Internacional de Estandarización (ISO) y la Sección Americana de la Asociación Mundial para Ensayos de Materiales (ASTM), definen a las AgNPs como porciones de materia cuyas tres dimensiones externas caen dentro del rango de la nano escala de entre 1-100 nanómetros (32). Estos aglomerados iónicos pueden formar una gran variedad de figuras como nanoesferas, nanoprismas, nanobarras, nanocables, nanocubos, nanopirámides, nanorices, nanoflores y otras estructuras amorfas, estas variaciones dependen mucho de los parámetros utilizados para su síntesis, las cuales también influyen en sus propiedades (33).

### **2.2.2 Métodos de síntesis**

Por lo general, existen dos técnicas empleadas para la síntesis de AgNPs, la técnica “Top-Down”, en la cual, se divide un material desde el tamaño a granel hasta convertirlas en pequeñas moléculas a escala manométrica y la de “Bottom-Up” donde se construye materiales desde la escala manométrica hasta su tamaño a granel; la segunda es la más utilizada debido a que se obtiene un mayor control de los parámetros, logrando obtener NPs con características deseadas. Dentro de estas técnicas existen diversos métodos utilizados para síntesis, los más utilizados son los métodos químicos, físicos y biológicos. Cada método tiene sus pros y sus contras; sin embargo, recientemente, los métodos de “síntesis verde” han ganado mayor importancia debido a la factibilidad y facilidad con la que se pueden sintetizar (12).

### **2.2.3 Síntesis biológica de nanopartículas de plata**

La síntesis biológica, o síntesis verde, es un método que permite aprovechar el potencial de los materiales biológicos para la síntesis de AgNPs. Este implica la reducción de iones metálicos utilizando la biomasa o extracto biológico como agente reductor, en esta reacción intervienen muchas moléculas con gran poder reductor como fenoles, carbonilos, aminos, grupos amida, proteínas, pigmentos, flavononas, terpenoides, alcaloides y entre otros



compuestos, dependiendo de la planta a utilizar (13). Logrando formar NPs estables ya sea de forma extracelular o intracelular, además de doparlas o recubrir las NPs con elementos propios del extracto. La adición de estos elementos le da un plus de biocompatibilidad, efecto que podría aumentar la actividad microbica (34).

De los diferentes biomateriales, la utilización de extractos de plantas se ha considerado un método más fiable y ecológico para la biosíntesis (16). Este tipo de síntesis mediada por plantas tiene una serie de ventajas sobre otros biomateriales, entre las principales tenemos: fácil disponibilidad, seguro de manejar, económico, compuesto por varios metabolitos que pueden ayudar en la reducción, eliminación del mantenimiento elaborado de cultivos celulares, rápida velocidad de síntesis, más respetuoso con el medio ambiente, nanopartículas más estables, mejor control sobre el tamaño y la forma de las nanopartículas (15).

#### **2.2.4 Extracto vegetal como agente reductor**

En los tiempos actuales se observa un aumento significativo en el empleo de extractos vegetales como agentes reductores en la síntesis de nanopartículas, ya que contienen compuestos bioactivos que desempeñan roles clave como agentes reductores y estabilizadores durante la formación de estas estructuras a escala nanométrica (35). La participación activa de estos extractos en el proceso de reducción de iones metálicos favorece la obtención de nanopartículas con tamaños y formas precisamente controlados (13). Además, cabe destacar que la obtención de estos extractos no se limita a un componente exclusivo de la planta, sino que se puede aprovechar cualquier parte de la misma, tales como hojas, tallos, raíces, flores, frutos, etc. (17).

En la síntesis de AgNPs se han empleado extractos de diversas plantas, entre las que se incluyen *Azadirachta indica* (36), *Carduus crispus* (37), *Cuphea procumbens* (38), *Syzygium jambos* (39), *Lepechinia meyenii* (40), *Physalis peruviana L.* (41), *Aloe vera* (42), *Skimmia laureola* (43), *Salvadora pérsica* (44), *Rumex hymenosepalus* (45), y más de 100 especies

adicionales (17). En este contexto, se destaca la utilización de las hojas de *Olea Europaea* (olivo), ya que sus estas albergan una amplia gama de metabolitos secundarios, los cuales presentan diferentes actividades biológicas, entre las que destacan las antimicrobianas (46).

### **2.2.5 Extracto de hoja de *Olea Europaea* (Olivo)**

Los principales metabolitos secundarios presentes en la hoja de olivo se pueden agrupar en fenoles simples (hidroxitirosol, tirosol y sus glucósidos); ácidos benzoicos (gálico, vanílico, salicílico, hidroxibenzoico, protocatélico, vanilina); ácidos cinámicos (cinámico, cafeico, cumarínico, ferúlico, clorogénico, homovanílico); secoiridoides (demetiloleuropeína, 3,4-dihidroxifeniletíl 4-formil-3-formilmetil-4-hexenoato, oleuropeína, oleuropeína aglicona, oleurósido, ligstroside, ligstroside aglicona); flavonoides (apigenina, hesperidina, luteolina, quercetina, quercitrina, rutina), ácido elenólico, verbascósido y otros compuestos bioactivos (amirina, beta-caroteno, eritrodol, ácido maslínico, ácido oleanólico, beta-sitosterol, esqualeno, estigmasterol, tocoferol, ácido ursólico, uvaol) (46). Donde los principios activos predominantes son los secoiridoides, compuestos que provienen del metabolismo secundario de los terpenos, siendo la oleuropeína el compuesto más característico (19).

Los polifenoles, flavonoides, alcaloides o cualquier otro compuesto que presente grupos hidroxilo (-OH) en su estructura química, se consideran los principales responsables de la reducción de iones metálicos durante el proceso de síntesis de nanopartículas metálicas (20). En este contexto un estudio reportó la síntesis exitosa de AgNPs a partir de la oleuropeína, compuesto aislado del extracto de hojas de olivo mediante un método cromatográfico, se obtuvieron NPs de un tamaño aproximado de 71 nm (47). Además se ha comprobado que estos compuestos polifenólicos por sí mismos también poseen propiedades antimicrobianas (18,48), características que podrían potenciar las capacidades bactericidas de las nanopartículas sintetizadas.

También se ha reportado la síntesis de otras MNP como la ferrita de cobalto ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) (49), magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (50,51), nanopartículas de platino (Pt NPs) (52), nanopartículas de óxido de zinc (ZnO NPs) (53–55), nanopartículas de quitosano (CS NPs) (56) y nanopartículas plata (AgNPs) (57–59), donde se utilizaron como agente reductor el extracto de hojas de olivo.

### **2.2.6 Factores que influyen en la síntesis**

Durante el proceso de síntesis, diferentes parámetros como el estado de las hojas (frescas, secas, cortadas, enteras, pulverizadas), la relación entre el peso del material vegetal y el solvente, la concentración molar del agente precursor (sal de plata), relación entre el volumen del extracto vegetal y el  $\text{AgNO}_3$ , temperatura, pH, tiempo de reacción, entre otros, influyen directamente en las características de las nanopartículas (tamaño, forma, carga eléctrica, etc), que a su vez se verán reflejados en su capacidad bactericida (16).

Algunos trabajos utilizan hojas de olivo enteras frescas para la síntesis de AgNPs (47,58), mientras que otros las cortan (25,26,29), y otros las pulverizan (28,30,57), cada proceso ha obtenido nanopartículas de tamaño diferente (entre 7-120 nm), por lo que se recomienda adaptar el método adecuado de acuerdo a las características que se desea obtener. Respecto a la relación entre el peso del material vegetal y el volumen del solvente a utilizar, la mayoría de trabajos utilizan la relación 1:10 (peso/volumen) (26,28,29,57); sin embargo también hay otros que reportan el uso de una relación 1:1 (25), 1:15 (30), y 1:25 (58). Por lo que elegir la relación adecuada para la obtención del extracto está determinada de acuerdo al objetivo del estudio.

### **2.2.7 Métodos de caracterización de las nanopartículas de plata**

La caracterización de nanopartículas es parte vital para determinar su pureza, forma, tamaño, morfología, carácter plasmónico de transición electrónica, ambiente atómico y carga superficial. Las técnicas más comunes para realizar este proceso son las espectrofotometría UV-visible y difracción de rayos X en polvo (21).

### **2.2.7.1. Espectroscopía UV-visible (UV-Vis)**

La espectroscopía UV-Vis es una técnica de medida no destructiva de la "absorción de luz", "emisión" y otras "radiaciones" de la materia en función de la longitud de onda. La luz ultravioleta (185-400 nm) y visible (400-700 nm) se utilizan en diversas aplicaciones. Al analizar la luz absorbida, la ecuación de Beer-Lambert es utilizada para estimar la concentración de diversas soluciones. Las MNPs como el hierro y el selenio, muestran características espectrales en general, especialmente después de la síntesis, ya que el color de la mezcla de reacción varía, evidenciándose en un cambio de color. La absorción se eleva a una solución brillantemente coloreada caracterizada por la resonancia plasmónica en las MNPs, especialmente en oro y plata (60).

Este método es esencial para la caracterización y seguimiento de la síntesis y estabilidad de las AgNPs, se destaca por su rapidez, simplicidad, y versatilidad en la detección de distintos tipos de nanopartículas sin requerir calibración. Las AgNPs interactúan con longitudes de onda específicas de la luz (400-450 nm). La proximidad de las bandas de conducción y valencia en las AgNPs permite el movimiento libre de electrones y generan una banda de absorción de resonancia de plasmón superficial (SPR) debido a la oscilación colectiva de los electrones en resonancia con la luz. La absorción de las AgNPs está influenciada por el tamaño de la partícula, el medio dieléctrico y el entorno químico. La observación del pico SPR, indicativo de un plasmón superficial, está bien documentada en diversas nanopartículas metálicas con tamaños entre 2 y 100 nm (21).

### **2.2.7.2. Difracción de rayos X en polvo (XRD)**

La determinación de la estructura cristalina, el tamaño y la forma de la celda unitaria, así como el tamaño cristalino de un material, puede llevarse a cabo mediante el uso de la espectroscopía de difracción de rayos X. Para las AgNPs comúnmente se identifican picos de difracción de rayos X a  $2\theta = 38,00^\circ$ ;  $44,16^\circ$ ;  $64,40^\circ$  y  $77,33^\circ$ , correspondientes a las reflexiones de Bragg (111), (200), (220) y (311) de la estructura cúbica centrada en la cara (fcc) de la plata metálica, respectivamente (según la tarjeta JCPDS estándar No. 04-0783 o 87-0597) (12). La estimación del tamaño cristalino de las partículas se puede realizar

aplicando la fórmula de Debye-Scherrer, donde  $d = K\lambda/\beta\cos\theta$ . Aquí,  $d$  representa el tamaño de cristalito,  $K$  es la constante de Debye-Scherrer (0,89),  $\lambda$  es la longitud de onda de la radiación de rayos X (1,5406 Å),  $\beta$  es el ancho completo a la mitad del máximo (FWHM) del pico más pronunciado (en radianes) del patrón de difracción, y  $\theta$  es el ángulo de Bragg (12).

### **2.2.8 AgNPs como agentes antimicrobianos alternativos**

La capacidad de los microorganismos para generar resistencia supera a la generación de antibióticos nuevos y eficientes; por lo tanto, es fundamental desarrollar nuevos agentes antimicrobianos y tratamientos antibióticos para controlar las infecciones bacterianas (61). Una alternativa a este problema mundial es el uso de nanomateriales con propiedades antimicrobianas. Las AgNPs se han estudiado ampliamente debido a su efecto antimicrobiano que presentan frente a diferentes organismos, tanto de forma individual como en conjugación con otros medicamentos (62). Y se han reportado tres principales mecanismos de acción, como la inducción de estrés oxidativo, liberación de iones metálicos y mecanismos no oxidativos (11).

### **2.2.9 Mecanismos de acción de las nanopartículas de plata**

El principal mecanismo de acción de las AgNPs es la liberación iones  $Ag^+$ , los cuales son biológicamente activos y promueven el efecto antimicrobiano. Estos iones interactúan con tres componentes vitales de las células: (a) pared celular de peptidoglicano, (b) membrana citoplasmática, donde las propiedades químicas y físicas se modifican y resultan en un desequilibrio de osmolalidad, permeabilidad, transporte de electrones y respiración celular, además se suma a ello (c) el daño en el ADN ribosómico, sitios moleculares de fósforo y azufre presentes en proteínas, especialmente en enzimas involucradas en la cadena de transporte de electrones, generación de ROS, peroxidación de lípidos, agotamiento de ATP, liberación de iones  $Ag^+$  y daño de biomoléculas intracelulares (13,63).

### **2.2.9.1. Interacción con la pared celular bacteriana**

Uno de los primeros y más importantes mecanismos bactericidas que presentan las AgNPs es la desestabilización y ruptura de la pared celular bacteriana causados por la exposición a iones  $\text{Ag}^+$  liberados por estas nanopartículas, este mecanismo se ve favorecido por la diferencia estructural que existe entre los grupos de bacterias grampositivas y gramnegativas (31), esta se presenta en la organización y composición de la capa de peptidoglicano en la pared celular, en caso de las bacterias grampositivas contiene una capa de peptidoglicano con un espesor aproximado de 30 nm, que recubre la membrana citoplasmática, mientras que en el caso de las gramnegativas, estas presenta una capa de peptidoglicano de 2 a 3 nm, que está cubierta por una membrana externa compuesta de fosfolípidos y lipopolisacáridos orientados hacia el entorno externo (64).

La carga negativa que le confieren estos compuestos de polaridad negativa al grupo bacteriano gramnegativo, atrae electrostáticamente las AgNPs y facilita el paso de los iones  $\text{Ag}^+$  en el espacio peri plasmático de la célula, mientras que bacterias positivas como *S. aureus* tienen una capa de peptidoglicano más gruesa, que se extiende más de 80 nm con ácidos teicoico y teicurónico unidos covalentemente, confiriendo una baja susceptibilidad a las AgNPs en comparación con las bacterias gramnegativas. Sin embargo, también se ha demostrado que estas NPs destruyen la pared celular sin necesidad de que penetren en la célula, observándose una agregación de NPs en la superficie celular, lo que sugiere, que esta agregación puede constituir una fuente importante de toxicidad (11).

### **2.2.9.2. Daño en la membrana celular**

El anclaje y la infiltración de las AgNPs a través de la pared celular, provoca cambios físicos en la membrana bacteriana, como el daño de la membrana, dado que los iones metálicos  $\text{Ag}^+$  liberados por estas NPs se unen a los grupos funcionales carboxilo y fosfato cargados negativamente de la membrana celular bacteriana (11). Los iones de plata  $\text{Ag}^+$  se adhieren firmemente en la membrana celular gracias a las fuerzas de Coulomb, lo que lleva a la coagulación de las proteínas. Además, también se ha demostrado que las AgNPs menores de 10 nm, atraviesan la membrana celular gracias a los poros presentes en esta, permitiendo que

las NPs penetren en el interior de las células bacterianas, causando alteraciones en el metabolismo bacteriano y daño en la membrana (62).

Se ha informado también que los iones  $Ag^+$  liberados por estas MNP alteran la función de los compuestos en la membrana celular, que es importante en la generación de energía transmembrana y el transporte de iones, al formar un enlace S-Ag estable con el grupo tiol de los compuestos en la membrana celular. Un transporte no regulado a través de los canales de membrana provoca una pérdida de nutrientes vitales, contenido celular y ATP de la célula microbiana que finalmente llevan a la necrosis y muerte celular (65).

### **2.2.9.3. Especies reactivas de Oxígeno**

También conocidas como ROS, este es un término genérico para moléculas y reactivos intermedios que tienen un fuerte potencial redox positivo, son cuatro tipos de ROS descritos en la literatura, las principales son, radical superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxilo (-OH), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno molecular, que exhiben diferentes niveles de dinámica y actividad, estas especies de oxígeno son altamente reactivas y se producen durante el metabolismo básico, también son consideradas como mecanismos de defensa intracelulares universales y han evolucionado para hacer frente a sustancias químicas no deseadas y evitar daños en biomoléculas esenciales para la célula (64,66).

Estas ROS se producen principalmente por un alto nivel de estrés que pueden ser causados por múltiples factores, entre ellos la presencia AgNPs, que puede aumentar significativamente los niveles de ROS, lo que genera un daño y muerte celular. Estas se producen cuando el oxígeno entra en estados de reducción no deseados y se transforman en radicales libres, superóxidos y peróxidos, en lugar de agua, por lo que se hipotetiza que las AgNPs inducen una alta generación de ROS provocando daño y muerte celular, lo que sugiere a este, como un mecanismo más para inhibir el crecimiento bacteriano (64).

#### **2.2.9.4. Interacción con estructuras celulares internas**

Las AgNPs de tamaño entre 1 y 12 nm son capaces de penetrar con mayor facilidad en el entorno intracelular bacteriano, una vez dentro liberan iones que se dirigen a varios sitios simultáneamente, uniéndose a proteínas debido a su afinidad por los grupos tiol. El tiol es el grupo funcional del aminoácido cisteína. La cisteína es muy importante en las reacciones biológicas debido al puente de disulfuro, que es crucial para el plegamiento y la adecuada función de las proteínas, así como su papel nucleofílico en las reacciones catalíticas (31).

Es importante mencionar que existen grupos tiol que son clave para algunos procesos esenciales en enzimas como la de síntesis respiratoria y de la pared celular, que representan ubicaciones potenciales de unión de Ag<sup>+</sup>. En el caso más específico de las enzimas de síntesis de la pared celular, se ha informado que la interacción proteína-AgNPs ocurre en el grupo SH de la manosa fosfato isomerasa, lo que lleva a una interrupción de la síntesis de la pared celular con una lixiviación concomitante de componentes internos y muerte celular (31).

Las células bacterianas expuestas a AgNPs inactivan la expresión de las proteínas de la subunidad ribosómica, así como otras proteínas celulares y enzimas esenciales para la producción de ATP, como es el caso de la proteína S2, que es una subunidad del ribosoma 30S, la cual al ser inactivada disminuye la producción de ATP. De no hacerlo, los iones Ag<sup>+</sup> harán que el ribosoma pierda su función y se desnaturalice. La subunidad 30S es responsable del apareamiento de bases adecuadas entre los codones y anticodones. Como resultado de su desnaturalización, se suprime la expresión de otras proteínas, como la succinil-CoA sintetasa, que es necesaria para la catálisis de la producción de ATP intracelular (31).

#### **2.2.9.5. Daños en el ADN**

El daño que causan las nanopartículas de plata (AgNP) a nivel del núcleo celular bacteriano se evidencia en la fragmentación nuclear o en la unión física de estas nanopartículas al ADN, probablemente debido a la alta afinidad del ion Ag<sup>+</sup> por los fosfatos abundantes en la molécula genética. Esta interacción directa provoca alteraciones estructurales y funcionales,



incluyendo la formación de enlaces covalentes con las bases del ADN, lo que puede interferir con la replicación y la transcripción del mismo. Además, afectan las proteínas involucradas en la reparación del ADN, lo que reduce la capacidad de la célula para corregir los daños en el ADN. Esto puede resultar en la acumulación de mutaciones y en una mayor probabilidad de eventos cancerígenos. La exposición a AgNP también puede inducir la apoptosis, o muerte celular programada, en parte debido al daño del ADN y al estrés oxidativo (66).

## **2.2.10 Factores que influyen en la capacidad bactericida**

### **2.2.10.1. Tamaño**

Debido a su escala nanométrica, las AgNPs cambian sus propiedades eléctricas, ópticas, mecánicas y magnéticas respecto a sus contrapartes a granel y exhiben efectos que son regidos por la mecánica cuántica, los mismos que a su vez, influyen profundamente en su actividad antimicrobiana (12). Normalmente, las NPs más pequeñas (<10 nm) tienen una mayor actividad antibacteriana. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que las NPs más grandes son más efectivas, lo que indica que el tamaño por sí solo no es el factor más importante de su toxicidad, ya que también están involucradas otras características físicas y químicas (14,64).

### **2.2.10.2. Relación superficie/volumen**

El hecho de que las AgNPs de menor tamaño puedan ser más tóxicas que las de mayor tamaño puede explicarse por la relación superficie/volumen; al ser más pequeñas las partículas cubren mayor área de interacción con el blanco o diana en comparación con las de mayor tamaño. Esto puede aumentar en gran medida la producción de especies reactivas de oxígeno, también conocidas como “ROS” (por sus siglas en inglés), lo que en consecuencia puede dañar e inactivar biomoléculas esenciales, incluyendo ADN, proteínas y lípidos (63).

### **2.2.10.3. Forma**

Para las AgNPs, la forma más común es esférica, aunque también se han informado otras formas como láminas, placas, tubos, cubos, varillas, triángulos y entre otras (67). Los

nanocubos y varillas parecen ser más efectivas que otras formas, posiblemente debido a la mayor área de planos expuestos, favorecidos por los altos niveles de oxidación de los metales. Esto sugiere que la presencia de esquinas, bordes o defectos aumentan su toxicidad, posiblemente porque el área de exposición de la partícula se ve aumentada, lo que ayuda en la adsorción y unión de compuestos, además del aumento de los defectos superficiales también aumenta la relación entre el área de la superficie y el volumen (14,64).

#### **2.2.10.4. Carga eléctrica**

La carga eléctrica o “potencial Z” de las AgNPs es otro factor importante en la actividad antibacteriana, mientras más positivas sean estas, alterarán en mayor magnitud la función de la cadena de transporte de electrones en las células bacterianas. Más importante aún, se ha demostrado que la toxicidad se ve aumentada porque la carga negativa de la pared celular bacteriana atrae electrostáticamente este tipo de partículas cargadas positivamente, aumentando su efectividad. Se ha descrito también que las condiciones ácidas favorecen la unión a la pared bacteriana, lo que respalda el hecho de que las interacciones electrostáticas juegan un papel importante en este proceso (14,64).

#### **2.2.11 Bacterias resistentes a antimicrobianos**

En la última década, la aparición de bacterias MDR se convirtió en un desafío a nivel mundial (5). La resistencia a los antimicrobianos está reconocida como un problema médico que aumenta la mortalidad, las tasas de morbilidad, la duración de la estancia y el coste; además que, tiene actualmente pocas posibilidades terapéuticas (68). Los antimicrobianos han sido el método de tratamiento preferido para las infecciones bacterianas debido a su rentabilidad y poderosos resultados. Sin embargo, varios estudios han proporcionado evidencia directa de que el uso generalizado de estos ha dado lugar a la aparición de aislamientos bacterianos resistentes (69).

#### **2.2.12 Mecanismos de resistencia a antimicrobianos**

La resistencia bacteriana se ha convertido en un problema grave debido a la aplicación masiva de antibióticos, la aparición de este tipo de bacterias puede resumirse como una interacción de factores extrínsecos e intrínsecos (70). La resistencia intrínseca puede ser

causada por la mutación espontánea de genes existentes o exógenos, mientras que la resistencia extrínseca o adquirida es causada por la adquisición de genes de resistencia de otro organismo a través de plásmidos, transposones e integrones (7). Otros mecanismos de resistencia son el resultado de cambios en las proteínas, incluidos tipos específicos de enzimas en la superficie de las células (71).

Los principales mecanismos con respecto al cambio de estructuras proteicas son 1) la alteración de dianas; 2) la generación de enzimas inactivadas o enzimas pasivadas; 3) el uso de sistemas de bombas de eflujo activo; 4) la presentación de obstáculos a la permeación de antibióticos; 5) la formación de biopelículas y 6) la aparición y eliminación de una proteína específica, como BamA o KatG, que pueden afectar la infección a través de mecanismos desconocidos (9). Ciertas bacterias muestran resistencia a los antimicrobianos a través de solo uno de los mecanismos enumerados anteriormente, pero también se pueden combinar dos o más mecanismos en un tipo de bacteria (72).

### **2.2.13 Enterobacterias resistentes a antimicrobianos**

La familia *Enterobacteriaceae* constituye el grupo más grande y heterogéneo de bacilos gramnegativos de importancia médica, estos han desarrollado mecanismo de resistencia para hacerle frente a diversos tipos de antimicrobianos, entre las principales especies reportadas están *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter*, *Serratia* spp., *Proteus* spp., y otras no tan comunes como *Pantoea* spp. Y *Leclercia adecarboxylata*, demostrando que el problema de resistencia que se afronta es bastante serio (73). Encontrándose resistencia a múltiples antimicrobianos como penicilinas, penicilinas con inhibidores betalactámicos, cefalosporinas de primera, segunda, tercera, cuarta y hasta quinta generación, cefamicinas, monobactámicos, carbapenémicos, aminoglucósidos, quinolonas, cotrimoxazol, tetraciclinas, glicilciclinas, fosfomicina, colistina y entre otros, lo que reduce el número de antimicrobianos eficientes frente a las infecciones causadas por estas bacterias (61,68).

#### **2.2.14 Métodos utilizados para evaluar la actividad antibacteriana**

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de las AgNPs, los estudios en la literatura han utilizado los métodos recomendados para los fármacos antimicrobianos como difusión de disco en agar, determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), la concentración mínima bactericida (CMB) y evaluación de tiempo muerto. Sin embargo, el método más utilizado es el ensayo de difusión en agar con disco para obtener valores de diámetro de zona de inhibición (ZOI) y luego categorizar los valores obtenidos mediante la escala de Duraffourd (74).

La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar). Tradicionalmente estos métodos se han venido usando para la determinación de la CMI y la CMB de los antimicrobianos. En la mayoría de los casos se preparan diluciones del antimicrobiano en progresión geométrica en base dos utilizando un medio de cultivo adecuado; posteriormente se inocula dicho medio y luego de la incubación para permitir el crecimiento del microorganismo, se realiza la lectura, determinando así la concentración que provoca la inhibición (75,76).

##### **2.2.14.1. Método de difusión en agar con disco**

El método de difusión en disco es una técnica comúnmente utilizada en microbiología para evaluar la sensibilidad de microorganismos a diferentes agentes antimicrobianos, como antibióticos o antifúngicos. Este método se basa en la capacidad de los agentes antimicrobianos para difundirse a través de un medio sólido, como el agar, y ejercer su acción inhibitoria sobre los microorganismos circundantes. Los discos de papel impregnados con concentraciones conocidas de sustancias antimicrobianas se colocan sobre la superficie del agar, y a medida que estas sustancias se disuelven, se establece un gradiente de concentración alrededor de los discos. La velocidad y la extensión de la difusión dependerán de las propiedades físicas y químicas del agente antimicrobiano, así como de la susceptibilidad del

microorganismo en cuestión. Cuando el agente antimicrobiano encuentra un microorganismo sensible, inhibe su crecimiento y formación de colonias, dando lugar a una zona de inhibición visible alrededor del disco. La medición del diámetro de estas zonas proporciona una indicación cuantitativa de la sensibilidad relativa del microorganismo a la sustancia antimicrobiana probada (76,77).

#### **2.2.14.2. Concentración mínima inhibitoria**

La concentración mínima inhibitoria constituye un pilar esencial en la evaluación de la actividad antimicrobiana de un compuesto. Este método se fundamenta en la premisa de identificar la concentración más baja de un agente antimicrobiano necesaria para detener el crecimiento de un microorganismo particular. A través de la exposición de aislamientos microbianos a distintas concentraciones del compuesto en un medio de cultivo, se busca discernir la eficacia del agente en cuestión. La CMI se determina observando la dilución mínima que resulta en la inhibición visible del crecimiento del microorganismo tras un periodo de incubación definido. Además, esta es esencial en la evaluación de la eficacia de nuevos medicamentos antimicrobianos y en la monitorización de la resistencia antimicrobiana. La capacidad de determinar la concentración más baja que inhibe el crecimiento garantiza una comprensión más precisa de la actividad antimicrobiana y facilita la adaptación de las estrategias terapéuticas para combatir las infecciones de manera efectiva (76,77).

#### **2.2.14.3. Concentración mínima bactericida**

La concentración mínima bactericida constituye un fundamento crucial para evaluar la actividad antimicrobiana de un compuesto, ya que representa la concentración más baja de dicho agente que resulta en la muerte irreversible de una población bacteriana específica. Al igual que con la concentración mínima inhibitoria, la determinación de la CMB implica la exposición de microorganismos a diferentes concentraciones del compuesto en un medio de cultivo. La CMB también se utiliza como una herramienta esencial en la evaluación de nuevos agentes antimicrobianos, permitiendo a los investigadores y profesionales de la salud comprender mejor la eficacia bactericida de un compuesto (76,77).

### 2.3 Definición de términos

**Microscopio electrónico de fuerza atómica (AFM):** Es un tipo de microscopía electrónica que es capaz de formar imágenes de las superficies utilizando una sonda o micro palanca, que escanea la muestra en función de la posición generando una imagen (15).

**Coalescencia:** Es el resultado de la unión de dos o más partículas, para formar una partícula de mayor tamaño. Esto a su vez favorece el crecimiento de nanomateriales a escalas de mayor magnitud (78).

**Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR):** Es un método utilizado para obtener el espectro infrarrojo de transmisión o absorción de una muestra para identificar la presencia de compuestos orgánicos e inorgánicos (15).

**Nanómetro:** Medida de longitud que equivale a la mil millonésima parte de un metro ( $10^{-9}$ ) (32).

**Microscopía electrónica de barrido (SEM):** Este tipo de microscopía utiliza electrones en lugar de luz para formar una imagen que refleja las características superficiales de una muestra, proporcionando información de las formas, texturas y composición química de sus constituyentes a escala nanométrica (15).

**Microscopía electrónica de transmisión (TEM):** Es una técnica que es utilizada para la caracterización de materiales nanoestructurados, permite proveer información acerca de la distribución de átomos en un material con alta resolución atómica (15).

**Espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis):** Es un método utilizado para la identificación de los grupos funcionales presentes en una molécula mediante la emisión de un haz de luz que excita los electrones hacia un estado superior de energía, que se presentan en forma de bandas o picos de absorbancia (15).

**Difracción de rayos x (XRD):** Es una técnica que permite identificar las fases cristalinas de los compuestos analizar, tanto en su aspecto cualitativo como cuantitativo (15).

**Resonancia de plasmón superficial (SPR):** Es un fenómeno óptico electromagnético que donde la luz induce oscilaciones de electrones en la interfaz entre un metal y un dieléctrico (15).

## CAPÍTULO III

### DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS

#### 3.1. Nivel de investigación

Nivel Descriptivo

#### 3.2. Tipo y diseño de estudio

**Tipo de estudio:** Básica

**Diseño de estudio:** Experimental

#### 3.3. Material Biológico

- ✓ Hojas de *Olea europaea* utilizadas para la obtención del extracto acuoso.
- ✓ Aislamientos de enterobacterias de origen clínico que presenten resistencia a dos o más antimicrobianos.

#### 3.4. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos.

La presente investigación se dividió en dos etapas, en la primera se sintetizaron y caracterizaron las OLE-AgNPs, mientras que, en la segunda, se evaluó el efecto bactericida sobre aislamientos de enterobacterias de origen clínico que presentan resistencia a dos o más antimicrobianos. La primera etapa se realizó en el Laboratorio multidisciplinario de investigación en nanociencia y nanotecnología “Mg Oswaldo Roger Sánchez Rosales” (LabMIN)-Departamento Académico de Física, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad Nacional de Trujillo, mientras que la segunda etapa se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca.

##### 3.4.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata

###### 3.4.1.1. Obtención de las hojas de olivo

El primer paso para iniciar con el proceso de síntesis de las OLE-AgNPs fue la obtención de las hojas de olivo, las cuales se obtuvieron del olivar que pertenece a la empresa “Agroindustrial Casa Grande” ubicado en el Centro poblado La Arenita, distrito de Paiján,

provincia de Ascope, región La Libertad, a 91 m.s.n.m, latitud de 7° 40' 59.0" S y longitud de 79° 19' 17,4" W (Apéndice N° 1). Las hojas verdes fueron colectadas y trasladadas al LabMIN, donde fueron lavadas con agua corriente un par de veces para eliminar el polvo y otros contaminantes, luego fueron enjuagadas con agua destilada y finalmente puestas a secar por 15 días a temperatura ambiente en un lugar con poca iluminación (79).

### 3.4.1.2. Obtención del extracto de hojas de olivo

Todo el procesos de síntesis se realizó en el LabMIN, donde se utilizó el método de decocción para la obtención del extracto (2), para lo cual se tomaron las hojas enteras previamente secadas y se pesaron 50 g, luego fueron puestas a hervir en un matraz con 400 mL de agua destilada (80); una vez cumplido el tiempo (10 minutos), el extracto se dejó enfriar a temperatura ambiente, y luego se filtró utilizando papel Whatman N° 1 (29). El extracto acuoso fue almacenado a 4 °C hasta el momento de la síntesis (25).

### 3.4.1.3. Síntesis de las OLE-AgNPs

Para la síntesis se preparó una solución de Nitrato de Plata ( $\text{AgNO}_3$ ) a 5 mM, para lo cual, el cálculo se realizó mediante la siguiente fórmula, donde se incluyen la densidad y el porcentaje de pureza:

$$Px AgNO_3 = \left(M \frac{mol}{L}\right) \left(Masa\ molar \frac{g}{mol}\right) \left(Porcentaje\ depureza \frac{g}{g}\right) (Vol.\ total\ L)$$

Donde  $Px AgNO_3$  es la cantidad de la sal de la plata a pesar en gramos,  $\left(M \frac{mol}{L}\right)$  es la Molaridad de la sal de plata expresada en moles sobre litro,  $\left(Masa\ molar \frac{g}{mol}\right)$  es la masa molar del  $\text{AgNO}_3$  expresada en gramos sobre mol,  $\left(Porcentaje\ depureza \frac{g}{g}\right)$  es la pureza del  $\text{AgNO}_3$  expresada en gramos sobre gramos y  $(Vol.\ total\ L)$  es el volumen total de la solución final expresado en litros (81), esto incluye también el volumen del extracto.



Reemplazando los valores para obtener el cálculo obtenemos:

$$Px AgNO_3 = (0,005)(169,87)(0,998)(0,1)$$

$$Px AgNO_3 = 0,0848 \text{ g}$$

Se pesó 0,0848 g de  $AgNO_3$  el cual se diluyó en 75 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer. El matraz se colocó sobre un agitador de placa caliente (Thermo Scientific, modelo SP131325) (Apéndice N° 2) a 100 °C y velocidad constante de 4 000 rpm. Inmediatamente después se agregaron 25 mL del extracto (proporción 1:3 extracto: $AgNO_3$ ) (25). Se tomaron aproximadamente de 4 a 5 gotas de muestra cada 5 minutos para medir en el espectrofotómetro UV-VIS y observar el pico de resonancia de plasmón superficial, se observó un cambio de un color en la solución coloidal el cual fue indicativo de la presencia de nanopartículas en la solución (82). Luego de 80 min, el matraz con la solución coloidal fue retirada y enfriada en un depósito con agua, para evitar la aglomeración de las nanopartículas por el fenómeno de coalescencia (83), Tres horas después, con la solución fría, se realizó otra medición para verificar la presencia de las OLE-AgNPs, luego se inició el proceso de centrifugado.

Utilizando una ultracentrífuga (Hermle, modelo Z 36 HK) (Apéndice N° 3), se centrifugó a 20000 rpm por 5 min, se desechó el sobrenadante y el precipitado con las nanopartículas se lavó para eliminar los residuos de síntesis. El lavado se realizó dispersando las OLE-AgNPs en etanol al 96° y luego llevadas a ultrasonido por 5 min, se utilizó el limpiador ultrasónico (Branson, modelo 2510-DTH) (Apéndice N° 4). Luego del proceso de dispersión las nanopartículas fueron centrifugadas nuevamente; este proceso se repitió 3 veces. El precipitado fue secado en horno a 70 °C por 12 h, el polvo color gris oscuro fue molido en mortero hasta convertirlo en polvo fino, el cual fue caracterizado mediante difractor de rayos X.

#### **3.4.1.4. Caracterización de las nanopartículas**

Las OLE-AgNPs fueron caracterizadas mediante espectroscopia ultravioleta-visible con un espectrofotómetro Lambda 750 (Perkin Elmer) (Apéndice N° 5) para identificar el pico de resonancia de plasmón; y mediante difracción de rayos X, en un difractor MiniFlex600 (Rigaku) (Apéndice N° 6) se verificó que los picos cristalográficos de la muestra en polvo de las nanopartículas sintetizadas coincidan con los picos para la plata en los respectivos ángulos; además, se calculó el tamaño del cristalito utilizando la fórmula de Debye-Scherrer (Anexo N° 1). Ambos equipos pertenecen al LabMIN-Departamento Académico de Física, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad Nacional de Trujillo. Las nanopartículas sintetizadas fueron trasladadas al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca para realizar la evaluación bactericida.

#### **3.4.2. Evaluación del efecto bactericida de las OLE-AgNPs**

Las OLE-AgNPs fueron probadas sobre 10 aislamientos de enterobacterias de origen clínico resistentes a uno o más antimicrobianos, proporcionados por el Laboratorio de Microbiología, Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNC. Los aislamientos fueron reactivados en agar nutritivo por 12 h a 37 °C. Estos cultivos fueron utilizados para evaluar la actividad bactericida mediante el ensayo de difusión en agar con disco, de acuerdo a al manual de procedimientos descrito por Picazo (77) con una ligera adaptación; se midieron los diámetros de la zona de inhibición (ZOI) y se categorizó de acuerdo a la escala de Duraffourd (74).

##### **3.4.2.1. Método de difusión en agar con disco**

###### **a) Preparación del material**

Se preparó una solución madre de AgNPs dispersas en agua destilada, para lo cual se pesó 10 mg de polvo de nanopartículas y se diluyeron en 1 mL de agua destilada, solución a la cual se denominó “OLE-AgNPs A”. También se preparó una solución madre de AgNPs dispersas en alcohol comercial de 96° de pureza, para lo cual se pesaron 10 mg del polvo

de nanopartículas y se diluyeron en 1 mL de alcohol, solución a la cual se le llamó “OLE-AgNPs B”.

#### **b) Preparación del inóculo**

Se tomó de 1 a 5 colonias de cada cultivo fresco y se suspendió en solución salina fisiológica hasta alcanzar, por comparación visual, la turbidez equivalente al tubo N° 0,5 en la escala de McFarland ( $1 - 5 \times 10^6$  UFC/mL) (77).

#### **c) Procedimiento**

El procedimiento se llevó a cabo siguiendo el manual M26-A del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) (84) y el manual de procedimientos descrito por Picazo (77). Los cultivos se inocularon en placas con agar Müller-Hinton (84). Se trabajó con 5 grupos de tratamiento, 3 grupos experimentales (G3, G4 y G5) y 2 grupos control (G1 y G2). Para el grupo experimental G3 los discos se cargaron con 20  $\mu$ L de OLE-AgNPs A, para el G4 se cargaron con 20  $\mu$ L de OLE-AgNPs B y el G5 con 20  $\mu$ L de alcohol de 96° de pureza. Los discos del grupo control G1 se cargaron con 20  $\mu$ L de agua destilada (control negativo) y los discos del grupo control G2 con 20  $\mu$ L del antimicrobiano Imipenem (control positivo) (Apéndice N° 7). Las placas fueron incubadas por 18 h a 37 °C, luego se midió el diámetro de las zonas de inhibición para cada disco empleando un vernier. Se comparó el diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano con la escala de Duraffourd y se clasificó en las siguientes categorías: Nula o sensibilidad nula: (-) para valores inferiores o iguales a 8 mm; sensibles o sensibilidad baja: = (+) para rangos de 9 a 14 mm; muy sensibles o sensibilidad media: = (++) para rangos de 15 a 19 mm y sumamente sensibles o sensibilidad alta: = (+++) para valores iguales o superiores a 20 mm (74).

#### **3.4.2.2. Concentración mínima inhibitoria (CMI)**

##### **a) Preparación del material**

Se preparó una solución madre de AgNPs dispersas en agua destilada, para lo cual se pesaron 10 mg del polvo de nanopartículas y se diluyeron en 10 mL de agua destilada,

solución a la cual se le llamó “OLE-AgNPs A”. También se preparó una solución madre de AgNPs dispersas en alcohol comercial de 96° de pureza, para lo cual se pesaron 10 mg del polvo de nanopartículas y se diluyeron en 10 mL de alcohol, solución a la cual se le llamó “OLE-AgNPs B” (Apéndice N° 8).

A partir de las soluciones madre previamente preparadas OLE-AgNPs A y OLE-AgNPs B se prepararon 10 diluciones dobles seriadas para cada una. Para esto se tomaron 10 tubos cónicos tipo Eppendorf de 15 mL, a cada uno de los tubos se le agregó 5 mL de agua destilada, luego se tomó 5 mL de la OLE-AgNPs A y se mezcló con los 5 mL de agua destilada del primer tubo, se homogenizó y se tomó 5 mL de este primer tubo y se mezcló con los 5 mL del tubo 2, se homogenizó y se tomó 5 mL del tubo 2 y se mezcló con los 5 mL del tubo 3 y el paso se repite hasta llega al tubo 10, donde luego de homogeneizar, se descartaron 5 mL sobrantes del último tubo, todos los tubos quedaron con un volumen final de 5 mL, obtuvieron así concentraciones de 1000 µg/mL en el tubo 1; 500 µg/mL en el tubo 2; 250 µg/mL en el tubo 3; 125 µg/mL en el tubo 4; 62,5 µg/mL en el tubo 5; 31,25 µg/mL en el tubo 6; 15,62 µg/mL en el tubo 7; 7,81 µg/mL en el tubo 8; 3,91 µg/mL en el tubo 9 y 1,95 µg/mL en el tubo 10; se rotularon como D1, D2, D3...D10. Se repite el mismo procedimiento para la solución OLE-AgNPs B (Apéndice N° 9).

#### **b) Preparación del medio**

Se preparó 100 mL de caldo Müller-Hinton enriquecido con glucosa, para ello se tomó en cuenta la preparación del caldo rojo de fenol suplementado con glucosa (por cada litro de medio se agrega 5-10 % de carbohidrato) (85). Primero, se pesó 2,2 g de caldo Müller-Hinton y se disolvió en 100 mL de agua destilada, luego a esta disolución se agregó 0,5 g de glucosa. Adicionalmente, se preparó una solución de 250 mL de rojo de fenol (86), de la cual, se tomó 30 mL y agregó a los 100 mL medio previamente preparado. De este modo se obtuvo el medio caldo Müller-Hinton + rojo de fenol + glucosa, a este medio se le denominó “CMHRFEG” (Caldo Müller-Hinton con Rojo de Fenol Enriquecido con Glucosa) (Apéndice N° 10).

### **c) Preparación del inóculo**

Se tomó de 1 a 5 colonias de cada cultivo fresco y se suspendió en tubos de ensayo con 3 mL de suero salino fisiológico hasta alcanzar por comparación visual la turbidez equivalente al tubo N° 0,5 en la escala de McFarland ( $1 - 5 \times 10^6$  UFC/mL). Se obtuvo un total de 10 tubos (Apéndice N° 11), cada tubo contenía una cepa diferente, es así que los tubos se rotularon con los números del 1 al 10. Luego, de cada tubo se tomaron 15  $\mu$ L y se diluyó en tubos tipo Eppendorf de 1.5 mL con 1500  $\mu$ L del medio CMHRFEG. Este constituyó el inóculo diluido a 1:100 y a una concentración de  $5 \times 10^4$  UFC/mL (77).

### **d) Procedimiento**

Se siguió la técnica de microdilución en placa de 96 pocillos, utilizándose una microplaca por cada cepa. Primero, se agregó 100  $\mu$ L del medio CMHRFEG en cada uno de los 96 pocillos de las 10 microplacas, luego, en las columnas del 1 al 10 se agregó 50  $\mu$ L de las diluciones dobles en orden ascendente D1-D10, ocupando las diluciones de las nanopartículas dispersas en agua en las 4 primeras filas (A, B, C, D) y las diluciones de las nanopartículas dispersas en alcohol en las 4 filas siguientes (E, F, G, H). La columna 11 fue el control negativo, por lo que solo contenían 100  $\mu$ L de medio, mientras que la columna 12 fue el control positivo donde se añadió el medio y la cepa. Antes de añadir el inóculo, las microplacas con el medio y las diluciones de las AgNPs fueron esterilizadas bajo radiación UV por una hora, para luego agregar a las filas A-C y E-G con 50  $\mu$ L de la suspensión bacteriana respectiva, siendo las filas A, B y C las 3 repeticiones de las OLE-AgNPs A, mientras que la fila D se usó como prueba de control de esterilidad. Las filas E, F y G fueron las 3 repeticiones para las OLE-AgNPs B, mientras que la columna H se usó como prueba de control de esterilidad. Todo este proceso se puede observar de mejor manera en la imagen del Apéndice N° 12. Se aplicó este mismo procedimiento para cada una de las microplacas. Una vez agregados los inóculos, las microplacas fueron selladas con cinta alrededor de la tapa para evitar que el calor evapore el agua presente en el medio, luego fueron puestas a incubar a 37 °C por 12 h. Pasado el tiempo se observó el crecimiento de los aislamientos y se anotaron los resultados (77).

### **3.4.2.3. Concentración mínima bactericida**

Luego de encontrar la CMI para cada uno de los aislamientos, se ubicó tres de las concentraciones más bajas donde hubo ausencia de crecimiento bacteriano; de ellos se tomó 10 µL para inocularlos en placas con agar Müller-Hinton; cada placa fue dividida en 8 segmentos, la distribución del inóculo para cada segmento se detalla en el Apéndice N° 13, las placas fueron incubadas por 12 h a 37 °C. Pasado el tiempo se observó el crecimiento de los aislamientos y se anotaron los resultado (77).

### **3.4.3. Técnicas de Procesamiento y Análisis estadístico**

Todos los datos obtenidos fueron procesados con el software estadístico IBM SPSS Statistics versión 25, aplicando el cálculo de medida de tendencia central (media aritmética, mediana) y de dispersión (desviación estándar) para datos cuantitativos; se aplicó la prueba estadística de Shapiro-Wilks para determinar la distribución normal de los datos. Luego se aplicó la prueba de Levene, para determinar la homocedasticidad de varianza. Los datos presentaron distribución normal pero la varianza de los grupos no fue homogénea, entonces se aplicaron pruebas no paramétricas; es así que, se aplicó el test de Kruskal Wallis para establecer las diferencias entre los valores medios de los distintos grupos de tratamiento obtenidos por el ensayo de difusión en agar con disco, y la prueba estadística de Mann-Whitney para los valores obtenidos en la CMI y CMB. También se aplicó la prueba estadística de Chi-cuadrado para determinar las diferencias entre el nivel sensibilidad en cada uno de grupos bacterianos. Se consideró un nivel de significancia de 95 % ( $p < 0.05$ ).

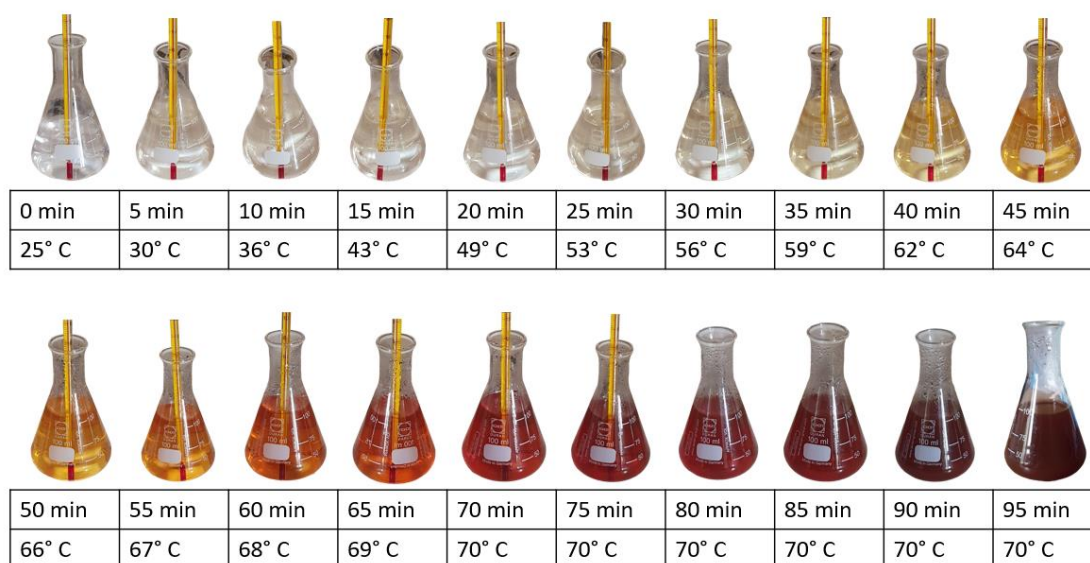
## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

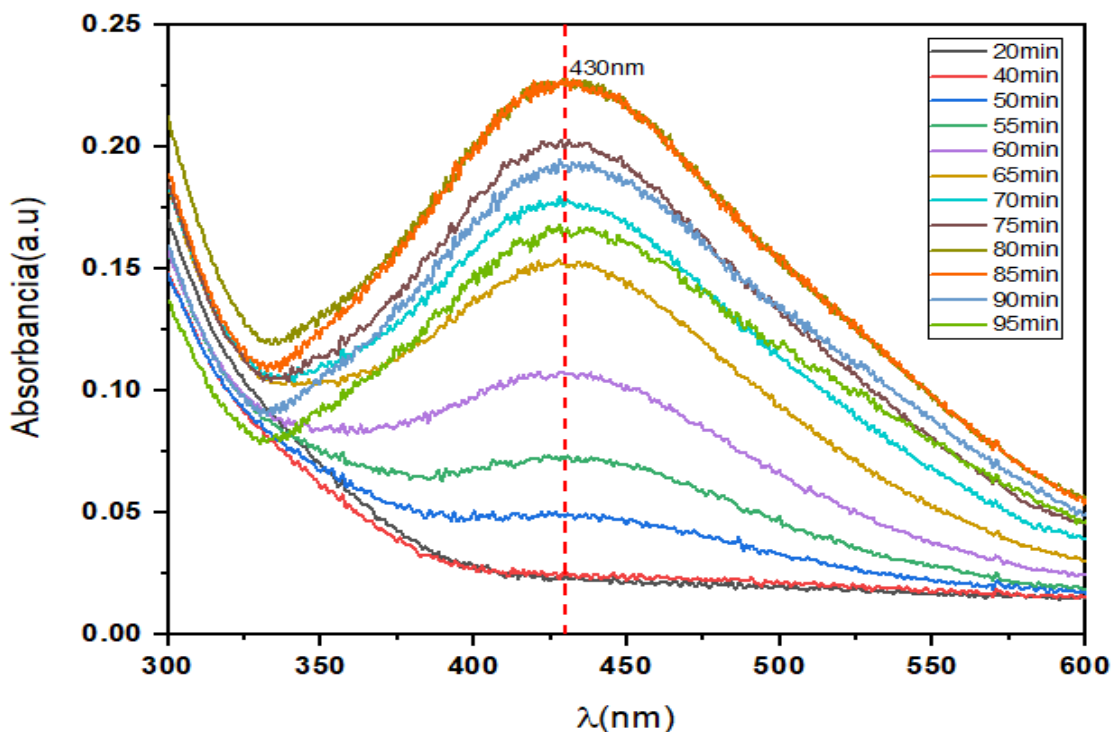
#### 4.1. Resultados

##### 4.1.1. Síntesis y caracterización de las OLE-AgNPs

A partir de los 45 min de iniciado el proceso de síntesis, se empezó a observar un notorio cambio de color en la solución coloidal (Figura 1). Este varió de un color amarillo claro a un color marrón oscuro, este cambio permitió identificar el inicio de la reacción, es decir, el inicio de síntesis de nanopartículas, al reducirse la sal de plata debido a los compuestos bioactivos del extracto, formando así las primeras nanopartículas (87); sin embargo, en el espectrofotómetro no se logró observar el pico de plasmón superficial sino hasta el minuto 50, donde se logró observar un pequeño pico que fue aumentando notablemente su intensidad con el tiempo, logrando alcanzar su punto máximo entre los 80 y 85 min, a una longitud de onda de 430 nm (Figura 2). Este intervalo de tiempo se tomó como el adecuado para la síntesis.



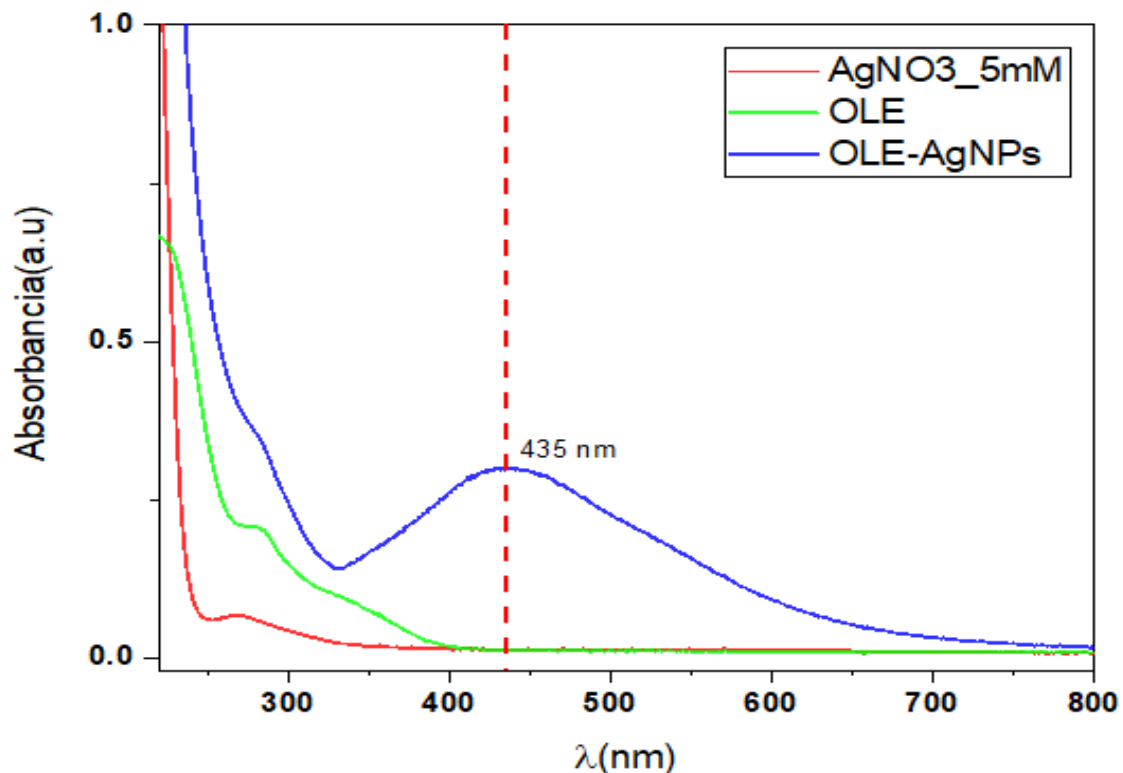
**Figura 1:** Cambio de color en la solución coloidal respecto al tiempo y temperatura durante el proceso de síntesis de las OLE-AgNPs.



**Figura 2:** Espectro UV-VIS de la síntesis de OLE-AgNPs respecto al tiempo, se observa que el pico máximo a 430 nm está entre los 80 y 85 minutos.

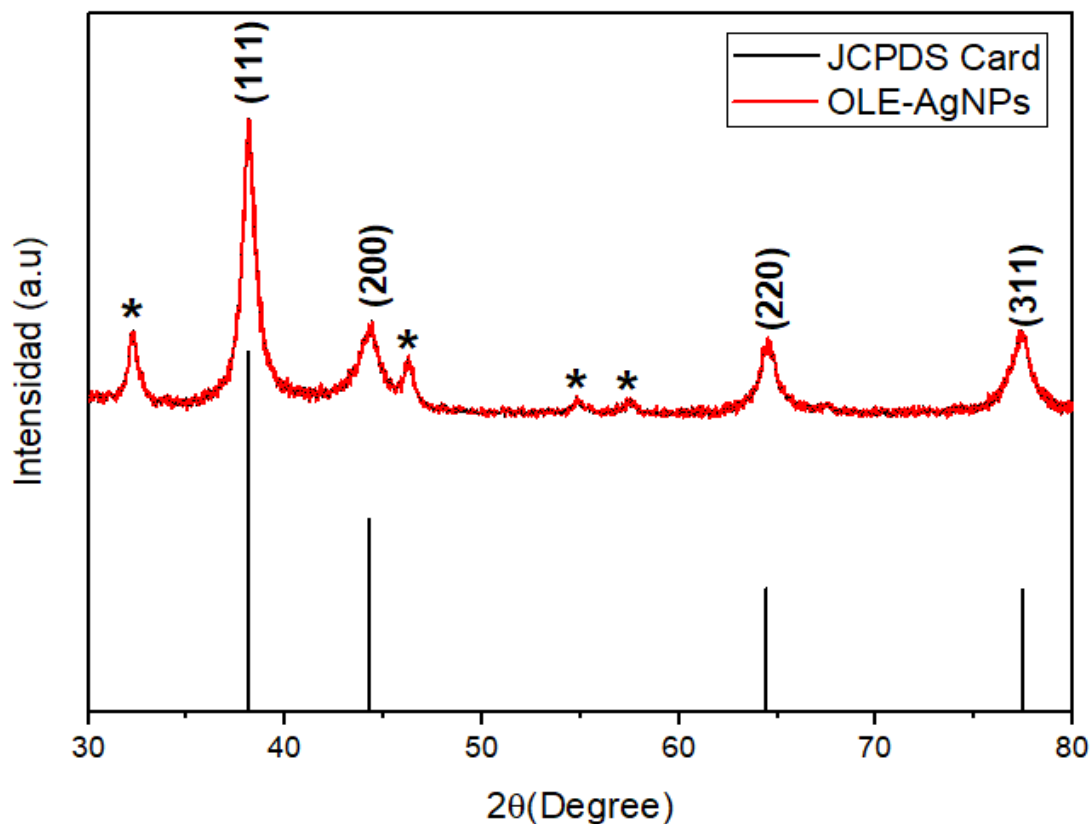
Una vez fría la solución coloidal fue nuevamente medida para confirmar la presencia de la de la banda en el pico del plasmón superficial; se confirmó un pico a 435 nm, este desplazamiento de 5 nm en la longitud de onda se podría deber al crecimiento de las nanopartículas en el medio por el fenómeno de la coalescencia. Además, el espectro UV-VIS de las OLE-AgNPs fue contrastado con los espectros del  $\text{AgNO}_3$  a 5 mM y del extracto acuoso de las hojas de olivo, para diferenciar de esta manera la síntesis exitosa (Figura 3).





**Figura 3:** Espectrograma UV-VIS de las soluciones de  $\text{AgNO}_3$  a 5 mM (rojo), extracto acuoso de la hoja de olivo (verde) y solución coloidal de las OLE-AgNPs (azul).

El espectro obtenido por la caracterización de rayos x reveló un total de 8 picos de difracción, donde los 4 más pronunciados se encontraron a  $2\theta = 38,00; 44,16; 64,40$  y  $77,33$ ; correspondientes a las reflexiones de Bragg (111), (200), (220) y (311) de la estructura cúbica de la plata metálica, respectivamente (según la tarjeta JCPDS estándar No. 04-0783 o 87-0597) (12). Otros 4 picos marcados con “\*” posicionados a  $2\theta$  a  $32,19; 46,63; 54,74$  y  $57,35$  (Figura 4), podrían representar a los compuestos orgánicos del extracto que se cristalizaron (88–90). Luego, el cálculo mediante la fórmula de Debye-Scherrer reveló que el tamaño promedio de cristalito fue de 8,25 nm (Apéndice N° 14).



**Figura 4:** Difractograma de las OLE-AgNPs (rojo) y la JCPDS card correspondiente a la plata metálica (negro).

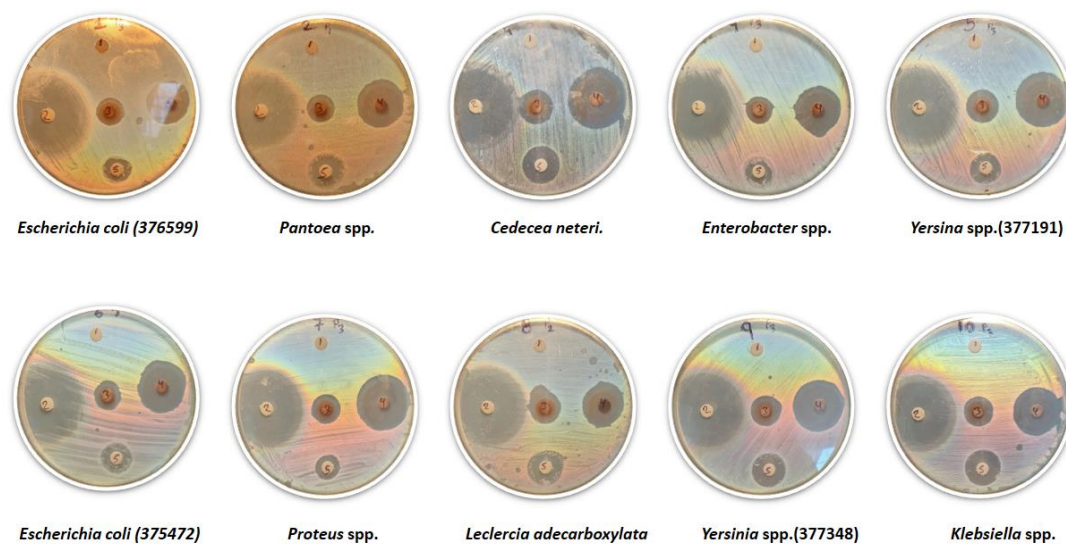
#### 4.1.2. Evaluación del efecto bactericida de las OLE-AgNPs

Los 10 aislamientos bacterianos presentaron un perfil de resistencia a uno o más antimicrobianos como se describe en el Apéndice N° 15. Los aislamientos bacterianos enfrentados a los tratamientos experimentales G3, G4 y G5 presentaron valores promedios de diámetros ZOI de 13,10 mm; 23,80 mm y 8,20 mm respectivamente. El grupo control negativo G1 no presentó zona de inhibición, mientras que, para el grupo control positivo presentó un valor promedio de diámetro de ZOI de 33,40 mm. (Tabla 1) (Figura 5) (Apéndice N° 16).

**Tabla 1.** Promedio del diámetro la zona de inhibición (en mm) de los diferentes grupos de tratamiento de NPs sobre los aislamientos.

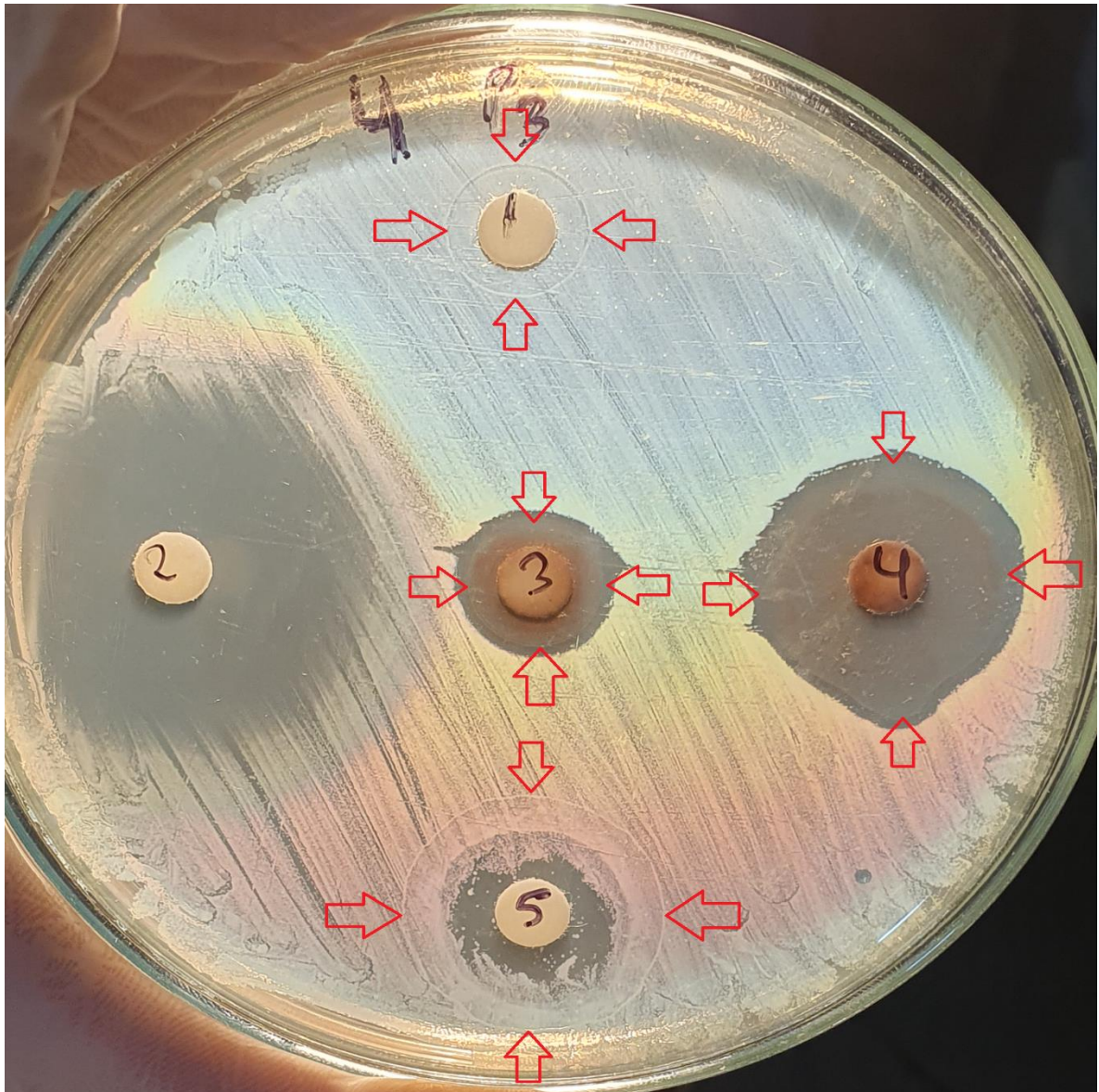
Número	Aislamientos	Diámetro de ZOI por grupos de tratamiento (mm)				
		G1	G2	G3	G4	G5
1	<i>E. coli</i> (376599)	00,00	34,20	12,13	20,93	8,43
2	<i>Pantoea</i> spp.	00,00	32,90	14,17	24,53	7,83
3	<i>C. neteri</i>	00,00	32,70	13,70	25,87	7,37
4	<i>Enterobacter</i> spp.	00,00	30,00	11,27	19,97	8,40
5	<i>Yersina</i> spp.(377191)	00,00	33,10	14,53	24,90	8,83
6	<i>E. coli</i> (375472)	00,00	36,40	13,50	23,67	7,10
7	<i>Proteus</i> spp.	00,00	35,30	11,87	24,97	7,70
8	<i>L. adecarboxylata</i>	00,00	35,30	14,10	22,13	8,57
9	<i>Yersinia</i> spp.(377348)	00,00	33,30	13,37	25,83	8,03
10	<i>Klebsiella</i> spp.	00,00	31,30	14,60	25,00	9,53

G1: Control negativo, G2: Control positivo, G3: Grupo con OLE-AgNPs A, G4: Grupo con OLE-AgNPs B, G5: Grupo con alcohol.



**Figura 5:** Efecto bactericida de las OLE-AgNPs sobre los aislamientos de enterobacterias resistentes a antimicrobianos, determinados mediante la prueba de difusión en agar con disco.

El área de desplazamiento de los líquidos en los que se han dispersado las OLE-AgNPs, son diferentes tanto para el grupo de las nanopartículas dispersas en agua como las dispersas en alcohol, esto se debe a la diferencia en el coeficiente de tensión superficial que tiene cada uno de los líquidos presenta, al tener el alcohol un coeficiente de tensión superficial más bajo (Coeficiente de tensión superficial del alcohol = 0,022 N/m) que el del agua (Coeficiente de tensión superficial del agua = 0,073 N/m) logra cubrir una mayor área de desplazamiento (Figura 6)



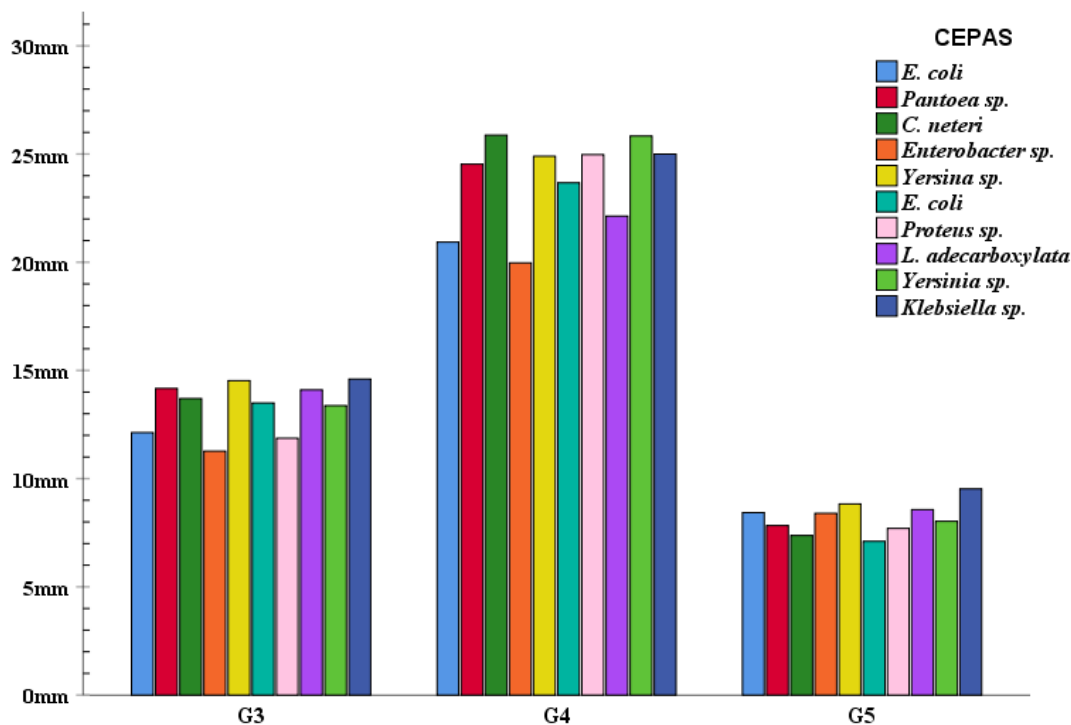
**Figura 6:** Áreas de desplazamiento de los líquidos utilizados para cada uno de los grupos de tratamiento.

El cálculo de las medidas de tendencia central y la aplicación de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks revelaron que los datos de los grupos siguieron una distribución normal, sin embargo, la prueba de homocedasticidad de varianzas reveló que la varianza de los grupos son diferentes, por lo que se aplicó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis, donde se observó que existía diferencias estadísticamente significativas entre cada grupo ( $p < 0,05$ ) (Tabla 2) (Apéndice N° 17). La distribución del tamaño de los halos no sigue una distribución homogénea, para cada grupo la diferencia de tamaño es notable (Figura 7).

Tabla 2. Comparación de las medias de los diámetros ZOI (en mm) para cada grupo de tratamiento.

<b>Grupo</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Mediana</b>	<b>Valor mínimo</b>	<b>Valor máximo</b>
<b>G3</b>	13,32	1,17	13,60	11,27	14,60
<b>G4</b>	23,78	2,07	24,72	19,97	25,87
<b>G5</b>	8,18	0,72	8,22	7,10	9,53

Valores de las medias muestran diferencias significativas entre cada grupo, prueba Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).



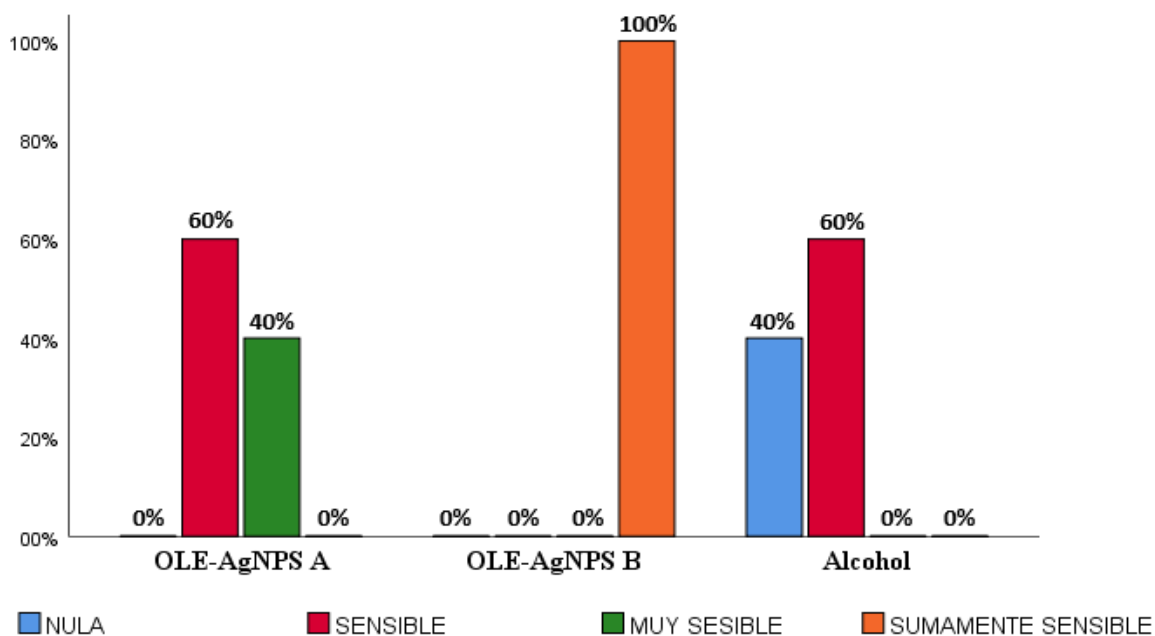
**Figura 7:** Distribución del tamaño de los diámetros ZOI de los 3 grupos experimentales; G3: Grupo con OLE-AgNPs A, G4: Grupo con OLE-AgNPs B, G5: Grupo con alcohol.

La escala de Duraffourd permitió identificar el nivel de sensibilidad de los aislamientos por cada grupo tratado (Tabla 3), así se logró determinar que 100 % de estos fueron sumamente sensibles para el grupo de discos con nanopartículas dispersas en alcohol, mientras que para el grupo de nanopartículas dispersas en agua se logró determinar que el 60 % presentaron sensibilidad, mientras que el otro 40 % fueron muy sensibles, finalmente, para el grupo con alcohol el 60 % presentó sensibilidad y el otro 40 % no presentó sensibilidad alguna (Figura 8). La aplicación de la prueba estadística de Chi-cuadrado demostró que el nivel de sensibilidad para cada grupo evaluado fue diferente ( $p < 0,05$ ) (Apéndice N° 18) encontrándose mejores resultados en el grupo G4.

Tabla 3. Nivel de sensibilidad de los aislamientos expuestos a nanopartículas de plata de acuerdo a la escala Duraffourd agrupados por tratamientos.

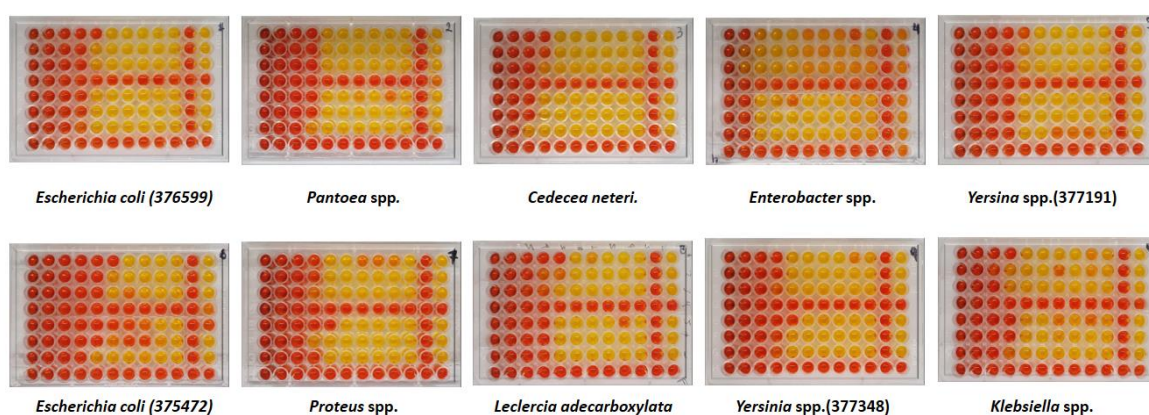
Número	Aislamientos	Grupo de tratamientos		
		G3	G4	G5
1	<i>E. coli</i> (376599)	(+)	(+++)	(+)
2	<i>Pantoea</i> spp.	(++)	(+++)	(-)
3	<i>C. neteri</i>	(+)	(+++)	(-)
4	<i>Enterobacter</i> spp.	(+)	(+++)	(+)
5	<i>Yersina</i> spp.(377191)	(++)	(+++)	(+)
6	<i>E. coli</i> (375472)	(+)	(+++)	(-)
7	<i>Proteus</i> spp.	(+)	(+++)	(-)
8	<i>L. adecarboxylata</i>	(++)	(+++)	(+)
9	<i>Yersinia</i> spp.(377348)	(+)	(+++)	(+)
10	<i>Klebsiella</i> spp.	(++)	(+++)	(+)

(-): existe una sensibilidad nula, (+): existe sensibilidad, (++): la cepa es muy sensible, (+++): la cepa es sumamente sensible.



**Figura 8:** Porcentaje de sensibilidad bacteriana, agrupada por tratamientos para cada uno de los aislamientos, de acuerdo a la escala de Duraffourd.

La concentración mínima inhibitoria varió desde los 62,5  $\mu\text{g/mL}$  hasta los 1000  $\mu\text{g/mL}$ , dependiendo de la cepa, con una media general de 193,75  $\mu\text{g/mL}$ , estos valores se obtuvieron al observar el cambio de color de los pocillos, donde el crecimiento bacteriano metabolizó la glucosa contenida en el medio provocando un cambio en el nivel de pH, de básico (rojo) hacia un nivel más ácido (amarillo) usando el rojo de fenol como indicador (36), gracias a esta característica, facilitó la obtención de los valores para la CMI (Tabla 3) (Figura 9) (Apéndice N° 19).



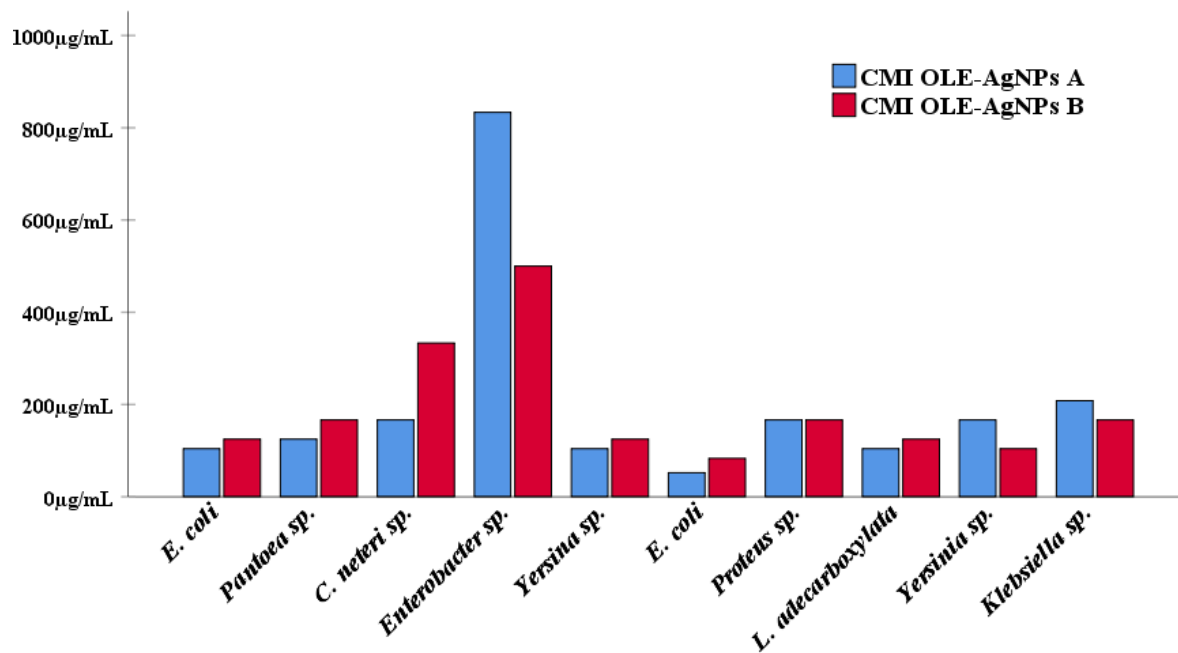
**Figura 9:** Efecto bactericida de las OLE-AgNPs sobre los aislamientos de enterobacterias resistentes a antimicrobianos, determinados mediante el cambio de color en el medio para encontrar la CMI.

Tabla 3. Valores promedio de la CMI encontradas para cada aislamiento.

Número	Aislamientos	Grupos de tratamiento en concentraciones	
		OLE-AgNPs A	OLE-AgNPs B
1	<i>E. coli</i> (376599)	125 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$
2	<i>Pantoea</i> spp.	125 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$
3	<i>C. neteri</i>	125 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$
4	<i>Enterobacter</i> spp.	1000 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$
5	<i>Yersinia</i> spp.(377191)	125 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$
6	<i>E. coli</i> (375472)	62,5 $\mu\text{g/mL}$	62,5 $\mu\text{g/mL}$
7	<i>Proteus</i> spp.	125 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$
8	<i>L. adecarboxylata</i>	125 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$
9	<i>Yersinia</i> spp.(377348)	125 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$
10	<i>Klebsiella</i> spp.	250 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$

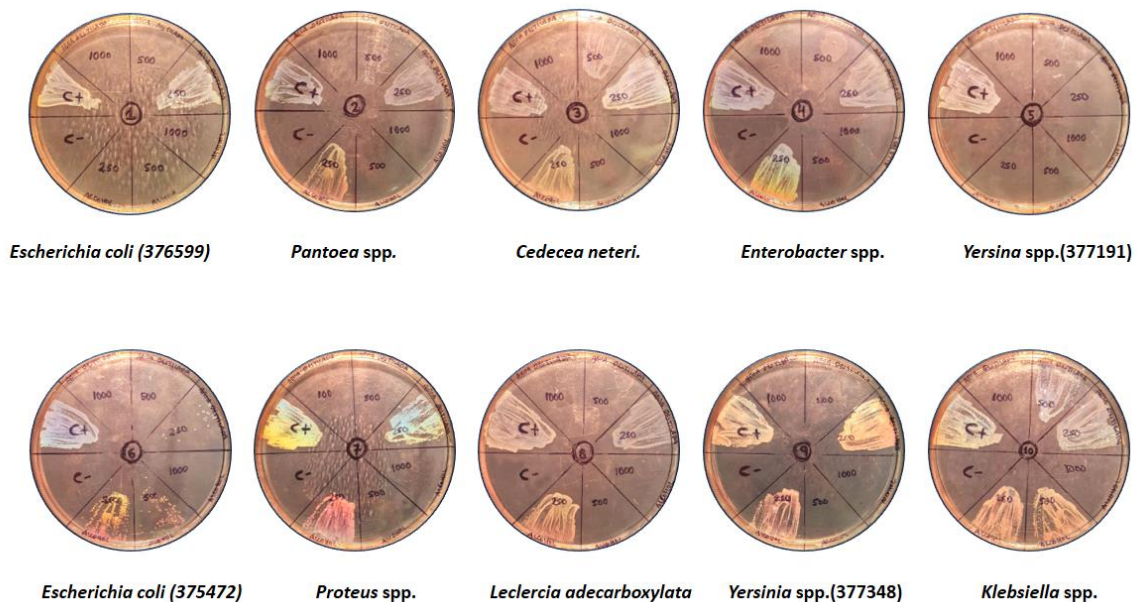


Se aplicó la prueba estadística de Mann-Whitney para determinar si existía diferencia significativa entre los valores promedio de las CMI entre los 2 grupos evaluados, la cual arrojó que no existía diferencia entre los grupos ( $p > 0,05$ ) (Apéndice N° 20), es decir todos los aislamientos presentaban valores similares para ambos tratamientos. Sin embargo, si existe diferencia respecto a la CMI entre los aislamientos (Figura 10).



**Figura 10:** Distribución de los valores de la CMI de las OLE-AgNPs para inhibir el crecimiento de los aislamientos bacterianos.

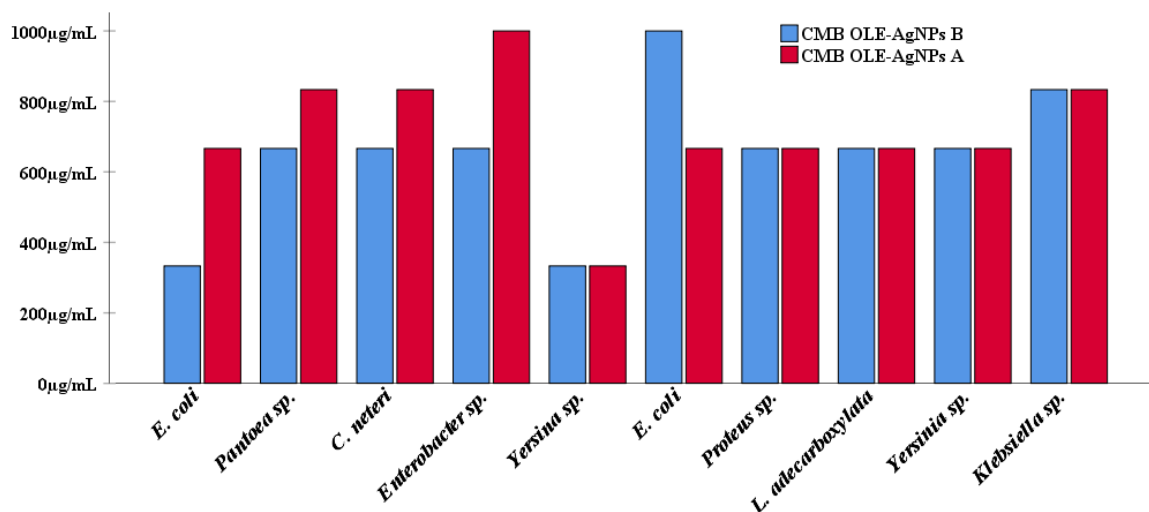
Cada placa fue dividida en 8 secciones y se tomó como la CMB al espacio inoculado donde no se observó crecimiento alguno (Figura 11), Los valores obtenidos para estos resultados variaron desde valores de 250 µg/mL hasta los 1000 µg/mL para ambos tratamientos (Tabla 4) (Apéndice N° 21), con una media de 612,5 µg/mL. Además, también se aplicó la prueba estadística de Mann-Whitney donde se logró determinar que no existe diferencia significativa entre los grupos de tratamiento, es decir las medias de los ensayos es similar en ambos tratamientos (Figura 12) (Apéndice N° 22).



**Figura 11:** Efecto bactericida de las OLE-AgNPs sobre los aislamientos de enterobacterias resistentes a antimicrobianos, determinados mediante la ausencia de crecimiento bacteriano para obtener el valor de la CMB.

Tabla 4. Valores promedio de la CMB encontrados para cada aislamiento.

Número	Aislamientos	Grupos de tratamiento en concentraciones	
		OLE-AgNPs A	OLE-AgNPs B
1	<i>E. coli</i> (376599)	500 µg/mL	250 µg/mL
2	<i>Pantoea</i> spp.	1000 µg/mL	500 µg/mL
3	<i>C. neteri</i>	1000 µg/mL	500 µg/mL
4	<i>Enterobacter</i> spp.	1000 µg/mL	500 µg/mL
5	<i>Yersina</i> spp.(377191)	250 µg/mL	250 µg/mL
6	<i>E. coli</i> (375472)	500 µg/mL	1000 µg/mL
7	<i>Proteus</i> spp.	500 µg/mL	500 µg/mL
8	<i>L. adecarboxylata</i>	500 µg/mL	500 µg/mL
9	<i>Yersinia</i> spp.(377348)	500 µg/mL	500 µg/mL
10	<i>Klebsiella</i> spp.	1000 µg/mL	1000 µg/mL



**Figura 12:** Promedio de la CMB de cada grupo de tratamiento para cada aislamiento.

## 4.2. Discusión

En cuanto a la solución coloidal, un factor importante a mencionar es el cambio de color en la solución, la síntesis de AgNPs mediante métodos coloidales ha sido objeto de extensa investigación y la variabilidad en los cambios de color de la solución coloidal es un fenómeno fascinante que puede ser suficiente para ser usado como un indicador de síntesis exitosa (91), el color inicial de la solución (aportado por el extracto) ya sea este verde (41,92), rojo (93), amarillo (43,45,94) o cualquier otro tono, todos reportan un cambio de color a marrón oscuro (Figura 1) (36,45,95). Estudios como el realizado por Cieśła *et al.*, han explorado la influencia de la morfología y tamaño de las nanopartículas, determinados por el método de síntesis en las propiedades ópticas y, por ende, en la apariencia visual de la solución coloidal (57). Estas contribuciones reflejan la complejidad del fenómeno y subrayan la importancia de elegir cuidadosamente el método de síntesis.

La resonancia del pico de plasmón superficial durante el proceso de síntesis se encontró a los 430 nm (Figura 2); sin embargo, cuando la solución coloidal fue enfriada las mediciones mostraron un movimiento del pico hacia la derecha a 435 nm, este desplazamiento podría deberse al fenómeno de coalescencia de las nanopartículas, es decir, que a medida que las nanopartículas aumentan su tamaño, la longitud de onda del RPS, relacionada con la luz

absorbida, se desplaza desde una zona de mayor energía (400 nm que correspondiente al color azul) hacia la zona visible del espectro electromagnético de longitudes de onda menor energía (800 nm que corresponden al color rojo) (96). Sin embargo, el desplazamiento del pico también podría estar relacionado a otros factores como la concentración de nanopartículas en la solución coloidal (87).

La ubicación del pico de RPS para las OLE-AgNPs, no se restringe a una longitud de onda específica, ya que dependiendo de las condiciones de síntesis los picos pueden ir en ubicaciones desde los 396 nm (57) hasta los 435 nm (29), obteniéndose nanopartículas de diferente tamaño. Algunos investigadores afirman que la relación en la ubicación del pico de RSP está directamente relacionada al tamaño de la nanopartícula, es decir un pico presente a menores longitudes de onda el tamaño de la nanopartícula también será menor, rigiéndonos bajo esta teoría, el pico presente a 435 nm (Figura 3) representaría que las nanopartículas obtenidas en este trabajo tendrían un tamaño promedio de 60 nm (97,98); sin embargo, esto aplicaría a nanopartículas sintetizadas químicamente y bajo ciertas condiciones, ya que para AgNPs sintetizadas usando extractos vegetales el tamaño promedio puede ser de  $8 \pm 1$  nm y el pico de RPS puede estar ubicado a 410 nm (28) o 433 nm (58), por lo que la ubicación del pico y el tamaño promedio de las nanopartículas sintetizadas por este método no están relacionados, su ubicación depende también de otros factores como la forma, ya que para nanopartículas de forma esférica el pico de RPS está ubicado alrededor de los 430 nm, mientras que para la forma hexagonal presentan 2 picos, uno a 416 nm y el otro 650 nm y las AgNPs de forma triangular presentan picos a 600 nm (14). Por lo que para determinar el tamaño promedio debe apoyarse de otras técnicas de caracterización como la de difracción de rayos X.

La naturaleza cristalina de las OLE-AgNPs se confirmó mediante el análisis del patrón de difracción de rayos X (Figura 4). El proceso de indexación del patrón de difracción obtenido se llevó a cabo, y se asignaron índices de Miller (hkl) a cada pico correspondiente a estas nanopartículas. El patrón de difracción de rayos X mostró la presencia de picos intensos en valores de  $2\theta$  a 38,10; 44,02; 64,45 y 77,07; que representan las reflexiones de planos de

red (111), (200), (220) y (311) respectivamente de una estructura de red cúbica centrada en las caras de la plata (99). Estos ángulos de difracción fueron comparados con la tarjeta de difracción de polvo estándar del Comité Conjunto de Normas de Difracción de Polvo (JCPDS) con el número de archivo 04-0783 correspondiente a la plata (Anexo N° 2), y se encontró que estos coincidían. El análisis de difracción de rayos X confirmó la formación de AgNPs con estructura cúbica centrada en las caras. El tamaño medio de las AgNPs se calculó utilizando la ecuación de Debye-Scherrer donde se encontró que el tamaño de cristalito de las OLE-AgNPs fue de 8,25 nm. Un tamaño bastante pequeño comparado con otras investigaciones donde se obtuvieron tamaños de 36 nm (100,101), 19 nm (102) y 13 nm (103).

Además de los picos de Bragg representativos pertenecientes a los nanocristales de plata, también se observaron picos adicionales indicados con “\*” en la figura 4 se hacen presentes en otras investigaciones, donde la síntesis se realizó con compuestos orgánicos. Algunos reportes afirman que se debe a la presencia de cristales de cloruro de plata (AgCl) (88,90), mientras que otros asocian estos picos al óxido de plata (Ag<sub>2</sub>O) (104); sin embargo, el hecho es que estos picos aparecen cuando en la síntesis se utilizaron compuestos orgánicos como el quitosano (89), flavonoides (105), sobrenadante de biofilm de bacterias (90), extractos vegetales (59), entre otros, Pero reportes más consistentes sugieren que se debe a la cristalización de la fase biorgánica de los compuestos presentes del extracto en la superficie de las nanopartículas que cumplen la función de reducirlas y estabilizarlas (102,106,107). Resultados similares se obtuvieron en AgNPs sintetizadas utilizando extracto de hojas de olivo (22).

Las AgNPs son conocidas como las sustancias antimicrobianas más universales debido a su fuerte efecto biocida contra los microorganismos, En este estudio, se probó la aplicación de las OLE-AgNPs como agente antimicrobiano contra 10 aislamientos de enterobacterias resistentes a 2 o más antimicrobianos, en placa de agar y medio líquido. El ensayo de difusión en disco permitió evaluar la efectividad bactericida de las nanopartículas sobre las bacterias utilizadas, midiendo su sensibilidad de acuerdo al diámetro de los halos de

inhibición, es así que los diámetros más grandes se obtuvieron del grupo control positivo (G2), discos con 20  $\mu$ L del antimicrobiano Imipenem, uno de los antimicrobianos de última generación más utilizados por su efectividad contra este tipo de bacterias (108), con un promedio de diámetro de  $33,4 \pm 5,4$  mm; seguido del grupo número 4 (G4) discos con 20  $\mu$ L de OLE-AgNPs dispersas en alcohol, los diámetros alcanzaron una media de  $23,78 \pm 2,95$  mm, estos valores pueden ser comparados con lo obtenido por Bassam *et al.*, donde encontraron una media de  $23,3 \pm 4,3$  mm, sobre 6 aislamientos bacterianos MDR, ellos utilizaron discos cargados con 50  $\mu$ g de OLE-AgNPs (30).

Un resultado similar fue obtenido utilizando AgNPs sintetizadas con extracto de *Aloe vera*, alcanzando una media de 24,6 mm sobre *P. aeruginosa*. Los valores de este grupo son casi el doble obtenidos por el G3, donde los discos se cargaron con 20  $\mu$ L de OLE-AgNPs dispersas en agua, obteniendo halos de inhibición de  $13,32 \pm 2,02$  mm, valores similares fueron obtenidos en otra investigación también con OLE-AgNPs con diámetros ZOI entre  $12 \pm 1,0$  mm sobre *E. coli* (29), además, también se reportó AgNPs sintetizadas con compuestos orgánicos como licopeno de tomate (93), extractos de hojas de té pu-erh (109), extracto de *Maclura pomífera* (110), donde se obtuvieron halos de inhibición de  $12 \pm 0,38$  mm,  $12,5 \pm 2,5$  mm,  $13,2 \pm 0,2$  mm, respectivamente sobre *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *E. coli*. El tamaño de los halos varían dependiendo de la sensibilidad de los aislamientos, de la concentración de las nanopartículas utilizadas (110), entre otros factores. Por otro lado, nanopartículas sintetizadas con extracto de *Coleus aromaticus* obtuvieron halos de 10 mm sobre *B. subtilis* y *Klebsiella planticola* (101). Valores similares a los obtenidos por el G5, discos cargados con 20  $\mu$ L alcohol, con una media de  $8,18 \pm 1,10$  mm, un valor que es categorizado como sensible en la escala de Duraffourd.

Los diámetros ZOI con mayor tamaño para los grupos de tratamiento fue del grupo G4 con una media de 23,8 mm; casi el doble del tamaño en comparación con los diámetros ZOI del G3 con una media de 13,1 mm; esta diferencia podría explicarse debido al fenómeno de tensión superficial (111), el alcohol al presentar un coeficiente de tensión superficial menor al del agua (112), logró alcanzar un mayor radio de desplazamiento, llevándose consigo

nanopartículas que cubrieron una mayor área de superficie, obteniéndose así diámetros de inhibición mucho más grandes que los del G3, mientras que, para el G5 el alcohol también cubrió áreas de desplazamiento similares a los del G4; sin embargo, los halos del G5 fueron más pequeños debido al crecimiento de colonias resistentes (Figura 6), este fenómeno se observó en todos los aislamientos evaluados, por lo que los diámetros de ZOI fueron mucho más pequeños, con una media de 8,2 mm, lo que demostró que las OLE-AgNPs presentes en el alcohol del G4 son las principales responsables de la inhibición del crecimiento bacteriano.

Los diámetros ZOI obtenidos por los 3 grupos experimentales de tratamientos (G3-G5) fueron categorizados utilizando la escala de Duraffourd, se encontró que, la valoración cualitativa de sensibilidad evidenció que el 100 % de las bacterias tratadas con el G4 presentaron excelente actividad, al ser los aislamientos sumamente sensibles a las OLE-AgNPs dispersas en alcohol, mientras que para el tercer grupo (G3) el 60 % presentaron una baja sensibilidad, y que el otro 40 % presentaron una sensibilidad media. Para el quinto grupo (G5) el 60 % de los aislamientos presentó una baja sensibilidad, mientras que el otro 40% presentaron una sensibilidad nula, es decir los aislamientos presentaron una baja sensibilidad al alcohol. Es decir, al comparar la sensibilidad de los 3 grupos experimentales, los 2 grupos con nanopartículas, los aislamientos presentaron sensibilidad, por ende, se podría concluir que las OLE-AgNPs son efectivas contra este tipo de bacterias resistentes. Un resultado similar se obtuvo en un trabajo donde se evaluaron la actividad de las AgNPs sobre *S. mutans* (74).

Las pruebas estadística de Kruskal-Wallis y Chi-cuadrado aplicadas a los datos obtenidos determinaron que hubo diferencias significativas entre el nivel de sensibilidad y el grupo de tratamiento utilizado, los gráficos estadísticos corroboran este hecho, donde se evidenció un mejor efecto bactericida cuando las nanopartículas fueron dispersadas en alcohol, este hecho se podría explicar al estar las AgNPs recubiertas por compuestos orgánicos, hace que se dispersen mejor en un solvente orgánico como el alcohol (113); Además que, la tensión superficial del alcohol al ser menor que la del agua, permitió que los discos del G4 y G5

embebidos con OLE-AgNPs y alcohol respectivamente tuvieran un mayor alcance, logrando expandir las nanopartículas del G4 en una mayor área respecto a los discos del G3 (Figura 6).

Se utilizó el rojo de fenol en el estudio como indicador en la determinación del crecimiento celular gracias a la capacidad de las enterobacterias de metabolizar la glucosa y generar ácidos que aumentan la concentración del pH que hace variar el color del medio (36). Gracias a esta característica se pudo obtener la CMI para este grupo bacteriano, los datos obtenidos para este ensayo, mostraron valores de concentración parecidos a los resultados obtenidos para otros ensayos aplicados contra bacterias resistentes a antimicrobianos, el valor mínimo obtenido en este trabajo fue de 62,5 µg/mL y un máximo de 1000 µg/mL, con una media de 218,75 µg/mL para el grupo OLE-AgNPs A (nanopartículas dispersas en agua), y 168,75 µg/mL para el grupo OLE-AgNPs B (nanopartículas dispersas en alcohol).

Valores cercanos a los encontrados por el estudio realizado por Abeer *et al.*, donde sintetizaron AgNPs utilizando el sobrenadante de un cultivo microbiano de *P. aeruginosa*, en sus resultados obtuvieron una CMI de 1000 µg/mL sobre bacterias MDR de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, y *A. baumannii* (114). Además, Samir *et al.*, lograron sintetizar biológicamente AgNPs usando una cianobacteria (*Desertifilum IPPAS B-1220*) y aplicaron estas NPs sobre *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. mutans*, *K. pneumoniae* y MRSA obteniendo CMI de 1200, 900, 900, 1200, 1200 µg/mL, respectivamente (115). Estos valores de CMI son bastante elevados comparados con los resultados obtenidos por otras investigaciones, Por ejemplo, Panpaliya *et al.*, obtuvieron valores 90, 60, 45, 15 y 3 µg/mL, donde utilizaron AgNPs comerciales y las aplicaron sobre *L. fermentum*, *S. mutans*, *S. oralis*, *L. acidophilus*, *C. albicans* respectivamente. También, Liao *et al.*, sintetizaron AgNPs por método químico y las aplicaron sobre *P. aeruginosa* resistente a múltiples fármacos, ellos obtuvieron una media de CMI de  $2,3 \pm 1,5$  µg/mL, reportando que la concentración del inóculo bacteriano juega un papel importante, a mayor concentración del inóculo, los valores de concentración mínima inhibitoria también aumenta (116).



De igual manera, los valores obtenidos para la CMB variaron desde los 250  $\mu\text{g/mL}$  hasta los 1000  $\mu\text{g/mL}$  para ambos grupos trabajados, con una media de 675  $\mu\text{g/mL}$  para el grupo OLE-AgNPs A y 550  $\mu\text{g/mL}$  para el grupo OLE-AgNPs B. Valores similares fueron reportados por Abidin *et al.*, que utilizaron extracto de manzana para sintetizar AgNPs, ellos obtuvieron valores de CMB de 125, 500, 1000 y 1000  $\mu\text{g/mL}$  sobre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) respectivamente (117). Valores mucho más bajos que los obtenidos por Samir *et al.*, quienes obtuvieron concentraciones de 1500, 1200, 1500, 1500,1500  $\mu\text{g/mL}$  sobre *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. mutans*, *K. pneumoniae* y MRSA respectivamente (115). El trabajo de Abeer *et al.*, también reportaron resultados similares con una CMI de 1500  $\mu\text{g/mL}$  sobre bacterias MDR de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, y *A. baumannii* (114). Además, Peña-Juárez *et al.*, también obtuvieron valores de CMB de 1000  $\mu\text{g/mL}$  (118). Estos datos obtenidos tanto por el ensayo de CMI y CMB revelarían que la variedad de valores obtenidos dependería de factores como, agente reductor (químico, físico o biológico) utilizado para la síntesis, el método de síntesis utilizado, tamaño de las nanopartículas obtenidas, concentración de las AgNPs, susceptibilidad de la cepa, tipo de cepa utilizada, entre otros.

Todos los datos obtenidos por los 3 ensayos fueron procesados mediante el software estadístico IBM SPSS versión 25, los resultados obtenidos por el ensayo de difusión con disco mostraron que existía una diferencia significativa entre los 3 diferentes grupos utilizados, mientras que los resultados obtenidos por la CMI y la CMB no existía diferencias estadísticas para el grupo de nanopartículas dispersa en agua y el grupo de nanopartículas dispersas en alcohol.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

- El tiempo óptimo para síntesis de las AgNPs fue a los 80 minutos, una temperatura de 70° C, una agitación constante de 4 000 rpm y una proporción de 1:3 extracto acuoso: AgNO<sub>3</sub> respectivamente.
- La caracterización UV-Vis logro determinar la síntesis de AgNPs con un pico de resonancia de plasmón superficial a los 435 nm, además, la caracterización mediante XDR reveló que los picos encontrados en la muestra coincidían con los índices de Miller en los ángulos asignados para la plata, confirmando la presencia de AgNPs en la muestra, también con los datos obtenidos se calculó un tamaño de cristalito de 8,25 nm.
- Las nanopartículas de plata presentaron una efectividad significativa sobre las enterobacterias resistentes a antimicrobianos utilizadas, especialmente AgNPs dispersas en alcohol; donde, todos los aislamientos presentaron una alta sensibilidad, con una media de diámetro ZOI de 23,78 mm, mientras que para las AgNPs dispersas en agua, los aislamientos presentaron una sensibilidad baja con una media de 13,32 mm, las pruebas estadísticas revelaron la existencia de diferencias significativas entre los grupos de tratamiento, así lo confirmaron los datos obtenidos mediante la escala de Duraffourd.
- También se determinaron los valores de la CMI y la CMB con valores promedio 193,75 µg/mL y 612,5 µg/mL respectivamente, donde las pruebas estadísticas revelaron que no existieron diferencias significativas en los valores de los tratamientos.

## 5.2. Recomendaciones

- Utilizar pruebas adicionales de caracterización como TEM, SEM, DLS, FTIR, para obtener más datos sobre las AgNPs sintetizadas.
- Utilizar un disolvente con un coeficiente de tensión superficial menor al del agua que no presente efecto bactericida.
- Aplicar las nanopartículas de plata sintetizadas sobre otro tipo de bacterias.

## LISTA DE REFERENCIAS

1. Lawrence A. Colloidal dispersions. Vol. 171, Nature. 1953. 142 p.
2. Bitwell C, Indra S Sen, Luke C, Kakoma MK. A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. *Sci African* [Internet]. 2023;19:e01585. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01585>
3. Delgoda R, Murray J. Evolutionary perspectives on the role of plant secondary metabolites [Internet]. *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy*. Elsevier Inc.; 2017. 93–100 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00007-X>
4. Stefani F. Resonancia por plasmones superficiales [Internet]. 2016. p. 2–3. Available from: [https://www.ucm.es/data/cont/media/www/pag-17833/Resonancia\\_por\\_plasmones\\_superficiales.pdf](https://www.ucm.es/data/cont/media/www/pag-17833/Resonancia_por_plasmones_superficiales.pdf)
5. Camou T, Zunino P, Hortal M. Alarma por la resistencia a antimicrobianos: situación actual y desafíos. *Rev Medica Del Uruguay*. 2017;33(4):277–84.
6. Giono-Cerezo S, Santos-Preciado J, Morfín-Otero M, Torres-López F, Alcántar-Curiel M. Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gac Med Mex*. 2020;156(2):172–80.
7. Joakim L, Carl-Fredrik F. Antibiotic resistance in the environment. *Nat Rev Microbiol*. 2022;20(5):257–69.
8. Rivera-Jacinto M, Rodríguez-Ulloa C, Huayán-Dávila G, Mercado-Martínez P.

- Susceptibilidad a betalactámicos y resistencia por betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en Enterobacteriaceae aisladas de reservorios ambientales de un hospital general en Cajamarca, Perú. *Rev Medica Hered.* 2011;22(2):69–75.
9. Moreno C, González R, Beltrán C. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello.* 2009;69(2):185–92.
  10. Rong F, Sun Y, Li X, Zhang C. Retracted: Drug Resistance Mechanism of Enterobacteriaceae with Decreased Antibiotic Sensitivity. *Appl Bionics Biomech.* 2023;2023:1–1.
  11. Qing Y, Cheng L, Li R, Liu G, Zhang Y, Tang X, et al. Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *Int J Nanomedicine.* 2018;13:3311–27.
  12. Chouhan N. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Applications. *Intech [Internet].* 2018;34(8):22–56. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12559-021-09926-6><https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics><http://dx.doi.org/10.1016/j.compmedimag.2010.07.003>
  13. Prasher P, Singh M, Mudila H. Silver nanoparticles as antimicrobial therapeutics: current perspectives and future challenges. *3 Biotech [Internet].* 2018;8(10):1–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-018-1436-3>
  14. Sánchez B. Estudio de los factores que afectan a la actividad bactericida de las AgNPs. 2020.
  15. Naganthran A, Verasoundarapandian G, Khalid F, Masarudin M, Zulkharnain A, Nawawi N, et al. Synthesis, Characterization and Biomedical Application of Silver Nanoparticles. *Materials (Basel).* 2022;15(2):1–43.
  16. Vijayaraghavan K, Ashokkumar T. Plant-mediated biosynthesis of metallic nanoparticles: A review of literature, factors affecting synthesis, characterization techniques and applications. *J Environ Chem Eng [Internet].* 2017;5(5):4866–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2017.09.026>
  17. Vanlalveni C, Lallianrawna S, Biswas A, Selvaraj M, Changmai B, Rokhum S. Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts and their antimicrobial activities:

- a review of recent literature. *RSC Adv.* 2021;11(5):2804–37.
18. Borjan D, Leitgeb M, Knez Ž, Hrnčič M. Microbiological and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in Olive Leaf Extract. *Molecules.* 2020;25(24).
  19. López M. El olivo. *Offarm.* 2006;25(11):1–6.
  20. Santos-Espinoza A, Gutiérrez-Miceli F, Ruíz-Valdiviezo V, Montes-Molina J. El papel de los compuestos polifenólicos en la síntesis verde de nanopartículas metálicas. *Inst Tecnológico Tuxtla Gutiérrez [Internet].* 2020;24(2):57. Available from: <https://smbb.mx/wp-content/uploads/2020/08/7-Santos-Espinoza-et-al-2020.pdf>
  21. Xi-Feng Z, Zhi-Guo L, Wei S, Sangiliyandi G. Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *Int J Mol Sci.* 2016;17(9).
  22. Khalil M, Ismail E, El-Baghdady K, Mohamed D. Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity. *Arab J Chem [Internet].* 2014;7(6):1131–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.007>
  23. González A. Síntesis y caracterización de nanopartículas metálicas obtenidas a partir de miel. *Análisis químico computacional.* 2010.
  24. Rashidipour M, Heydari R. Biosynthesis of silver nanoparticles using extract of olive leaf: synthesis and in vitro cytotoxic effect on MCF-7 cells. *J Nanostructure Chem.* 2014;4(3):112.
  25. Ramazanli V, Ahmadov I. Synthesis of silver nanoparticles by using extract of olive leaves. *Adv Biol Earth Sci [Internet].* 2022;7(3):238–44. Available from: <https://www.britannica.com/plant/olive-plant>
  26. Ramazanli V. Effect of pH and temperature on the synthesis of silver nano particles extracted from olive leaf. *Adv Biol Earth Sci.* 2021;6(2):169–73.
  27. Alhajri H, Al -Qahtani W, Soliman S, Terary R, Bahauddeen M, Alrfaei R. Synthesis of olive leaf extract silver nanoparticles. Vol. 1. US 10,702,550 B1, 2020. p. 12.
  28. Sellami H, Khan S, Ahmad I, Alarfaj A, Hirad A, Al-Sabri A. Green synthesis of silver nanoparticles using olea europaea leaf extract for their enhanced antibacterial, antioxidant, cytotoxic and biocompatibility applications. *Int J Mol Sci.* 2021;22(22).

29. Halob A, Gatea I, Khalaf M, Sabar A. Biopreparation for antimicrobial material from mixture of nano silver and olive leaves extract. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng.* 2020;928(6).
30. Alowaiesh B, Alhaithloul H, Saad A, Hassanin A. Green Biogenic of Silver Nanoparticles Using Polyphenolic Extract of Olive Leaf Wastes with Focus on Their Anticancer and Antimicrobial Activities. *Plants.* 2023;12(6).
31. Slavin Y, Asnis J, Häfeli U, Bach H. Metal nanoparticles: Understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J Nanobiotechnology.* 2017;15(1):1–20.
32. Lárez-Velásquez C, Koteich-Khatib S, López-González F. Quitosano y nanopartículas. In: *Nanotecnología: fundamentos y aplicaciones.* 2015. p. 203–22.
33. Nosál' E, Reinprecht L. Preparation and application of silver and zinc oxide nanoparticles in wood industry: The review. *Acta Fac Xylogiae.* 2018;60(2):5–24.
34. Chengzhu L, Yuchao L, Sie T. Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 2019;20:449.
35. García-Contreras A, Castañeda-Facio A. Obtención de Nanopartículas Metálicas Empleando Metodologías. 2020;(24):10–2.
36. Kundu S, Ashraf A, Habib A. Synthesis of Benign Silver Nanoparticles To Enhance Antibacterial Activity of *Azadirachta Indica*. *Int J Agric Environ Bioresearch.* 2019;04(06):122–38.
37. Urnukhsaikhan E, Bum-Erdene B, Gunbileg A, Sukhbaatar N, Mishig-Ochir T. Antibacterial activity and characteristics of silver nanoparticles biosynthesized from *Carduus crispus*. *Sci Rep [Internet].* 2021;11(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00520-2>
38. González-Pedroza M, Benítez AR, Navarro-Marchal S, Martínez-Martínez E, Marchal J, Boulaiz H, et al. Biogeneration of silver nanoparticles from *Cuphea procumbens* for biomedical and environmental applications. *Sci Rep [Internet].* 2023;13(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26818-3>
39. Partha D, Bordoloi M, Gogoi K, Roy S, Narzary B, Bhattacharyya D, et al. Antimalarial silver and gold nanoparticles: Green synthesis, characterization and in vitro study. *Biomed Pharmacother [Internet].* 2017;91:567–80. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.032>
40. Laime L. Diseño y modelamiento matemático para la síntesis verde de nanopartículas de plata a partir de la *Lepechinia meyenii*, aplicando la metodología superficie respuesta. 2022.
  41. Moreno C, Yanchapanta E, Alvarez D, Dávalos R. Síntesis verde de nanopartículas de plata como agente bactericida para el tratamiento de aguas residuales de tipo doméstico. *Rev Cient dominio las ciencias*. 2022;8:1332–52.
  42. Tippayawat P, Phromviyo N, Boueroy P, Chompoosor A. Green synthesis of silver nanoparticles in aloe vera plant extract prepared by a hydrothermal method and their synergistic antibacterial activity. *PeerJ*. 2016;2016(10):1–15.
  43. Ahmed M., Murtaza G, Mehmood A, Bhatti T. Green synthesis of silver nanoparticles using leaves extract of *Skimmia laureola*: Characterization and antibacterial activity. *Mater Lett* [Internet]. 2015;153:10–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2015.03.143>
  44. Arshad H, Sami M, Sadaf S, Hassan U. *Salvadora persica* mediated synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial efficacy. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85584-w>
  45. Rodríguez-Leon E, Iñiguez-Palomares R, Navarro R, Herrera-Urbina R, Tánori J, Iñiguez-Palomares C, et al. Synthesis of silver nanoparticles using reducing agents obtained from natural sources (*Rumex hymenosepalus* extracts). *Nanoscale Res Lett*. 2013;8(1):1–9.
  46. Ilieva G. Hoja de olivo : Interés Farmacológico y patentes de sus principios activos. 2019.
  47. Genc N, Yildiz I, Chaoui R, Erenler R, Temiz C, Elmastas M. Biosynthesis, characterization and antioxidant activity of oleuropein-mediated silver nanoparticles. *Inorg Nano-Metal Chem* [Internet]. 2020;0(0):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1080/24701556.2020.1792495>
  48. Basurto A. Relación entre polifenoles y actividad antibacteriana (contra fitopatógenos ) de extractos polares en *Rubus spp.* , silvestres y en invernadero. 2018.
  49. Banifatemi S, Davar F, Aghabarari B, Segura J, Alonso F, Ghoreishi S. Green

- synthesis of  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles using olive leaf extract and characterization of their magnetic properties. *Ceram Int* [Internet]. 2021;47(13):19198–204. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.03.267>
50. Boudouh D, Ikram R, Jan B, Metselaar H, Hamana D, Kenanakis G. Synthesis, characterization and filtration properties of ecofriendly  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles derived from olive leaves extract. *Materials (Basel)*. 2021;14(15).
  51. Boudouh D, Hamana D, Metselaar S, Achour S, Chetibi L, Akhiani A. Low-temperature green route synthesis of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -C nanocomposite using Olive Leaves Extract. *Mater Sci Eng B* [Internet]. 2021;271(May):115276. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2021.115276>
  52. Mohammed S, Rheima A, Aljaafari F, Al-Marjani M, Abbas Z. Green-synthesis of Platinum Nanoparticles using Olive Leaves Extracts and its Effect on Aspartate Aminotransferase Activity. *Egypt J Chem*. 2022;65(4):377–82.
  53. Al-Ghareebawi A, Al-Okaily B, Ibrahim O. Characterization of zinc oxide nanoparticles synthesized by *Olea europaea* leaves extract. 2020;52(3):580–8.
  54. Ogunyemi S, Abdallah Y, Zhang M, Fouad H, Hong X, Ibrahim E, et al. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using different plant extracts and their antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol* [Internet]. 2019;47(1):341–52. Available from: <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1557671>
  55. Al-Ameer E, Edan R. Synthesis of zno nanoparticles from olive plant extract. *Plant Arch*. 2019;19(January):339–44.
  56. Muzzalupo I, Badolati G, Chiappetta A, Picci N, Muzzalupo R. In vitro Antifungal Activity of Olive (*Olea europaea*) Leaf Extracts Loaded in Chitosan Nanoparticles. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8(March):1–10.
  57. Al-taee E. Effect of Silver Nanoparticles Synthesized Using Leaves Extract of Olive on Histopathological and Cytogenetic Effects in Albino Mice. *Iraqi J Agric Sci*. 2020;51(5):1448–57.
  58. Nuri M, Baran A, Baran M, Keskin C, Aktepe N, Yavuz Ö, et al. Economic fast synthesis of olive leaf extract and silver nanoparticles and biomedical applications.



- Part Sci Technol. 2022;40(5):589–97.
59. Mohammed H, Salih S, Alterary S, Alqathama A, Abdalla A, Alzhrani R, et al. Olive Leaf Extracts for a Green Synthesis of Silver-Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes. *J Funct Biomater*. 2022;13(4).
  60. Mohamed S. Synthesis, characterization, and applications of silver nanoparticles. *Pharmacologyonline*. 2021;3:2040–5.
  61. Daza R. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sist Nac Salud* [Internet]. 1998;22(3):57–67. Available from: <http://www.msc.es/fr/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>
  62. Vazquez-Muñoz R, Meza-Villezcás A, Fournier P, Soria-Castro E, Juárez-Moreno K, Gallego-Hernández A, et al. Enhancement of antibiotics antimicrobial activity due to the silver nanoparticles impact on the cell membrane. *PLoS One*. 2019;14(11):1–18.
  63. Del Rocío M, Ávila L, Arroyo O. Las nanopartículas de plata: Mecanismos de entrada, toxicidad y estrés oxidativo. *Rev Educ Bioquímica*. 2017;36(2):39–54.
  64. Wang L, Hu C, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:1227–49.
  65. Rai M, Deshmukh S, Ingle A, Gade A. Silver nanoparticles : the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J Appl Microbiol*. 2012;112:841–52.
  66. Olufunto T, Oluwatobi S. Bactericidal antibacterial mechanism of plant synthesized silver, gold and bimetallic nanoparticles. Vol. 12, *Pharmaceutics*. 2020. p. 1–20.
  67. Loiseau A, Asila V, Boitel G, Lam M, Salmain M, Boujday S. Silver-Based Plasmonic Nanoparticles for and Their Use in Biosensing. *Biosensors* [Internet]. 2019;9:78. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6627098/pdf/biosensors-09-00078.pdf>
  68. Leguizamón M, Samudio M, Aguilar G. Sensibilidad antimicrobiana de enterobacterias aisladas en infecciones urinarias de pacientes ambulatorios y hospitalizados del Hospital Central del IPS. *Memorias del Inst Investig en Ciencias la Salud*. 2017;15(3):41–9.

69. Oromí J. Resistencia bacteriana a Los antibioticos. *Med Integr.* 2000;81(10):367–9.
70. Quiñones D. Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque “Una salud.” *Rev Cubana Med Trop.* 2017;69(3):1–17.
71. Chávez-Jacobo V. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: Un problema de salud pública sin ESKAPE. *Milen Cienc y Arte.* 2020;9(15):6–8.
72. Calderón G, Aguilar L. Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Rev médica Costa Rica y Centroamérica LXXIII.* 2016;(621):757–63.
73. Huemer M, Mairpady S, Brugger S, Annelies S. Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Rep.* 2020;21(12):1–24.
74. Guevara L, Bonilla P, Caicedo M. Actividad antimicrobiana de adhesivo ortodóntico con nanopartículas de plata sobre *Streptococcus mutans*. *Odontol (Habana).* 2020;(August).
75. Ramirez L. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Sci Tech.* 2009;(42):263–8.
76. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda S. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal [Internet].* 2016;6(2):71–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
77. Picazo J. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Hum Vet Med.* 2000;4(2):76–81.
78. Kim J, Kang S, Kim B, Park J. Coalescence dynamics of platinum group metal nanoparticles revealed by liquid-phase transmission electron microscopy. *Isc* 25. 2022;
79. Sahayaraj K, Balasubramanyam G, Chavali M. Green synthesis of silver nanoparticles using dry leaf aqueous extract of *Pongamia glabra* Vent ( Fab .), Characterization and phytofungicidal activity. *Environ Nanotechnology, Monit Manag [Internet].* 2020;14(July):100349. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100349>
80. Djadjiti N, Moubarak A, Onyemata E, Senol D. Antimicrobial Activities of *Moringa oleifera* and *Psidium guajava* against Bacterial and Fungal Strains. 2022;12:10–3.

81. P A. Quimicayalgomas.com. 2020 [cited 2023 Dec 14]. Como calcular la Molaridad con la densidad y el porcentaje – Química y algo más. Available from: <https://quimicayalgomas.com/quimica-general/como-calcular-la-molaridad-con-la-densidad-y-el-porcentaje/>
82. Ibrahim O. Antibacterial activity of biosynthesized silver nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Iraqi J Vet Med*. 2018;41(1):60.65.
83. Wang J, Li Z, Jia Y, Wang B, Xu Z. Molecular dynamics simulation of effect of temperature on Cu nanoparticles agglomeration of nanofluids. *J Nanoparticle Res* [Internet]. 2021;23(1):28. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11051-020-05131-y>
84. Arthur B, Willam C, Harriette N, Reller B, Sanders C, Swenson J. M26-A Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute [Internet]. 1999;19(September):1–14. Available from: [www.clsi.org](http://www.clsi.org).
85. Condalab. Base de caldo rojo fenol [Internet]. Vol. Cat. 1115. 2019. p. 1–2. Available from: <https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/168-15123-base-de-caldo-rojo-fenol.html>
86. Gil M. Lifeder. 2023 [cited 2023 Dec 14]. Rojo de fenol: qué es, características, preparación, aplicaciones, toxicidad. Available from: <https://www.lifeder.com/rojo-fenol/>
87. Chhatre A, Solasa P, Sakle S, Thaokar R, Mehra A. Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects Color and surface plasmon effects in nanoparticle systems : Case of silver nanoparticles prepared by microemulsion route. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* [Internet]. 2012;404:83–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.04.016>
88. Aguilar N, Arteaga-Cardona F, Estévez J, Silva-González N, Benítez-Serrano J, Salazar-Kuri U. Controlled biosynthesis of silver nanoparticles using sugar industry waste, and its antimicrobial activity. *J Environ Chem Eng* [Internet]. 2018;6(5):6275–81. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.09.056>
89. Cavassin E, Figueiredo L, Otoch J, Seckler M, Oliveira R, Franco F, et al. Comparison

- of methods to detect the in vitro activity of silver nanoparticles (AgNP) against multidrug resistant bacteria. *J Nanobiotechnology*. 2015;13(1):1–16.
90. Xia F, Tao X, Wang H, Shui J, Min C, Xia Y, et al. Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using the Biofilm Supernatant of *Pseudomonas aeruginosa* PA75 and Evaluation of Their Antibacterial, Antibiofilm, and Antitumor Activities. *Int J Nanomedicine*. 2023;18(May):2485–502.
  91. Martinez F, Zuñiga E, Lafarga A. Método de síntesis de nanopartículas de plata adaptable a laboratorios de docencia relacionado con la nanotecnología. *Mundo Nano Rev Interdiscip en Nanociencias y Nanotecnología*. 2013;6(10):101–8.
  92. Basem A, Enas A. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using the Lotus lalambensis Aqueous Leaf Extract and Their Anti-Candidal Activity against Oral Candidiasis. *ACS Omega*. 2021;6(12):8151–62.
  93. Kiran P, Dheeraj S, Somnath D, Mangesh A, Sachin S, Anjum S, et al. Green synthesis of silver, iron and gold nanoparticles of lycopene extracted from tomato: their characterization and cytotoxicity against COLO320DM, HT29 and Hella cell. *J Mater Sci Mater Med* [Internet]. 2021;32(2). Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-021-06489-8>
  94. Khan S, Shahid S, Chung-Sing L. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using leaf extract of clerodendrum inerme; characterization, antimicrobial, and antioxidant activities. *Biomolecules*. 2020;10(6).
  95. Nagaonkar D, Rai M. Sequentially reduced biogenic silver-gold nanoparticles with enhanced antimicrobial potential over silver and gold monometallic nanoparticles. *Adv Mater Lett*. 2015;6(4):334–41.
  96. Cornejo L. Nuevas tecnologías y materiales. 2019 [cited 2023 Dec 7]. p. 1–11 Resonancia del plasmón de la superficie (RPS). Available from: <https://nuevatecnologiasymateriales.com/resonancia-del-plasmon-de-la-superficie-rps-propiedades-optoelectronicas/>
  97. Paramelle D, Sadovoy A, Gorelik S, Free P, Hobley J, Fernig D. Rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. *Analyst* [Internet]. 2014;139(19):4855–61. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1039/C4AN00978A>

98. nanoComposix. Silver Nanoparticles: Optical Properties – nanoComposix [Internet]. 2019 [cited 2023 Dec 7]. p. 0–2. Available from: <https://nanocomposix.com/pages/silver-nanoparticles-optical-properties>
99. Belmares-Perales S, Torres-López E, Coparán-Elizondo J, Arriaga-Garza J, Elizondo-Villareal N. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro , plata y fierro por el método de fisicoquímica. In: Tercero foro de divulgación científica y tecnológica. 2015.
100. Thapa R, Bhagat C, Shrestha P, Awal S, Dudhagara P. Enzyme-mediated formulation of stable elliptical silver nanoparticles tested against clinical pathogens and MDR bacteria and development of antimicrobial surgical thread. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2017;16(1):1–10.
101. Vanaja M, Annadurai G. *Coleus aromaticus* leaf extract mediated synthesis of silver nanoparticles and its bactericidal activity. *Appl Nanosci.* 2013;3(3):217–23.
102. Sowmya T, Vijaya G. *Soymida febrifuga* aqueous root extract maneuvered silver nanoparticles as mercury nanosensor and potential microbicide. *World Sci News* [Internet]. 2018;114(October):84–105. Available from: [www.worldscientificnews.com](http://www.worldscientificnews.com)
103. Kumar C, Astalakshmi A, Nima P, Ganesan V. Plant mediated Synthesis of Silver nanoparticles using leaves of *Odina wodier* Roxb. *Int J Adv Res.* 2013;1(8):1–6.
104. Li D, Chen S, Zhang K, Gao N, Zhang M, Albasher G, et al. The interaction of Ag<sub>2</sub>O nanoparticles with *Escherichia coli*: inhibition–sterilization process. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81305-5>
105. Aishah M, Azieyan C, Ahmad N, Sandai D, Lee C, Lim V. Optimization of biogenic synthesis of silver nanoparticles from flavonoid-rich *Clinacanthus nutans* leaf and stem aqueous extracts. *R Soc Open Sci.* 2020;7(7).
106. Christensen L, Vivekanandhan S, Misra M, Mohanty A. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Murraya koenigii* (curry leaf): An investigation on the effect of broth concentration in reduction mechanism and particle size. *Adv Mater Lett.*

- 2011;2(6):429–34.
107. Ibrahim H. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. *J Radiat Res Appl Sci* [Internet]. 2015;8(3):265–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jrras.2015.01.007>
  108. Yang Q, Zhang H, Yu Y, Kong H, Duan Q, Wang Y, et al. In vitro activity of imipenem/relebactam against enterobacteriaceae isolates obtained from intra-Abdominal, respiratory tract, and urinary tract infections in china: Study for monitoring antimicrobial resistance trends (smart), 2015-2018. *Clin Infect Dis*. 2020;71(Suppl 4):S427–35.
  109. Ying Y, Rukayadi Y, Rashid M, Kuan C, Chieng B, Nishibuchi M, et al. In Vitro Antimicrobial Activity of Green Synthesized Silver Nanoparticles Against Selected Gram-negative Foodborne Pathogens. *Front Microbiol*. 2018;9(July):1–7.
  110. Azizian O, Einali A, Ghasemi A. Rapid biologically one-step synthesis of stable bioactive silver nanoparticles using Osage orange ( *Maclura pomifera* ) leaf extract and their antimicrobial activities. *Adv Powder Technol* [Internet]. 2017;(October). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.appt.2017.10.001>
  111. Mak SY, Wong KY. The measurement of surface tension by the method of direct pull. *Am J Phys* [Internet]. 1990 Aug 1;58(8):791–2. Available from: <https://doi.org/10.1119/1.16362>
  112. Verguer E. *Ciencia Today*. 2017 [cited 2023 Dec 27]. p. 1-3 pp. ¿Qué es la Tensión Superficial? Available from: <https://cienciatoday.com/que-es-la-tension-superficial/>
  113. Li A, Yalkowsky S. Solubility of Organic Solutes in EthanolMlater Mixtures. 1994;83(72):1735–40.
  114. Abeer A, Mon E, Mohammed K, Soubhy A, Nabil R. The potential activity of biosynthesized silver nanoparticles of *Pseudomonas aeruginosa* as an antibacterial agent against multidrug-resistant isolates from intensive care unit and anticancer agent. *Environ Sci Eur* [Internet]. 2022;34(1):1–15. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12302-022-00684-2>
  115. Samir R, Abdelaal M, Doaa A, Ibrahim M, Al-Zaban M. Novel Biogenic Silver

- Nanoparticle-Induced Reactive Oxygen Species Inhibit the Biofilm Formation and Virulence Activities of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strain. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8(May):1–14.
116. Liao S, Zhang Y, Pan X, Zhu F, Jiang C, Liu Q, et al. Antibacterial activity and mechanism of moxifloxacin nanoparticles against drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Yaoxue Xuebao.* 2020;55(10):2460–5.
117. Abidin Z, Yahya R, Devi S, Puteh R. Green synthesis of silver nanoparticles using apple extract and its antibacterial properties. *Adv Mater Sci Eng.* 2016;2016.
118. Peña-Juárez M, Sánchez-Vargas L, Gutierrez-Castañeda E, Saldaña R, Lopez-Esparza R, Cuellar-Camacho J, et al. How green and simple can nontoxic antimicrobial nanoparticles be obtained? Deposition of AgNPs on the TiO<sub>2</sub> surface in a neutral aqueous media by using the flavonoid quercetin. *Appl Organomet Chem.* 2022 Dec 8;37.

## APÉNDICES

### Apéndice N° 1. Lugar de recolección de las hojas de olivo.

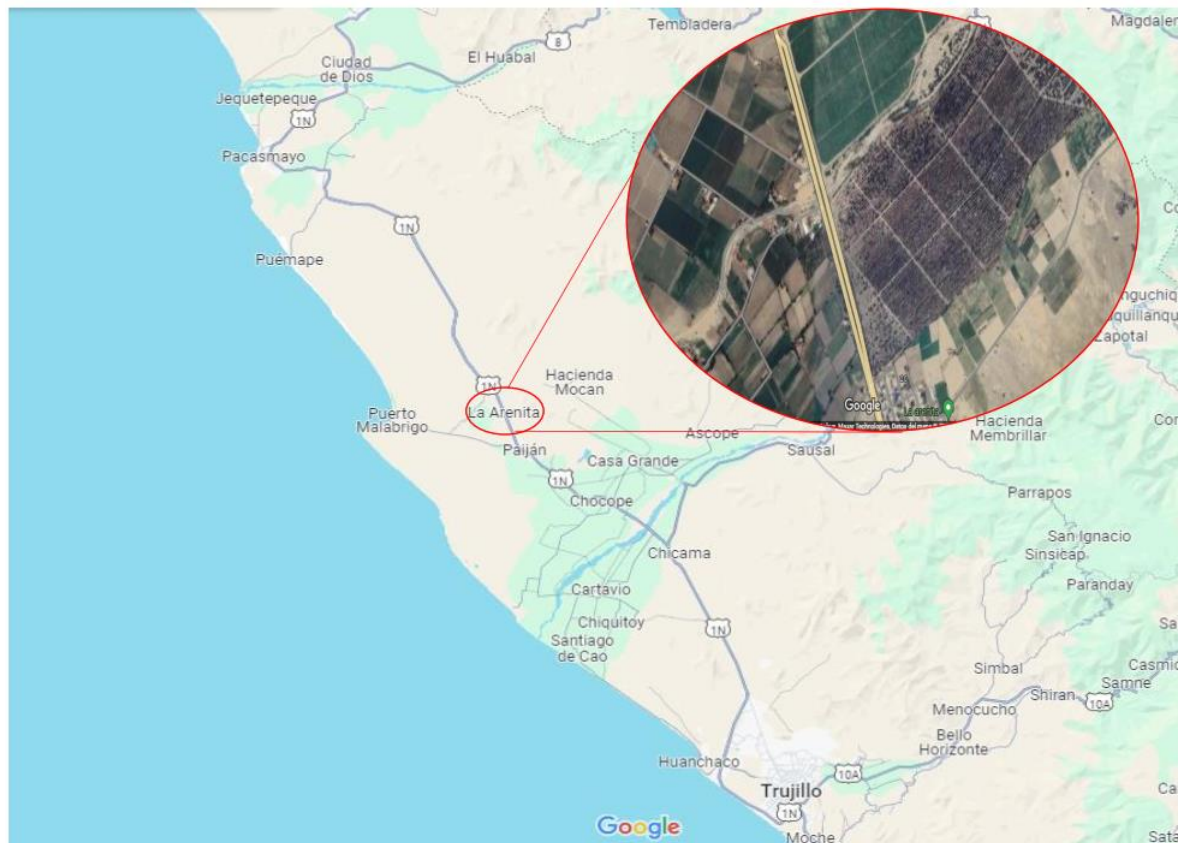


Fig N° 13. Ubicación geográfica del olivar Agroindustrial Casa Grande, Centro Poblado La Arenita, Distrito de Paján, Provincia de Ascope, Región La Libertad.  
Fuente: Imagen creada por el autor a partir de Google Maps 2024.



## Apéndice N° 2. Agitador de placa caliente



Fig N° 14. Agitador de placa caliente de la marca Thermo Scientific, modelo SP131325, utilizado para la obtención del extracto de las hojas de olivo y para la síntesis de las AgNPs.

### Apéndice N° 3. Ultracentrífuga Hermle Z 36 HK



Fig N° 15. Ultracentrífuga de la marca Hermle, modelo Z 36 HK, utilizado para la sedimentación de las AgNPs luego de la síntesis.

### Apéndice N° 4. Limpiador Ultrasónico



Fig N° 16. Ultrasonicador la marca Branson, modelo 2510-DTH, utilizado para los lavados y la dispersión de las AgNPs.

## Apéndice N° 5. Espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible



Fig N° 17. Espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible de la marca Perkin Elmer, modelo Lambda 750, utilizado para la ubicación del pico de resonancia del plasmón superficial durante la caracterización de las AgNPs.

## Apéndice N° 6. Difractómetro de rayos X



Fig N° 18. Difractómetro de rayos X de la marca Rigaku, modelo MiniFlex600, utilizado para la caracterización cristalina de las AgNPs.

## Apéndice N° 7. Distribución de los discos para la evaluación del efecto bactericida de las OLE-AgNPs

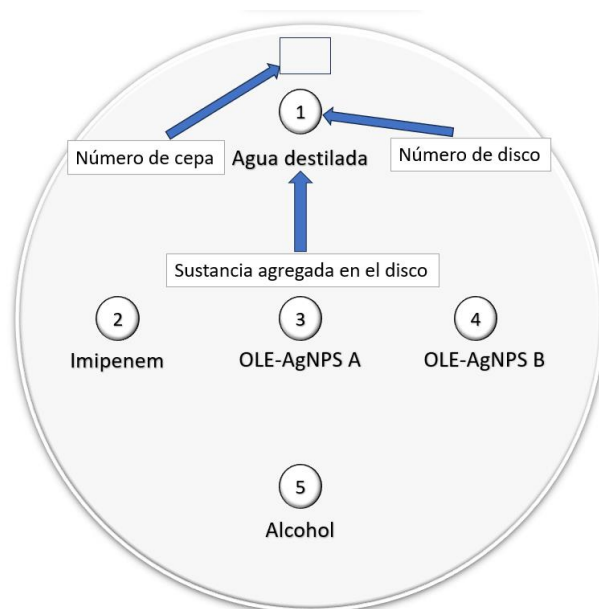


Fig N° 19. Distribución de los discos por grupo de tratamiento cada disco estuvo embebido con 20  $\mu$ L de las siguientes soluciones, G1: Agua destilada, G2: Imipenem, G3: OLE-AgNPs A, G4: OLE-AgNPs B, G5: Alcohol de 96° de pureza.

## Apéndice N° 8. Preparación de las soluciones madre de las AgNPs

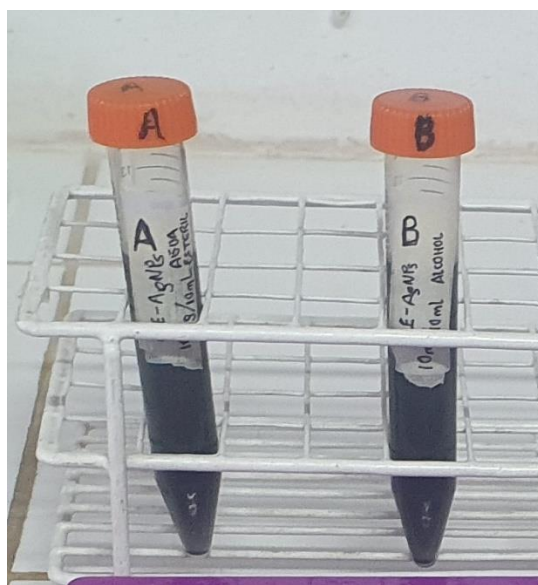


Fig N° 20. Preparación de las soluciones madre de las OLE-AgNPs A y OLE-AgNPs B para NPs dispersas en agua y en al alcohol respectivamente.

**Apéndice N° 9. Diluciones dobles de las soluciones madre de las OLE-AgNPs**



Fig N° 21. Diluciones madre para determinar la CMI, las diluciones quedaron en el siguiente orden D1: 1000 µg/mL, D2: 500 µg/mL, D3: 250 µg/mL, D4: 125 µg/mL, D5: 62,5 µg/mL, D6: 31,25 µg/mL, D7: 15,62 µg/mL, D8: 7,81 µg/mL, D9: 3,91 µg/mL, y D10: 1,95 µg/mL para ambas soluciones madre.

**Apéndice N° 10. Caldo Müller-Hinton con Rojo de Fenol Enriquecido con Glucosa (CMHRFEG) y Solución de rojo de fenol.**

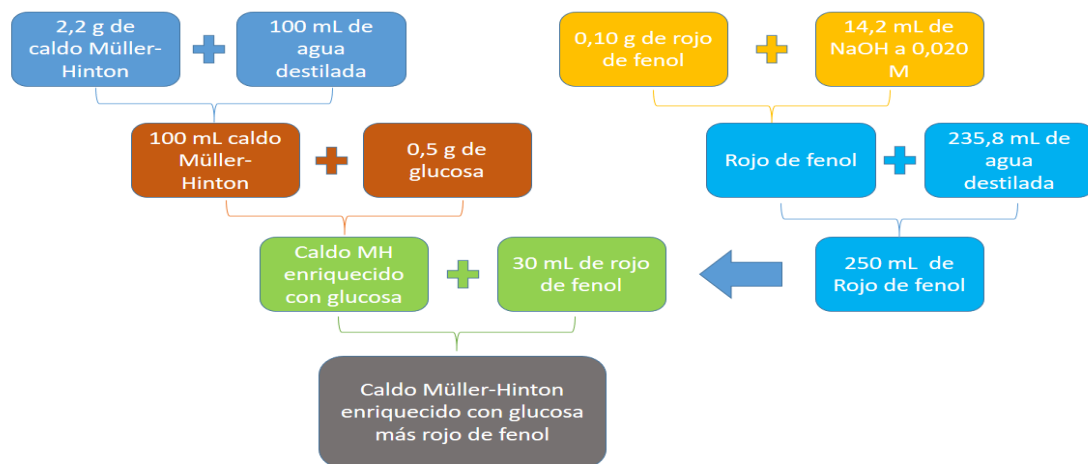


Fig N° 22. Esquema para la preparación del caldo Müller-Hinton enriquecido con glucosa más rojo de fenol.



Rojo de Fenol



CMHRFEG

#### Apéndice N° 11. Preparación de Inóculos

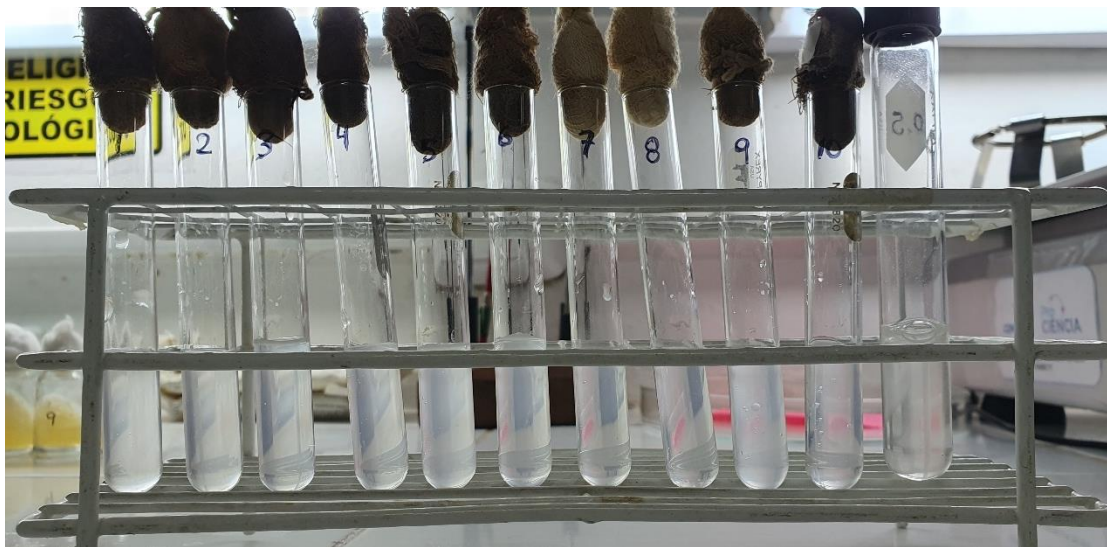


Fig N° 23. Preparación del Inóculo de los aislamientos a una concentración equivalente al tubo N° 0,5 en la escala de McFarland.

Apéndice N° 12. Distribución de las soluciones en microplaca

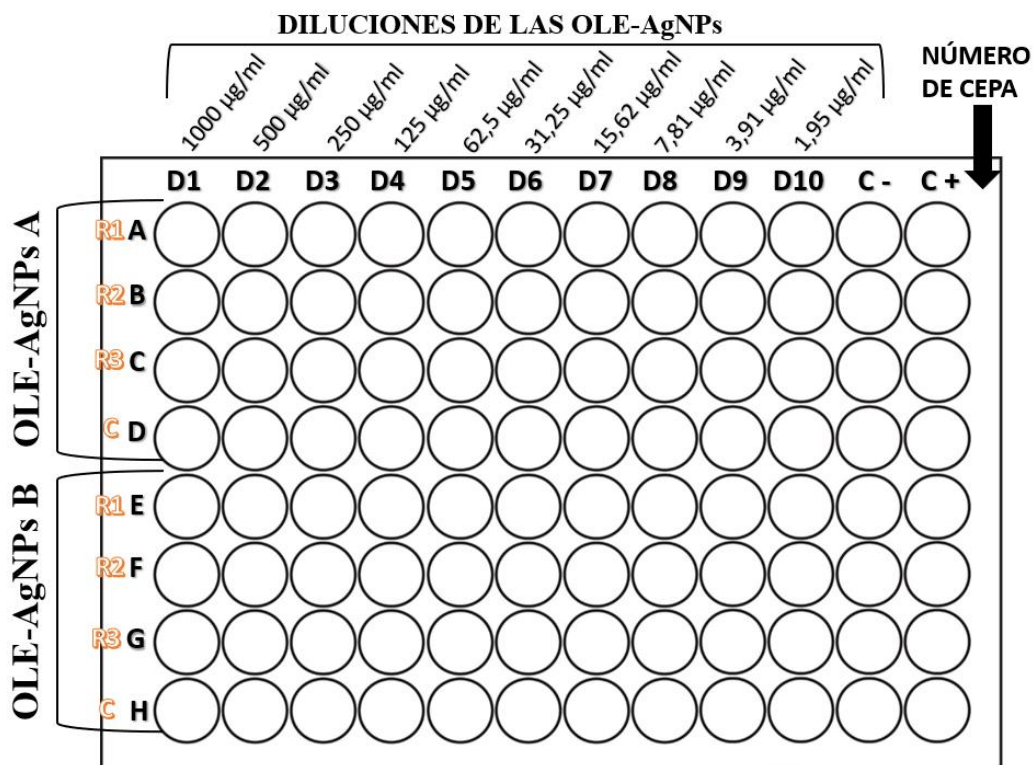


Fig N° 24. Distribución de las soluciones de nanopartículas dispersas en agua (OLE-AgNPs A) y en alcohol (OLE-AgNPs B) en la microplaca de 96 pocillos para la determinar la CMI.

**Apéndice N° 13. Distribución de los inóculos en placa para determinar la CMB**

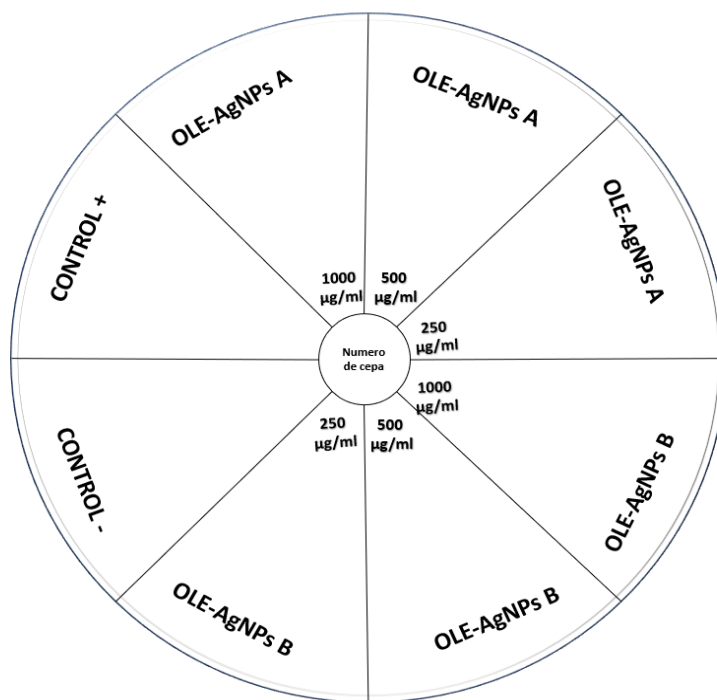


Fig N° 25. Distribución en placa de los inóculos tomados a partir de los aislamientos donde no se encontró crecimiento en la CMI, para determinar la CMB.

**Apéndice N° 14. Tabla con los cálculos obtenidos para el tamaño del cristalito de las OLE-AgNPs mediante la fórmula de Debye-Scherrer**

Parámetros								
K	$\lambda$ (Å)	#	Posición del pico $2\theta$ (°)	FWHM medido $\beta$ (°)	FWHM error $\beta$ (°)	FWHM propio $\beta$ (°)	$\theta$ (rad)	D (nm)
<b>0,89</b>	<b>1,54</b>	1	38,1016	0,9846	<b>0,09791</b>	0,88669	0,3324	<b>9,3700</b>
		2	44,0202	1,7230	<b>0,09791</b>	1,62509	0,3841	<b>5,2100</b>
		3	64,4521	0,9557	<b>0,09791</b>	0,85779	0,5624	<b>10,8200</b>
		4	77,0698	1,4186	<b>0,09791</b>	1,32069	0,6725	<b>7,6000</b>
<b>Promedio de los 4 picos</b>								<b>8,2500</b>

**K:** Constante de Debye-Scherrer.  **$\lambda$ :** Longitud de onda de rayos X (Å). **FWHM medido:** Valores del ancho medio de pico obtenidos por el software de rayos X. **FWHM error:** Valores obtenidos por el software de rayos X para el error del ancho medio de pico. **FWHM propio:** Valores obtenidos al restar los datos FWHM error de los datos FWHM medido.  **$\theta$ :** Ángulos medido en radianes. **D:** Tamaño de cristalito em nm.



**Apéndice N° 15. Tabla con los aislamientos trabajados y los medicamentos a los que presentaron resistencia**

Número de Cepa	Código	Aislamientos	Medicamentos a los que presentan resistencia				
1	376599	<i>E. coli</i>	AMP	CN			
2	376961	<i>Pantoea sp</i>	AMP	SXT			
3	378586 B	<i>C. neteri</i>	AMP	CTX	CRO	CAZ	CAR
4	377551	<i>Enterobacter sp.</i>	AMP	SXT	FOX	AMC	CN
5	377191	<i>Yersina sp.</i>	AMP	SXT	C	TZP	
6	375472 B	<i>E. coli</i>	AMP	SXT	CN		
7	377912	<i>Proteus sp.</i>	AMP	SXT	NA		
8	377411	<i>L. adecarboxylata</i>	AMP	SXT			
9	377348	<i>Yersinia sp.</i>	AMP	SXT			
10	377162	<i>Klebsiella sp.</i>	AMP	CAZ	FOX		

**AMP:** Ampicilina, **CN:** Gentamicina, **SXT:** Trimetoprima-sulfametoxazol, **CTX:** Cefotaxima, **CRO:** Ceftriaxona, **CAZ:** Ceftazidima, **CAR:** Carbenicilina, **FOX:** Cefoxitina, **AMC:** Amoxicilina-Ac. Clavulánico, **C:** Cloramfenicol, **TZP:** Piperacilina-tazobactam, **NA:** Ácido nalidixico.

**Apéndice N° 16. Medición de los diámetros ZOI para cada cepa**

Número de cepa	Agua destilada			Imipenem			OLE-AgNPs A			OLE-AgNPs B			Alcohol		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	0.0 mm	0.0 mm	0.0 mm	33.1 mm	36.5 mm	32.9 mm	11.0 mm	12.1 mm	13.3 mm	20.7 mm	21.9 mm	20.2 mm	7.7 mm	8.2 mm	9.4 mm
2	0.0 mm	0.0 mm	0.0 mm	32.1 mm	32.5 mm	34.0 mm	13.6 mm	15.0 mm	13.9 mm	22.8 mm	25.5 mm	25.3 mm	8.5 mm	7.5 mm	7.5 mm
3	0.0 mm	0.0 mm	0.0 mm	33.2 mm	32.7 mm	32.1 mm	15.3 mm	13.0 mm	12.8 mm	28.2 mm	25.3 mm	24.1 mm	8.6 mm	6.6 mm	6.9 mm
4	0.0 mm	0.0 mm	0.0 mm	34.5 mm	28.2 mm	27.2 mm	10.5 mm	11.0 mm	12.3 mm	18.4 mm	20.2 mm	21.3 mm	10.3 mm	6.6 mm	8.3 mm
5	0.0 mm	0.0 mm	0.0 mm	35.3 mm	30.5 mm	33.4 mm	13.6 mm	14.9 mm	15.1 mm	24.1 mm	25.4 mm	25.2 mm	7.1 mm	10.0 mm	9.4 mm
6	0.0 mm	0.0 mm	0.0 mm	37.7 mm	37.3 mm	34.2 mm	13.5 mm	13.4 mm	13.6 mm	24.0 mm	23.2 mm	23.8 mm	7.4 mm	6.8 mm	7.1 mm
7	0.0 mm	0.0 mm	0.0 mm	34.1 mm	36.6 mm	35.1 mm	11.4 mm	10.2 mm	14.0 mm	24.0 mm	24.6 mm	26.3 mm	6.6 mm	7.0 mm	9.5 mm
8	0.0 mm	0.0 mm	0.0 mm	34.0 mm	34.0 mm	38.0 mm	12.9 mm	15.9 mm	13.5 mm	23.9 mm	20.5 mm	22.0 mm	7.4 mm	10.3 mm	8.0 mm
9	0.0 mm	0.0 mm	0.0 mm	32.9 mm	33.5 mm	33.4 mm	13.9 mm	11.5 mm	14.7 mm	27.0 mm	25.5 mm	25.0 mm	6.1 mm	8.5 mm	9.5 mm
10	0.0 mm	0.0 mm	0.0 mm	30.0 mm	31.0 mm	33.0 mm	13.2 mm	15.9 mm	14.7 mm	26.5 mm	24.7 mm	23.8 mm	7.0 mm	10.3 mm	11.3 mm

**Apéndice N° 17. Prueba estadística de Kruskal-Wallis para determinar si hubo diferencia entre las medias los grupos de tratamiento**

**Resumen de prueba de hipótesis**

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de DIAMETRO ZOI es la misma entre las categorías de TRATAMIENTOS.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05

**Apéndice N° 18. Prueba estadística Chi-cuadrado para determinar la diferencia de sensibilidad para cada tratamiento**

**Tabla cruzada TRATAMIENTOS\*ESCALA DE DURAFFORD**

Recuento		ESCALA DE DURAFFORD				Total
		NULA	SENSIBLE	MUY SESIBLE	SUMAMENTE SENSIBLE	
TRATAMIENTOS	OLE-AgNPS A	0	6	4	0	10
	OLE-AgNPS B	0	0	0	10	10
	Alcohol	4	6	0	0	10
Total		4	12	4	10	30

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	42,000 <sup>a</sup>	6	,000
Razón de verosimilitud	49,281	6	,000
Asociación lineal por lineal	2,677	1	,102
N de casos válidos	30		

a. 12 casillas (100,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 1,33.

**Apéndice N° 19. Microplacas antes y después de la incubación; y valores de las CMI para cada cepa**

Número de cepa	OLE-AgNPs A			OLE-AgNPs B		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	62.5 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL
2	125 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL	250 µg/mL
3	125 µg/mL	125 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL
4	500 µg/mL	1000 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL	500 µg/mL	500 µg/mL
5	65.5 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL
6	31.5 µg/mL	62.5 µg/mL	62.5 µg/mL	62.5 µg/mL	62.5 µg/mL	125 µg/mL
7	125 µg/mL	125 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL
8	62.5 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL
9	125 µg/mL	125 µg/mL	250 µg/mL	62.5 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL
10	125 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL	250 µg/mL

**Apéndice N° 20. Prueba estadística de Mann-Whitney para determinar diferencias entre los tratamientos aplicados en la CMI**

<b>Estadísticos de prueba<sup>a</sup></b>		
	CMI OLE-AgNPs A	CMI OLE-AgNPs B
U de Mann-Whitney	1,000	3,000
W de Wilcoxon	7,000	9,000
Z	-1,650	-1,000
Sig. asintótica(bilateral)	,099	,317
Significación exacta [2* (sig. unilateral)]	,200 <sup>b</sup>	,700 <sup>b</sup>

a. Variable de agrupación: NÚMERO DE CEPAS  
b. No corregido para empates.

## Apéndice N° 21. Valores obtenidos de la CMB para cada cepa

Número de cepa	OLE-AgNPs A			OLE-AgNPs B		
	R1	R2	R3	R1	R3	R3
1	500 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL
2	1000 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL
3	1000 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL
4	1000 µg/mL	1000 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL
5	250 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL
6	500 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL	1000 µg/mL	1000 µg/mL
7	500 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL
8	500 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL
9	1000 µg/mL	500 µg/mL	500 µg/mL	500 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL
10	500 µg/mL	1000 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL	1000 µg/mL

## Apéndice N° 22. Prueba estadística de Mann-Whitney para determinar diferencias entre los tratamientos aplicados en la CMB

Estadísticos de prueba <sup>a</sup>		
	CMB OLE-AgNPs A	CMB OLE-AgNPs B
U de Mann-Whitney	3,000	,500
W de Wilcoxon	9,000	6,500
Z	-,745	-1,826
Sig. asintótica(bilateral)	,456	,068
Significación exacta [2* (sig. unilateral)]	,700 <sup>b</sup>	,100 <sup>b</sup>

a. Variable de agrupación: NÚMERO DE CEPAS

b. No corregido para empates.

## ANEXOS

Anexo N° 1. Fórmula de Debye-Scherrer utilizada para el cálculo del tamaño de cristalito.

$$D = \frac{K \lambda}{\beta \cos \theta}$$

**K** = Constante de Debye-Scherrer.

**λ** = Longitud de onda de rayos X (Å).

**β** = FWHM (Full Width at Half Maximum) Ancho medio de pico.

**θ** = Ángulo medido en radianes.

Anexo N° 2. Tarjeta de identificación para el difractograma correspondiente a la plata en polvo obtenida mediante el software PCPDFWIN.

