



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

**DEPARTAMENTOS DE QUÍMICA, MICROBIOLOGÍA, MATEMÁTICAS Y
FÍSICA**

**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA
TOXICIDAD Y BIOACTIVIDAD DE MATERIALES NANO-
ESTRUCTURADOS DE ZnO, Fe₃O₄ Y ZnO@Fe₃O₄**

PRESENTA:

LAQB. CÉSAR EDUARDO DÍAZ DE LEÓN MACÍAS

PARA OBTENER EL GRADO EN:

MAESTRO EN CIENCIAS: AREÁ DE TOXICOLOGÍA

TUTOR:

Dra. en C. ILIANA ERNESTINA MEDINA RAMÍREZ

ASESORES:

Dr. en C. RODLFO GONZÁLEZ SEGOVIA;

Dr. en C. JORGE EDUARDO MACÍAS DÍAZ

Aguascalientes, Ags. 21 de noviembre de 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M EN C JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **CÉSAR EDUARDO DÍAZ DE LEÓN MACÍAS** con ID 91664 quien realizó la tesis titulada: **SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD Y BIOACTIVIDAD DE MATERIALES NANO-ESTRUCTURADOS DE ZnO, Fe₃O₄ Y ZnO@Fe₃O₄**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 13 de Septiembre de 2016.

Dra. en C. Iliana E. Medina Ramírez
Tutor de tesis

Dr. en C. Rodolfo González Segovia;
Asesor de tesis

Dr. en C. Jorge Eduardo Macías Díaz
Asesor de tesis

c.c.p.- LAQB. César Eduardo Díaz de León Macías - Interesado
c.c.p.- Dr. Juan Jáuregui Rincón - Secretaria de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Dr. Martín Gerardo Rodríguez - Consejero Académico
c.c.p.- Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch - Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CÉSAR EDUARDO DÍAZ DE LEÓN MACÍAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS ÁREA TOXICOLOGÍA
PRESENTE.

Estimado alumno:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: "**Síntesis, caracterización y evaluación de la toxicidad y bioactividad de materiales nano-estructurados de ZnO, Fe₃O₄ y ZnO@Fe₃O₄**", hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 17 de octubre de 2016

"Se lumen proferre"

EL DECANO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS



c.c.p.- Archivo.

AGRADECIMIENTOS:

Dedico este trabajo de tesis a mis padres Jesús Manuel Díaz de León Martínez e Irma Macías Cruz, que siempre me apoyaron incondicionalmente de forma moral y económica, porque siempre creyeron en mí, me tuvieron paciencia y a pesar de todos los pesares y necesidades que pasamos como familia, ellos depositaron su confianza para que yo, su hijo, pudiera llegar a cumplir esta meta de mi vida, hoy día es todo un orgullo poder decirles GRACIAS POR TODO y me enorgullezco de ser su hijo y que GRACIAS A DIOS los tengo a ustedes, los mejores padres que podría pedir.

Agradezco enormemente a mi tía María Macías Cruz y a toda su familia, porque sin su apoyo este sueño nunca se hubiese concebido, igualmente agradezco a mi familia en general por el apoyo que siempre me brindaron día a día en el transcurso de cada año de posgrado.

El termino gratitud, no siempre es asociado o familiarizado con los tutores de tesis, estos en la mayoría de ocasiones son vistos con desprecio y asociados con personas que castigan o nos obligan a realizar actividades extracurriculares que causan banalidad en la optimización de nuestro tiempo; pero la realidad es que estas personas son sumamente importantes en nuestro desarrollo como personas, y especialmente en mi caso mis tutores fueron cruciales para la realización de esta tesis.

Quiero agradecerles a ellos por cada detalle y momento dedicado para aclarar cualquier tipo de duda que me surgiera, agradecerles por la caridad y exactitud con la que me enseñaron cada experimento, resultado, interpretación y presentación. Gracias a la Dra. Iliana Media Ramírez, al Dr. Rodolfo González Segovia y al Dr. Jorge Eduardo Macías Díaz por haber aceptado ser mis tutores, gracias a ellos por haberme enseñado tan bien y por haberme permitido el desarrollo de esta tesis. Gracias por las risas, por el trabajo, por lo regaños. Mil gracias por ser parte de mi vida.

El desarrollo de esta tesis no lo puedo catalogar como algo fácil, pero lo que sí puedo hacer, es afirmar que durante todo este tiempo pude disfrutar de cada momento, que cada investigación, proceso, y proyectos que se realizaron dentro de esta, lo disfruté mucho, y no fue porque simplemente me dispuse a que así fuera, fue porque mis amigos siempre estuvieron ahí, gracias por todo el apoyo Héctor Alejandro Martínez Reséndiz, Shinji Alcalá Okayasu, Sonia Sofía Cruz Muñoz, Cristina González Ramírez y Araceli Guadalupe Mendieta Vázquez por todo su tiempo, por las buenas vibras, las pláticas amenas, y todo lo que vivimos juntos, nuestra amistad será duradera.

Gracias a mi universidad, gracias por haberme permitido formarme en ella, gracias a todas las personas que fueron partícipes de este proceso, ya sea de manera directa o indirecta, gracias a los doctores Andrés Quintanar Stephano, Ma. Consolación Martínez Saldaña Isidoro Rubio Franchini, José Luis Rodríguez López y a mis compañeros Gladis Pedroza Herrera, Felipe Herrera Ponce. Gracias a todos ustedes, fueron ustedes los responsables de realizar su pequeño aporte, que el día de hoy se vería reflejado en la culminación de mi maestría.

César Eduardo Díaz de León Macías

ÍNDICE GENERAL:

INTRODUCCIÓN8

 1.1 Nanopartículas magnéticas.....10

 1.2 Nanopartículas de ZnO.....11

ANTECEDENTES.....13

 2.1. Helicobacter pylori.....14

 2.1.1. Características morfológicas y tintoriales14

 2.1.2. Epidemiología15

 2.1.3. Factores de virulencia.....16

 2.1.4. Tratamiento19

 2.2. Staphylococcus aureus19

 2.2.1. Características morfológicas y tintoriales20

 2.2.2. Factores de virulencia.....20

 2.2.3. Tratamiento y control.....22

 2.3. Biopelículas y su importancia médica.....24

 2.3.1. Formación de biopelículas in vitro26

 2.3.2. Formación de biopelículas in vivo30

 2.4. Interés biomédico de las NPs33

 2.4.1. Características físico-químicas de las Nanopartículas Magnéticas33

 2.4.2. Aplicaciones biomédicas de las MNPs.....37

 2.4.3. Características físico-químicas de interés biomédico de las ZnO NPs.....39

 2.4.4. Generación de estrés oxidativo mediado por ZnO NPs43

 2.4.5. Precauciones toxicológicas de las ZnO NPs.....45

 2.5. Ensayos sobre las biopelículas47

JUSTIFICACIÓN51

Hipótesis.....53

OBJETIVOS54

 Objetivo general:.....55

 Objetivos específicos:55

METODOLOGÍA56

 Cronograma de actividades.58

 Síntesis de materiales nano-estructurados:.....59

| | |
|--|-----|
| Cultivo de microorganismos | 62 |
| Caracterización de microorganismos | 63 |
| Formación de Biopelículas..... | 65 |
| Determinación de actividad bactericida y de inhibición de biopelículas | 67 |
| Determinación de actividad toxicológica in vivo..... | 69 |
| Análisis estadístico..... | 71 |
| RESULTADOS..... | 73 |
| 3.1 SÍNTESIS DE MNPs (Fe ₃ O ₄):..... | 74 |
| 3.2 SÍNTESIS DE NCs: | 76 |
| 3.3 CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES NANO-ESTRUCTURADOS: | 77 |
| 3.3.1. Caracterización morfológica y elemental. | 77 |
| 3.3.2. Difracción de Rayos X (DRX) | 85 |
| 3.3.3. Espectroscopia RAMAN..... | 88 |
| 3.4 EFECTO DE LOS NMs in vitro: | 90 |
| 3.4.1. Cultivo de <i>Helicobacter pylori</i> | 90 |
| 3.4.2. Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> | 91 |
| 3.4.3. Formación de biopelículas de <i>Staphylococcus aureus</i> | 92 |
| 3.4.4. Formación de biopelículas de <i>Helicobacter pylori</i> | 94 |
| 3.4.5. Interacción de NMs con <i>Staphylococcus aureus</i> | 96 |
| 3.4.6. Actividad bactericida estimulada por fotocátalisis | 99 |
| 3.4.7. Interacción de NMs con <i>Helicobacter pylori</i> | 101 |
| 3.4.8. Interacción de NMs con biopelículas de <i>Staphylococcus aureus</i> | 103 |
| 3.4.9. Interacción de NMs con biopelículas de <i>Helicobacter pylori</i> | 106 |
| 3.4.10. Comparación de efecto bactericida sobre <i>Staphylococcus aureus</i> | 107 |
| 3.4.11. Comparación de efecto bactericida sobre <i>Helicobacter pylori</i> | 110 |
| 3.5 EFECTO DE LOS NMs in vivo:..... | 114 |
| 3.5.1. Alteraciones en el peso..... | 115 |
| 3.5.2. Alteraciones en la excreta de orina..... | 118 |
| 3.5.3. Alteraciones en la ingesta de agua..... | 120 |
| 3.5.4. Alteraciones en albumina sérica. | 122 |
| 3.5.5. Alteraciones en glucosa sérica. | 125 |
| 3.5.6. Alteraciones en TGO sérica. | 127 |
| 3.5.7. Alteraciones en TGP sérica..... | 128 |
| 3.5.8. Alteraciones en creatinina sérica..... | 130 |

| | |
|---|-----|
| 3.5.9. Alteraciones en Bilirrubina Total sérica (BT) | 132 |
| 3.5.10. Alteraciones en Bilirrubina Directa sérica (BD) | 133 |
| 3.5.11. Eliminación de metales por orina | 135 |
| 3.5.12. Cambios morfológicos..... | 136 |
| DISCUSIONES | 156 |
| 4.1 SÍNTESIS DE NMs: | 157 |
| 4.2 Caracterización de materiales nano-estructurados | 157 |
| 4.3 Formación de biopelículas: | 158 |
| 4.4 Interacción con NMs: | 159 |
| 4.5 Análisis in vivo: | 162 |
| CONCLUSIONES | 164 |
| GLOSARIO..... | 167 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 174 |

ÍNDICE DE DIAGRAMAS:

| | |
|--|----|
| Diagrama 1. Síntesis de MNPs..... | 60 |
| Diagrama 2. Síntesis de ZnO NPs..... | 61 |
| Diagrama 3. Síntesis de NCs | 62 |
| Diagrama 4. Cultivo de microorganismos. | 63 |
| Diagrama 5. Caracterización de microorganismos. | 65 |
| Diagrama 6. Formación de Biopelículas. | 67 |
| Diagrama 7. Efecto de los NMs in vitro. | 69 |
| Diagrama 8. Efecto de los NMs in vivo. | 71 |

ÍNDICE DE IMÁGENES:

| | |
|---|-----|
| Imagen 1. Caracterización morfológica y elemental de ZnO NPs..... | 79 |
| Imagen 2. Caracterización morfológica y elemental de MNPs | 80 |
| Imagen 3. Caracterización morfológica y elemental de NCs..... | 84 |
| Imagen 4. DRX..... | 86 |
| Imagen 5. Raman | 89 |
| Imagen 6. Cultivo de <i>Helicobacter pylori</i> | 91 |
| Imagen 7. Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> | 92 |
| Imagen 8. Efecto de los NMs en hígado..... | 138 |

Imagen 9. Efecto de los NMs en Riñón 142
Imagen 10. Efecto de los NMs en Pulmón 146
Imagen 11. Efecto de los NMs en Corazón 151
Imagen 12. Efecto de los NMs en Cerebelo 154

ÍNDICE DE GRÁFICAS:

Gráfica 1. Síntesis de MNPs. 75
Gráfica 2. Síntesis de NCs..... 76
Gráfica 3. Biopelículas S. aureus..... 93
Gráfica 4. Biopelículas H. pylori..... 94
Gráfica 5. Actividad antimicrobiana 97
Gráfica 6. Actividad antimicrobiana estimulada 100
Gráfica 7. Actividad antimicrobiana 102
Gráfica 8. Interacción con biopelículas..... 104
Gráfica 9. Interacción con biopelículas..... 106
Gráfica 10. Comparación de actividad bactericida..... 108
Gráfica 11. Comparación actividad biocida..... 109
Gráfica 12. Análisis de UFC..... 110
Gráfica 13. Comparación de actividad bactericida..... 111
Gráfica 14. Comparación actividad biocida..... 112
Gráfica 15. Análisis de UFC..... 113
Gráfica 16. Alteraciones en el peso 116
Gráfica 17. Excreta de orina..... 119
Gráfica 18. Ingesta de agua..... 121
Gráfica 19. Albumina sérica 124
Gráfica 20. Glucosa sérica 126
Gráfica 21. TGO sérica..... 128
Gráfica 22. TGP sérica..... 129
Gráfica 23. Creatinina sérica 131
Gráfica 24. BT..... 133
Gráfica 25. BD..... 134
Gráfica 26. Excreción de metales en orina..... 135

ACRÓNIMOS:

| | | | |
|-------------|--|---------------|---|
| <i>MNP</i> | Nanopartícula magnética | <i>RT-PCR</i> | Reacción en Cadena de la Polimerasa Retro-Transcripcional |
| <i>NC</i> | Nanocompósito | <i>VBNC</i> | Bacteria Viable No Cultivable |
| <i>NP</i> | Nanopartícula | <i>EMS</i> | Energía Magnetostática Externa |
| <i>NM</i> | Nanomaterial | <i>Edw</i> | Pared de Energía Dominante |
| <i>SEM</i> | Microscopía Electrónica de Barrido | <i>AFeM</i> | Antiferromagnético |
| <i>EDS</i> | Espectrometría de Energía Dispersiva | <i>FIM</i> | Ferrimagnético |
| <i>ICC</i> | Infusión Cerebro-Corazón | <i>FM</i> | Ferromagnético |
| <i>ROS</i> | Especies Reactivas de Oxígeno | <i>MRI</i> | Imagenología por Resonancia Magnética |
| <i>DRX</i> | Difracción de Rayos X | <i>RES</i> | Sistema Retículo endotelial |
| <i>UV</i> | Ultravioleta | <i>SPIO</i> | Óxido de Hierro Superparamagnético |
| <i>RMN</i> | Resonancia Magnética Nuclear | <i>MH</i> | Hipertermia Magnética |
| <i>LPS</i> | Lipopolisacárido | <i>EPR</i> | Efecto de Permeabilidad y Retención |
| <i>U</i> | Unidades | <i>UABS</i> | Unidades de Absorbancia |
| <i>EPS</i> | Sustancia Polimérica Extracelular | <i>DMB</i> | Dosis Mínima Bactericida |
| <i>PNAG</i> | Polímero de N-Acetil Glucosamina | <i>DMI</i> | Dosis Mínima Biocida |
| <i>PIA</i> | Polisacárido Intracelular de Adhesión | <i>UFC</i> | Unidades Formadoras de Colonias |
| <i>BAP</i> | Proteínas Asociadas a Biopelículas | <i>PMN</i> | Polimorfonuclear |
| <i>ADNe</i> | Ácido Desoxi Ribonucleico extracelular | <i>GSH</i> | Glutatión |
| <i>ADN</i> | Ácido Desoxi Ribonucleico | <i>UDP</i> | Uracil Di fosfato |
| <i>ARN</i> | Ácido Ribonucleico | <i>PCR</i> | Reacción en Cadena de la Polimerasa |

RESUMEN:

El ZnO es un material semiconductor que ha despertado gran interés debido a sus excelentes propiedades optoelectrónicas. Así mismo ha sido señalado como uno de los mejores materiales empleados en remediación ambiental. No obstante, aún existen limitantes para su implementación a gran escala, entre ellas, mejorar su estabilidad química y elucidar la biocompatibilidad del mismo. Por otra parte, existen muy pocos reportes referentes al uso de campos magnéticos para el control del crecimiento de microorganismos patógenos. Aunque se reportó que la exposición de *Staphylococcus aureus* y *Helicobacter pylori* a campos electromagnéticos (50 Hz y 1 mT) induce cambios morfológicos y fisiológicos, disminuyendo de esta manera su capacidad para formar biopelículas, postulando de esta manera que la aplicación de NPs de ZnO y Fe₃O₄ así como NCs de ZnO@Fe₃O₄ en sistemas *in vitro* generan una alta eficiencia bactericida y una baja o nula toxicidad en sistemas *in vivo*. Para determinar esto se procedió a optimizar la síntesis de nanopartículas de Fe₃O₄ y nanocompuestos de ZnO@Fe₃O₄ empleando una ruta solvotérmica activada por microondas, así como la evaluación del desarrollo de biopelículas de *Staphylococcus aureus* bajo una densidad bacteriana 1×10^5 bacterias a 37°C durante 24hrs y de *Helicobacter pylori* durante 72hrs a 37°C y 40psi de CO₂ en ausencia y presencia de distintas dosis (1, 2 y 4 mg/Kg) de los nanomateriales por método espectrofotométrico con safranina. Los resultados de la optimización de síntesis de los nanomateriales indicaron que al realizar la purificación de las MNPs a temperaturas de 4°C aumenta significativamente el rendimiento ($39.30 \pm 4.26\%$) con respecto al control ($18.74 \pm 2.87\%$); así mismo se demostró la estructura nanométrica de los materiales. Los resultados *in vitro* demostraron que bajo una dilución de 1:40 se puede llegar a formar una biopelícula estable para ambas bacterias; así mismo se pudo determinar las dosis mínimas bactericidas de cada nanomaterial, siendo de 1mg/Kg para las NPs de ZnO con un 69% de inhibición con respecto al control; 2 mg/Kg para los NCs (52%) y 4 mg/Kg para las MNPs (44%), ulteriormente se pudo determinar la dosis mínima de inhibición para las biopelículas, 2 mg/Kg para las NPs de ZnO (55%); 4 mg/Kg para los NCs (47%) y para las MNPs (48%). Los resultados *in vivo* demostraron que las interacciones crónicas de estos materiales los organismos modelos no muestran ningún efecto toxicológico, mientras que una interacción aguda de ZnO y MNPs generan efectos histológicos adversos como la degradación hidrópica sobre el parénquima hepático, pérdida de la integridad alveolar y vacuolización de la zona molecular cerebelar. Estos resultados sugieren que a dosis bajas de los NMs se puede generar una eficaz actividad bactericida y biocida, con nulo efecto toxicológico.

ABSTRACT:

ZnO is a semiconductor material which has aroused great interest due to its excellent optoelectronic properties. Likewise it has been pointed out as one of the best materials used in environmental remediation. However, still exist constraints for its implementation at large scale, including improving its chemical stability and elucidate the biocompatibility of the material. On the other hand, there are very few reports concerning the use of magnetic fields to control the growth of pathogenic microorganisms. Although it was reported that exposure of *Staphylococcus aureus* and *Helicobacter pylori* to electromagnetic fields (50 Hz and 1 mT) induces morphological changes, decreasing its ability to form biofilms. Thus, in this work we evaluate the microbicidal activity and biocompatibility of ZnO, Fe₃O₄, and ZnO@Fe₃O₄ NCs in *in vivo* and *in vitro* systems. We postulate that these materials will exhibit high efficiency in the elimination of these microorganisms as well as presenting a low or zero toxicity. To determine this, we proceeded to optimize the synthesis of nanoparticles of Fe₃O₄ and ZnO@Fe₃O₄ nanocomposites using a solvothermal route activated by microwave (MW) radiation, as well as the evaluation of the development of biofilms of *Staphylococcus aureus* under a bacterial density 1×10^5 bacteria at 37° C during 24 hours and *Helicobacter pylori* during 72 hours at 37° C and 40 psi of CO₂ in the absence and presence of different doses (1, 2 and 4 mg/Kg) of nanomaterials by spectrophotometry with safranin. Optimization of synthesis conditions indicate that separation and purification of MNP at low temperatures (4°C) render higher recovery yields. *In vitro* results showed that under a 1:40 dilution is possible to form a stable biofilm for both bacteria; Likewise we could determine minimal bactericidal doses of each nanomaterial, being 1 mg/Kg for the NPs of ZnO with 69% inhibition relative to the control; 2 mg/Kg for the NCs (52%) and 4 mg/Kg for MNPs (44%), it was subsequently determined the minimum dose of inhibition for biofilms, 2 mg/Kg for the ZnO NPs (55%); 4 mg/Kg for the NCs (47%) and MNPs (48%). Evaluation of the toxicity of the materials using Wistar rats as model organisms indicate that chronic interactions of these materials don't show toxicological effect, whereas an acute interaction of ZnO and MNPs generate adverse histological effects as on the hepatic parenchyma hydropic degradation, loss of alveolar integrity and vacuolization of the cerebellar molecular area. These results suggest that at low doses of the NMs can generate an effective bactericidal activity and biocide, with no toxicological effect.

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es un campo emergente de la ciencia con un interés creciente por sus numerosas aplicaciones que van desde las tecnologías de la información a las aplicaciones médicas, las implicaciones sociales y económicas de este campo a resultado en su incrementada popularidad, conduciendo a su alta demanda. Esta ciencia es altamente dependiente de la colaboración de varias disciplinas científicas para manipular y alterar las dimensiones de los materiales hasta la escala atómica; resultando en la formación de los nanomateriales. Como lo describen Markides *et al* (2012), los nanomateriales poseen una, dos o tres dimensiones externas dentro del rango de 1 a 100 nanómetros (nm); rango que es conocido como “la nano-escala”. Actualmente los nanomateriales han sido el pilar en la búsqueda de nuevo conocimiento y aplicaciones, particularmente en los campos de la medicina regenerativa, microbiología y la ingeniería tisular; así mismo la integración de la nanotecnología con la biología molecular ha resultado en el desarrollo de una nueva área del conocimiento, la nanobiotecnología (Gao *et al*; 2008). Adicionalmente la nanotecnología ha permitido a los científicos, ingenieros y físicos trabajar a nivel celular y molecular; aunque las aplicaciones reales de los materiales nano-estructurados en las ciencias biológicas son poco comunes, sin embargo estos materiales al ser comparados con sus contra partes en masa (de mayor tamaño) proveen excelentes propiedades para su uso en este campo; en este sentido, los nanoclusters son partículas ultrafinas de dimensiones nanométricas, localizadas entre la región de transición entre las moléculas y las estructuras microscópicas; vistos como moléculas, son tan grandes que no pueden acceder a la categoría cuántica, por otra parte, vistos como materiales son tan pequeños que exhiben características que no son observadas en estructuras mayores (mayores de 100 nm). Es en este régimen de tamaño que muchos avances bioquímicos se han realizado, así como el inicio de aplicaciones industriales, ambientales y fármaco-toxicológicas (Tartaj *et al*; 2003).

En este sentido una nanopartícula puede ser definida como un material con tres dimensiones externas en el orden de la nano-escala y un diámetro contenido entre 1 y 100 nm, así mismo contienen cerca de algunos cientos hasta 10^5 átomos (Makides *et al*; 2012); desde el punto de vista físico y químico, cuando algunos materiales semiconductores alcanzan dimensiones de partículas o menores que el radio de Bohr, un incremento en la brecha de banda de energía puede ser observada. En metales nobles la disminución en el tamaño por debajo del recorrido libre medio de los electrones da lugar a una intensa absorción en la región del UV-visible cercano (Tartaj *et al*; 2003). En contraste los materiales metálicos que se encuentran dentro de la nano-escala poseen múltiples aplicaciones, sin embargo el mayor beneficio del uso de las nanopartículas es que, debido a su

tamaño, pueden ser maniobradas y dirigidas con precisión a una entidad o marcador biológico específico (Gao *et al*; 2009); además las nanopartículas pueden interactuar con estructuras celulares (100 – 1000 nm), subcelulares (20 – 250 nm), proteínas (3 – 50 nm) o estructuras genéticas (10 – 100 nm). Sus propiedades electrónicas, ópticas y magnéticas únicas junto con sus dimensiones específicas permite que las nanopartículas puedan ser personalizadas para un propósito específico biológico, como para el aislamiento celular, el transporte de fármacos, diagnósticos (Resonancia Magnética Nuclear RMN), imagenología celular e hipertermia (Issa *et al*; 2013). Es bien sabido que las nanopartículas inorgánicas pueden actuar como agentes bactericidas y anti-fúngicos debido a su alta capacidad de interactuar con los componentes de estos microorganismos (Chwalibog *et al*; 2010).

1.1 Nanopartículas magnéticas

De acuerdo a las investigaciones de (Issa *et al*, 2013) los materiales magnéticos son aquellos que muestran una respuesta al aplicar un campo magnético sobre los mismos, estos son clasificados en cinco tipos principales; ferromagnéticos, paramagnéticos, diamagnéticos, antiferromagnéticos y ferrimagnéticos (Kumar *et al*, 2011). En caso de los materiales ferromagnéticos (como hierro, níquel y cobalto) un átomo tiene un momento magnético neto que domina, el cual apunta en alguna dirección. Los momentos magnéticos que dominan están aleatoriamente distribuidos resultando en un momento magnético neto de cero del material. Cuando el material ferromagnético es posicionado en un campo magnético, los momentos magnéticos de los dominios se alinean a lo largo de la dirección del campo magnético aplicado formando un gran momento magnético neto. Un momento magnético residual existe incluso después que el campo magnético haya sido removido (Rahimi, 2010). En los materiales paramagnéticos (como el gadolinio, magnesio, litio y tántalo) un átomo tiene un momento magnético neto debido a los electrones no apareados, pero sus dominios magnéticos están ausentes. Cuando un material paramagnético es posicionado en un campo magnético, los momentos magnéticos de los átomos se alinean a lo largo de la dirección del campo magnético aplicado formando un momento magnético neto débil. Estos materiales no retienen momentos magnéticos cuando se quita el campo magnético (Yigit, 2012). Por otra parte los átomos de los materiales diamagnéticos (como el cobre, plata, oro y muchos otros) poseen un momento magnético neto igual a cero. Estos materiales presentan una respuesta muy débil contra el campo

magnético aplicado debido a la realineación de los orbitales de los electrones cuando se aplica un campo magnético. Estos materiales no retienen momentos magnéticos cuando el campo magnético es removido (Sandhu, 2010). Los materiales antiferromagnéticos (como lo son el MnO, CoO, NiO y el CuCl₂) son compuestos de dos diferentes átomos que ocupan diferentes posiciones enrejadas. Los dos átomos tienen momentos magnéticos que son iguales en magnitud y son opuestos en dirección, los cuales resultan en un momento magnético neto igual a cero (Hussein, 2014). Los materiales ferrimagnéticos (como la magnetita Fe₃O₄ y la maghemita γ -Fe₂O₃) son también compuestos de diferentes átomos que residen en distintos arreglos simétricos con momentos magnéticos anti-paralelos. Sin embargo, en estos materiales, los momentos magnéticos no se cancelan mientras estos tengan magnitudes disímiles los cuales resultan en un momento magnético espontáneo neto. Cuando se posicionan en un campo magnético, los materiales antiferromagnéticos y ferrimagnéticos muestran un comportamiento similar a los ferromagnéticos (Wang, 2011).

1.2 Nanopartículas de ZnO

Como ya se ha mencionado anteriormente, las nanopartículas de metales inorgánicos han tenido gran importancia debido a sus características distintivas, tales como las catalíticas, ópticas, magnéticas, electrónicas, antimicrobianas, procesos de cicatrización y antiinflamatorios (Hanley, 2009). Estas propiedades se deben principalmente a las variaciones en sus características específicas como lo son el tamaño, distribución atómica y la morfología de las partículas. Entre las nanopartículas de óxidos metálicos, el óxido de zinc es interesante debido a sus vastas aplicaciones, así mismo la nanoestructura del ZnO exhibe una alta eficiencia catalítica, una fuerte absorción y es utilizado frecuentemente en la manufactura de protectores solares, cerámicas, en el procesamiento del caucho, en tratamiento de aguas residuales y como fungicida (Chinnammal, 2015). Así mismo las NPs de ZnO representan una importante clase de materiales aplicados comercialmente, las cuales han sido generalmente aplicadas en diagnóstico, terapéutica, distribución de fármacos, electrónica, cosméticos, productos de higiene personal, aditivos para los alimentos, capacitores magnéticos, actividades catalíticas, semiconductores, microbicidas, agentes protectores contra rayos UV, etc. (Choi, 2014). Las NPs de ZnO tienen una estructura cristalina de wurtzita en condiciones ambientales, la cual tiene una unidad central hexagonal con dos parámetros en red, los cuales están compuestos de dos paquetes hexagonales altamente interpenetrados, los cuales consisten de un tipo

de átomo (Zn o O) desplazados con respecto al otro a lo largo del axis c , los cuales se organizan capa por capa en dirección a lo largo de esta estructura, coordinándose tetraédricamente los iones Zn^{+2} y O^{-2} . La coordinación tetraédrica del ZnO le confiere una estructura no centro-isométrica. En la wurtzita hexagonal del ZnO, cada anión está rodeado por cuatro cationes en cada esquina del tetraedro, exhibiendo de esta manera un enlace covalente con hibridación sp^3 (Kim, 2014).

Debido a sus características, varios métodos de síntesis han sido empleados para generar una alta variedad de nanoestructuras de ZnO, incluyendo NPs, nanocables, nanovarillas, nanotubos, nanocinturones y otras morfologías complejas, sin embargo los procesos convencionales de síntesis presentan un alto costo y baja pureza; como una solución viable, los métodos en solventes orgánicos presentan un bajo costo y una síntesis más rápida, en adición, la síntesis de NPs de ZnO en rutas solvotérmicas da como resultado final una forma y tamaño bien definidos de las NPs. En este aspecto, el principio de la síntesis solvotérmica está basado en la descomposición del precursor organometálico a la de un material oxidado debido a las altas temperaturas de exposición. Se ha observado que la morfología, tamaño y homogeneidad de los productos sintetizados dependen en mayor medida de la concentración del reactivo, el solvente, las condiciones de reacción, la naturaleza del ligando, el tiempo de reacción y la temperatura de reacción. Dichos parámetros explican que la reacción de complejos organometálicos con oxígeno o humedad, conduce exotérmicamente a la generación del material en forma de hidróxido y por acción de hidrólisis y condensación se lleva a cabo la oxidación exotérmica. En general, el mecanismo de síntesis de NPs involucra tres pasos, nucleación, crecimiento y maduración (Chinnammal, 2015).

ANTECEDENTES

2.1. *Helicobacter pylori*

El patólogo Robin Warren a principios de 1979, observó por primera vez a *Helicobacter pylori* en una biopsia gástrica proveniente de un paciente con gastritis crónica activa. Sus observaciones en estudios histopatológicos, continuaron por un par de años, asociando la presencia del microorganismo con el desarrollo de gastritis. Durante este tiempo hubo intentos para aislar a la bacteria, sin éxito alguno (Ruiz, 2001). En 1981, el médico gastroenterólogo Barry Marshall se unió a la investigación realizada por Warren confirmando esta asociación. La bacteria morfológicamente se parecía a un *Campylobacter spp*; razón por la cual fue llamada *Campylobacter pyloridis*, sin embargo fue hasta 1982 que *Helicobacter pylori* fue aislada por primera vez, observándose crecimiento después de cinco días de incubación (Smith, 2014). Finalmente fue en 1984, que se publica en la revista Lancet la asociación de *Helicobacter pylori* con la gastritis crónica y por primera vez se sugirió que la úlcera péptica pudiera ser de etiología infecciosa. En 1994 se efectuó una conferencia consensus por los Institutos Nacionales de Salud, donde *Helicobacter pylori* se ha declarado la principal causa de úlcera péptica y en este año la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer de la Organización Mundial de la Salud, declara que *Helicobacter pylori* es un patógeno cancerígeno en humanos (Testerman, 2014).

2.1.1. Características morfológicas y tintoriales

Helicobacter pylori es un microorganismo Gram-negativo, curvo, espirilado, que mide aproximadamente 3.5 por 0.5 μ m, posee múltiples flagelos en uno de sus polos (de cinco a seis) lo que lo hace altamente móvil (García, 2014). Posee un glucocalix con un grosor de 40 nm en grosor que le permite unirse a las microvellosidades de las células epiteliales, dando un aspecto de estar unidas por hilos. Es un microorganismo de crecimiento lento, tomando de 3 a 5 días para poder apreciar las colonias en medio sólido, para su crecimiento en el laboratorio se requiere de condiciones microaerófilas (10% de CO₂) y medios artificiales ricos en nutrientes como: agar sangre, peptona, triptona, extracto de levadura, glucosa y sales como cloruro de sodio y bisulfito de sodio, complementados con sangre de caballo, suero bovino fetal (SFB) o ambos (Carron, 2006). Su característica bioquímica más sobresaliente es la abundante producción de la enzima ureasa, la cual cataliza la hidrólisis de la urea en amonio y bióxido de carbono; la producción de amonio es un mecanismo importante para la supervivencia de la bacteria en un ambiente con pH bajo, presente en el jugo gástrico. Esta bacteria coloniza el estómago del humano y como característica especial dicha

colonización se presenta en forma de parches en la mucosa gástrica donde permanece por años o décadas (Folkesson, 2008). Las personas infectadas con este organismo tienen una inflamación gástrica crónico-activa que se puede presentar tanto en el antro pilórico como en el fondo gástrico, superficial y difusa que involucra tanto al antro como al fondo gástrico. Esta inflamación está relacionada con las alteraciones patológicas en la mucosa gástrica presentes en las diferentes enfermedades gastroduodenales asociadas con la infección por *Helicobacter pylori* (White *et. al.* 2014).

2.1.2. Epidemiología

Los estudios epidemiológicos han mostrado que la infección por *Helicobacter pylori* está presente en la población a nivel mundial. Sin embargo, la incidencia de la infección entre países desarrollados y en vías de desarrollo es muy diferente. Siendo en los Estados Unidos la incidencia anual de infección ente el 0.5 y el 1% para menores de 10 años y la infección aumenta hasta en un 50% en adultos. Por otro lado, se ha observado que entre un grupo de afroamericanos, hípanos e indios nativos de ese país, la infección por el microorganismo se presenta en edades tempranas con una incidencia del 70 al 80% y la transmisión familiar es alta (Roesler, 2013). Por el contrario, se estima que en los países en desarrollo la mayoría de las personas (del 80 al 90%) se infectan con *Helicobacter pylori* a una edad promedio de 10 años. Se han investigado muchos factores, pero todos tienen como denominador común el bajo nivel económico. El hacinamiento, la vivienda insalubre, el agua contaminada, la promiscuidad y la consanguinidad están involucrados. El residir en comunidades cerradas tales como hogares para pacientes con retraso mental, hospitales de estancia prolongada para enfermos crónicos y orfanatos son otros factores que aumentan la incidencia; en estas circunstancias, el contacto entre individuos es más cercano que el normal y las normas de higiene son menores (Cole, 2003). De hecho, se ha insistido en que la infección por *Helicobacter pylori* es un mejor indicador de las carencias. En países de Latinoamérica como Costa Rica, Brasil y México se reporta una incidencia anual de 45 enfermos de cáncer gástrico asociado a *Helicobacter pylori* por cada 100 000 habitantes; por otra parte en México se han observado regiones de mayor riesgo, como las zonas altas del estado de Chiapas donde existen grupos indígenas que presentan una alta incidencia de cáncer gástrico asociado con el microorganismo (López, 2010). En un estudio seroepidemiológico realizado en 2007 se mostró que el 20% de los niños de un año de edad presentaban anticuerpos contra *Helicobacter pylori* y que la seropositividad

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

aumentó hasta un 50% de los niños de 10 años de edad, lo que indica que la infección por el microorganismo en nuestro país se adquiere a edades tempranas. La tasa de seropositividad fue aproximadamente del 5% anual durante los primeros 10 años de vida y aumentó en un 80% en los adultos jóvenes entre los 18 y 20 años de edad (Atapoor, 2014). En la actualidad no se conoce un reservorio no humano, lo que hace suponer que la infección es específica para el hombre, aunque se ha documentado la infección experimental por *Helicobacter pylori* en primates, los cuales desarrollan un cuadro clínico de gastritis y úlcera muy parecido a la del humano. Los mecanismos específicos de transmisión de la bacteria siguen sin determinarse, pero por lo común de la infección y su amplia distribución se postula que ocurre de persona a persona, por las vías oral-oral y oro-fecal (Alzahrain, 2014). La familia del enfermo en la transmisión vertical es probablemente un factor de riesgo importante para perpetuar la infección. Dentro de las consideraciones epidemiológicas se debería tomar el diagnóstico y tratamiento de los miembros de la familia ya que frecuentemente el tratamiento es personal y no se investiga si hay otros miembros de la familia que presenten síntomas similares, lo que repercutiría en la eficacia del tratamiento haciendo difícil de valorar si la infección en un individuo que ha recibido tratamiento se debe a la reinfección por el tipo de cepa que predomina en el grupo familiar o por una cepa externa, o bien si se trata de recrudescencia de la enfermedad por cepas resistentes al tratamiento antimicrobiano elegido (Goh, 2011).

2.1.3. Factores de virulencia

A pesar de la alta incidencia de la infección por *Helicobacter pylori* en todo el mundo, no todas las personas infectadas por esta bacteria desarrollan una enfermedad, al parecer el tipo de cepa bacteriana que se encuentra colonizando la mucosa gástrica tiene una función determinante en el desarrollo de la enfermedad. Se han propuestos varios mecanismos de virulencia para *Helicobacter pylori*, uno de ellos es la producción de ureasa (Wong, 2014). Esta enzima se caracteriza por tener un peso molecular de 550 kDa y está formada por dos subunidades UreA y UreB; esta enzima es una de las proteínas más abundantes, ya que constituye un 5% del total de proteínas que sintetiza el microorganismo. La ureasa hidroliza la urea, ésta necesita que dos iones de níquel (Ni^{+2}) se fijen en su sitio activo redituando amonio y bióxido de carbono (Dunne, 2014). El amonio es un agente neutralizante de ácido clorhídrico del estómago, que ocasiona transitoriamente aclorhidria con un pH gástrico neutro. Este proceso permite que *Helicobacter pylori* se mueva rápidamente y atraviese la capa de moco para llegar al epitelio gástrico. Más aún, la ureasa *per se* y el amonio como

producto final del desdoblamiento, tienen una función importante en la inflamación induciendo la respuesta inmune, ya que el amonio actúa como factor quimiotáctico que activa a los monocitos y leucocitos polimorfonucleares para liberar citocinas y ocasiona una respuesta inflamatoria localizada con daño en el tejido del epitelio gástrico (Hagymasi, 2014). Otro factor de virulencia es el lipopolisacárido (LPS) que posee en su antígeno “O” los carbohidratos de Lewis “X” (*Lex*) o Lewis “Y” (*Ley*) o ambos. Se ha demostrado que *Lex* es similar al antígeno presente en el grupo sanguíneo 02 y en la superficie de las células epiteliales gástricas. Los genes involucrados en estas similitudes son los que codifican para la glucosiltransferasa y la fucosiltransferasa. Estos antígenos tienen una participación dual en la patogénesis; por un lado, producen un mimetismo molecular, que posiblemente ayuda al microorganismo a evadir la respuesta inmune en el momento de la colonización en el estómago y con ello favorece su permanencia por tiempo prolongado en el nicho gástrico y por el otro lado la inducción de una respuesta autoinmune contra los antígenos de Lewis que expresa *Helicobacter pylori* y que son compartidos por las células eucariotas contribuyendo al daño directo o indirecto (Ierardi, 2013). Aproximadamente el 60% de las cepas de *Helicobacter pylori* producen proteínas codificadas por genes (*picB* y *cagE*) localizados en una isla de patogenicidad denominada *cag* (PAI-*cag*). Estos genes se encuentran involucrados con la respuesta inflamatoria, favoreciendo la inducción de la interleucina-8 la cuál es un potente mediador inflamatorio que recluta y activa neutrófilos. Esta isla tiene un tamaño aproximado de 40kb, con alrededor de 40 genes. PAI-*cag* presenta características similares a las de otras islas de patogenicidad encontradas en *E. coli*, *Salmonella* y *Yersinia* (Lina, 2014). La PAI-*cag* puede estar organizada de forma diferente dependiendo de la cepa que se estudie. Sin embargo la variabilidad existente entre las cepas de *Helicobacter pylori* no solo está dada por la organización de PAI-*cag*, si no por otras regiones en el cromosoma. Otro factor de virulencia importante es una proteína de membrana externa denominada Proteína Asociada a la Citocina (CagA), la cual es codificada por el gen *CagA* que se encuentra localizado en el extremo 3' de PAI-*cag*, esta proteína tiene un peso molecular que varía entre 120 y 140 kDa, es altamente inmunogénica y cuya función se desconoce. Sin embargo, la detección de anticuerpos contra CagA de *Helicobacter pylori* está bien documentada debido a su relación en 87.5% en pacientes con úlcera duodenal, 76% en pacientes con úlcera gástrica y 56.4% en pacientes con dispepsia no ulcerosa (Moyat, 2014). La producción de una citoxina vacuolizante (VacA) es, sin lugar a dudas, otro factor de virulencia importante de *Helicobacter pylori*. VacA es responsable de la formación *in vivo* de vacuolas en células del epitelio

gástrico. VacA esta codificada por el gen *VacA* que es constitutivo y se encuentra en una sola copia en el cromosoma de *Helicobacter pylori*, este gen es responsable del grado de inflamación de la mucosa gástrica y la región media del gen es responsable del daño en tejido epitelial (Yonezawa, 2013). Está bien documentado que los genotipos de VacA son buenos indicadores de la enfermedad ulcerosa, siendo la relación de un 90% en pacientes con úlcera duodenal. En un estudio realizado en México se mostró que el 60% de los pacientes mexicanos presentaron infección múltiple con cepas de *Helicobacter pylori* con diferentes alelos de VacA, sugiriendo que la infección múltiple en la población esta mediada por tres tipos de mecanismos de acción de estas citoxina, los cuales son:

- a) La formación de grandes vacuolas en el citoplasma de las células epiteliales, que se originan a nivel perinuclear hasta llenar completamente el citosol de la célula lo que origina su muerte (Morales, 2013).
- b) Aumento en la permeabilidad de las células polarizadas in vitro al paso de moléculas de bajo peso molecular, un fenómeno que, al parecer, aumenta el flujo de nutrimentos del interior de la célula hacia la submucosa favoreciendo la sobrevivencia de *Helicobacter pylori* (García, 2014).
- c) Formación de canales a través de la membrana de lípidos de la membrana celular. Se ha demostrado que la citoxina se activa por un pH ácido, formando canales selectivos de baja conductividad de aniones y dependientes de voltaje. El aumento en la conductividad de iones en las membranas endosomales activa la ATPasa V electrogénica favoreciendo el flujo de H^+ y Cl^- del citosol al lumen del endosoma, ocasionando cambios osmóticos que aumentan el transporte de agua y, por consiguiente, un hinchamiento del compartimento endosomal (López, 2010).

Además de estos factores de virulencia que participan claramente en el desarrollo de estados patológicos, *Helicobacter pylori* cuenta con otros mecanismos por los cuales produce daño directo al tejido gástrico como son: la producción de una proteína de 150kDa que favorece la adherencia de neutrófilos a células endoteliales (Stark, 1998). La inhibición de la respuesta secretora de moco por las células productoras de moco, produce fosfolipasas tipo A₂ y C que rompen la capa protectora rica en fosfolípidos de las membranas apicales de las células de moco. Por otra parte, *Helicobacter pylori* produce una mucinasa que está involucrada con la ruptura de mucosa gástrica. *Helicobacter pylori* induce la síntesis de radicales libres (como Especies Reactivas de Oxígeno ROS),

favoreciendo la muerte celular por apoptosis, produciendo Superóxido dismutasa, catalasa y proteínas de choque térmico. Con todos estos mecanismos con los que cuenta *Helicobacter pylori*, el papel del microorganismo en las diferentes patologías gástricas en la actualidad no tiene dudas (Salamana, 2013).

2.1.4. Tratamiento

A pesar de los avances médicos, es necesaria una conversación exhaustiva con el paciente antes de iniciar un tratamiento anti- *Helicobacter*. Con la finalidad de dar a conocer las posibilidades del poco éxito de erradicación del microorganismo, así como la generación de efectos colaterales de los medicamentos, enfatizando la necesidad de un cumplimiento estricto del régimen completo, a pesar de dichos efectos (Yamaoka, 2010). Aunque la mayoría de los pacientes con úlcera duodenal experimentan una notoria mejoría en sus síntomas tras una erradicación parcial de la bacteria, pueden llegar a persistir los síntomas siendo necesario un tratamiento invasivo, agresivo y específico para cada sintomatología (Yonezawa, 2009). El tratamiento ideal para la erradicación de *Helicobacter pylori* deberá ser sencillo, seguro, sin efectos colaterales, con una eficacia del 100% y de bajo costo. Sin embargo, este aún no se define y no ha sido posible realizar recomendaciones específicas para un esquema óptimo de tratamiento (Morales, 2013).

2.2. Staphylococcus aureus

El género *Staphylococcus* pertenece a la familia *Micrococcaceae*, la cual está formada además por los géneros: *Micrococcus*, *Stomatococcus* y *Planococcus*, siendo los *Staphylococcus* pertenecientes al género *Micrococcus* y son los más importantes desde el punto de vista médico. Este género está formado por 33 especies y 15 subespecies, siendo una en particular la más frecuentemente encontrada como causante de enfermedad en el humano (*Staphylococcus aureus*), aunque es importante denotar que esta especie se puede encontrar como parte de la microbiota autóctona del tracto respiratorio superior del humano (Sambanthamoorthy, 2008).

2.2.1. Características morfológicas y tintoriales

Staphylococcus aureus es una bacteria esférica, Gram-positiva, con un tamaño promedio de 1µm de diámetro, se caracteriza por ser inmóvil, no forma espora, catalasa positiva y generalmente no tiene cápsula, es anaerobia facultativa y se presenta como células en forma de racimos de uvas. Su pared celular está formada de péptidoglucanos y ácido teicoico (Archer, 2011). El di-aminoácido presente en el péptidoglucano es L-lisina, en tanto que el puente interpeptídico es una oligolisina, resistente a la lisozima pero susceptible a la lisostafina. La estructura antigénica de *Staphylococcus aureus* es muy compleja y variada. Las distintas especies comparten varios antígenos entre los cuales se encuentran los de naturaleza proteica, polisacarídica, y de ácido teicoico, éste último es responsable de la adherencia de *Staphylococcus aureus* a las células epiteliales de la mucosa nasal. Las cepas que tienen cápsula, la cual está formada por polisacáridos son más virulentas (Kulkarmi, 2012). El determinante antigénico más importante de *Staphylococcus aureus* está representado por el polisacárido A, específico de grupo y ubicado en la pared celular. Este determinante antigénico se encuentra dado por la unidad N-acetilglucosamina con uniones alfa o beta al ribitol del ácido teicoico, capaz de inducir la producción de anticuerpos séricos (García, 2013). La proteína A, constituye otro componente de superficie de *Staphylococcus aureus* y se caracteriza por presentar cuatro residuos de tirosina completamente expuestos, responsable de la actividad biológica. Se encuentra unida covalentemente a la mureína, aunque durante su desarrollo es capaz de liberarla al medio de cultivo. Además de ser anti-complementaria y antifagocítica, promueve reacciones de hipersensibilidad, produce lesiones plaquetarias, es quimiotáctica y centra su capacidad para interactuar con IgG₃ (Cramton, 1999).

2.2.2. Factores de virulencia

Staphylococcus aureus produce una amplia variedad de exotoxinas que le capacitan para colonizar y causar patologías en el hospedero (Boles, 2011). Casi todas las cepas secretan enzimas que incluyen: cuatro hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta), nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasas y colagenasa. Algunas cepas producen una o más exotoxinas adicionales como son: la toxina del síndrome del choque tóxico; enterotoxinas estafilocócicas (A, B, C, D, E, H, I), y la toxina exfoliativa (A y B) (Fux, 2004). Entre las principales toxinas que secreta esta bacteria se encuentran:

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- a) **Toxinas epidermolíticas.** Se conocen dos tipos de toxinas que actúan sobre la epidermis; exfoliativa A y B, cuyos genes se encuentran localizados en el cromosoma para el tipo A, en tanto para el B se localizan en plásmido, el cual tiene además los genes que codifican para la tolerancia al cadmio y producción de bacteriocina (Thurlow, 2011).
 - b) **Enterotoxinas.** La enterotoxina A, se encuentra codificada en un bacteriófago. La B no se sabe en qué parte del genoma se encuentran los genes asociados a su producción. La enterotoxina C está codificada en cromosoma. En tanto que la D esta codificada en un plásmido que le confiere la capacidad para la producción de penicilinas y tolerancia al cadmio. La mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus*, sintetizan enterotoxina A, pudiendo además producir algún otro tipo de ellas (Sambanthamoorthy, 2008).
 - c) **Hemolisinas y estafilolisinas.** A este grupo pertenecen las hemolisinas alfa, beta, gamma y delta. Productos extracelulares que afectan eritrocitos y otras células de diferentes especies. Mientras que la leucocidina se encuentra restringida a su acción en granulocitos y macrófagos. La mayoría de las cepas producen una o más combinaciones de hemolisinas. Es la beta-hemolisina la que se produce más frecuentemente por cepas de origen animal. Esta es una fosfolipasa C, específica de la esfingomiélin activada por iones de magnesio. También es llamada hemolisina caliente-fría, ya que su efecto lítico no se manifiesta plenamente a menos que la mezcla de sangre y toxina o cultivos en agar sangre, sean colocados a bajas temperaturas tras su incubación a 37°C. La alfa-hemolisina es la principal hemolisina de cepas de origen humano y daña también a las plaquetas. La gamma-hemolisina está formada por dos proteínas básicas que actúan conjuntamente. Son sensibles a ellas los eritrocitos de conejo, humanos y cordero. Es inhibida por agar, compuestos azufrados, colesterol y otros lípidos. Es producida por la mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* de origen humano y daña eritrocitos de diferentes especies, leucocitos y protoplastos bacterianos debido a su efecto surfactante (Gaupp, 2013).
 - d) **Leucocidina de Panton-Valentine.** Presenta especificidad por neutrófilos y macrófagos de humanos y conejos, teniendo un efecto dermonecrótico en este último. Su sitio de acción es la membrana celular alterando su permeabilidad (salida de K^+ y Ca^{+2}) y activando ciertas enzimas de membrana. El gangliósido GM, actúa como receptor del complejo llevando finalmente a la lisis celular (Leid, 2002).

Como se mencionó anteriormente esta bacteria secreta y posee enzimas que actúan como parte de los factores de virulencia, entre las principales enzimas características de esta bacteria se encuentran:

- a) **Colagenasa.** Es una proteasa considerada un determinante primario de patogenicidad. Sin embargo, como consecuencia de sus propiedades sobre el organismo, es un factor que promueve la diseminación del patógeno en el cuerpo (Boles, 2010).
- b) **Hialuronidasa.** Familia de enzimas que actúa sobre el cemento intracelular. Tiene una condición equivalente al descrito por la colagenasa. Considerado también como factor de diseminación (Boles, 2008).
- c) **Fibrinolisisina.** Algunas especies especialmente de origen humano producen estafiloquinasa, también llamada factor de Müller o fibrinolisisina. Aquellas cepas productoras de grandes cantidades de fibrinolisisina, pueden aparecer como coagulasa negativas, sobre todo después de largos períodos de incubación (Boles, 2011).
- d) **DNAsas.** *Staphylococcus aureus* produce una nucleasa resistente a calor (termonucleasa, DNAasa, fosfodiesterasa), la cual, presenta propiedades de endo y exonucleasa, con la que, el ADN y ARN pueden ser degradados (Lebeaux, 2013).
- e) **Penicilinasas.** También llamadas betalactamasas son enzimas que producen hidrólisis del anillo betalactámico, lo cual conduce a la pérdida en la actividad antimicrobiana, contribuyendo a la resistencia del microorganismo. Estas betalactamasas son mediadas por los plásmidos R, inducibles, que difunden al espacio periplásmico para alcanzar su sitio de acción, que en caso de ser penicilina lo convierte en ácido penicilánico, molécula que no ejerce ninguna acción inhibitoria. En las cefalosporinas, además de la ruptura del enlace betalactámico hay una mayor degradación del antimicrobiano. *Staphylococcus aureus* es considerado el principal productor de betalactamasa entre las bacterias Gram positivas (Chew, 2014).

2.2.3. Tratamiento y control

Las infecciones por *Staphylococcus aureus* tienen un espectro extraordinariamente amplio en sus localizaciones y gravedad. Las formas graves se presentan frecuentemente en pacientes

inmunosuprimidos así como en edades extremas. Se considera que *Staphylococcus aureus* causa aproximadamente el 40% de las neumonías, 20 – 40% de las septicemias y 30 – 90% de las infecciones de heridas, aunque estos datos varían acuerdo al hospital y grupos de edades. En caso de septicemias por *Staphylococcus aureus*, en aquellas situaciones en que el microorganismo sea sensible a la penicilina, ésta puede administrarse en dosis de 20 – 40 millones de U/día en adulto y de 3 – 10 millones de U/día en recién nacidos (García, 2013). En aquellos casos en que *Staphylococcus aureus* sea resistente a dicho antibiótico, la flucloxacilina (6 – 12g/día en 4 – 6 dosis) es el fármaco de elección en niños, a dosis de 3 mg/kg, en 3 – 4 administraciones intravenosas. Como alternativa, una cefalosporina de primera generación (cefalotina o cefazolina), a dosis de 6g/día para adulto y 20 mg/kg en niños. En pacientes con alergia a penicilinas la vancomicina a dosis de 2g/día en adulto y 4 mg/kg en niños, repartidos en dos tomas es el fármaco de elección (García, 2014). La duración del tratamiento depende de la existencia de complicaciones. Como norma general la presencia de focos supurativos viscerales es la indicación de tratamientos durante 4 – 6 semanas. En ausencia de aquellos, 12 – 14 días de terapia con antibiótico es suficiente para una remoción parcial de la bacteria. En el caso de la meningitis producida por *Staphylococcus aureus* posterior a la septicemia, endocarditis, infecciones óticas y nasales, el tratamiento se establece a base de flucloxacilina y cloxacilina por vía intravenosa, inicialmente hasta que se establezca la sensibilidad de la cepa causante del proceso (Gaupp, 2013). En pacientes alérgicos a las penicilinas, la cefuroxima es una forma de tratamiento alternativo, ya que llega mejor al líquido céfalo-raquídeo que otras cefalosporinas. En el caso de infecciones de heridas, el antimicrobiano de elección son las penicilinas estables a la penicilinas y como tratamiento alternativo: clindamicina. Para osteomielitis por *Staphylococcus aureus*, se administra una penicilina estable a la penicilinas. Las alternativas son clindamicina y ciprofloxacino (Thurlow, 2011).

Como ya se mencionó con anterioridad la diseminación de *Staphylococcus aureus* de persona a persona es muy difícil de controlar. El lavado de manos y el cubrir las superficies cutáneas expuestas disminuyen el riesgo de infección durante la intervención quirúrgica (Mooremeler, 2014). También es difícil el control de la diseminación de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina, debido a que los portadores nasofaríngeos asintomáticos constituyen la fuente más común de estos microorganismos. Se han obtenido buenos resultados por medio de la quimioprofilaxis con el uso combinado de vancomicina y rifampicina; pero como ya se mencionó anteriormente debido a las

características de poder ser multi-drogo resistentes no existe un tratamiento preventivo que erradique a *Staphylococcus aureus* con un 100% de eficacia (García, 2013).

2.3. Biopelículas y su importancia médica

Las bacterias son capaces de crecer adheridas a casi todas las superficies, formando comunidades complejas estructuralmente, en 1970 el término “biopelícula” fue utilizado para describir estructuralmente el complejo ecosistema bacteriano que le permite a las bacterias funcionar colectivamente de una forma coordinada, y se distribuyen en ambientes naturales, industriales y clínicos mostrando ser estructuras críticas en muchas infecciones crónicas (Yonezawa, 2013). Desde entonces, se ha establecido que la mayoría de las bacterias existen en complejos ecosistemas microbianos unidos a superficies y no tanto como organismos planctónicos. Por lo tanto, el crecimiento planctónico en cultivo puro no es como la bacteria normalmente existe en la naturaleza (Carron, 2006). En la naturaleza, las biopelículas son estructuras asociadas a superficie con microorganismos comunes encapsulados dentro de una matriz secretada de exopolisacáridos. Las biopelículas pueden contribuir a la patología humana y reducir el desempeño de dispositivos médicos implantables, debido a que estas estructuras bacterianas expresan propiedades, que aumentan la resistencia a agentes antimicrobianos. Se cree que este proceso contribuye de manera importante al desarrollo de las enfermedades infecciosas (Giao, 2008). Por otra parte, en condiciones naturales, la formación de biopelículas microbianas a menudo permite simbiosis multiestáticas. Hay muchos beneficios que una comunidad de bacterias debe de recibir de la formación de biopelículas, entre las cuales están la resistencia a antimicrobianos, protección de protozoarios y a la respuesta inmune del huésped. Una posible razón para el incremento de la resistencia a estrés ambiental observada en biopelículas parece ser la incrementada porción de bacterias persistentes dentro de la estructura (Hestvik, 2010). Se ha propuesto que las células persistentes son protegidas de la acción de antibióticos porque expresan sistemas toxina-antitoxina donde el objetivo de los antibióticos es bloqueado por las toxinas moduladoras. En adición a un aumento en las células persistentes, la presencia de una matriz extracelular protege constitutivamente a las células de agresiones externas (Pich, 2013). La matriz extracelular también puede actuar como una barrera de difusión para moléculas pequeñas. Relacionado a esto, la difusión de nutrientes, vitaminas o cofactores en la biopelícula, es más lento resultando en una comunidad bacteriana en la cual algunas de las células son metabólicamente inactivas. Además, la tasa de

crecimiento bacteriano está influenciada por el hecho que las células dentro de la biopelícula están confinadas a un espacio limitado. Esta condición es similar a la fase estacionaria creada en condiciones de laboratorio (Posselt, 2013). Por lo tanto, la formación de biopelículas representa la fase estacionaria natural del crecimiento bacteriano. Durante la fase estacionaria, la bacteria cambia profundamente su fisiología para incrementar la producción de metabolitos secundarios, como son algunos antibióticos, pigmentos y otras moléculas pequeñas (Oleastro, 2013). Los metabolitos secundarios también funcionan como moléculas de señalización para iniciar los procesos de formación de biopelículas o para inhibir la formación de biopelículas de otros organismos que invaden el mismo hábitat (López, 2010). Por lo tanto, es crítico conocer mejor la composición y los factores que conducen a su formación. La formación de biopelículas se inicia cuando la bacteria se convierte de un estado planctónico a su forma común, en el cual están firmemente unidas a superficies bióticas o abióticas, por lo tanto el crecimiento de las bacterias en las biopelículas se dan en forma de agregados multicelulares encapsulados en una matriz extracelular producida por ellas mismas (Yonezawa, 2013). Los ácidos nucleicos extracelulares participan en la formación de algunas biopelículas bacterianas, así mismo la matriz extracelular de biopelículas microbianas contienen polisacáridos y enzimas que pueden modificar la propagación y estabilidad de la propia biopelícula, dependiendo de las condiciones medio ambientales, sin embargo, algunos tipos de bacterias precipitan hidroxapatita intracelular o de las vesículas de la pared celular que podría interactuar potencialmente con células de mamíferos durante la formación de biopelículas, iniciando las respuestas inflamatorias características de estas estructuras bacterianas (Schwartz, 2009). Por lo tanto las biopelículas bacterianas están frecuentemente embebidas en su propia matriz extracelular producida por ellas mismas; la matriz de sustancia polimérica extracelular (EPS), la cual puede constituir hasta el 90% de la biomasa de la biopelícula, es una mezcla compleja de exopolisacáridos, proteínas, ADN y otras macromoléculas (Yonezawa, 2009). Por lo tanto las infecciones nosocomiales crónicas por bacterias Gram positivas y Gram negativas al formar biopelículas se han convertido en uno de los problemas médicos con mayor prevalencia en los últimos años, debido a la infección crónica de implantes prostéticos que pueden servir como foco séptico particularmente en pacientes inmunocomprometidos. Una vez que las biopelículas se han formado en las superficies de implantes prostéticos como pequeñas capas, pueden ser muy difíciles de tratar clínicamente debido a todos los mecanismos de defensa que la bacteria obtiene dentro de la biopelícula. los organismos más frecuentemente aislados en asociación con ciertos tipos de infecciones relacionadas con

biopelículas en implantes biomédicos, incluyendo catéteres centrales venosos, agujas para fluido cerebro-espinal, válvulas prostéticas para corazón, implantes de lentes oculares, catéteres intravasculares periferales, cánulas endotraqueales y de traqueotomía, catéteres para diálisis peritoneal, cánulas nasogástricas y lentes corneales son *Staphylococcus aureus* y *Helicobacter pylori*, lo que representa a estos microorganismos como una amenaza clínica seria debido a su alta morbilidad y mortalidad comparada con los modelos de bacterias aisladas o de vida libre (Cramton, 1999).

2.3.1. Formación de biopelículas *in vitro*

En detalle, el mecanismo molecular que regula la formación de biopelículas varía grandemente entre las diferentes especies de bacterias, sin embargo, algunas características son reconocidas como atributos generales de la formación de biopelículas, un ejemplo de esto es la matriz extracelular que mantiene a las células unidas (Roesler, 2013). Esta matriz está compuesta por un biopolímero polisacarídico junto con otros compuestos como son proteínas y ADN. La naturaleza de matriz exopolisacarídica varía grandemente dependiendo de las condiciones de crecimiento, medio y sustratos. La mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* usan un polímero de N-acetil glucosamina (PNAG) también referido como polisacárido intracelular de adhesión (PIA), para formar biopelículas. El operón *ica* codifica para la maquinaria que sintetiza este polímero, aunque se ha demostrado que la depleción de este operón disminuye la habilidad de formar biopelículas por medio de una vía independiente de *ica*. Este mecanismo confía la capacidad de *Staphylococcus aureus* para expresar una variedad de proteínas de adhesión que le permiten a las células unirse y colonizar una gran variedad de superficies (Boles, 2008). Como se mencionó con anterioridad, la matriz extracelular de las biopelículas también alberga proteínas de adhesión. Por ejemplo, la matriz de *Staphylococcus aureus* alberga proteínas asociadas a biopelículas (conocidas como Bap) que son necesarias para la formación de estas estructuras. Estas proteínas se encuentran ancladas a la pared celular de *Staphylococcus aureus* y sirven para mantener a las células unidas dentro de la biopelícula, probablemente por la interacción con otras proteínas en la superficie de otras células vecinas (López, 2010). A diferencia de la concentración de proteínas Bap, esta bacteria también puede expresar una cantidad menor de proteínas asociadas a la matriz extracelular, denominadas como TasA y su depleción disminuye la capacidad de la bacteria para producir exopolisacáridos. Recientemente se ha demostrado que TasA forma filamentos extracelulares que tiene propiedades

amiloideas y se cree que juega un papel estructural en la matriz extracelular (Kulkarni, 2012). TasA no es la primera proteína tipo amiloidea que se implica en la formación de biopelículas, siendo las proteínas *curli* las responsables de formar filamentos amiloideos y son críticas para la formación de biopelículas. Hay otras proteínas de unión a lectina asociadas a matriz que reconocen y se unen a fracciones de carbohidratos, estas facilitan las interacciones célula-matriz o célula-célula dentro de la biopelícula (Fux, 2004). Además de los exopolisacáridos y proteínas, el ADN extracelular (ADNe) también proporciona integridad estructural a la biopelícula, debido a que la matriz de la biopelícula contiene concentraciones importantes de este material genético debido a la lisis celular de bacterias parásitas o viejas y la subsecuente liberación de su material genético a la matriz extracelular, por lo que, la adición de ADNasa a los cultivos inhibe la formación de la biopelícula y disuelve biopelículas maduras (Chew, 2014). La participación de múltiples moléculas en la formación de la matriz extracelular hace imposible presentar una recopilación sencilla de la matriz de la biopelícula (López, 2010). Por lo tanto el desarrollo de biopelículas se da en varios pasos:

- a) Condicionamiento.
- b) Adhesión.
- c) Síntesis de matriz extracelular.
- d) Maduración.
- e) Dispersión.

En este proceso se genera una estructura uniforme de células depositadas alrededor de una matriz que deja canales abiertos, donde el agua puede difundirse libremente. La matriz puede alterar la superficie bacteriana y promover la adhesión de la bacteria a las superficies. Esta ampliamente aceptado que las biopelículas están implicadas en más del 80% de las infecciones crónicas causadas por bacterias (Lebeaux, 2013). La importancia de las biopelículas en medicina es debido a su papel en la persistencia de la infección debido a que la biopelícula no se remueve por completo y las bacterias que la incorporan son 1000 veces más resistentes a los antibióticos y a los sistemas de defensa de los hospederos, esto comparado con bacterias de vida libre (Leid, 2002). Los mecanismos involucrados en la resistencia antibióticos son:

- a) Retrasar la difusión del antibiótico, permitiendo la expresión de los genes de resistencia.
- b) Cambio químico de moléculas como los antibióticos aminoglucósidos los cuales muestran una difusión alterada a través de la matriz de exopolisacáridos cargada negativamente.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- c) La presencia de enzimas hidrolizantes de antibióticos. Muchos de los antibióticos ejercen su efecto sobre bacterias en estado de crecimiento, este estado está en decremento cuando las bacterias estén formando la biopelícula.
 - d) La presencia de ROS como consecuencia del estrés oxidativo por células fagocíticas que aumentan la resistencia bacteriana a los antibióticos a través del incremento de actividad mutagénica en los microorganismos por la inducción de sistemas de reparación de rupturas de ADN (Boles, 2010).

En adición, evidencia de experimentos recientes sugieren que la biopelícula es un factor de virulencia importante en una comunidad bacteriana, debido a que las células bacterianas que residen en la biopelícula pueden adquirir nuevos atributos de virulencia que las bacterias de vida libre no poseen (García, 2014).

Al igual que *Staphylococcus aureus*, los experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* han demostrado que *Helicobacter pylori* pueden tener periodos de vida de formación de biopelículas (Carron, 2006). La primera evidencia de la formación de biopelículas por esta especie bacteriana surgió aproximadamente hace 15 años; donde la obtención de la biopelícula por el crecimiento de la cepa ATCC 43504 de *Helicobacter pylori* en un medio químicamente bien definido (Caldo *Brucella* suplementado con 0.1% de ciclodextrina) era insoluble en agua y estaba adherida a la superficie de vidrio del recipiente en la interfase vidrio-agua (Cole, 2003). Cinco años después, se estudió la capacidad de realizar aislados clínicos y cultivos de referencia de *Helicobacter pylori* en Infusión Cerebro Corazón (ICC) suplementados con la misma concentración de ciclodextrina. Ambos cultivos fueron capaces de formar biopelículas y estas tenían una progresión similar cuando se compararon con las biopelículas producidas por otras bacterias (Folkesson, 2008). Por otra parte, también se analizó el efecto de la mutación específica de los genes *luxS* y el gen de secreción tipo IV *cagE* sobre la formación de biopelículas por *Helicobacter pylori* detectando que ambas mutantes fueron sorprendentemente dos veces más eficientes para la formación de biopelículas que el tipo isogénico salvaje en los cultivos parentales (Alzahrain, 2014). La adherencia de *Helicobacter pylori* a la mucosa gástrica es un paso importante en la interacción positiva de la colonización de las células gástricas epiteliales del hospedero. Esta adherencia esta mediada por la adhesina BabA, la cual se une al antígeno Lewis b y facilita la colonización de *Helicobacter pylori* al epitelio gástrico humano (Giao, 2008). Por otra parte, las células epiteliales gástricas están protegidas por una capa

de moco constituida principalmente por MUC5AC la cual contiene un dominio rico en glicanos (incluyendo el antígeno Lewis b), en contraste a MUC5AC, la mucina MUC6 sintetizada en la mucosa profunda y secretada por las células de la mucosa glandular trabaja como un antibiótico natural para la inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori*, evitando la colonización de la capa de mucosa gástrica profunda por el patógeno (Yonezawa, 2009). Debido a que esta mucina evita la adhesión de *Helicobacter pylori* a las células del epitelio gástrico en condiciones *in vivo*, se ha estudiado el efecto de esta mucina sobre la formación de biopelículas por *Helicobacter pylori*, observando que al incrementar las concentraciones de la mucina favorece significativamente el crecimiento planctónico de *Helicobacter pylori* sobre la formación de biopelículas, sugiriendo que esta especie vive principalmente en biopelículas debido a que prolifera rápidamente como bacteria de vida libre después de haber estado en contacto con la mucina en el estómago de humano (Wong, 2014). Por otra parte, se ha demostrado que todos los cultivos de *Helicobacter pylori* son capaces de formar biopelículas en la interfase aire-agua de un cubreobjetos. La capacidad aumentada para la formación de biopelículas en algunas cepas de *Helicobacter pylori* puede deberse a la presencia de vesículas fuera de la membrana producidas únicamente cuando esta bacteria está formando las biopelículas, sugiriendo que estas vesículas juegan un papel clave en la formación de estas estructuras (García, 2014). Por otra parte un estudio realizado en 1998 reportó la formación de biopelículas por *Helicobacter pylori* en cultivos continuos, esto debido a la sobreproducción de un polisacárido extracelular en medio, el cual contenía una alta concentración de carbono y nitrógeno, a pesar que no se pudo determinar la composición y estructura de la biopelícula formada por *Helicobacter pylori*, el análisis de carbohidratos de un extracto crudo de esta biopelícula demostró la presencia de lípidos con cantidades de carbono entre los C₁₄ y C₁₆, N-acetil glucosamina, fucosa, glucosa, galactosa y glicero-manno-heptosa, la cual está compuesta de LPS de *Helicobacter pylori*, por otra parte este estudio demostró que la antigenicidad de los componentes polisacáridicos de los LPS de *Helicobacter pylori* es pobre y puede variar con respecto al cultivo y al tipo de enfermedad gastroduodenal, por lo que, la presencia de anticuerpos para la biopelícula en alta proporción de pacientes sero-positivos y sero-negativos sugiere que el material de las biopelículas que genera la antigenicidad no son los LPS y que comparte epítomos con otros productos microbianos, así mismo, se demostró que las bacterias que están rodeadas de una gran cantidad de material extracelular tendrán cierta protección contra fluctuaciones en el pH, por otra parte, se ha reportado que el crecimiento de *Helicobacter pylori* en medios que contienen almidón producen colonias mucoides,

lo cual podría extrapolarse a la actividad microbiana en pacientes; debe tenerse en cuenta que la biopelícula formada por *Helicobacter pylori* es insoluble en ácido clorhídrico en concentraciones de 0.2 mol/L, sugiriendo que la producción de EPS por *Helicobacter pylori in vivo* puede proteger al organismo del ácido estomacal durante la infección y la transmisión (Testerman, 2014). En suma, el EPS puede modular la respuesta de las citocinas, cambiando el tipo de respuesta inmune a la infección, por lo que la producción de biopelículas insolubles en agua por *Helicobacter pylori* puede ser importante en el aumento de la resistencia hacia los factores de defensa del hospedero, facilitando la homeostasis y modificando el pH que requiere para el crecimiento y supervivencia de *Helicobacter pylori in vivo* (Stark, 1998). A diferencia de *Helicobacter pylori*, la formación de biopelículas por *Staphylococcus aureus* es a través de un proceso de dos pasos que requiere la adhesión de la bacteria a una superficie de un sustrato seguido de la adhesión célula-célula, formando las múltiples capas de la biopelícula. Como se mencionó con anterioridad, este proceso tardío está asociado con la PIA, la cual está compuesta de glucosaminoglucanos lineales unidos por enlaces β -1-6 y por el locus *ica*, *icaADB* y *C*, en donde *icaA* e *icaD* juntos median la síntesis de oligómeros de azúcar *in vitro*, usando UDP-N-acetil glucosamina como sustrato, por otra parte, la actividad de la enzima N-acetil glucosamina transferasa junto con la actividad de *icaC* generan un producto *in vitro* que es reconocido por un anticuerpo surgido contra la PIA y la mutación de este locus o de la PIA produce defectos en la formación de biopelículas *in vitro* (Cramton, 1999 y Boles, 2010).

2.3.2. Formación de biopelículas *in vivo*

La primera evidencia de la formación de biopelículas *in vivo* surgió en Estados Unidos durante el año 2006; donde se describió que las biopelículas están caracterizadas por una actividad metabólica, crecimiento bacteriano y susceptibilidad a efectos de agentes antimicrobianos disminuidos, estos hallazgos se realizaron por medio de la comparación, por medio de escaneo de microscopía electrónica (SEM), de biopsias gástricas de pacientes con actividad de ureasa positiva (presencia de *Helicobacter pylori*) y ureasa negativa (ausencia de *Helicobacter pylori*), detectando la presencia de una densa biopelícula madura en las biopsias con el patógeno positivo mientras que la biopelícula estuvo ausente en las biopsias con actividad negativa de ureasa, lo cual indica que *Helicobacter pylori* es capaz de formar biopelículas en la mucosa gástrica humana (Carron, 2006). Como consecuencia de este estudio, en la actualidad se ha tratado de entender las causas de las

enfermedades gástricas debido a la formación de biopelículas por esta especie de bacterias, realizando un estudio con biopsias gástricas obtenidas de pacientes que recibían tratamiento anti-*Helicobacter pylori* durante tres meses antes del análisis, buscando la presencia de la bacteria por cultivo y detección por PCR retro-transcripcional (RT-PCR) de los genes *glmM* y *luxS*. Solamente el 30% de las muestras fueron positivas para *Helicobacter pylori* por cultivo, mientras que el 90% de las muestras analizadas por RT-PCR fueron positivas, sugiriendo de esta manera que *Helicobacter pylori* podría estar presente en estos pacientes en su forma de bacteria cocoide viable no cultivable (VBNC). El análisis de las muestras por SEM demostró una forma de espirilo de las células bacterianas en todas las muestras que también fueron positivas por el método convencional microbiológico en cultivo, con algunas células cocoides embebidas en una matriz extracelular. Por otra parte, el mismo estudio hecho con estas muestras positivas solamente por RT-PCR mostró la predominancia de células cocoides. En adición, las muestras positivas para los genes *glmM* y *luxS* también fueron positivas con respecto a lo encontrado en la SEM y el cultivo microbiológico, soportando de esta manera que esta detección es un marcador confidencial de la formación de biopelículas de *Helicobacter pylori in vivo*. Interesantemente, el análisis de susceptibilidad a antibióticos hecho a los cultivos de aislados clínicos demostró que solamente la amoxicilina presenta un efecto parcial sobre las bacterias que se encuentran en la biopelícula (antibiótico usado para la terapia de erradicación de *Helicobacter pylori*), lo cual sugiere que la erradicación de las biopelículas en la actualidad es un proceso desconocido y claramente poco abordado (Folkesson, 2008).

En el caso de *Staphylococcus aureus* su capacidad de formar biopelículas *in vivo* está relacionada con infecciones crónicas en los tejidos de los hospederos, como las osteomielitis, artritis séptica, y endocarditis. La pronunciada capacidad de *Staphylococcus aureus* para producir biopelículas asociada con estas enfermedades ha llamado la atención considerablemente durante la pasada década con el fin de comprender el complejo mecanismo detrás de la formación de estas estructuras persistentes, para desarrollar estrategias que permitan generar su desmontaje y erradicación eficaz (Lu, 2014). Como se mencionó con anterioridad, las biopelículas hechas por *Staphylococcus aureus* están revestidas en una matriz extracelular compuesta de proteínas, polisacáridos, ADNe, y presumiblemente algunos factores específicos de los hospederos. Esta composición precisa de la matriz de la biopelícula varía grandemente dependiendo del estatus fisiológico de la cepa de *Staphylococcus aureus*, los nutrientes viables y las condiciones de prevalencia físicas *in vivo*, donde

el polisacárido de la biopelícula de esta bacteria es un homopolímero parcialmente desacetilado de uniones β -1-6 de acetil glucosamina (PNAG), el cual forma parte de la PIA, por lo que las condiciones *in vivo* que pueden contribuir a la formación de este PNAG son el crecimiento anaeróbico, la presencia de concentraciones sub-inhedoras de antibióticos, altas temperaturas, alta osmolaridad y otras condiciones de estrés, por lo que se ha demostrado que PNAG juega un papel crucial para la formación de biopelículas altamente densas en tejidos animales, en comparación de condiciones *in vitro* donde la matriz está compuesta principalmente de proteínas y ADN (Boles, 2011). Las proteínas conforman el segundo componente más importante en la biopelícula de *Staphylococcus aureus in vivo*, lo que la hace parcialmente susceptible a la acción de las proteasas, se cree que esta alta concentración de proteínas dentro de la biopelícula se debe a la actividad de la proteína para generar la integridad estructural sobre PNAGs, entre las cuales se tienen a las proteínas de unión a fibronectina, proteína A, SasG y la proteína asociada a biopelículas (BAP), aunque esta última no se ha encontrado en altas concentraciones en aislados de muestras humanas (Gaupp, 2013). Una proteína recientemente descrita por tener un papel estructural en la matriz de la biopelícula de *Staphylococcus aureus* es la beta toxina, la cual es capaz de unirse al ADN por medio de enlaces covalentes entre ella misma y esta estructura genómica; este enlace es susceptible a las proteasas, proporcionando el primer enlace entre ADN y proteínas en la formación del esqueleto que da lugar el marco de anclaje para establecer la formación de la biopelícula de *Staphylococcus aureus* (Thurlow, 2011). Por último, el componente que se ha descrito actualmente y que se encuentra en menor concentración en la producción de biopelículas de esta bacteria *in vivo* es el ADN, el cual tiene actividad autocatalítica. Esta actividad de la subpoblación de células resulta en la liberación de ADN genómico que contribuye a la adhesión de las células durante la formación de las biopelículas (Archer, 2011). Se cree que este ADN tiene un papel estructural en la matriz de la biopelícula de *Staphylococcus aureus* y facilita las interacciones entre las células o la superficie, a pesar de estos estudios, las complejidades de las matrices de las biopelículas de *Staphylococcus aureus* no están completamente entendidas, especialmente el papel emergente del ADN debido sus bajas concentraciones y poca capacidad de aislarlo *in vivo* (Boles, 2011)

2.4. Interés biomédico de las NPs

2.4.1. Características físico-químicas de las Nanopartículas Magnéticas

Las nanopartículas magnéticas (MNPs) son aquellas que muestran alguna respuesta a algún campo magnético aplicado; en este sentido la síntesis de materiales magnéticos de tamaños nanométricos es relevante ya que las leyes de la física clásica son diferentes a esta pequeña escala (Tran, 2010). Como el tamaño de la partícula disminuye, el radio del área de superficie y el volumen de la partícula magnética incrementa. Para este tipo de nanopartículas, el radio es significativamente amplio causando que una gran porción de los átomos residan sobre la superficie comparados con los encontrados en el núcleo de la partícula. El amplio rango de volumen de superficie de las MNPs es el factor clave para comparar sus propiedades físicas, químicas y mecánicas comparadas con los materiales de tamaño normal (Schlorf, 2011). Diversas MNPs de distintos tamaños han sido sintetizadas por varios métodos físicos y químicos para ser caracterizadas y manipuladas con algunas técnicas experimentales usando microscopía de fuerza atómica, microscopía de efecto de túnel de barrido y microscopía electrónica de transmisión. Se ha demostrado que el momento magnético de cada átomo y la anisotropía de las nanopartículas magnéticas puede ser diferente a la de sus homólogos de tamaño natural (Krishan, 2010). Está bien establecido que los materiales ferromagnéticos de tamaño normal están compuestos de regiones pequeñas, llamadas dominios; estos dominios magnéticos resultan de un balance de varios términos energéticos: el intercambio de energía, anisotropía magneto-cristalina y la energía magnetostática o dipolar. El intercambio de energía trata de alinear todos los momentos magnéticos en la misma dirección, la anisotropía magneto-cristalina trata de orientar todos los momentos magnéticos a lo largo de direcciones específicas y la energía magnetostática trata de eliminar la magnetización en el material. En cada dominio los momentos magnéticos de los átomos están alineados en una sola dirección, dando una magnetización neta de cada dominio. Las direcciones de las magnetizaciones de los dominios son diferentes (Ragab, 2013). Por lo tanto la magnetización de un material magnético resulta de la suma de las diferentes magnetizaciones de todos los dominios. Los dominios magnéticos en los cristales ferromagnéticos tienen un tamaño mínimo crítico alrededor de los 100nm el cual los materiales ferromagnéticos no pueden dividir entre más dominios y son llamados como partículas de dominio simple (Veiseh, 2010). Las MNPs deben de estar compuestas de un dominio magnético simple si su tamaño decrece por debajo del límite crítico; también deben de poseer un comportamiento superparamagnético tan grande como los materiales superparamagnéticos, los momentos magnéticos

de las nanopartículas fluctúan alrededor de un eje simple de magnetización. Así, cada una de las MNPs poseerá un gran momento magnético que continuamente cambiará de dirección (Cervadoro, 2013). Cuando un campo magnético es aplicado, las MNPs en su estado superparamagnético presentan una respuesta rápida a los cambios del campo magnético, sin magnetización residual y sin coercitividad (intensidad de campo magnético para regresar a cero la magnetización del material). Así en su estado superparamagnético una MNP se comporta como un átomo paramagnético con un spin gigante; a temperaturas bajas estas propiedades no son capaces de causar fluctuaciones en las orientaciones de los momentos magnéticos de las nanopartículas (Du, 2013). Para analizar de forma satisfactoria las propiedades de las nanopartículas magnéticas es necesario conocer su tamaño, forma, composición, estructura cristalina, magnetización dependiente de temperatura, saturación de magnetización, magnetización residual, coercitividad y bloqueo por temperatura (Settles, 2011). Las dos principales características que dominan las propiedades magnéticas de las nanopartículas y les dan sus varias propiedades especiales son:

- a) Efectos de tamaño finito (estructuras de dominio simple o múltiple y confinamiento cuántico de los electrones).
- b) Efectos de superficie, los cuales resultan de la ruptura de la simetría de la estructura cristalina en la superficie de la partícula, la oxidación, los enlaces colgantes, presencia de surfactantes, deformación superficial o incluso diferentes estructuras químicas y físicas del “núcleo” interno y las partes superficiales de la nanopartícula (Markides, 2012).

En partículas magnéticas grandes, es bien sabido que hay una estructura de dominio múltiple donde las regiones de magnetización uniforme están separadas por muros dominantes. La formación de estos muros dominantes es un proceso conducido por el balance entre dos factores:

- a) La energía magnetostática externa (EMS), la cual incrementa con el volumen de la partícula.
- b) La pared de energía dominante (Edw), la cual incrementa con el área interfacial entre dominios (Mc Bain, 2008).

Si el tamaño de la partícula es reducido, hay un volumen crítico menor el cual cuesta más energía para crear una pared dominante que soporte la energía magnetostática externa (campo de dispersión). Bajo este diámetro crítico el cual típicamente yace entre los 10nm (y depende sobretodo del tipo de material), la partícula se constituirá de un dominio simple. En una partícula con un

dominio simple, todos los spines están alineados en la misma dirección y la partícula está uniformemente magnetizada; debido a que no existen paredes de dominio para mover, la magnetización será revertida a través del spin de rotación en lugar de que sea a través del movimiento de los dominios de las paredes (Wang, 2012). Esto resulta en una gran coercitividad de las MNPs; existen dos factores los cuales resultan en una elevada coercitividad de las NPs pequeñas:

- a) El movimiento del spin de rotación en lugar del dominio de la pared.
- b) La forma de la anisotropía, donde la coercitividad es más pequeña cuando las partículas son esféricas.
- c) La forma de la anisotropía también afectará la estimación del volumen crítico (por debajo del cual la partícula posee un dominio simple). Las MNPs esféricas tienen diámetros críticos pequeños comparados con aquellos de una gran forma anisotrópica. Los spines en una partícula aislada están retenidos en una dirección particular (no necesariamente paralela al campo aplicado), la energía anisotrópica magnética (la cual es causada por la interacción orbital-spin de los electrones). Si las partículas no están aisladas, otras interacciones estarán involucradas (Shen, 2012).

Debido al pequeño tamaño de las MNPs, grandes fracciones de todos los átomos en la nanopartícula son átomos de superficie con una magnetización significativa; generalmente una nanopartícula magnética en forma de esfera posee un dominio simple con una anisotropía uniaxial (Gao, 2009). Debido a los efectos de superficie que poseen estas partículas (vacantes atómicas, cambios en la coordinación atómica, enlaces colgantes y desorden del enrejado atómico), el ferromagnetismo podría ser una característica universal de las nanopartículas y sus óxidos. Se ha determinado que al aplicar un gran campo magnético ($> 70\text{kOe}$) sobre una capa de MNPs superparamagnéticas se genera una expansión del comportamiento anómalo de la anisotropía. Así los spines superficiales tienen configuraciones múltiples para cada orientación del núcleo de magnetización (Thomas, 2013). Algunos efectos magnéticos podrían también resultar del tamaño finito de las NPs, las cuales podrían incluir:

- a) La existencia de orientaciones aleatorias de spines superficiales.
- b) La existencia de spines paralelos.
- c) La existencia de comportamientos extraños en los spines superficiales.
- d) La existencia de una capa magnéticamente muerta en la superficie.

e) El encadenamiento de la anisotropía magnética la cual resulta de la anisotropía superficial.

Se puede enfatizar que los efectos superficiales pueden conducir a un decremento o un incremento en la magnetización de las NPs, aunque la reducción en la magnetización de las MNPs se atribuye a la existencia de una capa muerta (magnéticamente) sobre la superficie de las partículas, la existencia de spines paralelos y alteraciones en el comportamiento de los spines (Kumar, 2011). La magnetización total de una MNP esta debida a dos componentes; uno debido a los spines superficiales y al núcleo de la partícula. Así la magnetización de las MNPs puede ser moldeada por estos dos componentes conduciendo a otro tipo de interacción magnética dependiendo la interacción de los factores (Kim, 2013). En NPs de materiales antiferromagnéticos (AFM) o ferrimagnéticos (FIM), estas interacciones ocurren en la interfase entre la superficie ferromagnética (FM) y el núcleo AFM/FIM. En algunas NPs FM, la superficie del metal normalmente se oxida con el aire y forma carcasas del metal oxidado alrededor del núcleo FM, formando una interacción entre estas dos fases, esta interacción es llamada sesgo de intercambio o acoplamiento. El intercambio por acoplamiento se desvanece por arriba de una temperatura crítica (temperatura de bloqueo), debido a que los núcleos AFM/FIM tienen una masa de magnetización pequeña, sirve para estabilizar la magnetización de la superficie FM sin adicionar magnetización adicional al sistema y obteniendo un diámetro total de la MNP aproximado de 35nm (Lee, 2013).

Las propiedades magnéticas de las MNPs tales como la permeabilidad, coercitividad, o la saturación de magnetización pueden tener un alto impacto en las aplicaciones biomédicas y microbiológicas, la unidad central de estas MNPs está formada por 32 aniones de O^{-2} y 24 cationes (divalentes o trivalentes), por lo que existen 96 posibles posiciones que pueden adoptar esta unidad (64 tetraédricas y 32 octaédricas), la cual tiene la forma de un cubo de “paquete cerrado” (Sun, 2008). Debido a estas características únicas, las MNPs son de gran interés como fluidos magnéticos, catálisis biomédica y por su actividad potencialmente microbiciada; estas pueden ser usadas también como agentes de contraste al aumentar la sensibilidad en la imagenología por resonancia magnética (MRI), en la terapia contra tumores son también introducidas cuidadosamente en las células neoplásicas, por lo que al usar un campo magnético oscilante incrementa su temperatura hasta 43°C (Esta temperatura hace a las células tumorales más sensibles a la radiación y a agentes quimioterapéuticos); y finalmente también son usados como agentes acarreadores de fármacos a sitios específicos, los cuales involucran inmovilización (Issa, 2013).

2.4.2. Aplicaciones biomédicas de las MNPs

La síntesis de MNPs para este tipo de aplicaciones no es simple, debido a que necesita el control del tamaño, forma, estequiometría y estructura de la superficie de la partícula, algunos métodos como lo son la co-precipitación, la descomposición y reducción térmica, síntesis de micelas, así como la síntesis hidrotérmica han sido usadas para producir pequeñas nanopartículas con un tamaño y distribución aparentemente uniformes, pero con un control de la estructura de superficie bajo (Yallapu, 2011). Como el tamaño de la nanopartícula es reducido, existen desviaciones con respecto a las propiedades magnéticas de los materiales de tamaño normal; estas nuevas propiedades son atribuidas a los efectos de magnetización de la superficie así como a su tamaño finito. Para las aplicaciones biomédicas, las NPs deben de acatar las siguientes propiedades:

- a) Las MNPs deben de ser biocompatibles y no tóxicas.
- b) Deben de ser lo suficientemente pequeñas (10 – 50 nm), lo cual aporta algunas ventajas:
 - I. Las NPs pueden preservar su estabilidad coloidal y su resistencia de agregación si su interacción magnética es reducida. Esto puede ser alcanzado si su magnetismo desaparece después de remover el campo magnético aplicado. Este comportamiento superparamagnético se logra solamente bajo ciertas especificaciones de tamaño y temperatura.
 - II. Las interacciones dipolo-dipolo disminuyen demasiado, lo que minimiza la agregación de las partículas cuando se aplica el campo magnético.
 - III. Poseen mayor superficie de contacto por cada cierto volumen de la partícula. La eficiencia de la cubierta conducirá a una mayor resistencia de aglomeración, conduciendo a un mayor aclaramiento biológico de las NPs.
 - IV. Pueden permanecer en la circulación después de la inoculación y pasar a través del sistema de capilares de los órganos y tejidos.
 - V. Poseerían mayor estabilidad en el agua a pH = 7 y en condiciones fisiológicas.
- c) Las MNPs deben de tener una alta saturación de magnetización.
 - I. El movimiento de las partículas en la sangre puede ser controlada con un campo magnético moderado externo.
 - II. Las partículas pueden dirigirse cerca del tejido patológico blanco (Kumar, 2010).

Las MNPs usadas en aplicaciones biomédicas son principalmente las NPs de óxido de hierro como la magnetita (Fe_3O_4) y sus dos productos oxidados, la maghemita tetragonal ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y la hematita hexagonal ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), de forma natural estos materiales se encuentran en muchos sistemas biológicos. Para que las NPs sean capaces de interactuar con las moléculas biológicas, estas deben de ser capaces de evadir el sistema reticuloendotelial (RES) (Miller, 2013). Inmediatamente después de ser inoculadas en el torrente sanguíneo las NPs se recubren con proteínas plasmáticas. Este proceso es conocido como opsonización, la cual se refiere a la susceptibilidad de las NPs para ser identificadas y posteriormente removidas por las células fagocíticas, por otra parte las NPs hidrofílicas (debido a su recubrimiento con dextrano y polietilenglicol) pueden resistir la opsonización y así incrementar su tiempo de circulación e incrementar la probabilidad de interactuar con las células blanco. Así mismo, estos polímeros pueden generar estabilidad coloidal por efectos estéricos (Chertok, 2010). La configuración extendida en la superficie de las NPs favorece la capacidad de las NPs para evadir el RES y así incrementar los procesos de permeabilidad y retención; dentro de los principales sistemas de protección por recubrimiento se tiene: los recubrimientos orgánicos (surfactantes y algunos polímeros) y los recubrimientos inorgánicos (sílica). A pesar del amplio uso de las NPs superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIO) en aplicaciones biomédicas se siguen generando interrogantes sobre el efecto citotóxico con respecto al tamaño y recubrimiento de las NPs en el organismo, debido a su alta capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) (Tartaj, 2003).

Dentro de las aplicaciones biomédicas más recurrentes de las MNPs se encuentra la Hipertermia Magnética (MH) la cual emplea a las MNPs como fuente para alcanzar temperaturas tisulares de $\sim 43^\circ\text{C}$ (temperatura de Curie), temperatura bajo la cual las células tumorales son más sensibles que las células sanas, esto debido a las bajas concentraciones de oxígeno y nutrientes acopladas con el bajo pH, tiende a hacer a estas células más sensibles al calor (Xiang, 2013). Arriba de los 41°C las células cancerosas tienden a entrar en acidosis, con lo que decrece la viabilidad de las células, altera las funciones de muchas enzimas y proteínas estructurales que afectan el crecimiento y diferenciación celular, conduciéndolas posiblemente a apoptosis. Así mismo la localización de las MNPs es obviamente crítica para la inducción de MH, la implementación de una modalidad imagenológica para el monitoreo, la distribución y el posterior aclaramiento de las MNPs juega un importante papel en la planeación, ejecución y evaluación de los procesos de estudio patológico (Leuba, 2013).

Las MNPs recubiertas o la aglomeración de estas pueden ser funcionales para adjuntar varias moléculas como grupos carboxilo, biotina, etc. Estas moléculas sirven para acoplar varios fármacos terapéuticos o antibióticos específicos a los complejos de MNPs. Estos acarreadores magnéticos pueden ser utilizados para la distribución en un sitio u órgano específico de terapia génica o tumoral. Estos acarreadores cargados con fármacos esta, en el torrente sanguíneo en la forma de un fluido magnético biocompatible, debido a esto un alto gradiente de campo magnético es usado para concentrar los acarreadores magnéticos en un sitio específico (Kucheryavy, 2013). El fármaco puede ser liberado pasivamente (debido a la degradación de su acarreador) o activamente (a través de la aplicación de activación en forma de un pulso magnético o calor). Se debe de tener en cuenta que el ambiente natural del sitio puede jugar un papel importante en la liberación del fármaco a través de varias condiciones como son el pH, osmolaridad, etc... El éxito del acarreamiento de la interacción del complejo con muchas variables como las propiedades del campo magnético aplicado y la MNP, incluyendo la unión fármaco-partícula, condiciones hidrodinámicas, la concentración de la MNP, el método de inoculación y el sitio blanco de liberación (Wahajuddin, 2012). Un desarrollo significativo en el área de las aplicaciones biomédicas de las MNPs ha sido su uso en el acarreamiento de genes y la terapia génica. Un vector viral que posee un gen apropiado es adjuntado al recubrimiento de las MNPs y cuando se acercan al blanco la transfección y expresión genética puede sobrevenir y de esta manera rectificar los desórdenes genéticos. Las mejores terapias genéticas utilizando este proceso con MNPs incluyen las células epiteliales de los pulmones y las células endoteliales del tracto gastrointestinal, así como los vasos sanguíneos (Mohamoudi, 2011). La transfección magnética (o magnetofección) se ha utilizado para la expansión de transfecciones no virales de ADN, ARN y otras biomoléculas, o en el estudio de genes involucrados en los mecanismos de acción patológicos (Smolenski, 2011). Otros mecanismos que han cambiado la eficacia de la transfección y la endocitosis de la partícula-gen incluyen la aplicación simultanea de ultrasonido y campos magnéticos, o induciendo oscilaciones mecánicas de las muestras *in vivo* en dirección lateral al campo magnético aplicado. La distribución de los métodos de acarreamiento *in vivo* de genes permanece en la fase de desarrollo (Sathyannaraynan, 2013).

2.4.3. Características físico-químicas de interés biomédico de las ZnO NPs

Las ZnO NPs como moléculas en solución son muy sensibles al pH y temperatura, por lo tanto existe una necesidad general para sintetizar NPs de óxidos metálicos semiconductores para su

posible aplicación en detección biológica, etiquetas biológicas, acarreamiento de fármacos y genes y nanomedicamentos (Pan, 2014). En particular, debido a su fácil fabricación, amigable con el medio ambiente natural y una ruta de síntesis generalmente no tóxica, las ZnO NPs pueden proveer una mejor opción para varias aplicaciones biológicas. Sin embargo, la solubilidad en agua y la biocompatibilidad de las ZnO NPs son los principales requisitos para sus aplicaciones biológicas. En este aspecto se ha reportado la “síntesis bio-amigable” de ZnO NPs en solución acuosa a pH cercano al neutro y a baja temperatura (37°C); por lo tanto, en términos de aplicación, la solubilidad en agua de un nanomaterial es la principal preocupación, y generalmente la solubilidad en agua se logra por la modificación de la superficie con ligandos solubles en agua, silanización o la encapsulación dentro de micelas de bloques de copolímeros (Xue, 2014). En este aspecto, se ha reportado que la síntesis de las ZnO NPs en presencia de otro metal facilita la solubilización de estas en agua, formando así nanocompuestos (NCs) con funcionalidad dual por bioconjugación. En contraste, se ha reportado el uso de las ZnO NPs como agentes antimicrobianos debido a su toxicidad ante bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*), Gram positivas (*Staphylococcus aureus*), sistemas bacterianos y células inmunitarias primarias del humano, estas aseveraciones confirman sus posibles aplicaciones biomédicas, ya que en países europeos recientemente se han utilizado las ZnO NPs como tratamiento preferencial contra células cancerosas, además de generar la activación de células T humanas, observando que el estado de activación de los linfocitos T citotóxicos contribuye a la toxicidad de las NPs, mostrando una resistencia relativa de las células T en reposo, las cuales son estimuladas por las ZnO NPs al unirse al receptor de estos linfocitos, así como una coestimulación con CD28 (Xie, 2011). Esta toxicidad selectiva está dada aparentemente por la Generación especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales son segregadas por las células T activadas por ZnO NPs en linfocitos normales. Así mismo la aplicación de ZnO NPs puede inducir apoptosis en células blanco en un periodo inferior a las 20 horas, debido a la fragmentación de ADN y núcleo celular, por lo que se ha desarrollado una nueva estrategia profiláctica contra la metástasis del cáncer (Vaseem, 2010).

Como ya se mencionó anteriormente el tamaño de las ZnO NPs es otra de las características que hacen atractiva la aplicación de estas NPs en el campo biomédico, debido a su nano-escala, su tamaño les permite internalizarse dentro de las células, y les permite interactuar con las biomoléculas dentro de la superficie celular, permitiéndoles afectar potencialmente las respuestas celulares de forma dinámica y selectiva, así mismo su tamaño facilita la subsecuente retención de estas NPs en el interior de las células, por un proceso conocido como Efecto de Permeabilidad y

Retención Mejoradas (EPR) (Vatansever, 2013). Las ventajas del uso del EPR ahora son reconocidas como un “estándar de oro” en el diseño de agentes terapéuticos. El fenómeno del EPR puede ser descrito como una combinación de vasos sanguíneos “agujereados” debido a alteraciones de reguladores angiogénicos, estrechas uniones entre las células endoteliales y el drenaje linfático comprometido en el microambiente de un tejido afectado. Este desbalance localizado, permite a las NPs de cierto tamaño entrar fácilmente, pero a su vez también les permite ser retenidas dentro del espacio intersticial de las células afectadas, aumentando de este modo el potencial terapéutico de estas NPs, generalmente se ha observado que las partículas de 100 – 200nm de tamaño muestran una tasa hasta cuatro veces mayor en el ingreso de NPs a las células afectadas comparada con partículas de tamaño superior a los 300nm o menores a los 50nm (Cho, 2013). Aunque las NPs más pequeñas no usan el EPR, estas usualmente muestran nanotoxicidad relacionada a su gran superficie de contacto y rango de volumen (Petrochenko, 2013). La naturaleza electrostática de las NPs es otra importante consideración debido a las interacciones electrostáticas entre NMs cargados positivamente y las células blanco, permitiendo jugar un papel importante en la adhesión e ingreso celular. Comparando con las células eucariotas cuyo exterior consiste de una carga neutral de fosfolípidos zwitteriónica, las células en estado patológico frecuentemente mantienen un alta concentración de fosfolípidos aniónicos en su exterior, grandes potenciales de membrana y una sobreexpresión en las cargas de algunos grupos específicos de proteínas y carbohidratos (Hong, 2014). En suma, los estudios han demostrado que el pH intracelular aumenta con las interacciones con partículas cargadas en la membrana celular, pudiendo causar de esta manera alteraciones en las biomembranas debido a la formación de polímeros policatiónicos de las partículas, aunque la aplicación *in vivo* resultaría en una aplicación terapéutica más prolongada debido al aclaramiento acelerado de estas NPs en el suero (Rana, 2013). Así mismo, la morfología de los NMs es otra consideración importante para las aplicaciones biomédicas, sobre todo aquellas NPs que son aproximadamente esféricas, aunque actualmente se ha comenzado con el uso de nanoestructuras tetraédricas de ZnO debido a que se ha observado que pueden ser sintetizadas de una forma rápida y eficiente de una alta variedad de materiales, incluyendo semiconductores, los cuales pueden participar en reacciones REDOX celulares y tener actividad fotocatalítica (Lu, 2012). Por otra parte el uso de NMs como acarreadores farmacéuticos para incrementar la eficacia anti-tumoral *in vivo* ha sido considerada por más de 30 años (Salah, 2011). Los primeros estudios del potencial clínico de los acarreadores de nano-fármacos como liposomas ocurrieron a mediados de 1970 donde los

tratamientos tumorales realizados en ratones con actinomicina D atrapada en liposomas demostró un aumento en la calidad de vida. En la actualidad, el uso de NMs para la distribución de fármacos y agentes de diagnóstico recae como el primer plano de la nanomedicina, donde las más recientes mejoras han sido descritas por la conjugación de ligandos específicos de la células a la superficie de las NPs resultando en un mejor control de la focalización de fármacos en el tejido y niveles celulares, y por la encapsulación de los fármacos dentro de NPs para mejorar la liberación de los fármacos en su sitio de acción específico (Kim, 2014).

El ZnO es un semiconductor con una amplitud de banda prohibida convencional, el cual en su forma de NPs ha sido recientemente utilizado como una promesa como biosensor de colesterol, modulador dietético de la actividad de las hidrolasas, logrando un control de la diabetes y la hiperlipémia. Adicionalmente las ZnO NPs pueden regular las reacciones alérgicas al inhibir la desgranulación de los mastocitos. La diversidad de estas actividades ha permitido que estas NPs sean utilizadas como tratamiento contra el cáncer (Baek, 2012). Una de las principales ventajas para considerar el uso de las ZnO NPs es su inherente citotoxicidad preferencial contra las células cancerosas *in vitro*. Su selectividad a células cancerosas puede estar fuertemente impulsada por su morfología que minimiza los efectos perjudiciales en células corporales normales, lo cual se ha observado a altas concentraciones de las ZnO NPs, particularmente, en un rango de tamaño menor a los 4 – 20 nm (Hong , 2014). En este aspecto, la superficie química de las ZnO NPs rápidamente les permite la interacción con proteínas o sus grupos químicos, y puede ser la clave de su actividad selectiva (Dimkpa, 2011). Como se mencionó antes, las características electrostáticas de las ZnO NPs son otros rasgos para su aplicación biomédica, las ZnO NPs normalmente tienen grupos hidroxilos neutro anclados a su superficie, los cuales juegan un papel clave en el comportamiento de carga de superficie. En medio acuoso y a pH alto el protón quimisorbido se mueve fuera de la superficie de la partícula dejando la superficie cargada negativamente con átomos de oxígeno parcialmente unidos (ZnO⁻). A bajo pH, los protones del ambiente son probablemente transferidos a la superficie de la partícula generando una carga positiva de la superficie (ZnOH₂⁺). El punto isoeléctrico de 9 – 10 indica que las ZnO NPs tendrán una fuerte carga positiva en la superficie bajo condiciones fisiológicas (Dwivedi, 2014). Dado que las células cancerosas frecuentemente cuentan con una alta concentración de interacciones con ZnO NPs cargadas positivamente se espera que sean conducidas a estas células por interacciones electrostáticas, para de este modo, permitir el ingreso celular, su fagocitosis y su final citotoxicidad. La concentración de varios grupos químicos (-ZnOH₂⁺, -ZnOH, -

ZnO) sobre la superficie de las ZnO NPs es pH dependiente. La disponibilidad de los grupos químicos reactivos conduce a las ZnO NPs a la funcionalización anticuerpo/proteína mediante la vía de la N-hidroxisuccinimida/1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)-carbodiimida (NHS/EDC) la cual puede focalizar fuertemente a las células cancerosas (Moos, 2011). Las ZnO NPs también han mostrado una fuerte propiedad de adsorción a proteínas, la cual puede ser usada para modular la citotoxicidad, el metabolismo y otras respuestas celulares. Otra característica importante de las ZnO NPs es el proceso relativamente sencillo que permite a su tamaño y distribución ser controlados (Jan, 2013). Los estudios demuestran que la citotoxicidad contra células cancerosas y bacterianas está directamente relacionada con el tamaño, por lo que a menor tamaño de las NPs, mayor será su toxicidad, por lo que es posible tomar ventaja del EPR para incrementar las concentraciones intra-tumorales/intra-bacterianas de las ZnO NPs (Hanley, 2009). Otra consideración importante es que las NPs son hidrofílicas a tamaño de 100nm o menos, estas tienden a permanecer en circulación por un tiempo mayor y son más propensas a evitar su aclaramiento por macrófagos, aunque poseen un aclaramiento en suero mayor debido al RES (Chakraborti, 2013). En contraste, las NPs con una preponderancia de superficies hidrofóbicas tienden a ser preferencialmente ingeridas por las células hepáticas, seguidas por el bazo y los pulmones. La capacidad de las ZnO NPs de modificar sus características electrostáticas y de superficie (potencial Zeta) es una característica deseable, así como morfología esférica, la cual está bien estudiada para ser removidas del torrente sanguíneo por los riñones para ayudar a evitar la acumulación de estos materiales en el hígado (Adamcakova, 2014). El potencial Zeta de estas NPs puede ser variado, de -30mV al no estar recubiertas, o hasta +50mV al estar recubiertas con surfactantes catiónicos como el bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB), el polimetil metacrilato, dodecil sulfato de sodio (SDS), albumina de suero bovino, entre otros. La evaluación detallada de las variaciones electrostáticas de las ZnO NPs en sistemas *in vivo* es importante para la identificación de la carga óptima necesaria para mediar la adhesión y citotoxicidad de estas en las células blanco, evitando el aclaramiento sanguíneo y la toxicidad en los órganos por estas NPs (Bondarenko, 2013).

2.4.4. Generación de estrés oxidativo mediado por ZnO NPs

Otra característica de las ZnO NPs, como se mencionó anteriormente, es su habilidad para generar ROS, las cuales pueden conducir a la muerte celular cuando la actividad antioxidante es excedida (Papavlassopoulos, 2014). Esta capacidad para generar ROS, está relacionada a su potencial

REDOX; sin embargo existen otros materiales semiconductores que no pueden generar ROS. A diferencia de los metales, los cuales tienen estados electrónicos continuos, los electrones en los semiconductores pueden tener energía solamente dentro de ciertas bandas. La región de vacío, la cual se extiende desde la parte superior de la banda de valencia llega hasta la parte inferior de la banda de conducción vacía es también llamada como banda prohibida y es de $\sim 3.3\text{eV}$ para la forma cristalina del ZnO (Nuñez, 2014). Consecuentemente, la luz de ciertas longitudes de onda contienen suficiente energía para estimular a los electrones para viajar hacia la banda de conducción, dejando vacíos electrónicos (h^+), o estados desocupados en la banda de valencia. Estos electrones y los vacíos se recombinan rápidamente, pero también pueden migrar a la superficie de la nanopartícula donde pueden reaccionar con especies químicas adsorbidas, permitiendo:

- a) La reacción de los electrones con el oxígeno.
- b) La reacción de los vacíos con los iones hidroxilo del agua o con los iones superóxido

Debido a estas interacciones las ZnO NPs pueden realizar procesos foto-oxidativos con los cuales se puede realizar la foto-destrucción de células cancerosas y bacterianas por la vía del daño oxidativo, la cual se explica debido al gran número de vacíos de banda de valencia y/o a los electrones de la banda de conducción, los cuales se cree que están disponibles para ser utilizados en las reacciones REDOX incluso en la ausencia de luz UV (Salah, 2011). Una de las razones de estas reacciones es que a medida que el tamaño de las ZnO NPs decrece también lo hace la calidad del nanocrystal (morfología), lo cual resulta en el incremento de los iones zinc y oxígeno intersticial y posiblemente impurezas donador/aceptor. Estos defectos del cristal pueden conducir a la generación de un gran número de pares electrón-hueco ($e^- - h^+$). Los huecos son poderosos oxidantes y pueden dividir las moléculas de agua derivadas del ambiente acuoso del ZnO en H^+ y OH^- . Los electrones de la banda de conducción son buenos reductores y pueden mover la superficie de la partícula para reaccionar con moléculas disueltas de oxígeno para generar aniones del radical superóxido (O_2^-), el cual sucesivamente reacciona con H^+ para generar radicales $HO_2\cdot$. Estas moléculas $HO_2\cdot$ pueden entonces producir aniones de peróxido de hidrógeno (HO_2^-). Los aniones HO_2^- pueden entonces reaccionar con H^+ para producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Bondarenko, 2013). La posición relativa de los límites de banda para las bandas de conducción y valencia del ZnO, y el potencial REDOX para adsorber sustancias provee un amplio potencial (con diferencias de voltaje) para generar reacciones REDOX y la generación de ROS en ambientes celulares. Las diversas moléculas de ROS producidas

de esta manera puede disparar un ciclo de cascadas REDOX en la célula blanco, o sobre las membranas celulares adyacentes, conduciendo a la depleción de las reservas endógenas celulares de antioxidantes, produciendo así un daño oxidativo irreparable a las células (Chinnammal, 2015). En contraste, el recubrimiento de las ZnO NPs con iones de metales de transición ha demostrado ser otra ventaja al mejorar el potencial terapéutico, así como potenciar los ciclos de cascadas REDOX. Se ha postulado que la incorporación de iones Fe^{+3} en los cristales de ZnO aumenta la capacidad de la partícula para generar ROS por la catálisis de la disociación de H_2O_2 al radical hidroxilo, ion hidróxido o al ion H^+ y al radical hidropéroxido, seguido de las reacciones de Fenton (Choi, 2014). En suma, los recientes estudios han demostrado que los iones Fe^{+3} ayuda a las ZnO NPs a mejorar su actividad catalítica para la producción de H_2O_2 , así mismo la introducción de iones libres de metales de transición puede inducir a la oxidación de proteínas y a las reacciones REDOX en el interior celular. Aunque en otros estudios se ha reportado que el recubrimiento con hierro del ZnO puede no funcionar de esta manera, lo cual puede estar ligado a las condiciones de síntesis de las ZnO NPs (Hussein, 2014).

2.4.5. Precauciones toxicológicas de las ZnO NPs

Aunque las NPs de muchos tipos diferentes de materiales pueden ser producidas en cuestiones de compatibilidad con células vivas, los tipos de NMs están siempre bajo consideración para su uso en aplicaciones biomédicas (Vaseem, 2010). El ZnO es considerado como un compuesto “generalmente reconocido como seguro” (GRAS) por la FDA. Sin embargo, la designación GRAS comúnmente se refiere con un tamaño perteneciente a la microescala o superior, por lo que cuando estas sustancias son reducidas a la nano-escala pueden generar nuevas acciones de citotoxicidad. Como resultado, una evaluación detallada de la toxicidad de los NMs tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro* es necesaria, así como una valoración de la identificación de la reducción de efectos indeseados de toxicidad (Dimkpa, 2011). Un enfoque común para aumentar la biocompatibilidad y reducir la agregación de las partículas involucra el revestimiento de las NPs con polímeros de tamaño discreto para hacerlas menos tóxicas, probablemente más fagocitadas por las células, y potencialmente más adecuadas para las aplicaciones de acarreamiento de fármacos. El principal método por el cual las NPs se exponen de forma inadvertida en humanos puede ocurrir por vía de inhalación, ingestión o contacto dérmico (Jan, 2013). Después de acceder al torrente sanguíneo las NPs pueden ser distribuidas a través del cuerpo y los órganos específicos y ser fagocitadas por las

células a través de distintos mecanismos fagocíticos o endocíticos. El hígado, el corazón, el bazo, el páncreas y todos los huesos aparentan ser los sitios blancos de las ZnO NPs en ratones, y la inhalación de estas partículas en ratas produce una inflamación pulmonar reversible. En humanos, se desarrolla una enfermedad pulmonar ocupacional común conocida como fiebre por humos metálicos, un tipo de influenza resultante de la inflamación del tracto respiratorio. Otra ruta de exposición común de las ZnO NPs en humanos ocurre vía tópica por la aplicación de protectores solares y productos cosméticos los cuales incorporan estas NPs debido a su capacidad de absorber luz UV, pudiendo de esta manera entrar al cuerpo y causar toxicidad, aunque la mayor parte de los estudios indica que las ZnO NPs no penetran la piel y no causan enfermedades notorias (Hanley, 2009).

El mecanismo de citotoxicidad de las ZnO NPs no está completamente entendido, pero la generación de ROS se cree que es la principal causa. Cuando las NPs interactúan con las células, los mecanismos de defensa celular se activan para minimizar el daño, sin embargo, si la producción de ROS excede la capacidad de defensa antioxidante de la célula, da como resultado un daño oxidativo de las biomoléculas, lo que puede conducir a la muerte celular. Se ha descrito el estrés oxidativo mediado por ROS como un modelo de tres pasos. El primer paso involucra el incremento de las enzimas antioxidantes para iniciar con las defensas antioxidantes, seguido por el segundo paso, el cual incluye un incremento de las citocinas pro-inflamatorias, conduciendo a la inflamación, mientras que el tercer paso está caracterizado por la perturbación mitocondrial resultando en la muerte celular por apoptosis o necrosis (Ierardi, 2013). Estos tres pasos han sido observados en células epiteliales bronquiales por ZnO NPs, conduciendo al daño de lípidos, proteínas y ADN, aumento de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) y la muerte mediada por apoptosis o necrosis. Los estudios han demostrado algunos grados de toxicidad de las ZnO NPs en una amplia gama de organismos incluyendo bacterias, macroalgas, levaduras, protozoarios, peces cebras y ratones. Esta toxicidad ha sido atribuida a el potencial de solvatación de las ZnO NPs en iones libres de Zn^{+2} , mientras otros reportes indican que la disolución de las partículas en iones Zn^{+2} no es el mecanismo principal de citotoxicidad (Tartaj, 2003). Estas diferencias en las propiedades de disolución de las NPs pueden probablemente estar relacionadas a diferencias en las condiciones de síntesis. Normalmente, los niveles fisiológicos de zinc son importantes para una amplia variedad de procedimientos de crecimiento y desarrollo, como lo son la buena regulación del sistema inmune para el control de las actividades de muchos tipos diferentes de enzimas incluyendo factores de

transcripción, metaloproteínas, y polimerasas (Baek, 2012). Bajo condiciones normales, la célula tiene una alta concentración relativa de zinc unido a varias proteínas, mientras los niveles de iones libres de Zn^{+2} permanecen en niveles muy bajos y estrechamente regulados por mecanismos homeostáticos. El exceso de zinc puede ser perjudicial, sin embargo, con acumulación intracelular implicada en toxicidad neuronal y lesiones cerebrales. El consumo del exceso de zinc o la inhalación también ha demostrado causar ataxia y fiebre de humos metálicos respectivamente (Chwalibog, 2010). La disolución de las NPs puede ocurrir en ambientes ácidos incluyendo los compartimentos intracelulares lisosomales, los iones de zinc hidratados en conjunto con las ZnO NPs pueden conducir al daño mitocondrial y a la disrupción de la homeostasis celular del zinc conduciendo a la muerte celular. El último papel tóxico o citoprotectivo probable del zinc se refleja en la ruta de administración y en la dosis, con altas concentraciones de sales de zinc pueden causar daño en la membrana celular debido a la disrupción osmótica (Rasmussen, 2010).

2.5. Ensayos sobre las biopelículas

Debido a la susceptibilidad antibacterial de algunas cepas particulares, estos tratamientos se ven favorecidos cuando la biopelícula está desestabilizada, se cree que una combinación de agentes antimicrobianos y moléculas anti-biopelículas podrían generar sinergia (Schwartz, 2009). Sin embargo, solamente dos compuestos anti-biopelículas se han ensayado contra *Staphylococcus aureus* y *Helicobacter pylori*: la Curcumina, un colorante natural extraído de *Curcuma longa*, y la N-acetil-cisteína, un agente mucolítico que provee actividad anti-biopelícula contra estos y otros patógenos. La curcumina actúa sobre la formación de la biopelícula de forma dosis dependiente cuando se ensayó a concentraciones sub-inhedoras, sugiriendo su utilidad como coadyuvante estándar de primera opción para la erradicación parcial de *Helicobacter pylori* y *Staphylococcus aureus* especialmente en infecciones recurrentes por la formación de biopelículas. Un año después, el efecto de la N-acetil-cisteína sobre la formación de biopelículas fue analizado tanto *in vitro* como *in vivo*; este ensayo demostró que la N-acetil-cisteína es capaz de disminuir la formación de biopelículas y la desestabilización de las biopelículas ya formadas a concentraciones mayores de 10 mg/Kg, aunque los estudios *in vivo* demostraron que solamente del 20 al 65% de los pacientes con diagnóstico positivo de biopelículas tuvieron una erradicación parcial de esta estructura de virulencia de *Staphylococcus aureus* y *Helicobacter pylori*, por lo que se debe de encontrar nuevas

propuesta para su eliminación total sin ejercer efectos secundarios tóxicos en los pacientes (García, 2014).

Debido a estas serias amenazas de salud pública con respecto a estas enfermedades infecciosas, especialmente con las emergencias de bajo índice de erradicación y de cepas resistentes a antibióticos de amplio espectro cuando las bacterias Gram positivas y Gram negativas (*Staphylococcus aureus* y *Helicobacter pylori*) se encuentran formando sus respectivas biopelículas es que en la actualidad se busca un tratamiento eficiente contra estas estructuras de patogenicidad (Mooremeler, 2014). En los últimos años se han realizado avances en la nanobiotecnología, particularmente la capacidad de sintetizar NPs de óxidos metálicos, como lo son el ZnO y el Fe₃O₄ y debido a sus características fisicoquímicas de interés biomédico, estas se podrían utilizar para el desarrollo de nuevos agentes anti-biopelículas, debido sobre todo a la actividad antimicrobiana descrita por las NPs con tamaño menor a los 100nm (Kaittanis, 2009). Esta actividad antimicrobiana de las NPs ha sido ampliamente estudiada en bacterias patógenas humanas como lo son *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, aunque nunca se ha realizado este estudio a detalle para *Helicobacter pylori*. Por otra parte, estos microorganismos aparentan ser altamente sensibles a las ZnO NPs, tomando en cuenta que esta actividad antimicrobiana depende sobre todo de su tamaño, estabilidad y concentración en el medio de cultivo en condiciones *in vitro*, aunque dichos parámetros y actividad antimicrobiana no ha sido bien establecidos en la interacción de las NPs y los agentes patógenos en condiciones *in vivo* (Azam, 2012). Debido a esto y que los mecanismos de actividad antibacteriana varían de NP a NP, se han propuesto mecanismos *in vivo* relacionados a la estructura física de las NPs y a la liberación de iones metálicos de la superficie de las mismas. El área de superficie específica de una NP aumenta, mientras su tamaño de partícula disminuye, permitiendo una gran interacción de los materiales con el ambiente que los rodea, por lo que, para materiales inertemente antibacteriales como el Zn, aumentar la superficie aumenta la tasa de volumen del efecto antibacteriana (Kolthatkar, 2013). Una NP de material antibacteriana inerte puede entonces, tener múltiples mecanismos de actividad antibacteriana como lo son la penetración de la pared celular o el daño membranal. Una de las ventajas de las ZnO NPs, es que se ha demostrado que posee una actividad natural para reducir el crecimiento de un gran número de cepas bacterianas sin el uso de antibióticos, tanto en células suspendidas en medios líquidos o en superficies sólidas del organismo. Así mismo se ha demostrado en cultivos celulares, la completa inhibición de *Staphylococcus aureus* al usar ZnO NPs, a concentraciones menores de 1mM (81.408µg/mL) en un

periodo de exposición de 10hrs, aunque también es necesario mencionar que la luz UV posee un papel potenciador en las propiedades antibacteriales de las ZnO NPs, por lo que los tiempos de exposición podrían disminuirse, probablemente por el aumento en la producción de iones Zn^{+2} , la producción aumentada de ROS o bien un daño masivo a la membrana celular de los patógenos. Los iones de Zn inhiben múltiples actividades de las células bacterianas, como lo son la glucólisis, el transporte de protones por la membrana y la tolerancia ácida (Chwalibog, 2010). En contraste a la presencia de ZnO NPs, la presencia de iones de Zn solos, permite solamente la inhibición de la proliferación bacteriana (efecto bacteriostático); por otra parte se ha demostrado que la presencia de ZnO NPs resulta en un incremento dosis-dependiente en la presencia de ROS, resultando este aumento en una alta tasa de actividad bactericida; aunque se debe de considerar que las propiedades antibacteriales de las ZnO NPs dependen de múltiples mecanismos de defensa de las bacterias. A pesar de esta teoría, el mecanismo de la actividad antibacterial de las ZnO NPs *in vivo* es muy complejo (Archer, 2011). Por otra parte, a pesar que el óxido de hierro convencional no está considerado como un agente antibacterial, unos pocos estudios sobre bacterias *in vivo* han demostrado que este material posee una actividad de inhibición bacteriana hasta en un 95% a concentraciones de 3 mg/Kg con tiempo de exposición de 48hrs en líneas celulares de hígado; se cree que la actividad antimicrobiana de las MNPs estaba relacionado con la capacidad de las NPs para penetrar dentro de la célula y generar ROS; el potencial zeta negativo de las NPs y las interacciones electrostáticas mínimas con las cargas superficiales negativas de la bacteria, podrían explicar porque concentraciones relativamente altas de estas MNPs son necesarias para producir un efecto bactericida en condiciones *in vivo* (Chinnammal, 2015). Las MNPs poseen un interés particular no solamente por su propiedad antibacterial inerte, si no también debido a sus propiedades superparamagnéticas que le podrían permitir a las partículas ser insertadas directamente dentro de la biopelícula o del soma bacteriano al usar un campo magnético, incluso se ha reportado que se ha aumentado su actividad antimicrobiana al recubrir estas MNPs con agentes con mayor fuerza antimicrobiana (como la plata) por lo que se ha propuesto la asociación de varios óxidos metálicos para generar sinergia antimicrobiana como un tratamiento anti-biopelículas *in vivo* (Seil, 2012).

Como ya se ha hablado, las propiedades de las MNPs y ZnO NPs en condiciones *in vitro* han sido fuertemente estudiadas de forma aislada, aunque solo un grupo de investigadores han realizado hipótesis de la generación de un efecto bactericida más fuerte al generar “mezclas” de estos dos tipos de NPs, generando estructuralmente nanocompuestos (NCs), lo cuales consisten de núcleos

magnéticos y cápsides luminiscentes (Beltran, 2010); sin embargo, no existen estudios reportando la muerte o inactivación de los patógenos bacterianos; específicamente *Staphylococcus aureus* y *Helicobacter pylori* por medio de estos NCs; se ha teorizado que la interacción eficaz de Fe₃O₄@ZnO NCs para la captura e inhibición simultánea de bacterias Gram positivas y Gram negativas es debida a la interacción físico-química de los iones superficiales de estos NCs con los agentes patógenos, una de estas interacciones podría ser por inactivación bacteriana mediada por hipertermia debido las propiedades magnéticas que poseen estos NCs al exponerlos a un campo magnético externo; por otra parte algunos estudios han sugerido que los Fe₃O₄@ZnO NCs podrían ser utilizados como una terapia fotodinámica contra estos agentes patógenos, donde la luz UV interactuaría con estos NCs generando una alta concentración de iones O⁻²; lo cuales serían responsables de la muerte de la células bacterianas selectivamente; esto último debido a que estas nanoestructuras podrían ser conducidas hacia las células blanco aunque estos patógenos se encontraran en tejidos profundos, por otra parte la capacidad de ambos materiales (Fe₃O₄ y ZnO) de generar ROS podría ayudar a la destrucción de las biopelículas por medio de estrés oxidativo (Beltran, 2010). Específicamente, el desarrollo de NCs biocompatibles tiene un fuerte potencial en el área biomédica, por lo tanto la aplicación de estos NCs podría resultar en el desarrollo de nuevos tratamientos económicamente viables, los cuales aliviarían las patologías asociadas con las biopelículas formadas por estas bacterias, así mismo estos NCs podrían abrir nuevas posibilidades para la investigación de efectos sinérgicos de distintas NPs, así como abordar un gran número de aplicaciones, que estas de manera individual no serían capaces de hacer; sin embargo el efecto citotóxico de estos NCs no ha sido completamente dilucidado (Singh, 2014).



JUSTIFICACIÓN

En la medicina moderna, el uso de biomateriales como implantes y dispositivos con el fin de restaurar y soportar funciones vitales de algunas estructuras del cuerpo humano se ha convertido en una práctica común con una alta tasa de éxito, en términos de aumentar la calidad de vida del paciente. A pesar de esto, un serio problema asociado con el uso de biomateriales es la alta incidencia de infecciones microbianas. Las infecciones asociadas a biomateriales representan complicaciones serias relacionadas con una alta tasa de mortalidad y altos costos en el cuidado de la salud. El promedio de prevalencia de estas infecciones asociadas a biomateriales se ha estimado en el 7.1% de la población mundial, lo que se traduce en aproximadamente 4131000 pacientes afectados; por otra parte, los costos asociados con el cuidado de la salud por infecciones asociadas a biomateriales supera los 78 billones de dólares anuales; debido a que aproximadamente más de 800000 prótesis ortopédicas se encuentran infectadas con distintos tipos de antropo-patógenos. *Staphylococcus aureus* y *Helicobacter pylori* son los patógenos que se aíslan frecuentemente de superficies de implantes de biomateriales en pacientes con infecciones severas. Esta concurrencia de infecciones nosocomiales son atribuidas principalmente por la capacidad de estas bacterias de formar estructuras de proliferación y resistencia denominadas como biopelículas. Para evitar este foco de infección se han realizado diversas modificaciones en las superficies de los biomateriales y en los tratamientos paliativos con el fin de inhibir la formación de biopelículas y la eliminación de estos patógenos del organismo, aunque, hasta ahora, estas modificaciones solo han podido reducir la capacidad de adhesión de estas bacterias por un breve periodo de tiempo, además que la eliminación de estas bacterias en tratamientos *in vivo* no es total. Actualmente la aplicación de metales en su forma nano-particulada es considerada como un tratamiento prometedor para resolver las infecciones relacionadas con *Staphylococcus aureus* y *Helicobacter pylori*, esto debido a las características físico-químicas únicas que presentan como lo son un diámetro menor a los 100nm, reactividad química relacionada a su área de superficie y potencial biocompatibilidad. Dentro de nuestro grupo de investigación, se lograron implementar rutas solvotérmicas para la síntesis controlada de materiales nanoestructurados de ZnO y magnetita (Fe₃O₄). De igual manera se ha demostrado la naturaleza superparamagnética de las partículas de óxido de hierro. Por ello, con este trabajo se pretende evaluar la actividad microbicida de ambos materiales y la acción sinérgica de los mismos (compósitos ZnO@Fe₃O₄), en contra de microorganismos patógenos de importancia clínica (*H. pylori* y *S. aureus*). Se postula que ambos materiales contribuirán en inhibir el crecimiento de estos microorganismos, particularmente, la formación de biopelículas. De igual manera, se evaluará

la biocompatibilidad de los materiales (simples y compuestos), mediante la implementación de estudios de toxicidad *in vitro* e *in vivo*, esto con el fin de desarrollar un material bactericida eficiente que idealmente represente bajo o nulo impacto a otros seres vivos (mamíferos). Las pruebas *in-vitro* se llevarán a cabo empleando *H. pylori* y *S. aureus* como organismo modelo, mientras que las pruebas *in- vivo* se realizarán en ratas Wistar

Hipótesis.

El ZnO es un material semiconductor que ha despertado gran interés debido a sus excelentes propiedades optoelectrónicas. En últimas fechas, el ZnO ha sido señalado como uno de los mejores materiales que pueden ser empleados en remediación ambiental (purificación y desinfección de aire, agua y superficies mediada por foto-catálisis heterogénea). No obstante, aún existen limitantes para su implementación a gran escala, entre ellas, mejorar su estabilidad química y elucidar la biocompatibilidad del mismo. Por otra parte, existen muy pocos reportes referentes al uso de campos magnéticos para el control del crecimiento de microorganismos patógenos. Recientemente se reportó que la exposición de *Staphylococcus aureus* y *Helicobacter pylori* a campos electromagnéticos de baja intensidad (50 Hz y 1 mT) induce cambios morfológicos en estos patógenos, disminuyendo la capacidad de las mismas para formar biopelículas, postulando que la aplicación de NPs de ZnO y Fe₃O₄ así como los NCs de ZnO@Fe₃O₄ en sistemas *in vivo* e *in vitro* generan una alta eficiencia en la eliminación de estos microorganismos, además de presentar una baja o nula toxicidad.



OBJETIVOS

Objetivo general:

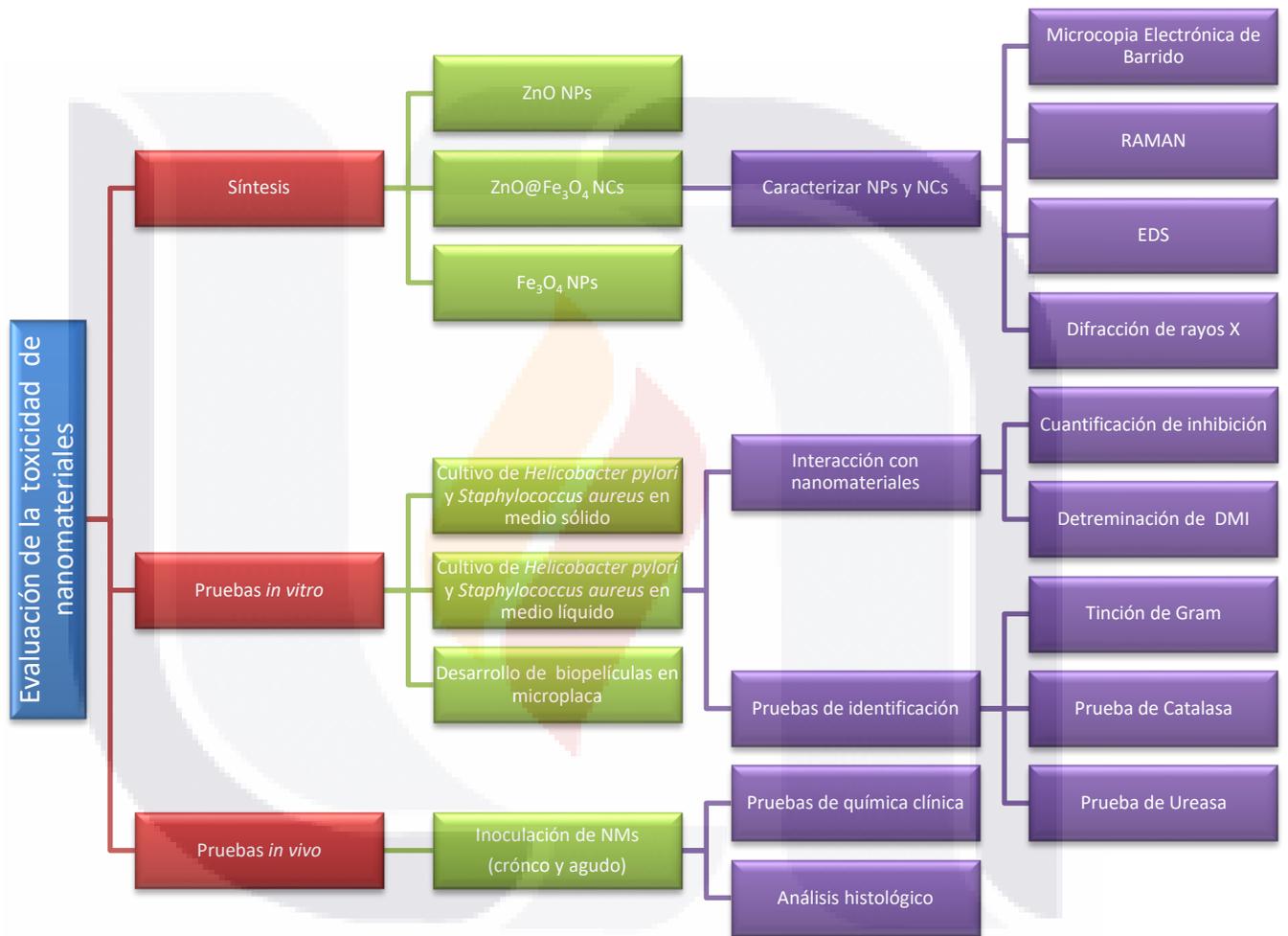
- Sintetizar, caracterizar y evaluar la toxicidad y bioactividad de NPs magnéticas simples (Fe_3O_4) y compuestas ($\text{ZnO@Fe}_3\text{O}_4$).

Objetivos específicos:

- Optimizar condiciones de reacción para la síntesis de NPs magnéticas empleando una ruta solvotérmica y radiación de microondas.
- Optimizar condiciones de reacción para la síntesis de nanocompuestos de tipo $\text{ZnO@Fe}_3\text{O}_4$ empleando una ruta solvotérmica y radiación de microondas.
- Caracterizar NPs y nanocompuestos mediante microscopía electrónica de barrido, Raman, difracción de rayos X y Espectrometría de energía dispersiva.
- Evaluar la toxicidad de NMs y nanocompuestos en ratas Wistar macho.
- Evaluar el desarrollo de bio-películas (*Helicobacter pylori* y *Staphylococcus aureus*) en presencia y ausencia de NPs y nanocompuestos.



METODOLOGÍA



Cronograma de actividades.

2015

2016

| | Jun | Jul | Ago | Sep | Oct | Nov | Dic | Ene | Feb | Mar | Abr | May | Jun |
|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Síntesis de NMs | X | X | X | X | X | | | | | | | | |
| Caracterización de NMs | | | | | X | X | | | | | | | |
| Evaluación de toxicidad por NMs | | | | | | X | X | X | X | X | X | X | |
| Desarrollo de biopelículas | | | | X | X | X | X | | | | | | |
| Pruebas de inhibición microbiana | | | | | X | X | X | X | X | | | | |
| Integración de Resultados | | | | | | | | | | | | X | X |
| Revisión bibliográfica | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |

Síntesis de materiales nano-estructurados:

Esta fue una investigación experimental, analítica y prospectiva, la cual consistió en la síntesis de tres tipos de nanomateriales; ZnO NPs, MNPs (Fe_3O_4) y NCs ($\text{ZnO}@\text{Fe}_3\text{O}_4$), dichos materiales fueron sintetizados por medio de una ruta solvotérmica activada por microondas (como se observa en el diagrama 1) siguiendo lo establecido por Herrera (2013) con ligeras modificaciones, dicho proceso de síntesis se basa en el método solvotérmico de Bilecka *et al* (2008) modificado, consistente en dispersar 1 mmol de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (Sigma-Aldrich, 97%) en 5 mL de alcohol bencílico (J.T. Baker, 99.90%) en ciclos de calentamiento: el primero a 60°C en microondas (CEM Discovery 908005, U.S.A.) en condiciones atmosféricas durante 2 minutos y un segundo a 215°C durante 5 minutos con agitación constante y dejando enfriar 20 minutos a temperatura ambiente una vez terminada la reacción. Posteriormente se sometió el producto obtenido a una separación con el fin de obtenerlo en forma de polvo. En primer lugar se llevó a cabo una separación en centrifuga (UNICO HX-C822, U.S.A.) a 3400 r.p.m. durante 15 minutos, eliminando el sobrenadante. El precipitado se sometió a dos lavados con 2 mL de una mezcla 1:1 V/V de etanol anhidro (Alquime, 99.5%): éter etílico anhidro (Golden Bell, Grado técnico) para eliminar impurezas, sometiendo a ciclos de centrifugado a 3400 r.p.m. durante 10 minutos posterior a cada lavado. Por último se resuspendió el producto obtenido en la misma mezcla de solventes y se sometió a secado en parrilla eléctrica (Barnstead Thermolyne, Deutschland) a 100°C en campana de extracción, obteniéndose los productos secos después de alrededor de una hora. El rendimiento se estableció obteniendo la masa del producto seco en una balanza analítica (OHAUS Pioneer PA214, U.S.A.) y calculando las relaciones molares correspondientes. A este tratamiento se le denominó como TRATAMIENTO CONTROL. Adicionalmente, para realizar la optimización del rendimiento molar de esta ruta de síntesis se procedió a modificar las temperaturas de lavado de las MNPs una regulando el proceso a 61°C (TRATAMIENTO A) y otro bajo temperaturas de 4°C (TRATAMIENTO B).

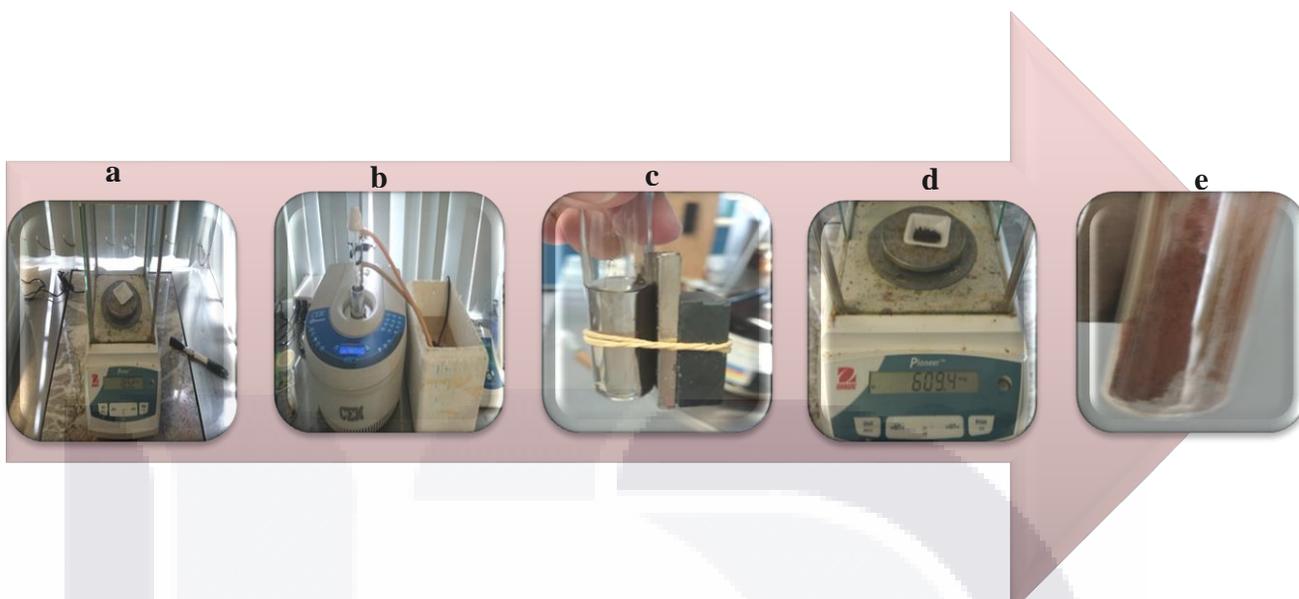


Diagrama 1. **Síntesis de MNPs.** Se observa el procedimiento realizado para la síntesis solvotérmica activada por microondas de las Fe_3O_4 NPs; realizando el pesaje de 1 mmol de precursor (a), ciclos de calentamiento en microondas CEM Discovery® a condiciones ambientales. Paso 1: $rt = 1 \text{ min.}$, $t = 2 \text{ min.}$, $T = 60^\circ\text{C}$; Paso 2: $rt = 3 \text{ min.}$, $t = 2-6 \text{ min.}$, $T = 150-215^\circ\text{C}$ (b). Lavado de nanopulvos con solventes orgánicos (c). Cálculo del rendimiento molar (d). Magnetita nanoestructurada (e).

En el caso de las ZnO NPs se realizó su síntesis solvotérmica siguiendo la metodología de Bilecka *et al* (2008) con modificaciones en los ciclos térmicos (como se observa en el diagrama 2), dicha metodología consistió en dispersar 1 mmol de $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, 95%) en 5 mL de alcohol bencílico en dos ciclos de calentamiento en microondas CEM: el primero a 60°C en condiciones atmosféricas durante 2 minutos y un segundo a 200°C durante 3 minutos con agitación constante y dejando enfriar 20 minutos a temperatura ambiente. Una vez finalizada la reacción se procedió a realizar la separación del NM en forma de polvo. En primer lugar una centrifugación a 4500 r.p.m. durante 15 minutos, eliminando el sobrenadante. El precipitado se sometió a dos lavados con 3 mL de éter etílico anhidro para eliminar impurezas, sometiendo a ciclos de centrifugado posterior a cada lavado. Por último se resuspendió el producto obtenido en la misma mezcla de solventes y se sometió a secado bajo temperatura ambiente, obteniéndose los productos secos después de alrededor de tres horas. El rendimiento se estableció obteniendo la masa del producto seco en una balanza analítica y calculando las relaciones molares correspondientes.

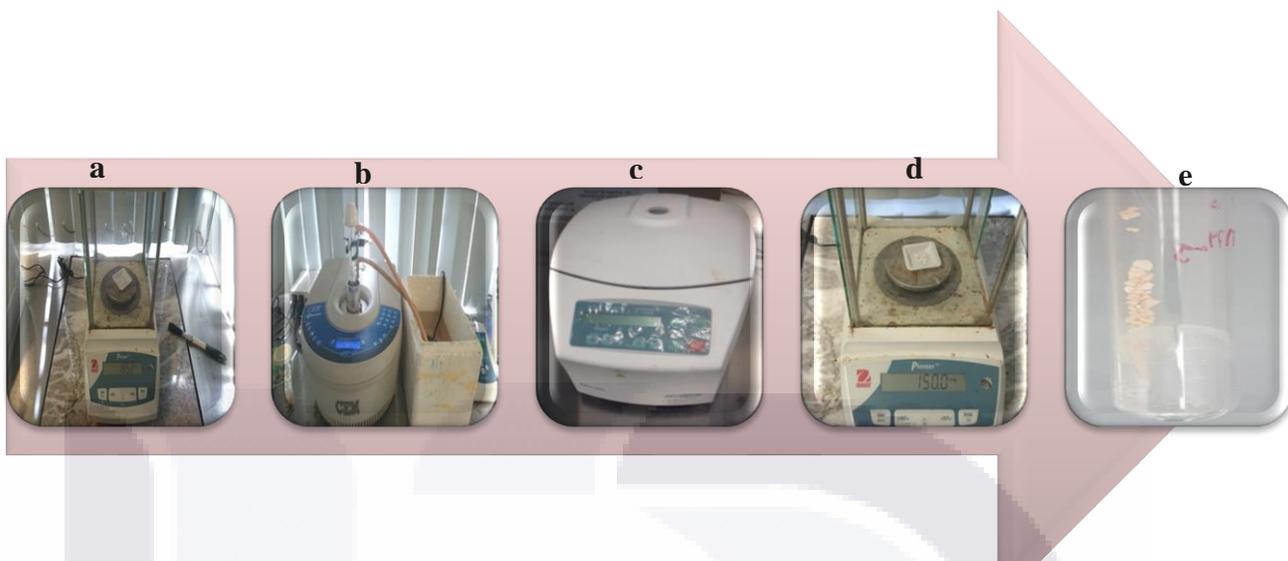


Diagrama 2. **Síntesis de ZnO NPs.** Se observa el procedimiento realizado para la síntesis solvotérmica activada por microondas de las ZnO NPs; realizando el pesaje de 1mmol de precursor (a), ciclos de calentamiento en microondas CEM Discovery® a condiciones ambientales. Paso 1: $rt = 1min.$, $t = 2min.$, $T = 60^{\circ}C$; Paso 2: $rt = 2min.$, $t = 3min.$, $T = 200^{\circ}C$ (b). Lavado de nanopulvos con solventes orgánicos por centrifugación (c). Cálculo del rendimiento molar (d). ZnO nanoestructurado (e).

Para la síntesis de NCs se siguió la técnica sugerida por Chin *et al* (2010) modificado (como se observa en el diagrama 3), realizando la dispersión 1 mmol de $Fe(acac)_3$ con 1mmol de ZnO NPs en 10 mL de alcohol bencílico durante 5 minutos en sonicador (BRANSON CPXH; U.S.A.), ulteriormente se realizó la reacción solvotérmica en microondas CEM bajo dos ciclos de calentamiento: el primero a $60^{\circ}C$ en condiciones atmosféricas durante 2 minutos y el segundo a $215^{\circ}C$ durante 5 minutos con agitación constante, dejando enfriar 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se sometieron los productos obtenidos de cada uno de los tres tratamientos al proceso de purificación de los nanopulvos del TRATAMIENTO B en la síntesis de MNPs, además el rendimiento se estableció obteniendo la masa del producto seco en una balanza analítica y calculando las relaciones molares correspondientes.

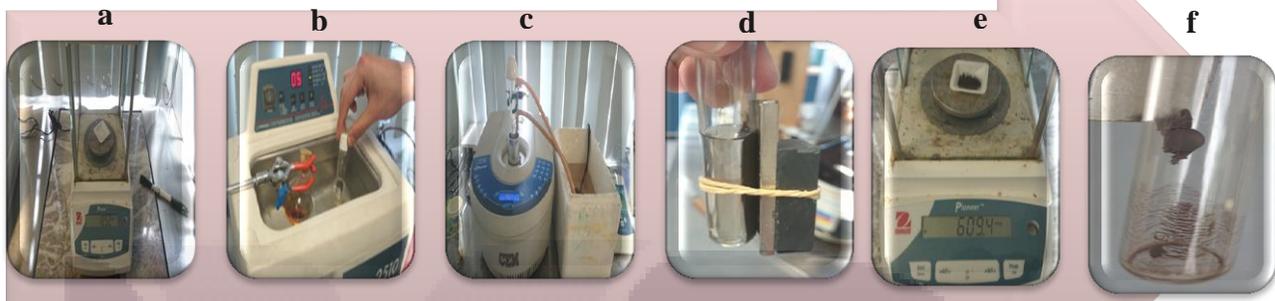


Diagrama 3. **Síntesis de NCs.** Se observa el procedimiento realizado para la síntesis solvotérmica activada por microondas de los ZnO@Fe₃O₄ NCs; realizando el pesaje de 1mmmol de ZnO NPs y 1mmol de Fe(acac)₃ (a). Sonicación de la mezcla de materiales (b). Ciclos de calentamiento en microondas CEM Discovery® a condiciones ambientales. Paso 1: rt = 1 min., t = 2 min., T = 60°C; Paso 2: rt =3 min., t = 2-6 min., T = 150-215°C (c). Lavado de nanopulvos con solventes orgánicos (d). Cálculo del rendimiento molar (e). NC nanoestructurado (f).

Cultivo de microorganismos

Para obtener los organismos modelo de esta investigación se llevó a cabo la metodología sugerida por García y Morales (2013) para cultivo selectivo de *Helicobacter pylori* y *Staphylococcus aureus* (véase el diagrama 4); en el caso de la primera se utilizaron inóculos bacterianos (500 UFC/mL) congelados a -40°C en ICC/glicerol 10%) bajo ultracongelador (ULTRA.GUARD™ UF V 500 BINDER; U.S.A.) de un aislado clínico (cepa A97) caracterizado previamente por pruebas bioquímicas y moleculares; dichos inóculos fueron descongelados a temperatura ambiente para su posterior separación del medio de cultivo por medio de centrifugación bajo microcentrifuga (SCI LOGEX; U.S.A.) por 5 minutos a 10 000 R.P.M.; posterior a la centrifugación se procedió a resuspender el pellet obtenido en 100µL de medio Infusión Cerebro Corazón (ICC;BD Bioxon; México), con este nuevo volumen del inóculo se procedió a tomar alícuotas de 10µL para su cultivo por estría cruzada en medios sólidos de Agar base Sangre (10% sangre de borrego adulto; BD Bioxon; México) sin antibiótico y suplementados con 5% de antibiótico selectivo (5 mg/mL Vancomicina, 2.5 mg/mL, Cefasolodina, 2.5 mg/mL Anfotericina), posterior al cultivo se procedió a incubar las cajas Petri bajo cámara de cultivo (LAB-LINE INSTRUMENTS Inc.; U.S.A.) a 37°C bajo 40 PSI de CO₂ (Smith's; México) durante 72 horas; la inyección de CO₂ se realizó periódicamente cada 48 horas posterior a cada resiembra, así mismo la resiembra en medios sólidos

se efectuó cada 72 horas antes de la realización de los ensayos con el fin de trabajar con la fase de crecimiento logarítmica de esta bacteria. Por otra parte, para realizar el cultivo de *Staphylococcus aureus* se partió de un stock concentrado de bacterias multi drogo resistentes (5000 UFC/mL) suspendidas en medios ICC inactivado a 4°C (Mabe; U.S.A.), este stock fue llevado a incubación en cámara de cultivo (Prendo; México) durante 24 hrs bajo 37 °C para poder realizar la reactivación de estos microorganismos; posterior a la activación de las bacterias se procedió a realizar la resiembra de los microorganismos tomando 10µL del stock e inoculándolos en tubos falcón (AXYGEN; U.S.A.) con 7 ml de medio ICC fresco a temperatura ambiente (25°C) e incubado bajo las anteriores condiciones de cultivo; el stock fue inactivado a 4°C para su uso posterior en situaciones de contaminación de los inóculos sembrados; la resiembra en medios líquidos de esta bacteria se llevó a cabo cada 24 horas anterior a la realización de los experimentos, con el fin de trabajar con la fase de crecimiento logarítmica de esta bacteria.



Diagrama 4. **Cultivo de microorganismos.** Se observa el procedimiento realizado para la propagación de bacterias; re-suspensión de primocultivo en ICC (a). Siembra de inóculos bacteriano en medios de Agar Sangre por estría cruzada (b). Incubación de microorganismos a 37°C (c). Evaluación de crecimiento bacteriano (d).

Caracterización de microorganismos

Con el fin de asegurarse que se trabajó con cultivos monoxenicos de los microorganismos cultivados se procedió a realizar una serie de pruebas bioquímicas específicas de este tipo de microorganismos, estas pruebas fueron basadas en la metodología propuesta por Bayona (2013); como se puede apreciar en el diagrama 5, partiendo de los cultivos de *Helicobacter pylori* se procedió a tomar una

asada (10 UFC/mm) y ponerlas en interacción con 200µL de reactivo de Peroxidasa bajo una dilución 1:10 (Sigma-Aldrich, 95%), bajo esta prueba se espera observar la formación de un burbujeo intenso en el medio debido a la acción de la enzima Catalasa presente en esta bacteria Gram negativa, la cual es capaz de hidrolizar el peróxido y realizar la liberación de O₂ en forma de burbujas; por otra parte se realizó la prueba de ureasa al efectuar la interacción de una asada de las colonias de *Helicobacter pylori* con 200µL de reactivo de Ureasa bajo una dilución 1:50 (Sigma-Aldrich, 90%), con esta prueba se esperó observar un viraje de coloración del medio hacia una tinción rosa intensa, este cambio de coloración es debido al cambio de pH en el medio ya que la acción de la enzima ureasa presente en *Helicobacter pylori* permite la hidrólisis de la urea presente en el medio para la posterior liberación de ácido carbónico y amoníaco, causando una disminución del pH del medio y el cambio subsecuente de la coloración. Por otra parte para realizar la caracterización por medios bioquímicos de *Staphylococcus aureus* se procedió a realizar la prueba de Peroxidasa al poner a interaccionar 5µL del cultivo de esta bacteria Gram negativa con las mismas condiciones del reactivo para la prueba con *Helicobacter pylori*, esperando la presencia de burbujeo intenso en el medio; así mismo otra prueba que se realizó para caracterizar el crecimiento en los cultivos de *Staphylococcus aureus* fue la siembra de 10µL del cultivo en medio sólido en placa para identificación de DNAsas (Sigma-Aldrich, U.S.A.), donde se esperó observar que en este medio se lograra la formación de un coágulo debido a la acción de esta termonucleasa a 37°C por la degradación del material genético presente en el medio sólido; por otra parte se realizó el cultivo de estos microorganismos en medios sólidos de Sal y Manitol (Sigma-Aldrich, U.S.A.) por estría cruzada durante 24 horas a 37°C esperando observar el cambio de coloración de este medio hacia una tinción amarilla pálido debido a la degradación del manitol y las peptonas del medio realizando un cambio en el pH del medio; bajo este principio este cultivo sólido es específico para *Staphylococcus aureus*, ulteriormente se realizó el cultivo de esta bacteria Gram-positiva en medios de Agar Base Sangre 10% sin antibióticos a 37°C durante 24 horas, esperando observar la presencia de un halo β-hemolítico característico de estas bacterias. Finalmente la morfología de ambas bacterias fue corroborada por medio de tinción de Gram modificada, la cual se efectuó al re suspender una asada de cada cultivo bacteriano en 10µL de Solución Salina Fisiológica (SSF), los cuales fueron fijados en portaobjetos (Optik Labor; U.S.A.) a temperatura ambiente, posterior a esta fijación de las alícuotas bacterianas se procedió a adicionar 10µL de colorante microbiológico Cristal Violeta a cada fijación microbiana por 3 minutos para su posterior lavado con agua, posterior

al lavado se adicionaron 10 μ L de Lugol (Delva, 15%) por 3 minutos, este reactivo posteriormente se eliminó por decantación, ulteriormente se adicionaron 200 μ L de Etanol – Acetona (Sigma-Aldrich, 90%) en una dilución 1:9 (V:V) para su posterior enjuague con agua y una última interacción con 10 μ L de Safranina (Sigma-Aldrich, 90%) durante 2 min, bajo esta tinción se esperó observar bacterias curvo espiriladas Gram negativas para *Helicobacter pylori* y bacterias esféricas Gram positivas para *Staphylococcus aureus*.

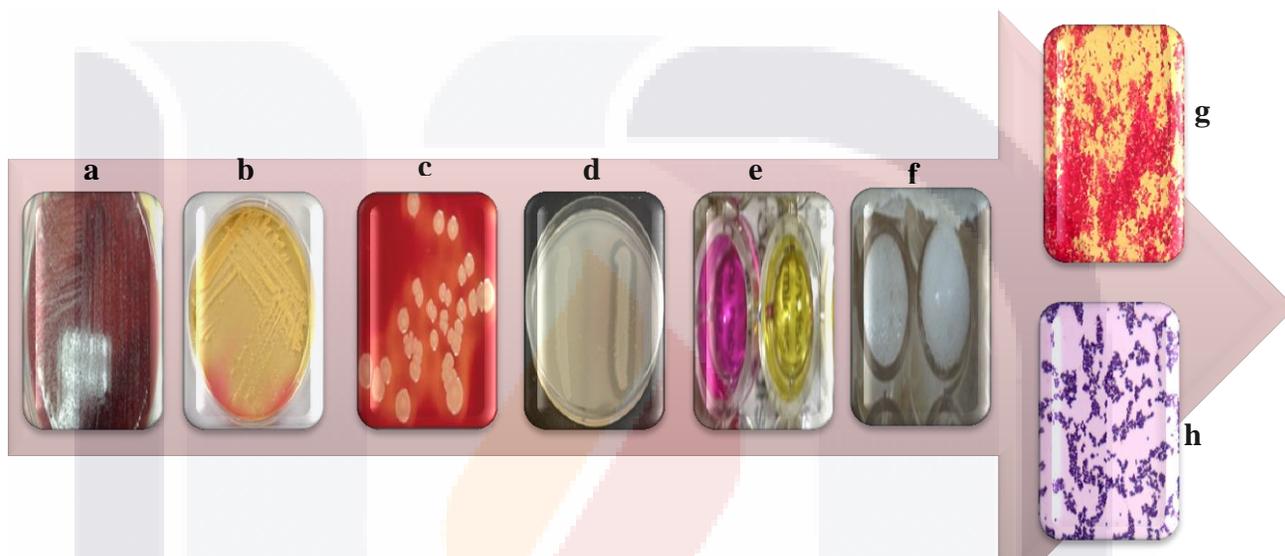


Diagrama 5. **Caracterización de microorganismos.** Para *Helicobacter pylori*: Bacterias translúcidas en Agar-Sangre (a). Hidrólisis de urea (positivo) (e). Actividad de peroxidasa con abundante burbujas (positivo) (f). Bacterias espirilares Gram-negativas (g). Para *Staphylococcus aureus*: Viraje de coloración en Sal y Manitol (positivo) (b). Presencia de β -hemólisis en Agar-Sangre (c). Aglutinación de ADN (d). Actividad de peroxidasa con abundante burbujas (positivo) (f). Bacterias esféricas Gram-positivas (h).

Formación de Biopelículas

Debido al alto potencial de patogenicidad que presentan las estructuras microbianas complejas denominadas como biopelículas y con el fin de establecer una propuesta de erradicación de esta estructura se procedió a realizar la metodología (modificada) propuesta por Cramton *et al* (1999) para obtener biopelículas estables de *Helicobacter pylori* y *Staphylococcus aureus* en condiciones *in vitro*; en primer lugar se procedió a tomar un inóculo de cada cultivo bacteriano en fase de crecimiento logarítmico y sembrarlo en PBS (pH 7.2), bajo estas condiciones se realizaron diluciones de este inóculo realizando lecturas bajo espectrofotómetro (JENWAY 7305; U.S.A.) hasta obtener una absorbancia de 0.5 bajo longitud de onda de 465 nm, la cual es correspondiente a 1×10^5 UFC/mL (corroborado por cuantificación de colonias en medio sólido) de acuerdo a los

establecido por Sutton (2011). Una vez obtenido este inóculo se procedió a adicionar 200µL de estos inóculos en placas de cultivo celular (COSTAR; U.S.A.) en tres medios distintos, ICC normal, ICC suplementado con 3% de Glucosa (Sigma-Aldrich, 95%) e ICC suplementado con 5% de Peptona (Sigma-Aldrich, 90%) con el fin de demostrar si una mayor concentración de carbohidratos favorece la formación de biopelículas y que tipo de nutriente favorece esta formación de biopelículas, una vez realizado el inóculo en la placa se procedió a dejar una incubación de las placas a distintas condiciones, siendo para *Helicobacter pylori* una incubación bajo 37°C con 40 PSI de CO₂ durante 48 horas y para *Staphylococcus aureus* una incubación bajo 37°C durante 12 horas, posterior a estos tiempos de incubación se procedió a realizar diluciones 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320 del inóculo principal (CONTROL) con el fin de establecer las mejores condiciones de crecimiento de biopelículas, una vez realizadas esta diluciones se realizaron nuevas incubaciones de la placas de cultivo a distintos tiempos 24, 48, 72, 96 y 120 horas con la finalidad de observar la cinética de formación de esta estructura microbiana bajo las condiciones de temperatura y presión de CO₂ anteriormente descritas; posterior a estas incubaciones se procedió a realizar la cuantificación de la densidad de biopelícula formada por medio de espectrofotometría al realizar 3 lavados con PBS y dos lavados con agua destilada estéril de cada pozo de cultivo; ulterior a estos lavados se adicionaron 20µL de Safranina a cada pozo durante 2 minutos y se realizaron lavado con agua destilada estéril; una vez removido el exceso de colorante se procedió a realizar las lecturas en espectrofotómetro (BIOTEK ELx800; U.S.A) bajo una longitud de onda de 450 nm; las medidas fueron procesadas en el sistema digital (Gen 5; Step Wise). Posterior a este ensayo se procedió a tomar una muestra de sobrenadante y de la misma biopelícula para realizar su estudio de morfología bajo microscopio óptico invertido (Zeiss; Alemania) y su inoculación en medios sólidos de Agar Base Sangre 10% sin antibióticos a los tiempos especificados para cada bacteria y su posterior análisis de morfología por tinción de Gram.



Diagrama 6. **Formación de Biopelículas.** Se observa el procedimiento realizado para la formación de biopelículas: Cultivos monoxénicos (a). Interacción bacteriana con medios suplementados (b). Inoculación bacteriana bajo distintos tratamientos (c). Incubación a 37°C (d). Tinción con Safranina y lectura de absorbancia (e). Evaluación microscópica de biopelículas (f).

Determinación de actividad bactericida y de inhibición de biopelículas

Una vez establecidas las condiciones de cultivo bajo las cuales se generan biopelículas estables para cada bacteria se procedió a realizar ensayos de actividad antimicrobiana sobre nuestros organismos modelo; este tipo de ensayo se realizó siguiendo la metodología establecida por Sadeghi *et al* (2014) modificada (véase diagrama 7); bajo esta referencia se procedió en primer instancia a realizar cultivos monoxenicos de cada bacteria y realizar la incubación de inóculos de 1×10^5 UFC/mL en medios ICC no suplementado como se describió anteriormente en las placas de cultivo; posterior a esta inoculación se adicionaron distintas dosis de cada NM (1 mg/mL, 2 mg/mL y 4 mg/mL) bajo esta densidad bacteriana conocida, dejando un grupo de pozos sin interacción (CONTROL) posterior a esta inoculación las placas se dejaron en incubación con agitación constante (Lumistell IRO-60; U.S.A.); una vez concluido el tiempo de incubación se dejaron reposar los inóculos durante 8 horas para asegurar la unión de las bacterias al fondo de la placa, así mismo al concluir este tiempo se realizó el lavado de cada pozo con PBS/agua destilada para la remoción de lisados bacterianos y los NMs, posteriormente cada pozo fue tratado con Safranina para la cuantificación de la densidad bacteriana como se describió anteriormente y realizar las comparaciones en orden de densidad bacteriana y establecer las Dosis Mínimas Bactericidas (DMB) para cada NM. En orden de determinar las dosis biocidas o Dosis Mínimas Inhibitorias (DMI) necesarias para ejercer un efecto

de disminución significativa contra las biopelículas de cada bacteria se realizó la formación de esta estructura bajo una dilución 1:40/24hrs de cada microorganismo; una vez obtenidas las biopelículas de cada bacteria se procedió a dejar en interacción con los NMs para su posterior análisis espectrofotométrico y realizar la comparación en orden de densidad de biopelícula, cabe mencionar que tanto el ensayo de DMB como de DMI se realizaron los sondeos en alícuotas de sobrenadante y de masa unida a placa por medio de microscopía óptica, así mismo los resultados obtenidos de DMB fueron corroborados por medio de una prueba de actividad bactericida bajo un estímulo de luz y oscuridad por 6 horas, partiendo de una densidad de 1×10^5 bacterias/mL, bajo incubación a 27°C en agitación constante en baño de agua (Lab Companion; Bs-06), para las pruebas de actividad con estímulo de luz se utilizó una lámpara (Kit-Circular; 22 watts 120 V, 60 Hz), posterior a cada hora de interacción con las DMB se realizó la inoculación de una alícuota (100 bacterias/mL) en medios de Sal y Manitol para su posterior cuantificación 24 hrs post-interacción, se procedió a realizar la comparación de actividades contra los estándares específicos de alta eficiencia en el tratamiento de estos patógenos, bajo las dosis recomendadas por las instituciones de salud; en el caso de las pruebas comparativas para *Staphylococcus aureus*, se realizó una primera interacción con bacterias (1×10^5 bacterias/mL) suspendidas en ICC en forma planctónica sobre una placa de cultivo celular de 24 pozos, para la posterior adición de 2 mg/mL de Kanamicina diluida en agua inyectable, este mismo procedimiento de interacción se llevó a cabo posterior a la formación de biopelículas de esta bacteria, igualmente las DMB y DMI de cada NM fueron utilizadas para llevar a cabo esta comparativa, dejando bajo interacción por 24hrs bajo las condiciones de cultivo previamente descritas para esta bacteria, y realizando la lectura de resultados por espectrofotometría, este protocolo se llevó a cabo para *Helicobacter pylori*, modificando los tiempos de interacción (72hrs) y el antibiótico a estudiar (Pylopack), posterior a cada ensayo se tomó una alícuota de la biopelícula para inocularla en medios enriquecidos para su posterior análisis de resistencia bacteriana en su forma de biopelícula.



Diagrama 7. **Efecto de los NMs *in vitro***. Se observa el procedimiento realizado para la evaluación de la DMI y DMB de los NMs: Interacción NMs/antibiótico y bacterias/biopelículas (a). Inoculación bacteriana/biopelículas bajo distintos tratamientos (b). Incubación a 37°C (c). Tinción con Safranina y lectura de absorbancia (d). Evaluación microscópica de biopelículas (e). Conteo de colonias remanentes de biopelículas tratadas (f)

Determinación de actividad toxicológica in vivo

Una vez establecida la actividad de nuestros NMs sobre las bacterias en su estado planctónico así como en su forma de biopelícula se procedió a elucidar la actividad de estos NMs sobre sistemas biológicos *in vivo* usando como organismo modelo ratas Wistar macho adultas (2 meses de edad; 200gr), este análisis se realizó con 8 grupos experimentales (como se observa en el diagrama 8): **a)** Prueba crónica con ZnO **b)** Prueba aguda con ZnO, **c)** Prueba crónica con MNPs crónico, **d)** Prueba aguda con MNPs, **e)** Prueba crónica con NCs crónico, **f)** Prueba aguda con NCs agudo **g)** Prueba crónica con Agua destilada (control crónico) y **h)** Prueba aguda con Agua destilada (control agudo) (n = 7/gpo); este procedimiento se realizó siguiendo el modelo establecido por (Roghayeh , et al., 2015), el cual está basado en la suspensión de los NMs en un volumen establecido de excipiente (como se aprecia en el diagrama 8), siendo en este caso la suspensión de 1, 2 y 4 mg (para la interacción crónica) y 6, 9 y 12 mg (para la interacción aguda) en 1mL de agua destilada estéril y posteriormente sonicadas por 5 min, esta suspensión fue tomada en una jeringa de insulina de 1000 unidades (BECTON DICKINSON®), posterior a la preparación de las muestras se procedió a anestesiarse los organismos modelo usando dosis hipnóticas de pentobarbital sódico; la inoculación de los NMs se realizó a través de la vena caudal realizando una aplicación lenta de la muestra para evitar el daño en la vena, posterior a la aplicación las ratas fueron divididas en dos subgrupos, uno

de ellos (n=3/gpo) con el fin de realizar el análisis de los parámetros fisiológicos de ingesta de agua, volumen de orina excretada, peso, y bioacumulación; las ratas pertenecientes a estos subgrupos fueron dispuestas en jaulas metabólicas (TECNIPLAST®), estos parámetros fisiológicos fueron medidos durante 90 días para el modelo crónico y durante 30 días para el modelo agudo, realizando la inoculación de los NMs en estos subgrupos los días 1, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 para la interacción crónica y en una única dosis el día 1 en la interacción aguda; otro subgrupo de roedores (n=4/gpo) fueron dispuestas en jaulas estándar de análisis veterinario, para realizar el estudio de los parámetros bioquímicos en suero de TGO, TGP, Albumina, Creatinina, Glucosa y Bilirrubina total y directa para establecer el posible daño sistemático de la interacción de estos NMs a distintas dosis con respecto al tiempo, el estudio de estos parámetros enzimáticos se realizó en equipo automatizado CLIMA PLUS (DPC), en suero en distintos días de la intoxicación; 1, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 para la interacción crónica y diariamente en la intoxicación aguda; así mismo se realizaron pruebas de absorción atómica en las muestras de orina, para determinar la cantidad de iones metálicos de cada NM eliminada, dicho análisis se llevó a cabo por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer; PinAAcle 900 T), bajo lámparas específicas para Zn y Fe; las muestras de orina fueron previamente tratadas, bajo una digestión en medio ácido, dicha reacción se llevó a cabo al añadir ácido nítrico (hasta alcanzar un pH de 5 en la muestra) a las muestras (5mL) esta mezcla se dejó en interacción bajo baño de aceite y con extracción de gases (Fisher Hamilton) hasta lograr el aclaramiento de la muestra; posterior a esta digestión las muestras fueron conservadas bajo refrigeración (4 °C; LG, Smart fresh) hasta el día de su análisis. Posteriormente se procedió a realizar el sacrificio de los organismos modelo mediante perfusión sistémica, la cual se basó en la previa anestesia de los organismos modelo con pentobarbital sódico (SEDALPHORTE®); posterior al proceso de anestesia de los organismos modelos y obtener un estado de hipnosis profunda se procedió a sujetar los animales a una cama quirúrgica, realizando una incisión por encima de la epífisis xifoides y realizar la fractura de la cavidad torácica, con el fin de dejar al descubierto el corazón (aun funcional), este órgano fue lavado con solución salina fisiológica y se le retiró las capas de pleura y pericardio que lo rodeaban, posterior a esto se realizó una lesión en la parte superior a la aurícula derecha permitiendo el desangramiento del animal por volumen controlado, mientras que en el ventrículo izquierdo se realizó una punción con una cánula conectada a una bomba peristáltica, con lo cual se realizó el lavado de los órganos por medio de la aplicación de 120mL/ de Solución de lavado y 120mL de Solución fijadora, posterior a este proceso de fijación

por perfusión, los órganos fueron extirpados de los animales y conservados en 200mL de Formalina Neutra (J.T. BAKER) por 7 días, posterior a este tiempo con conservación se realizó la inclusión en parafina de los órganos utilizando un equipo automatizado (LEICA, TP 1020). 24 horas después a la inclusión de parafina se tomaron muestras de estos órganos, las cuales fueron colocadas en bloques de parafina por métodos automatizados (LEICA, EG 1150H) para su posterior conservación a 4°C (LG, smart fresh) por 48 hrs, ulterior a esta conserva se realizaron cortes histológicos de cada órgano en micrótopo (LEICA, RM 2125RT) con un grosor de 5nm, una vez obtenidos los cortes se eliminó el exceso de parafina bajo incubación (37°C / 24hrs) (LYON, 48-OR), posterior a esta incubación, las laminillas fueron teñidas siguiendo la técnica de Hematoxilina-Eosina bajo equipo automatizado (LEICA ST 4040), una vez teñidas las muestras histológicas estas fueron montadas y selladas con Entellan (MAILE) para su posterior análisis bajo microscopía de luz visible (ZEISS, Primo Star).



Diagrama 8. **Efecto de los NMs *in vivo***. Se observa el procedimiento realizado para la evaluación de la toxicidad de los NMs en rata Wistar Macho: Interacción NMs-Ratas (a). Lectura de parámetros fisiológicos y química sanguínea (b). Absorción atómica de iones metálicos en orina (c). Tinción histológica por H-E y evaluación microscópica (d).

Análisis estadístico

La correlación de los resultados *in vitro* se realizó por evaluaciones estadísticas en modelos ANOVA de Tukey y análisis estadístico descriptivo realizado en programa computacional GraphPad Prism 5.00.

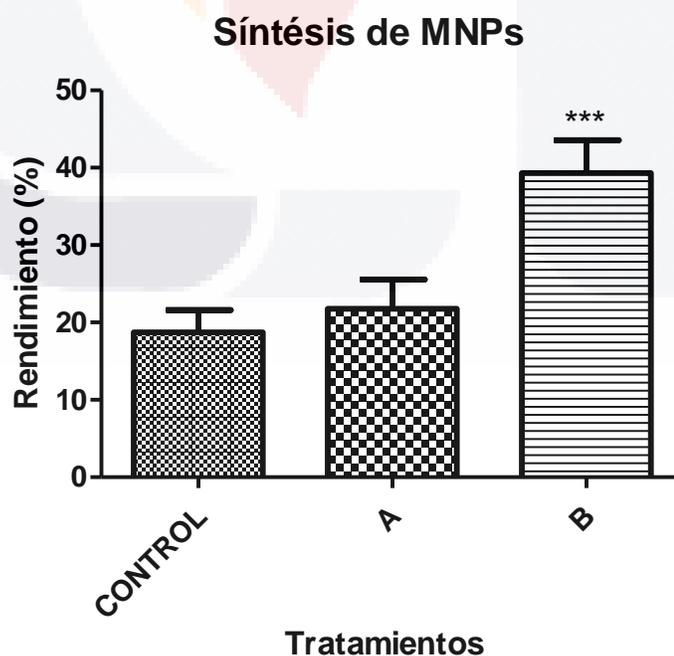


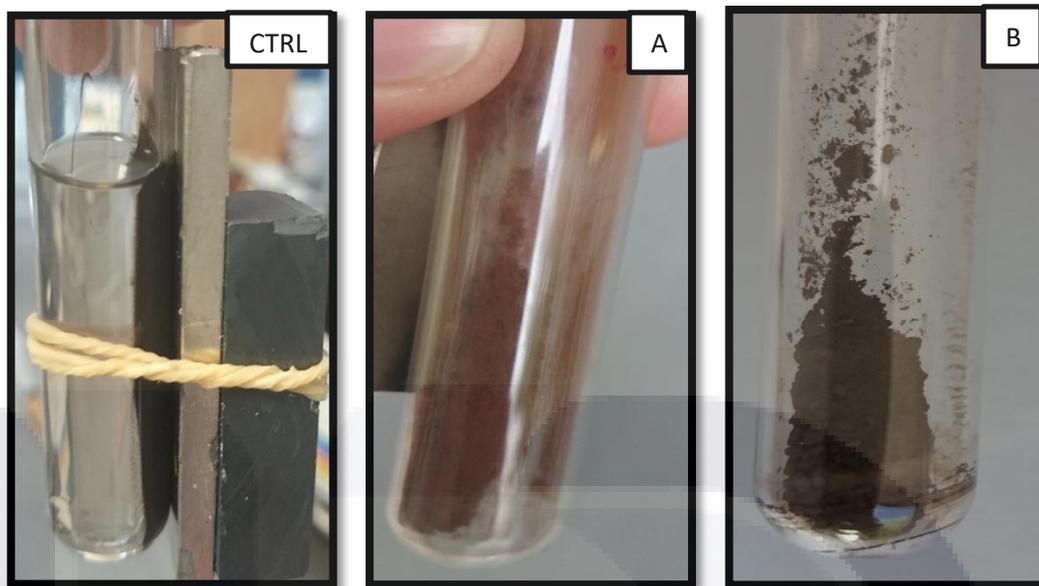


RESULTADOS

3.1 SÍNTESIS DE MNPs (Fe_3O_4):

Para poder dilucidar la biocatividad y toxicidad en sistemas *in vitro* e *in vivo* que poseen las Fe_3O_4 MNPs, se realizó la síntesis y optimización de estos NMs a través de distintas variantes en las etapas iniciales (reposo en frío) y en las etapas finales (secado) del proceso de purificación; con la finalidad de incrementar el rendimiento final en la síntesis de estas NPs en comparación a la metodología tradicional sugerida (Herrera, 2013) (Tratamiento control); realizando varios ensayos de síntesis ($n = 10$) bajo consideraciones estequiométricas de 1 mmol, se realizó la comparación estadística entre los rendimientos de los tres tratamientos de síntesis para determinar el mejor modelo para la producción de estos MNMs; como se puede observar en la gráfica 1 al hacer las comparaciones entre el tratamiento control y el procedimiento A (secado a 61°) no existen diferencias significativas ($P \geq 0.05$) entre los rendimientos finales de las MNPs obtenidas con el control ($18.74 \pm 2.87\%$) y las obtenidas con el tratamiento A ($21.78 \pm 3.79\%$); sin embargo como se puede observar las NPs obtenidas bajo este procedimiento de síntesis tienden a ser de una coloración más rojiza con respecto a la control. Por otra parte al realizar la comparación estadística en el tratamiento control y el procedimiento B (reposo en frío) se puede observar una clara diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre el rendimiento obtenido del tratamiento B ($39.30 \pm 4.26\%$) con respecto al control; cabe mencionar que estos MNMs se asemejaban en coloración a los obtenidos en el control.





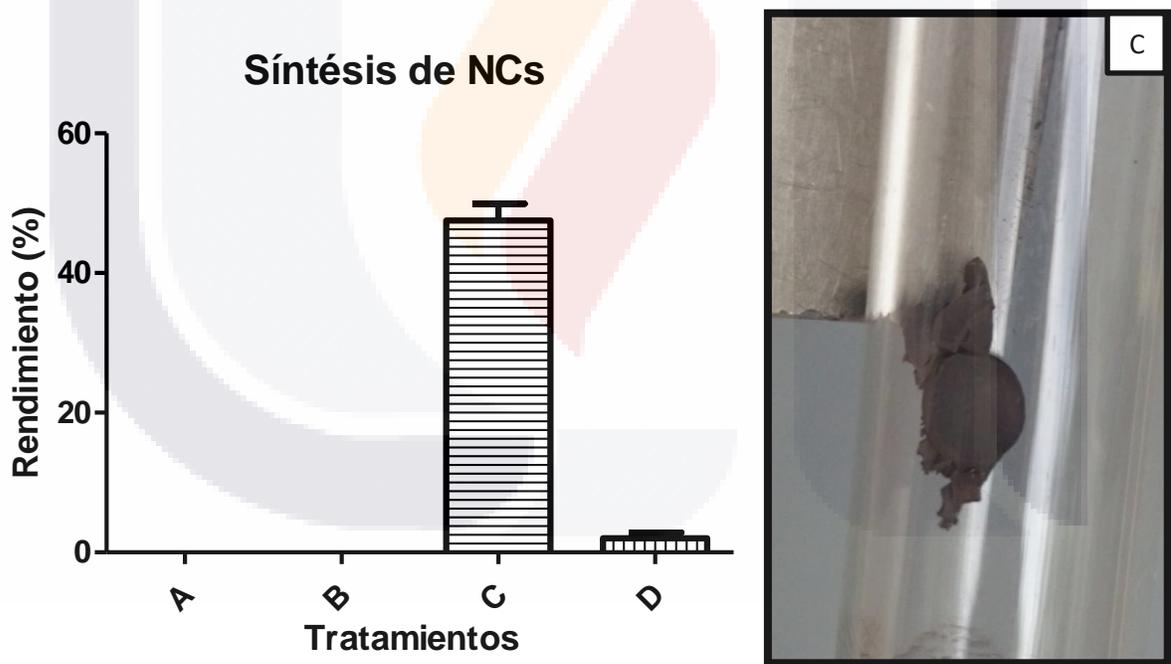
Gráfica 1. **Síntesis de MNPs.** Se optimizaron las condiciones de síntesis y purificación por recapturación magnética de MNPs. La recapturación a bajas temperaturas (B), incrementa los rendimientos hasta $39.30 \pm 4.26\%$ con respecto al control ($18.74 \pm 2.87\%$) y a tratamientos a altas temperaturas (A) ($21.78 \pm 3.79\%$).

Estos resultados sugieren que la purificación por recapturación magnética de óxidos magnéticos nano-estructurados a bajas temperaturas logra aumentar significativamente el porcentaje de rendimiento molar con respecto a las condiciones de extravasación sugeridas por Herrera (2013). Debido a que en este tipo de procesos, las condiciones de reacción, como lo son los reservorios de solvente, la temperatura y el tiempo, usualmente tienen un efecto importante sobre los productos; así mismo cabe resaltar que el tamaño de las NPs de Fe_3O_4 aumenta con un tiempo prolongado de reacción. Al mantener una alta cantidad de reservorio de solvente (alcohol bencílico), el producto resultante puede generar una menor precipitación de MNPs de acuerdo a lo establecido por Laurent *et al* (2008) con lo que se podría explicar el bajo porcentaje de rendimiento molar en el tratamiento control. Como lo estipulan Sun *et al* (2006) la generación de NMs depende de la temperatura de reacción en mayor medida debido a que la nucleación de estos materiales nano-estructurados se beneficia a altas temperaturas generando un tamaño de partícula menor a los 30 nm; así mismo se ha descrito que las reacciones de síntesis a altas temperaturas con Hierro (III) acetilacetonato en solventes orgánicos generan MNPs mono-dispersas caracterizadas por ser altamente hidrofóbicas hasta la adherencia de un agente surfactante bipolar. Por otra parte Lopez *et al* (2010) describen que la purificación de MNPs a temperaturas inferiores a los $10^\circ C$ podría favorecer la de reducción de

agentes externos a la reacción (como agentes estabilizadores) o bien para prevenir la agregación interpartícula al disminuir los enlaces electrostáticos existentes entre los átomos de la NP.

3.2 SÍNTESIS DE NCs:

Ulterior de la optimización de la purificación de las MNPs se procedió a realizar la obtención de ZnO NPs y de ZnO@Fe₃O₄ NCs por ruta solvotérmica activada por microondas (n = 10); como se demuestra en la gráfica 2 el rendimiento máximo de los NCs de ZnO@Fe₃O₄ fue de 47.30 ± 2.39%; correspondiente al tratamiento C (ZnO NPs + Fe(acac)₃), el cual posee un porcentaje de rendimiento molar significativamente mayor (P ≤ 0.05) que el rendimiento obtenido por el tratamiento D (ZnO NPs + MNPs) correspondiente a 2.6 ± 1.04%; sin embargo es posible observar que los tratamientos A ((CH₃COO)₂Zn·2H₂O + Fe(acac)₃) y B (ZnO NPs + Fe(acac)₃) no lograron la síntesis de este NC bajo las condiciones de reacción propuestas.



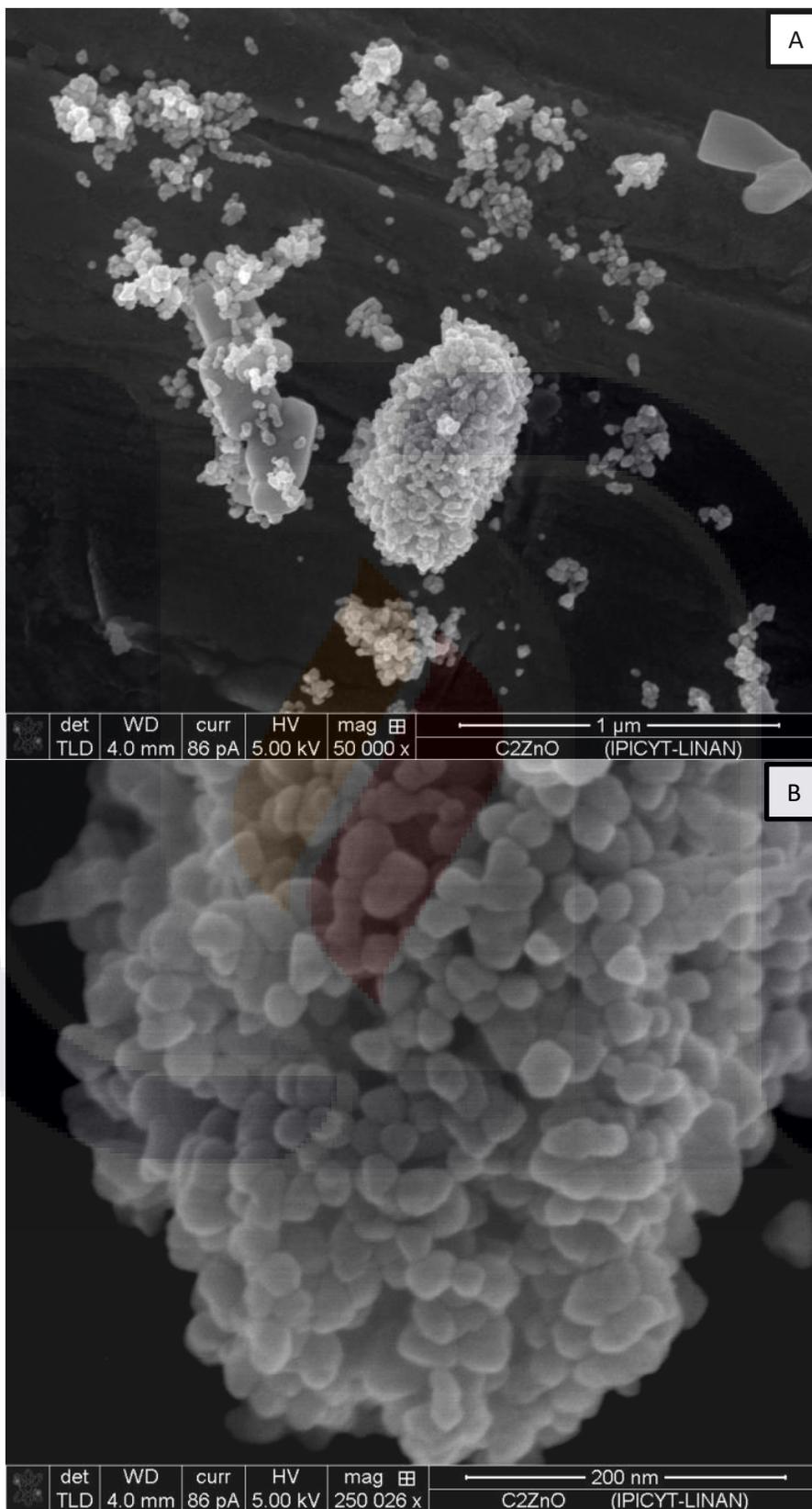
Gráfica 2. Síntesis de NCs: Se optimizaron las condiciones de síntesis y purificación por recapturación magnética de NCs. La mezcla de las ZnO NPs con el Fe(acac)₃ (C), incrementa los rendimientos hasta 47.30 ± 2.39% con respecto al tratamiento D (2.6 ± 1.04%) y los tratamientos A (0%) y B (0%).

Como se puede observar en la gráfica 2 la síntesis de NCs únicamente fue posible mediante la mezcla de 1 mol de ZnO NPs previamente sintetizadas y 1 mol de Hierro (III) acetilacetato, bajo reacción solvotérmica activada por microondas (condiciones de síntesis de MNPs), lo cual puede explicarse a los establecido por Hong *et al* (2008), los cuales establecen que el realizar una síntesis de NCs a temperaturas de 200 – 250°C partiendo de MNPs, estas perderían sus propiedades magnéticas debido a su oxidación de Fe₃O₄ a Fe₂O₃, por otra parte se teoriza un mecanismo de síntesis de NCs, donde, el Fe(acac)₃ se oxida a Fe₃O₄ a la par que interaccionan y recubren a las ZnO NPs, generando un compósito con propiedades opto-eléctricas y fotocatalíticas semejantes al ZnO y superparamagnéticas como las Fe₃O₄ NPs, así mismo planteando lo establecido por Wei *et al* (2011) se puede observar una mayor dispersión y homogeneización de los NCs en medios acuosos en contraste a las MNPs debido la estabilidad que le confiere el núcleo de ZnO NPs cubiertos de Fe₃O₄, sin necesidad de usar algún agente estabilizador como lo postulan Beltran *et al* (2010).

3.3 CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES NANO-ESTRUCTURADOS:

3.3.1. Caracterización morfológica y elemental.

Ulterior a la síntesis, se procedió a realizar un análisis con respecto a la morfología cristalina y la identificación de la composición elemental de los NMs sintetizados; lo anterior se realizó por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia de energía dispersiva (EDS), realizando el estudio por triplicado (n =3); como se observa en la imagen 1, la morfología cristalina de las ZnO NPs puede ser descrita como esferas aglomeradas nano-estructuradas (**a**) con un tamaño aproximado de 25 nm ± 10 nm (**b**); así mismo en el análisis por EDS (**c**) se puede apreciar que estos NMs se encuentran constituidos en su mayoría de Zn y O en alta proporción molar característicos de este NM.



C

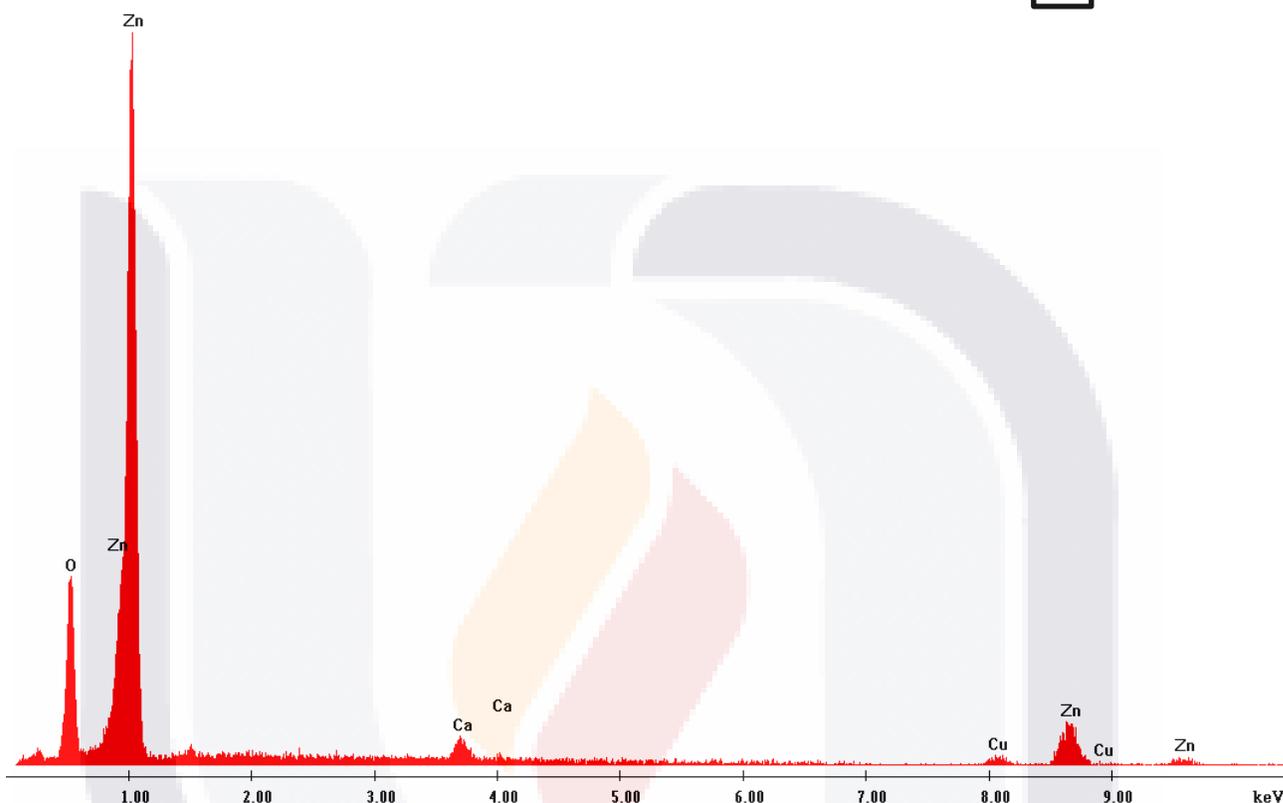


Imagen 1. **Caracterización morfológica y elemental de ZnO NPs:** Se observa la morfología cristalina de las ZnO NPs sintetizadas; encontrando que a 50000x (a) se observa el material nano-estructurado y aglomerado; mientras que a 250000x (b) presentan una morfología esférica con un diámetro aproximado de $25 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$, así mismo se puede observar en el análisis elemental (c) la composición en mayor proporción de Zn y O de este NM.

Haciendo énfasis en la aglomeración de las ZnO NPs mostrada en la imagen 1 (a), esta se podría explicar debido a los procesos de pulverización física aplicados a este NM, donde posiblemente la fragmentación por pulverización mecánica no fue lo suficientemente homogénea o bien el tiempo de exposición a sonicación de estos materiales fue poco para lograr ZnO NPs disgregadas, lo anterior está sustentado de acuerdo a la investigación realizada por Kumar *et al* (2011); por otra parte al observar el diámetro aproximando de este NM (b) se encontró que concuerda con los experimentos realizados Seil *et al* (2012) quienes obtuvieron cristales esféricos nano-estructurados con un diámetro aproximado de 28 nm, lo que respalda que nuestras condiciones de síntesis para ZnO NPs

son óptimas. Por otra parte en el estudio por EDS (c) se puede denotar la presencia de remanentes de Cu y Ca en una baja proporción molar lo cual está relacionado directamente con el soporte utilizado para este análisis.

Por otra parte como se observa en la imagen 2 las MNPs presentan una morfología esférica nanoestructurada con diversas aglomeraciones (a) con un diámetro aproximado de 5 ± 3 nm (b); así mismo en el análisis por EDS (c) se puede apreciar que estos NMs se encuentran constituidos en alta proporción molar de Fe y O característicos de este NM.

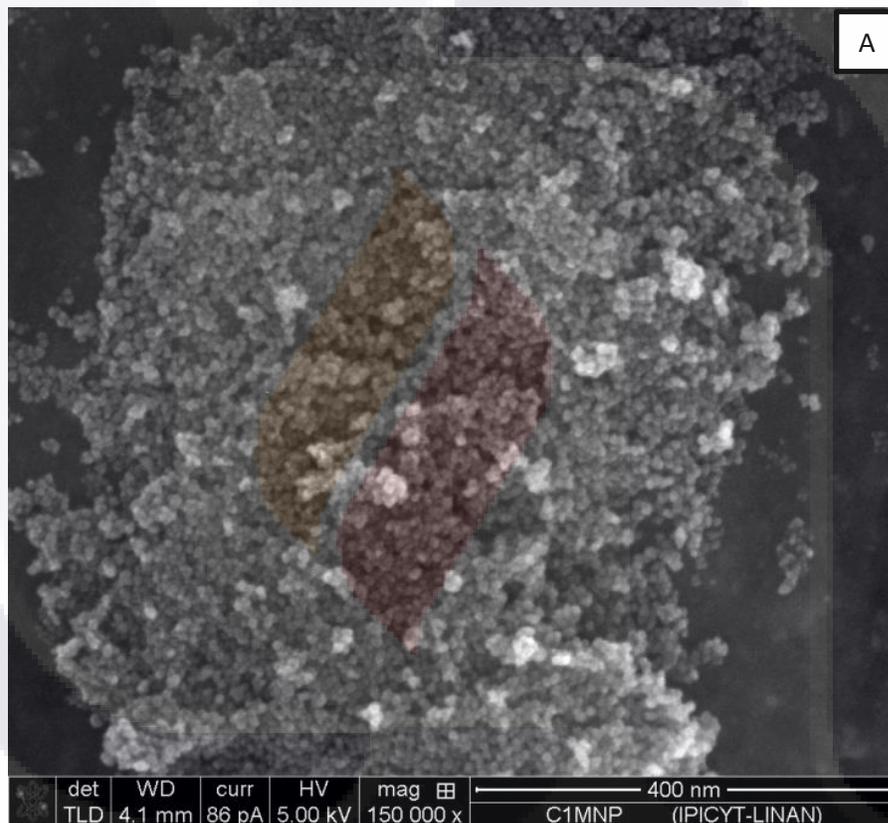
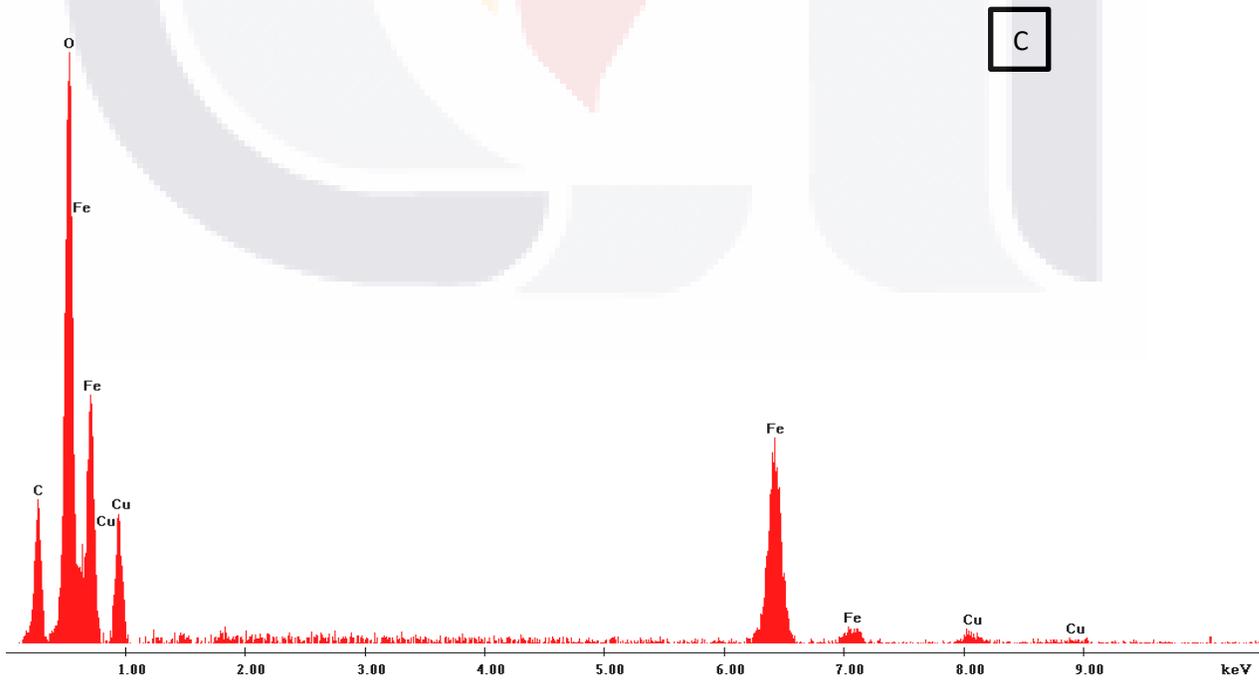
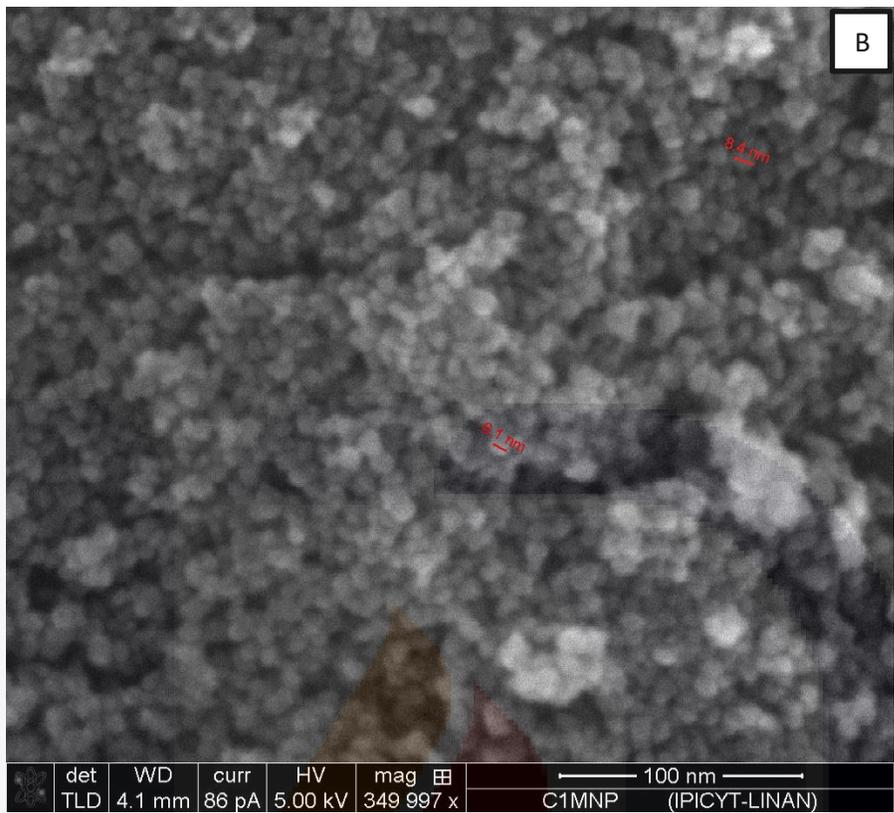
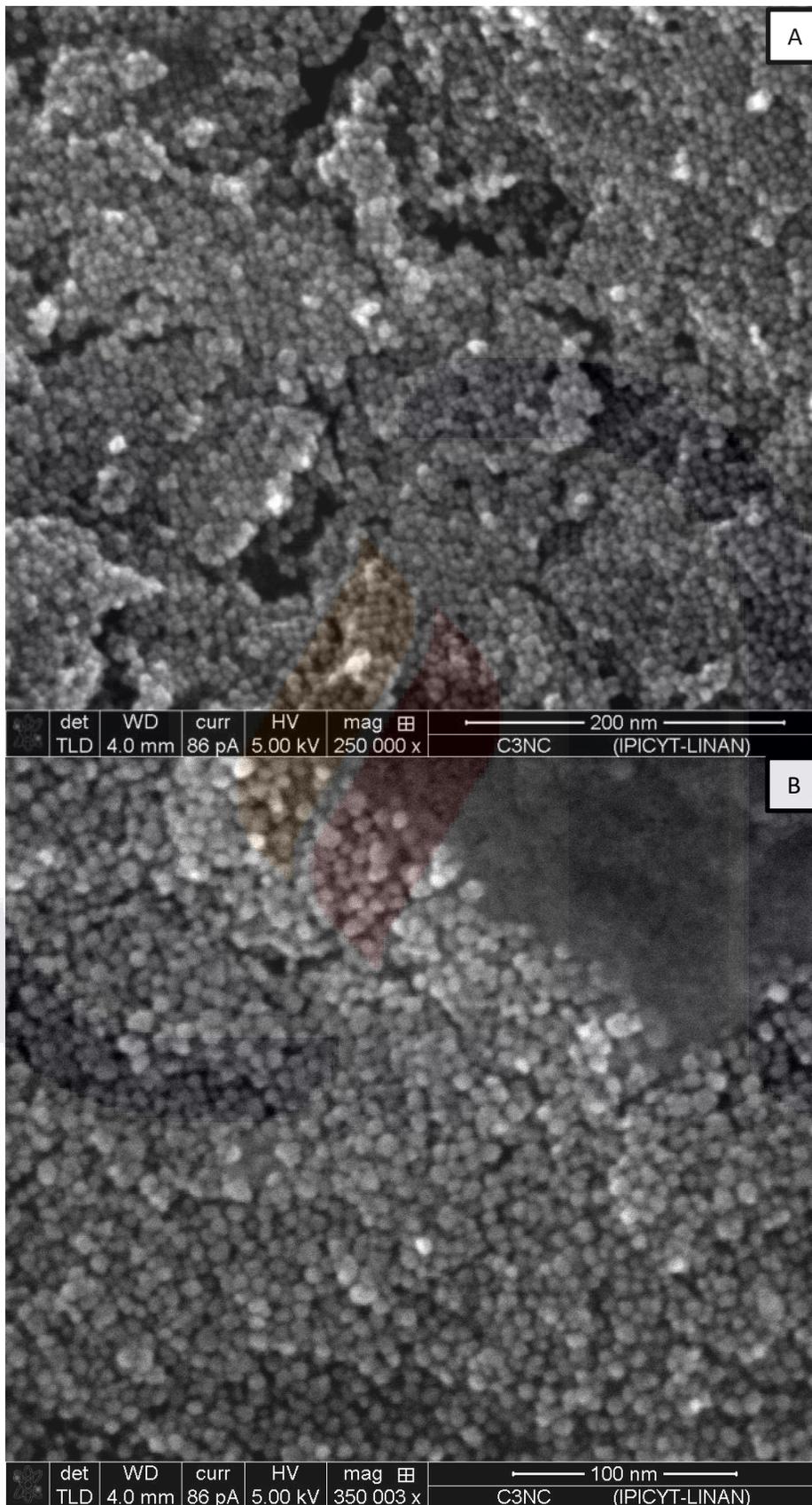


Imagen 2. **Caracterización morfológica y elemental de MNPs:** Se observa la morfología cristalina de las MNPs sintetizadas; encontrando que a 150000x (a) se observa el material nano-estructurado y aglomerado; mientras que a 350000x (b) presentan una morfología esférica con un diámetro aproximado de $5 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$, así mismo se puede observar en el análisis elemental (c) la composición en mayor proporción de Fe y O de este NM.



Como se puede observar en la imagen 2, estas MNPs se encuentran aglomeradas (**a**) esto podría deberse en mayor medida al proceso de secado, como lo sugiere Herrera (2013) debido a que la disgregación del ferro-fluido se encuentra compresada debido al diámetro del recipiente, por lo que es posible que la aglomeración se llevara a cabo de esta manera, sin embargo al evaluar el diámetro de estos NMs, este se encontraba dentro de la nano-escala; este diámetro concuerda con la experimentación realizada por Bilecka *et al* (2008) quienes obtuvieron cristales esféricos nano-estructurados con un diámetro aproximado de 8 nm, gracias a estos resultados se puede respaldar que nuestro proceso de optimización del proceso de purificación por recapturación magnética a bajas temperaturas son benéficas para este estudio. Así mismo en el estudio por EDS (**c**) se pueden observar remanentes a baja proporción molar de Cu y C, siendo el primero relacionado con el soporte utilizado para este análisis, y el segundo atribuible a una contaminación del precursor o bien la presencia del solvente, sin embargo el estudio realizado por Herrera (2013) indica que la presencia de C en el análisis, está relacionado al Electrodag 502 utilizado en este análisis.

En contraste como se observa en la imagen 3 los NCs se pueden describir como aglomeraciones cristalinas nano-estructuradas (**a**), conformadas por dos tipos de esferas, una de diámetro mayor (correspondientes aparentemente a ZnO) rodeadas de los cristales esféricos de menor diámetro (correspondientes aparentemente a Fe₃O₄) (**b**). Al realizar el análisis por EDS (**c**) se puede apreciar que estos NMs se encuentran constituidos de Fe, Zn y O lo cual era esperado de acuerdo a nuestro proceso de síntesis.



C

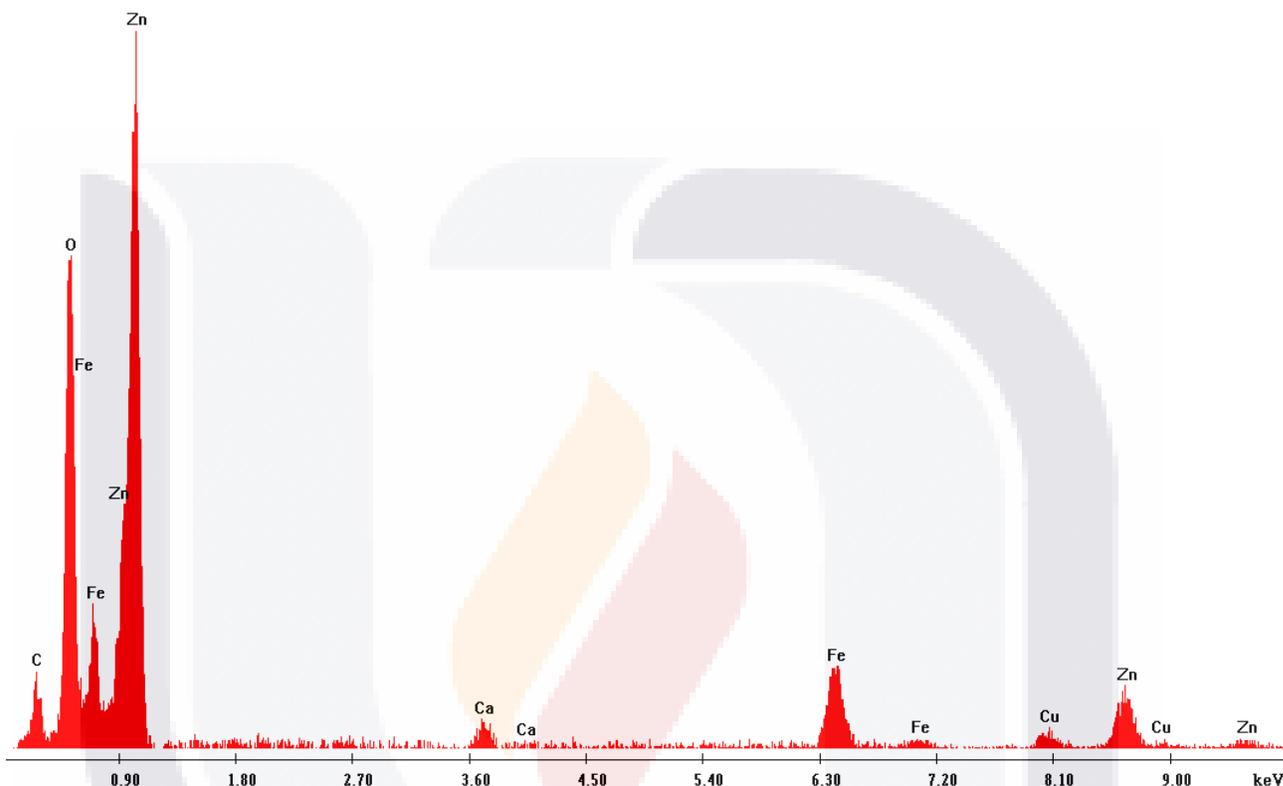


Imagen 3. **Caracterización morfológica y elemental de NCs:** Se observa la morfología cristalina de las NCs sintetizados; encontrando que a 250000x **(a)** se observa el material nano-estructurado y aglomerado; mientras que a 350000x **(b)** presentan una morfología esférica, así mismo se puede observar en el análisis elemental **(c)** la composición en mayor proporción de Fe, Zn y O de este NM.

Como se puede observar en la imagen 3, estas MNPs se encuentran aglomeradas **(a)** esto podría deberse en mayor medida a la gran cantidad de interacciones electrostáticas presentes en el NM, como lo sugiere López *et al* (2010), por lo que es posible que la aglomeración se llevara a cabo de esta manera gracia a la alta cantidad de iones en el NC. Así mismo en el estudio por EDS **(c)** se pueden observar una baja proporción molar de Cu, C y Ca, siendo el primero y el tercero relacionados con el soporte utilizado para este análisis, el segundo atribuible al Electrodag 502 utilizado en este análisis.

3.3.2. Difracción de Rayos X (DRX)

Posteriormente, se procedió a realizar un análisis con respecto a la identificación de la fase cristalina de los NMs sintetizados; lo anterior se realizó por medio de DRX realizando el estudio por triplicado ($n = 3$); como se observa en la imagen 4, el difractograma de ZnO NPS indica la formación de un material cristalino con una estructura típica hexagonal de Wurtzita 2H P63mc (186), así mismo el difractograma de MNPS indica la formación de un material cristalino con una estructura cúbica de magnetita Fd-3m (227); en contraste el difractograma de NCs indica la formación de un material cristalino con una estructura Hexagonal Wurtzita y algunas similitudes con magnetita.

Por otra parte como se puede observar en la imagen 4 las ZnO NPs presentan el difractograma característico de cristales hexagonales, posiblemente de Wurtzita, sin embargo se pueden apreciar máximos de intensidad anormales no pertenecientes a esta estructura cristalina entre los 40 y 50 cm^{-1} , dichos máximos pueden ser explicados debido a la presencia de las bajas proporciones molares de contaminantes (posiblemente de CaCO_3) aunque no se sabe con exactitud de donde provienen, bajo estos resultados se corrobora los resultados obtenidos en el EDS para estos NMs (imagen 1).

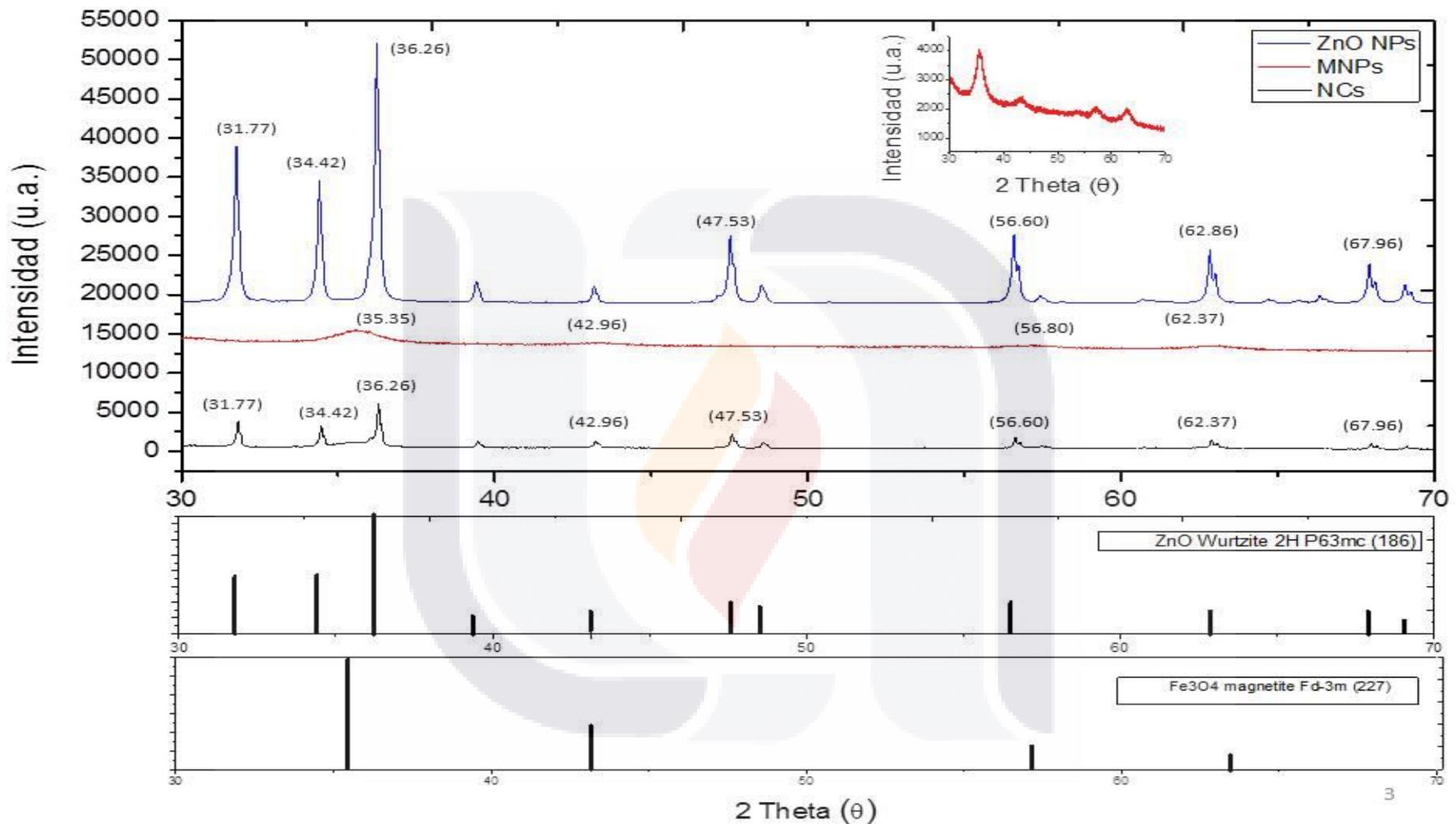


Imagen 4. **DRX:** Se observa la fase cristalina de cada uno de los NMs, encontrando fase hexagonal para las ZnO NPS, en el caso de las MNPs se encontró una fase cristalina cúbica, también se observa una fase cristalina hexagonal para los NCs; se anexa una ampliación del difractograma de MNPs en la parte superior y los difractogramas control de wurtzita y magnetita en la parte inferior

Así mismo en la imagen 4 se puede apreciar el difractograma de MNPs, el cual concuerda con la estructura cristalina cúbica de la magnetita de acuerdo a lo establecido en las cartas cristalográficas y a lo reportado por Herrera (2013) y Aliahmad *et al* (2013), sin embargo es posible observar que los máximos de intensidad de esta caracterización se encuentran un tanto dispersos lo cual es explicado por la presencia de remanentes de CaCO_3 como se presenta en el EDS de este NM (imagen 2), sin embargo como lo describen Aliahmad *et al* (2013) la presencia de este tipo de impurezas no afectan en gran medida a la propiedades optoelectricas y magnéticas del material.

En base a lo anterior al interpretar los resultados obtenidos del difractograma para NCs (imagen 4) se pudo observar la presencia de los máximos de intensidad característicos de cada uno de los NMs que lo constituyen sin embargo es posible observar que los máximos pertenecientes a la fase cristalina hexagonal de ZnO poseen una mayor intensidad que los que pertenecen al Fe_3O_4 , lo que puede sugerir que los cristales hexagonales de ZnO se encuentran acoplados a los cristales cúbicos de Fe_3O_4 ; así mismo estas intensidades pueden estar relacionadas con el tamaño y el porcentaje molar presente de cada material en forma cristalina dentro del NC; tomando en cuenta el estudio realizado por Romčević *et al* (2008) estos resultados concuerdan debido a que estos autores describen que al realizar la incorporación de estos NMs en un NC y la concentración de las ZnO NPs se encuentra por debajo del 5%, la fase cristalina del ZnO suele no aparecer en el difractograma, sin embargo al realizar este NC bajo una concentración mínima del 20% de ZnO NPs ambas fases cristalinas pueden observarse de forma de máximos con una mayor intensidad a lo normal, a pesar de esto, los autores describen que al realizar el NC con concentraciones superiores al 40% de ZnO NPs es posible observar ambas fases cristalinas de los NMs de forma detallada; así como máximos característicos del compuesto, esto último respalda los resultados obtenidos en el difractograma debido a que en nuestra investigación se trabajaron con porcentajes molares del 50% de ZnO NPs, sin embargo también fue posible observar la presencia de máximos característicos a cristales tetraédricos pertenecientes al CaCO_3 , concordando de esta manera con los resultados obtenidos en el EDs de estos materiales (imagen 3).

3.3.3. Espectroscopia RAMAN

Ulteriormente, se procedió a realizar un análisis con respecto a la composición química de los NMs sintetizados; lo anterior se realizó por medio de Raman realizando el estudio por triplicado ($n = 3$); como se observa en la imagen 5, el espectro de ZnO NPS indica la presencia de los modos vibracionales característicos de cristales de ZnO nano-estructurados; así mismo se puede observar la presencia de bandas contaminantes y la apreciación de un ligero corrimiento hacia la izquierda respecto a los valores control. Por otra parte el espectro de MNPS indica la presencia de modos vibracionales característicos para cristales de Fe_2O_3 nano-estructurados, sin presencia de bandas contaminante, adicionalmente se observa un ligero corrimiento hacia la izquierda respecto a los valores control para este material. En contraste el espectro de NCS indica la presencia de modos vibracionales característicos de cristales de ZnO y Fe_3O_4 nano-estructurados, así mismo se puede observar la presencia de bandas contaminantes y la apreciación de un ligero corrimiento hacia la izquierda respecto a ambos valores control.

Como se aprecia en la imagen 5 el espectro Raman para ZnO NPs denota una banda Raman característica de cristales nano-estructurados, sin embargo se aprecia un ligero corrimiento hacia la izquierda, lo cual puede ser indicador que el compuesto obtenido posee aglomeraciones cristalinas (como se observa en la imagen 1) en forma micro-estructurada, esto puede ser respaldado por lo reportado por Nejadi *et al* (2011) quienes trabajaron con muestras de alta pureza de este NM en fase cristalina de Wurtzita micro y nano-estururada.

De igual manera se observan estos cambios en los espectros realizados para la caracterización de las MNPs que presentan bandas difusas (imagen 5), así mismo también es posible observar un ligero corrimiento hacia la izquierda, lo cual puede ser indicador que el compuesto obtenido posee aglomeraciones cristalinas (como se observa en la imagen 2) en forma micro-estructurada sin embargo estos corrimeintos son característicos para la composición química de la maghemita; en este sentido se podría explicar que este comportamiento es debido a la oxidación de las MNPs y pasar de magnetita a maghemita quizá debido a un mal procesamiento de la muestra, una larga exposición de las MNPs al ambiente sin llevar acabo la caracterización, entre otras.

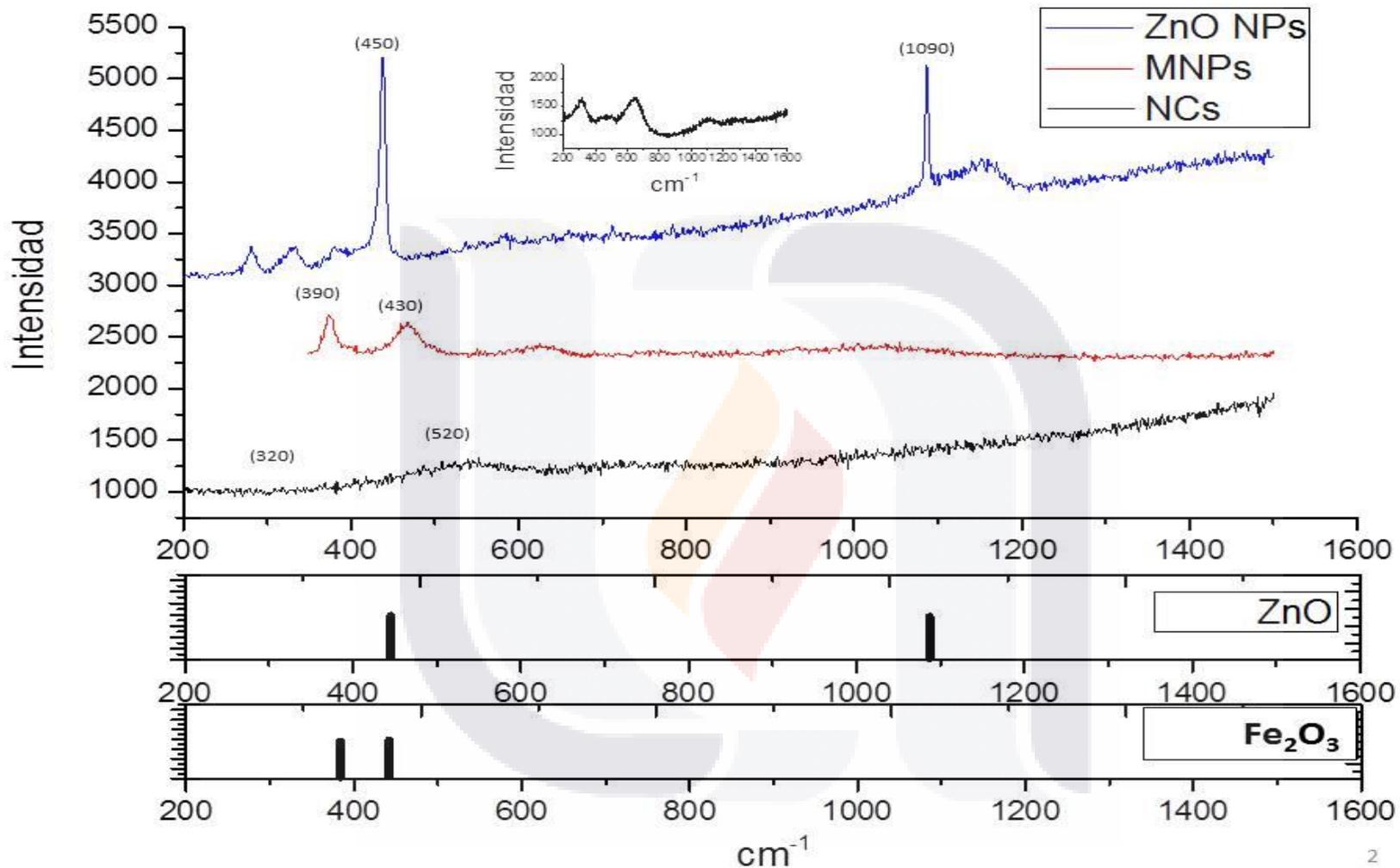


Imagen 5. **Raman:** Se observa la composición química de cada uno de los NMs, el espectro de ZnO NPs presenta bandas que concuerda mayoritariamente con el ZnO en fase cristalina nano-estructurada, así como un leve corrimiento hacia la izquierda por posibles estructuras cristalinas micro-estructuradas; el espectro de MNPs presenta bandas que concuerda con la maghemita en fase cristalina nano-estructurada, así como un leve corrimiento hacia la izquierda por posibles estructuras cristalinas micro-estructuradas; el espectro de NCs presenta bandas que concuerdan con ambos materiales en fase cristalina nano-estructurada, y un leve corrimiento hacia la izquierda por posibles estructuras cristalinas micro-estructuradas. Se anexa una ampliación del espectro de NCs en la parte superior y los espectros control de ZnO y Fe_2O_3 en la parte inferior

Sin embargo Hanesch (2009) describe que al realizar el estudio Raman de las MNPs y realizar la interacción de estas NPS con los láseres del estudio se logra la oxidación de la muestra por lo que el espectro que se observa es de Fe_2O_3 o en ocasiones dependiendo de la estabilidad de la NP sintetizada, esta puede llegar a oxidarse hasta el estado de la hematita, así mismo estos autores describen que la presencia de impurezas de otros metales pueden llegar a generar bandas difusas en el espectro que podrían llegar a confundirse con una baja cristalinidad del NM.

Por otra parte al considerar el estudio realizado en los NCs (imagen 5) se observa una difuminación de las bandas del espectro, este ligero corrimiento hacia la izquierda puede ser atribuido a la presencia de aglomeraciones cristalinas micro-estructuradas (como se observa en la imagen 3), así mismo los estudios realizados por Zhang *et al* (2012) en este mismo material indican que la presencia de dopantes en bajas concentraciones molares sobre el ZnO puede generar un corrimiento anormal hacia la izquierda del espectro, a pesar de esto, los estudios realizados por Romčević *et al* (2008) concuerdan con el espectro Raman obtenido en este estudio; señalando que la presencia de impurezas puede afectar la difusión e intensidad de los picos del espectro. Así la posible oxidación de las MNPs a Fe_2O_3 explica que los picos del espectro concuerdan con un NC de $\text{ZnO}@\text{Fe}_2\text{O}_3$.

3.4 EFECTO DE LOS NMs *in vitro*:

3.4.1. Cultivo de *Helicobacter pylori*

Posterior a la reactivación de la cepa A97 de *H. pylori* en medios de ICC_{10%} glicerol se realizaron distintas pruebas bioquímicas para corroborar la presencia de esta bacteria en medios sólidos de agar sangre 9% y 5% de coctel de antibióticos selectivos (vancomicina, anfotericina B, trimetoprima y cefsulodina); como se observa en la imagen 2 las pruebas bioquímicas de catalasa y ureasa presentan reacciones positivas para la determinación de esta bacteria Gram-negativa al virar el medio de urea hacia una coloración rosa intenso. Así mismo se pudo observar que esta cepa bacteriana es capaz de oxidar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generando una gran cantidad de burbujas en el medio; en contraste se puede observar la formación de colonias puntiformes translúcidas en los medios sólidos sin presencia de halos de hemólisis, en este contexto al realizar la caracterización microscópica por tinción de Gram, se pudo observar la presencia de bacterias curvo-espirladas Gram negativas con una longitud promedio de $3.5 \times 0.5 \mu\text{m}$ lo que confirma la presencia de *Helicobacter pylori* en medios de cultivo.

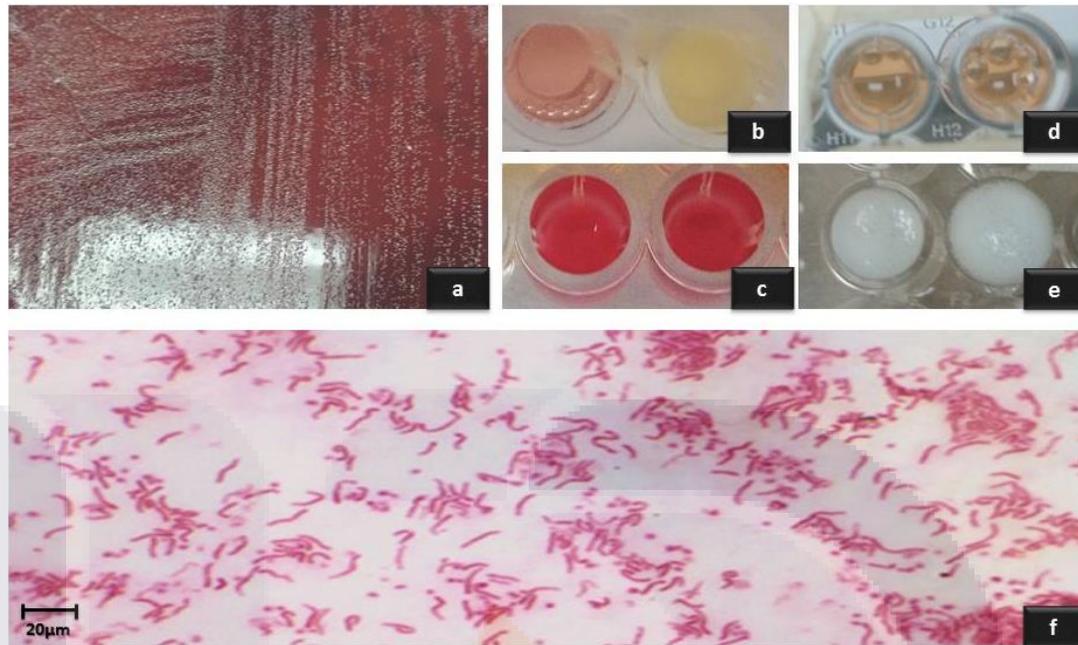


Imagen 6. **Cultivo de *Helicobacter pylori***: Se observan colonias puntiformes translúcidas en medio agar-sangre (a), las pruebas de caracterización bioquímica mostraron ser positivas para ureasa (c) (b: control negativo) y catalasa (e) (d: control negativo); se muestra tinción de Gram, demostrando espirilos con una longitud promedio de 3.5 x 0.5 µm teñidos con safranina (f)

3.4.2. Cultivo de *Staphylococcus aureus*

Ulterior a la reactivación de la cepa de *Staphylococcus aureus* en medios de ICC_{10%} glicerol se realizaron distintas pruebas bioquímicas para corroborar la presencia de esta bacteria en medios líquidos de ICC normales y medios ICC suplementados con 3% de glucosa; como se observa en la imagen 3 las pruebas bioquímicas de catalasa y DNasa presentan reacciones positivas para la determinación de esta bacteria Gram-positiva al virar el medio de urea a una coloración rosa intenso; así mismo se pudo observar que esta cepa bacteriana es capaz de hidrolizar el ADN en los medios al liberarse las termonucleasas al inducir el medio a temperaturas de 37°C; en contraste se puede observar la formación de colonias de 1 a 3 mm de diámetro, lisas, levemente elevadas, de bordes enteros, levemente convexas y con una pigmentación amarillenta en los medios sólidos de sal y manitol y presencia de halos de hemólisis tipo beta en medio de agar sangre, en este contexto al realizar la caracterización microscópica por tinción de Gram, su pudo observar la presencia de bacterias esféricas Gram positivas con un diámetro promedio de 1 µm lo que confirma la presencia de *Staphylococcus aureus* en nuestros medios.

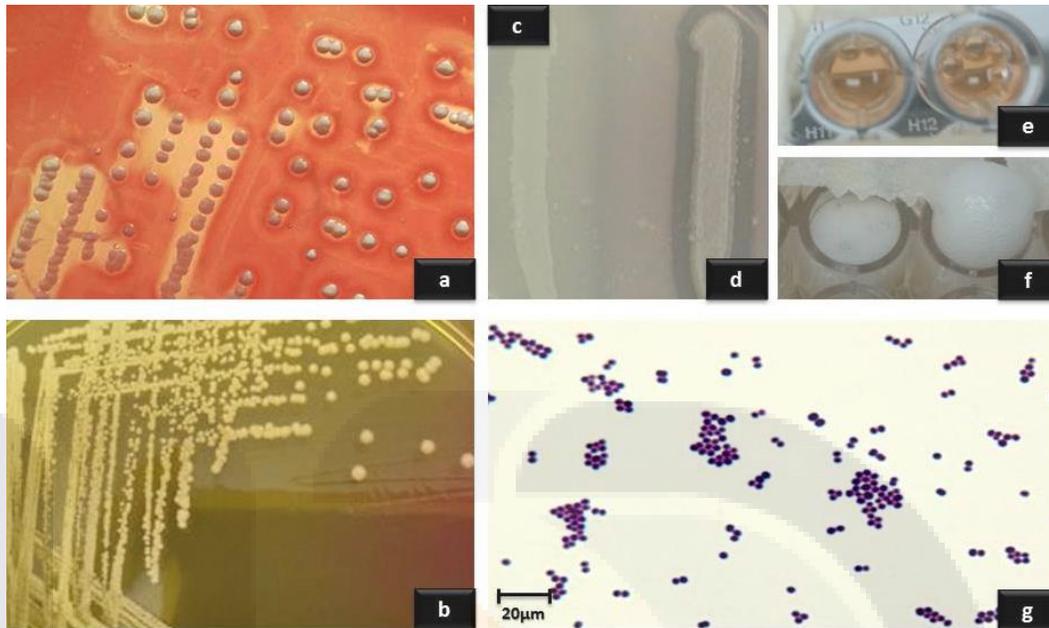
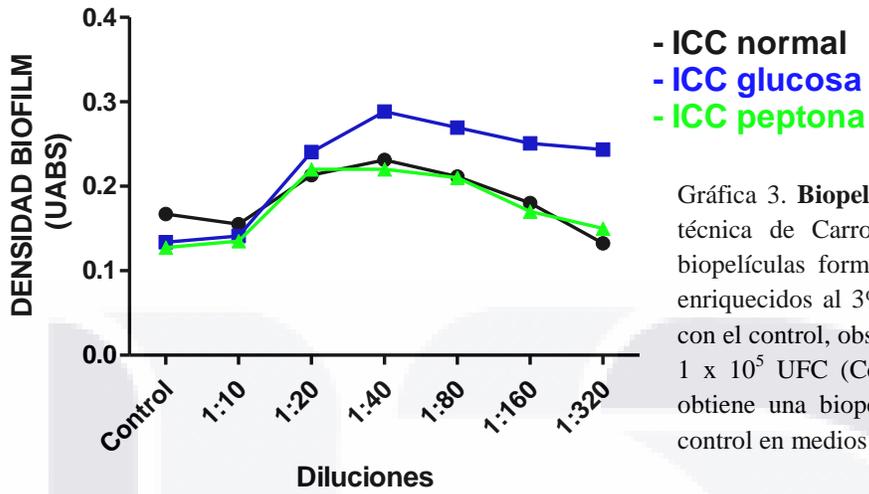


Imagen 7. **Cultivo de *Staphylococcus aureus***: Se observan colonias convexas β -hemolíticas en medio agar-sangre (a) y con capacidad de cambiar la pigmentación en los medios Sal y Manitol (b), las pruebas de caracterización bioquímica mostraron ser positivas para DNAsa (d) (c: control negativo) y catalasa (f) (e: control negativo); se muestra tinción de Gram, demostrando racimos cocoides con un diámetro promedio de 1 μ m teñidos con cristal violeta (g).

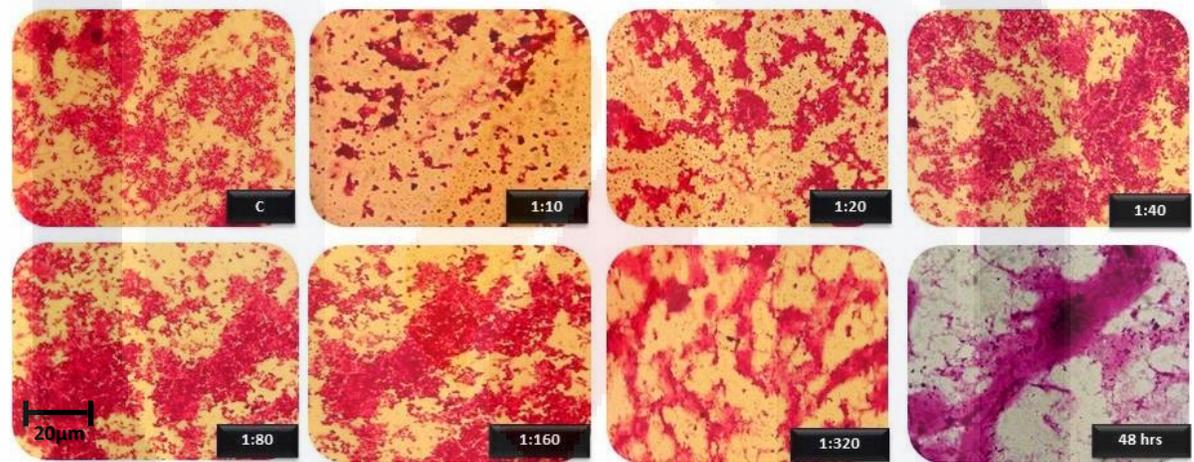
3.4.3. Formación de biopelículas de *Staphylococcus aureus*

Posterior a la caracterización bioquímica y morfológica de ambas cepas bacterianas se procedió a determinar las condiciones óptimas para la formación de biopelículas para ambas bacterias; partiendo de lo establecido por Carron (2006) y se cultivó *Staphylococcus aureus* en ICC sin suplementos, ICC suplementado con 3% de glucosa e ICC suplementado con 5% de Peptona (n =10); partiendo de un inóculo bacteriano de 1×10^5 UFC (Control); como se observa en la gráfica 3 se realizó la comparación estadística en forma de densidad de biopelícula (unidades de ABS) para distintas diluciones de este inóculo, observando que las biopelículas obtenidas en el medio enriquecido con glucosa poseen una mayor densidad con respecto a la formada en el medio no suplementado y suplementado con peptona; por otra parte se puede observar que bajo la dilución 1:40 la formación de biopelícula es más abundante y estable con respecto a las demás diluciones e inclusive con respecto a dejar la biopelícula incubando durante 48 hrs; estos resultados se pudieron corroborar con las imágenes tomadas por el microscopio óptico.

Comparación Biopelículas *S. aureus*



Gráfica 3. **Biopelículas *S. aureus***: Aplicando la técnica de Carron (2006), se compararon las biopelículas formadas por *S. aureus* en medios enriquecidos al 3% de glucosa y 5% de peptona con el control, observando que bajo un inóculo de 1×10^5 UFC (Control) y una dilución 1:40 se obtiene una biopelícula estable con respecto al control en medios suplementados con glucosa.

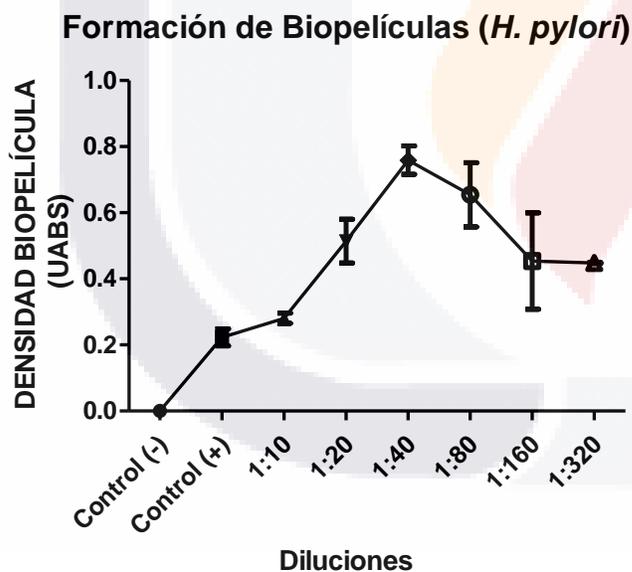


Como se puede observar en la gráfica 3, la formación de biopelículas para *Staphylococcus aureus* se ve claramente beneficiada al enriquecer los cultivos con Glucosa (3%) con respecto a las biopelículas formadas en medios estándar o inclusive los enriquecidos con peptona (5%), esto podría ser a que las biopelículas se caracterizan por la gran capacidad de las bacterias para producir una excesiva red de exopolisacáridos altamente hidratados partiendo de la glucosa específicamente, como lo describen Satrk *et al* (2012) esta estimulación de las bacterias con el medio suplementado con glucosa podría desencadenar la presencia de lípidos de C₁₄ y C₁₆, NAG, fucosa, glucosa, galactosa y GMH, en la matriz amorfa, cabe mencionar que estos a su vez son componentes de los LPS de ambas bacterias (García *et al*; 2014). Por otra parte es importante señalar que la formación óptima de biopelículas se realiza bajo diluciones 1:40, esto aparentemente debido a que la densidad bacteriana es menor al inóculo inicial, ya que como lo estipulan Zhao *et al* (2012), uno de los

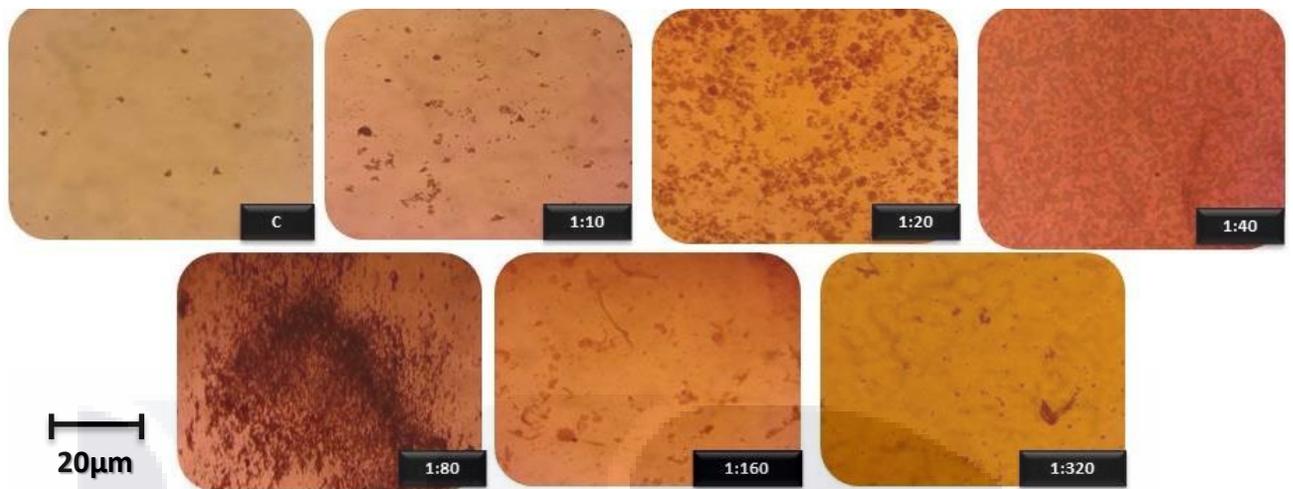
factores determinantes para la formación de una biopelícula se encuentra en la fase de crecimiento exponencial de las bacterias, dicha fase es favorecida por la cantidad de nutrientes, pH, actividad acuosa, temperatura y el espacio físico donde se encuentre el medio de cultivo

3.4.4. Formación de biopelículas de *Helicobacter pylori*

Después de la estandarización de las condiciones óptimas para generar biopelículas microbianas estables de *Staphylococcus aureus* se procedió a generar biopelículas de *Helicobacter pylori* siguiendo las mismas condiciones de cultivo que la bacteria Gram-positiva; como se puede observar en la gráfica 4 la densidad de biopelícula es mayor significativamente ($P \leq 0.05$) en diluciones 1:40 (0.31 ± 0.08 UABS) con respecto a los inóculos concentrados (0.13 ± 0.05 UABS); así mismo esta determinación se corroboró por medio de micrografías, observando que a esta dilución la densidad de biopelícula es mayor con respecto a las demás diluciones.



Gráfica 4. **Biopelículas *H. pylori***: Posterior a la anterior estandarización, se observó que bajo un inóculo de 1×10^5 UFC (Control) y una dilución 1:40 se obtiene una biopelícula estable con respecto al control en medios suplementados

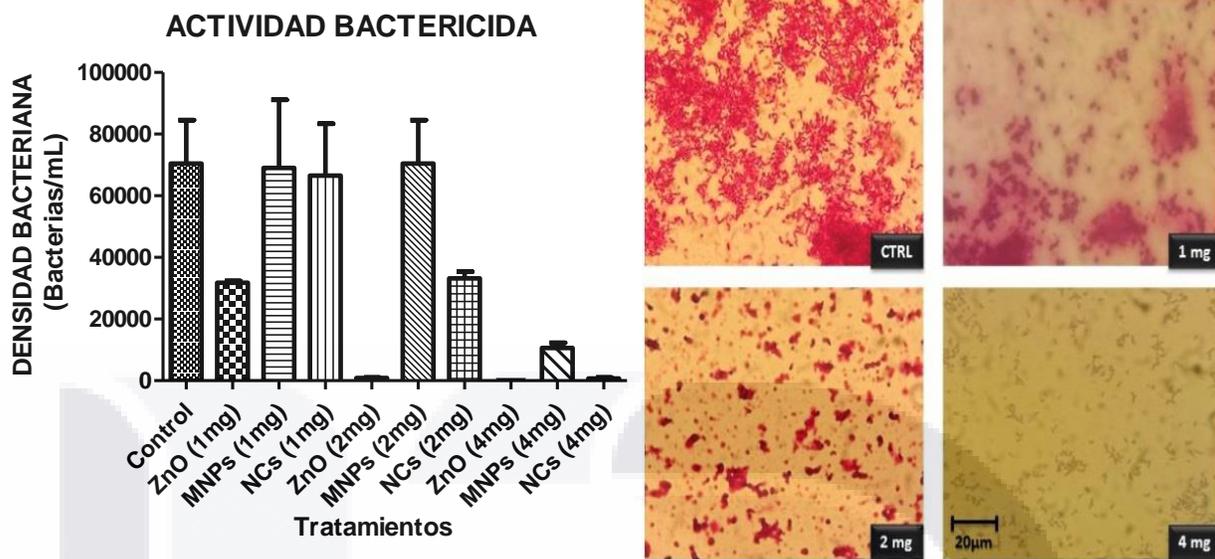


Como se puede observar en la gráficas 4 la formación de biopelículas para *Helicobacter pylori* a diluciones bajas o incluso en el inóculo inicial, la biopelícula es inestable, esto debido principalmente a la carencia de nutrientes para la alta carga microbiana o bien a la carencia de espacio donde las células microbianas pudieran unirse a la superficie de la placa para comenzar con el proceso de síntesis de matriz amorfa, generando de esta manera un aumento en el estrés en la homeostasis bacteriana, resultando en un posible paso a un estado de muerte celular; en contraste como se puede observar en los mismos resultados bajo altas diluciones la formación de biopelícula es nula e igualmente inestable que a bajas diluciones; sin embargo como lo describen Meng *et al* (2014) una baja concentración de bacterias en un microambiente no favorece la formación de biopelículas; esto debido principalmente a la alta carga metabólica a la cual se enfrenta la bacteria por lo que en lugar de estimular la formación de matriz amorfa así como la proliferación de la bacteria esta última pasara a un estado de latencia el cual morfológicamente puede ser detectado como una apariencia cocobacilar; cabe mencionar que dicha morfología pudo ser detectada durante los procesos de siembra de *Helicobacter pylori* al estimularla a medios enriquecidos durante las primeras 12 horas de cultivo; al igual esta morfología pudo detectarse durante los primeros ensayos de formación de biopelícula así como durante las cinéticas de formación a altas diluciones (1:160 y 1:320). Por otra parte como lo describe Lina *et al* (2014) las biopelículas se caracterizan por disminuir su actividad metabólica, su tasa de crecimiento y disminuir su susceptibilidad a agentes antimicrobianos mientras entran a un estado sésil; dicha disminución de actividad metabólica pudo ser corroborada al tomar una alícuota de las biopelículas formadas así como de los medios acuosos para realizar las distintas pruebas bioquímicas de identificación, pudiendo observar que a diferencia

de lo observado en la imagen 6, las pruebas bioquímicas demostraron tener una menor intensidad en el viraje de coloración y una disminución significativa de la intensidad de la reacción; sin embargo al realizar los cultivos en medios sólidos de estas alícuotas, las bacterias pudieron desarrollarse de una forma normal; este fenómeno puede ser descrito por lo postulado por Stark *et al* (2012), ya que aseveran que este estado sésil de las bacterias dentro de las biopelículas es transitorio y únicamente afecta a bacterias individuales planctónicas; las cuales una vez son liberadas de las biopelículas durante la fase de dispersión estas pueden rápidamente pasar a un estado metabólico activo para su multiplicación, dispersión, posible infección, o nuevamente la adherencia a otra superficie y generar una nueva biopelícula.

3.4.5. Interacción de NMs con *Staphylococcus aureus*

Posterior a las estandarizaciones de formación de biopelículas para ambas bacterias se procedió a dilucidar el efecto de las tres NPs sobre estos agentes antro-po-patógenos; por medio de su incubación a distintas dosis de cada nanomaterial previo a la formación de biopelículas, con un inóculo estandarizado en $1 \times 10^5 \pm 1 \times 10^3$ bacterias/ml por 24hrs a 37°C (n = 10); como se puede observar en la gráfica 5, se logró elucidar las “dosis mínimas bactericidas” (DMB) efectivas para cada nanomaterial, donde las ZnO NPs presentaron una actividad bactericida altamente significativa ($P \leq 0.05$) al disminuir la densidad bacteriana hasta 31800 ± 849 bacterias/ml con respecto al tratamiento control (70467 ± 24364 bacterias/ml) a dosis de 1 mg/mL, además se puede observar una tendencia dosis/efecto debido que al incrementar cantidad de ZnO NPs a 2 mg/ mL la densidad bacteriana decreció a 867 ± 306 bacterias/ml y a dosis de 4 mg/ mL la densidad disminuyó a 120 ± 20 bacterias/ml; en contraste se pudo determinar que bajo dosis de 1 mg/ mL tanto las MNPs, como los NCs no presentan una actividad bactericida significativa ($P \geq 0.05$) con respecto al control, sin embargo al realizar la exposición de las bacterias con dosis de 2 mg/ mL de NCs se observa una disminución significativa ($P \leq 0.05$) de la densidad bacteriana (33200 ± 3747 bacterias/ml) con respecto al control, así mismo se observó que al aumentar la dosis de estos NMs a 4 mg/ mL la densidad bacteriana decrece significativamente hasta las 733 ± 503 bacterias/ml con respecto al control. Por otra parte las MNPs no presentaron actividad bactericida significativa a dosis de 2 mg/mL ($P \geq 0.05$) con respecto al control; sin embargo al hacer interacciones estas NPs con este inóculo bacteriano a dosis de 4 mg/ mL el grupo control se ve reducido significativamente ($P \geq 0.05$) hasta las 10600 ± 2946 bacterias/ml.



Gráfica 5. **Actividad antimicrobiana.** Se realizó la interacción de distintas dosis de NMs con bacterias aisladas de *S. aureus* observando que se induce un decremento significativo de la densidad microbiana a 1 mg de ZnO (31800 ± 849 bacterias/ml), 2 mg de NCs (33200 ± 3747 bacterias/ml) y 4 mg de MNPs (10600 ± 2946 bacterias/ml) con respecto al Control ($1 \times 10^5 \pm 1 \times 10^3$ bacterias/ml).

Como se puede elucidar en la gráfica 5; pese a la clara diferencia en la actividad microbicida que presentan las ZnO NPs frente a las MNPs y a los NCs, el ZnO posee actividad microbicida inclusive en su estado macroscópico, en contraste de las MNPs las cuales únicamente expresan esta actividad al estar dentro de la nano-escala; igual para los NCs, aunque es importante señalar que para todas las variedades de NPs, su mecanismo bactericida no está totalmente comprendido, pero se propone que este mecanismo está relacionado con la estructura física de la NP o bien a la capacidad que tiene el NM para liberar iones desde la superficie de la NP (Seil *et al*; 2012). Por otra parte es necesario resaltar que conforme el tamaño de partícula disminuye, la superficie de contacto de este NM aumenta, permitiendo de esta manera una mayor interacción de este material con el microambiente a su alrededor, como en el caso de las ZnO NPs donde podría aumentar su superficie de contacto, siendo esta una de las principales explicaciones de su alta actividad bactericida a bajas dosis frente a bacterias aisladas; en contraste las NCs y las MNPs al ser materiales inertes para las bacterias podrías tener distintos mecanismos de actividad bactericida, como la mencionada liberación de iones metálicos los cuales podrían interactuar de forma física con los componentes de la pared y membrana bacterianos, lo cual conduciría a un daño y penetración de estas estructuras, postulando

de esta manera que la actividad bactericida depende principalmente de las características físico-químicas de estos NMs.

En la gráfica 5 se observa que las MNPs pueden reducir significativamente la densidad bacteriana a una DMB baja (4 mg/mL) con respecto a las dosis estudiadas por Seil *et al* (2012) (10 mg/mL), en este sentido es importante resaltar que una de las características principales en conferir la toxicidad microbiana a este material recae en su diámetro, morfología y su potencial zeta, debido a la importancia de estas características físicoquímicas se ha propuesto que el mecanismo bactericida de estas MNPs a pesar de su baja dosis está relacionado a la generación de ROS, dicha teoría está fundamentada por los experimentos realizados por Hong *et al* (2014) quienes describen que debido al potencial zeta negativo de las MNPs y las mínimas interacciones electrostáticas con las cargas positivas superficiales de las bacterias generarían en primera instancia la internalización de este NM al citosol bacteriano y su interacción con la mitocondria para la posterior lisis bacteriana, así mismo (y como se puede observar en nuestros resultados) el efecto bactericida de las MNPs es dosis-dependiente atribuyendo que el estrés oxidativo y la interferencia en la membrana bacteriana aumenta conforme la dosis de prueba se incrementa; es preciso mencionar que de acuerdo a lo establecido por Prabhu *et al* (2015) es posible que estos NMs continúan interaccionando con las células bacterianas muertas, por lo que la liberación de ROS en el microambiente es continua generando de esta manera una muerte bacteriana a aquellas células contiguas a pesar no haber interaccionado directamente con las MNPs; así mismo estos autores demuestran que a pesar de la lisis bacteriana por los NMs aún se puede observar que la actividad bacteriana sigue activa pero en menor intensidad, lo que explica los resultados de las pruebas de caracterización bioquímica realizadas posterior a la interacción con las MNPs, donde dichas pruebas generaban resultados levemente positivos (Imagen 5 y 6), así mismo es importante mencionar que al igual que las ZnO NPs las MNPS aumentan su capacidad bactericida conforme aumenta la dosis de prueba; por lo que se estipula que la inhibición bacteriana de la concentración de este material en el medio; así mismo otro punto a notar es que por sí mismas las MNPs no ejercen un impacto celular negativo (Gestal *et al* 2014).

Como se pudo observar en la Gráfica 5 los NCs de ZnO@Fe₃O₄ presentan una mayor capacidad bactericida con respecto a las MNPs, suponiendo de esta manera que al realizar la cubierta del ZnO con Fe₃O₄ la susceptibilidad de las bacterias aumenta significativamente, así mismo se puede

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

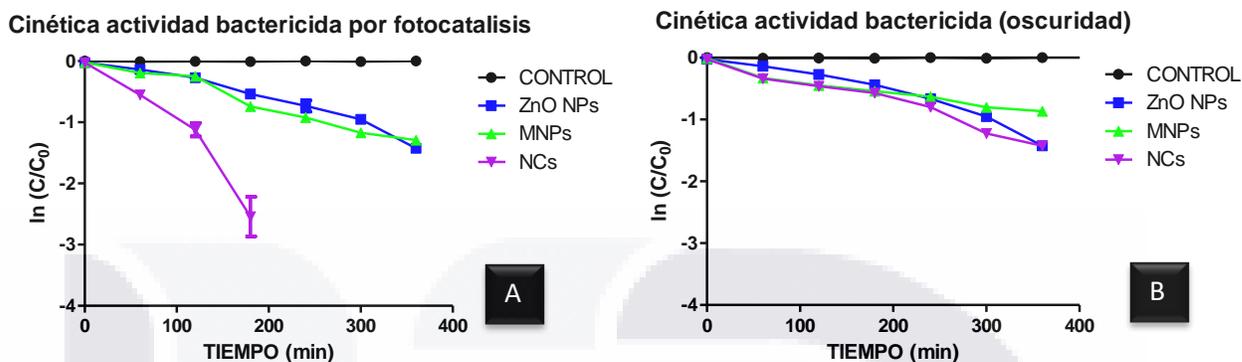
observar que la alta capacidad bactericida e inestabilidad en medios acuosos (ácidos) de las ZnO NPs decrece al combinarse con Fe₃O₄, estos efectos bactericidas pueden explicarse por un mecanismo de acción postulado por Prabhu *et al* (2015) donde las cargas positivas de estos NCs al liberar iones generan una interacción electromagnética con la carga negativa de las bacterias (posiblemente los iones de estos NMs se unen electrostáticamente a los grupos tiol de las proteínas membranales), explicando la actividad bactericida significativamente mayor con respecto a las MNPs que observamos en nuestros resultados de DMB.

3.4.6. Actividad bactericida estimulada por fotocatalisis

Después de dilucidar la DMB de cada NM hacia *Staphylococcus aureus*; se procedió a realizar un análisis de esta actividad ante un estímulo con luz visible. Ya establecidas las DMB para cada material se procedió a evaluar el efecto sinérgico del NM y luz visible a la concentración establecida (DMB), interaccionado con las bacterias aisladas $1 \times 10^5 \pm 1 \times 10^3$ bacterias/ml por 6 hrs a 37°C con irradiación de luz visible (22W; 127V; 60Hz) con agitación en baño de agua (n = 10); como se puede observar en la gráfica 6, se logró elucidar el efecto que posee la luz visible sobre la actividad bactericida de cada NM, contrastando este estímulo con el efecto obtenido en oscuridad bajo las mismas condiciones de interacción; encontrando que las ZnO NPs no llegan a eliminar significativamente las UFC de *Staphylococcus aureus* posterior a 6 hrs de interacción con esta NP tanto con estímulo (**a**) como sin este (**b**). En contraste la capacidad de eliminar en un 100% las UFC bacterianas puede ser observada con los NCs estimulados con luz visible a las 4hrs post-interacción (**a**); sin embargo al realizar la interacción en oscuridad (**b**) de este NC solo es posible observar un decremento significativo (30 ± 7 UFC) con respecto al control (89 ± 6 UFC) 6 horas post-interacción, indicando de esta manera que al realizar el NC este se beneficia disminuyendo su banda de ancho prohibida al ser estimulada con luz visible aumentando su actividad bactericida como se describe más adelante.

Por otra parte se puede observar que existe un decremento significativo ($P \leq 0.05$) al realizar la interacción con las MNPs (21 ± 5 UFC) con respecto al control (77 ± 8 UFC) sin embargo no llega a generar la eliminación completa de este inóculo bacteriano posterior a 6 hrs de interacción bajo las condiciones fotocatalíticas (**a**); en contraste se observa que estas MNPs sin el estímulo logran una lisis bacteriana parcial (79 ± 6 UFC) respecto al control después de 6 horas de interacción (**b**),

indicando que al realizar la síntesis del NC se favorecen las propiedades bactericidas de este NM tanto al ser estimulado con luz visible como en ausencia de este estímulo.



Gráfica 6. **Actividad antimicrobiana estimulada.** Se realizó la interacción de las DMB de cada NM con bacterias aisladas de *S. aureus* en presencia de luz (A) y en ausencia de este estímulo (B) observando que no se induce una eliminación total de la densidad microbiana con ZnO (posterior a 6hrs) mientras que este efecto altamente significativo se observó con los NCs (posterior a 4hrs) mientras que con las MNPs se realizó una eliminación parcial (21 ± 5 UFC) con respecto al Control (77 ± 8 UFC) bajo fotocatalisis; en contraste al realizar la prueba sin estímulo no se observa una eliminación de la densidad microbiana con ZnO, con NCs una eliminación parcial (30 ± 7 UFC) con respecto al Control (89 ± 6 UFC); mientras que con MNPs se obtuvo un decremento (79 ± 6 UFC) respecto al Control.

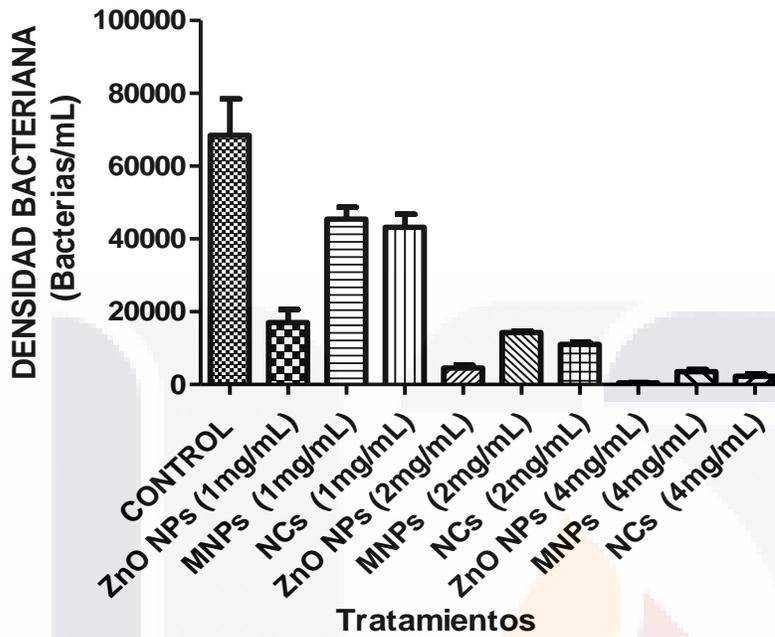
Como se puede observar en la gráfica 6, al estimular estos NMs bajo luz visible se pudo observar un incremento significativo en la actividad microbicida; haciendo énfasis en los resultados obtenidos con los NCs y comprándolos con los obtenidos en la gráfica 5, estos resultados pueden explicarse con los ensayos realizados por Kekha *et al* (2010), donde ellos postulan que al realizar una mezcla del ZnO un agente magnético podría aumentar significativamente la eficiencia fotocatalítica del NC hasta en un 45% debido al aumento en su capacidad de absorber energía un 10% por encima y por debajo del espectro de luz visible; es decir que los NCs podrían ser capaz de reaccionar al interactuar con la luz solar o al estimularlos (como en este experimento) con lámparas de luz convencionales, en adición con los cambios a las propiedades eléctricas y ópticas de este NM por su capacidad de absorber energía dentro del espectro visible, gracias a esto se puede explicar porque los NC presentan una mayor actividad bactericida al mantenerse bajo estímulos con luz visible (Gordon *et al*; 2011); así mismo el de NCs al ser estimulado con radiaciones de luz visible permite que uno de los electrones de la banda de valencia se mueva hacia la banda de conducción provocando una carga parcialmente positiva (h^+), debido a esto estos NCs, podrían reaccionar con los grupos hidroxilos libres en el medio acuoso, generando iones OH^- con los que las bacterias podrían ser lisadas, se podrían generar iones superóxido debido a la presencia de oxígeno en el

medio ocasionando probablemente un daño celular a estas bacterias aisladas, es necesario resaltar que el mecanismo de acción bactericida no está claramente descrito para los NCs debido que son un material relativamente innovador, así mismo sus aplicaciones clínicas, optoeléctricas y fotocatalíticas están pobremente descritas.

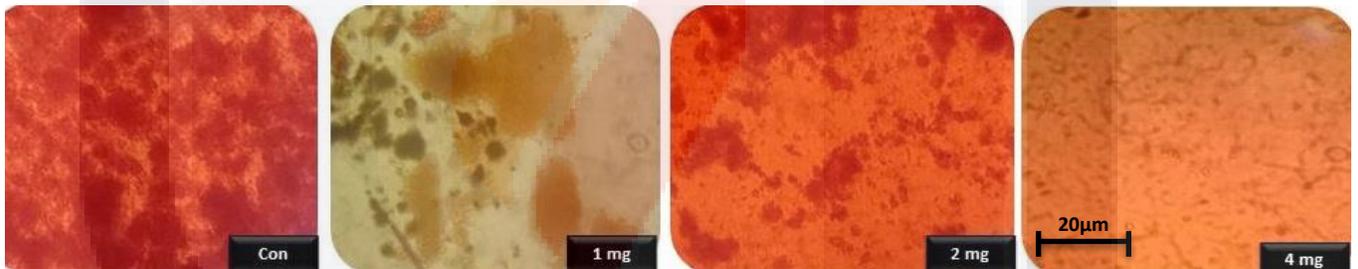
3.4.7. Interacción de NMs con *Helicobacter pylori*

Después de dilucidar la DMB de cada NM hacia *Staphylococcus aureus*; se procedió a realizar un inóculo estandarizado en $1 \times 10^5 \pm 1 \times 10^2$ bacterias/ml por 72hrs a 37°C con 40 PSI de CO₂ (n = 10), al cual se sometió a una interacción con distintas dosis de los NMs ; como se puede observar en la gráfica 7, se logró elucidar las DMB efectivas para cada nanomaterial, donde las ZnO NPs presentaron una actividad bactericida altamente significativa a dosis de 1 mg/mL ($P \leq 0.05$) al disminuir la densidad bacteriana hasta 17000 ± 3606 bacterias/ml con respecto al tratamiento control (68467 ± 9967 bacterias/ml), además se puede observar una tendencia dosis/efecto debido que al incrementar cantidad de ZnO NPs a 2 mg/mL la densidad bacteriana decreció a 4540 ± 714 bacterias/ml y a dosis de 4 mg/mL la densidad disminuyó a 482 ± 58 bacterias/ml; en contraste se pudo determinar que bajo dosis de 1 mg/mL tanto las MNPs, como los NCs no presentan una actividad bactericida significativa ($P \geq 0.05$) con respecto al control, sin embargo al realizar la exposición de las bacterias con dosis de 2 mg/mL en ambos NMs se observa una disminución significativa ($P \leq 0.05$) de la densidad bacteriana 14333 ± 375 bacterias/ml para las MNPs y 11053 ± 595 bacterias/ml para los NCs con respecto al control, así mismo se observó que al aumentar la dosis de estos NMs hasta los 4 mg/mL la densidad bacteriana decrece significativamente hasta las 3559 ± 602 bacterias/ml para las MNPs y 2310 ± 540 bacterias/ml para los NCs con respecto al control.

INTERACCION *H. pylori*



Gráfica 7. **Actividad antimicrobiana.** Se realizó la interacción de distintas dosis de NMs con bacterias aisladas de *H. pylori* observando que se induce un decremento significativo de la densidad microbiana a 1 mg de ZnO (17000 ± 3606 bacterias/ml), 2 mg para NCs (11053 ± 595 bacterias/ml) y MNPs (14333 ± 375 bacterias/ml) con respecto al Control (1 x10⁵ ± 1 x 10² bacterias/ml).



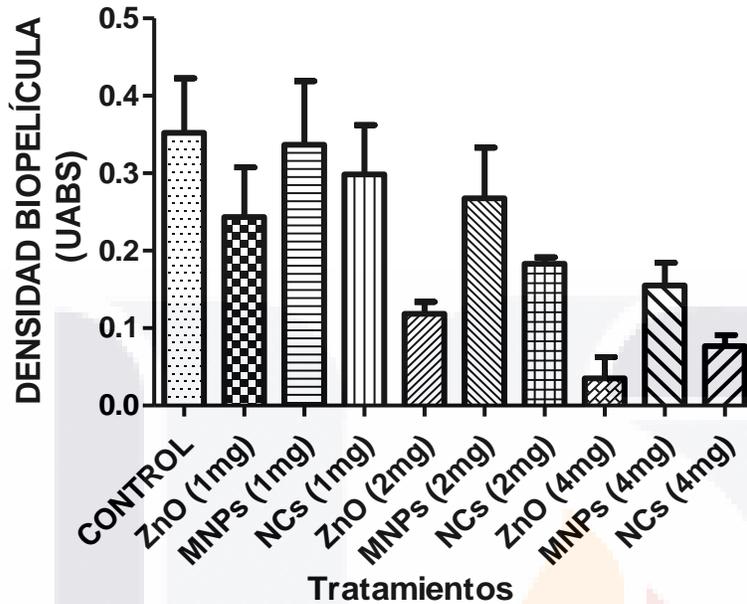
Lo anterior descrito en la gráfica 7 presenta una prueba sólida que los NMs poseen mayor actividad bactericida sobre bacterias Gram negativas al necesitar una DMB menor a las que se necesitaron frente a la interacción con bacterias Gram-positivas, cabe mencionar que en contraste a lo determinado por otros autores (Webster *et al*; 2012) las DMB que utilizan es mayor (40 mg/mL) con respecto a la elucidada en esta investigación (1 mg/mL) bajo condiciones similares de prueba; una de las principales causas de la diferencia significativa de estas dosis, puede albergarse en la finalidad del tratamiento; debido a que los autores buscaban demostrar el daño en pared y membrana celular para establecer un mecanismo bactericida; sin embargo en la actualidad se ha demostrado que los iones de Zn⁺² pueden llegar a producir grandes cantidades de peróxido de hidrógeno a bajas concentraciones del NM; iones podrían inhibir múltiples actividades de la células bacterianas, como lo pueden ser la glucolisis, la translocación de protones en la membrana y tolerancia ácida (principal efecto bacteriostático); lo anterior puede estar sustentado por el trabajo de Dimkpa *et al* (2012)

quienes demostraron que la generación de ROS por ZnO NPs posee una relación dosis-dependiente al interaccionar con colonias aisladas de *Staphylococcus aureus*, proponiendo de esta manera un mecanismo bactericida para nuestros resultados a esta DMB y sus efectos posteriores al incrementar la dosis de este NM.

3.4.8. Interacción de NMs con biopelículas de *Staphylococcus aureus*

Ulterior a la determinación de las DMB de cada NM en bacterias aisladas de *Staphylococcus aureus* se procedió a dilucidar el efecto de estas NPs sobre las biopelículas de esta bacteria Gram-positiva; por medio de su incubación a distintas dosis de cada nanomaterial 24hrs después a la formación de biopelículas, con un inóculo estandarizado en $1 \times 10^5 \pm 1 \times 10^3$ bacterias/ml por 48hrs a 37°C (n = 10); como se refleja en la gráfica 8, se logró elucidar las “dosis mínimas inhibitorias” (DMI) efectivas para cada NM, donde, en contraste al experimento anterior, las ZnO NPs no presentaron una actividad de inhibición de biopelículas significativa ($P \geq 0.05$), con respecto al control a dosis de 1 mg/mL, sin embargo se puede observar que al incrementar cantidad de ZnO NPs a 2 mg/mL se disminuye las UABS hasta 0.1187 ± 0.026 UABS con respecto al tratamiento control (0.352 ± 0.122 UABS) y a dosis de 4 mg/mL estas decrecen a 0.035 ± 0.005 UABS; en contraste se pudo determinar que bajo dosis de 1 mg/mL y 2 mg/mL tanto las MNPs, como los NCs no presentan una actividad inhibitoria significativa ($P \geq 0.05$) con respecto al control, sin embargo al realizar la exposición de las biopelículas con dosis de 4 mg/mL de NCs y MNPS se observa una disminución significativa ($P \leq 0.05$) con respecto al tratamiento control de 0.077 ± 0.025 UABS y 0.155 ± 0.051 UABS respectivamente

Interacción NM´s - biopelículas



Gráfica 8. **Interacción con biopelículas.** Se realizó la interacción de distintas dosis de NMs con biopelículas de *S. aureus* observando que se induce un decremento significativo de la biopelícula a 2 mg de ZnO (0.1187 ± 0.026 UABS), 4 mg de NCs (0.077 ± 0.025 UABS) y 4 mg de MNPs (0.155 ± 0.051 UABS) con respecto al Control (0.352 ± 0.122 UABS).

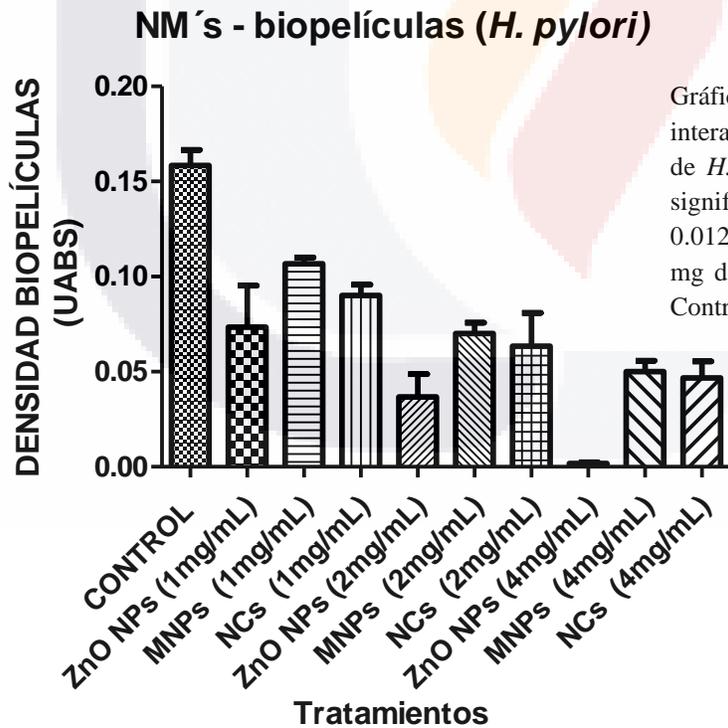
Se puede observar en la gráfica 8 debido el incremento en la dosis de cada NM (excepto Fe_3O_4) para ocasionar una disminución significativa en la densidad óptica de las biopelículas respecto a la DMB obtenida de la interacción con bacterias planctónicas; por lo que estos resultados sugieren que las ZnO NPs poseen una actividad anti-biopelícula (Biocida) en contra de *Staphylococcus aureus* aunque a comparación de la dosis utilizada en la DMB (1 mg/mL) se usaron 2 mg/mL para generar una disminución significativa; lo cual puede ser atribuido a la protección conferida por la matriz extracelular aumentado la probabilidad de viabilidad celular con respecto a lo encontrado en la interacción con bacterias aisladas, se ha reportado que las ZnO NPs probablemente ejercen su actividad biocida a través de la liberación de iones metálicos y la subsecuente inhibición de la actividad enzimática dentro de la biopelícula, principalmente interrumpiendo las enzimas DapE, las cuales están involucradas en las síntesis del peptidoglicano de la matriz celular (Tarek *et al*; 2013); esto da una base de lo que observado en la pruebas de inhibición, donde al aumentar la dosis de ZnO NPs la estabilidad de las biopelículas disminuía, por otra parte Khan *et al* (2014) han demostrado que el uso de estas NPs estimulan a la citocromo C oxidasa a dosis de hasta 3 mg/mL, logrando de esta manera la inhibición de la biopelícula al realizar la destrucción de la pared celular en *Staphylococcus aureus* e inducir la expresión de genes relacionados a estrés oxidativo (*katA* y

ahpC), lo que podría dar un mecanismo de soporte ante la presencia de bacterias en estado de letargo después de la interacción de las biopelículas con este NM inestable a pH ácido.

En contraste de la interacción de las bacterias planctónicas de *S. aureus* con los NCs se puede observar en la gráfica 8 que para disminuir significativamente la densidad de la biopelícula de esta bacteria se requirió una dosis de 4 mg/mL (DMI), así mismo se pudo observar un fenómeno similar con las ZnO NPs debido a la necesidad de incrementar la dosis para generar un efecto de disminución significativo; una de las principales razones que podría explicar este aumento es debido a la presencia de ZnO en la superficie del Fe₃O₄, lo que le da cierta inestabilidad al NC a los medios ácidos; por otra parte como lo describe López *et al* (2010) las biopelículas son capaces de alterar tanto el pH como el medio interno de la matriz amorfa con el fin de evitar un efecto nocivo contra las bacterias que las conforman, explicando de esta manera el requerimiento de una dosis mayor para observar el cambio deseado; como se explicó con la interacción de los NCs con las bacterias aisladas, este NM es relativamente novedoso debido a que muchos de sus mecanismos de acción están poco estudiados, sin embargo uno de los mecanismos que más se asemeja a lo observado en nuestra investigación, fueron los ensayos realizados por Cotar *et al* (2013) quienes describen la unión de este material a la membrana celular generando daños a la misma y generando canales, debido a que estos NCs están recubiertos de ZnO el Fe₃O₄ podría fungir el papel de una molécula acarreadora y desacoplante de las principales defensas de la biopelícula y de las bacterias para posteriormente liberar iones Zn⁺² desde la superficie del NC hacia el interior de la bacteria o bien la diseminación de estos iones en la matriz amorfa, bajo este contexto se explica la actividad de nuestros NCs ante esta estructura microbiana, postulando un mecanismo de acción *in vitro*; cabe mencionar que nuestros resultados sugieren que el uso de estos NMs poseen un mecanismo bactericida y biocida mixto (mecanismos de inhibición físicos y químicos), postulando que debido a las cargas parciales de las MNPs estas se pueden unir a los componentes esenciales de las biopelículas o a la pared de las bacterias desestabilizando estas estructuras de resistencia para su eliminación mecánica, por otra parte la actividad química del ZnO así como la liberación de iones Zn⁺² al medio podrían lograr la inactivación de las proteínas y enzimas que logran la reestabilización de la biopelícula, así como la generación de ROS para la lisis bacteriana mediada por estrés oxidativo.

3.4.9. Interacción de NMs con biopelículas de *Helicobacter pylori*

Una vez determinadas las DMB de cada NM en *Helicobacter pylori* se procedió a dilucidar las DMI de cada NP sobre las biopelículas de esta bacterias Gram-negativas; siguiendo la metodología anterior, se inocularon $1 \times 10^5 \pm 1 \times 10^2$ bacterias/ml por 96hrs a 37°C con 40 PSI de CO₂ (n = 10); como se muestra en la gráfica 9, las ZnO NPs no presentaron una actividad de inhibición de biopelículas significativa ($P \geq 0.05$), con respecto al control a dosis de 1 mg/mL, sin embargo se puede observar que al incrementar cantidad de ZnO NPs a 2 mg/mL se disminuyen las UABS hasta 0.036 ± 0.012 UABS con respecto al tratamiento control (0.158 ± 0.008 UABS) y a dosis de 4 mg/mL estas decrecen a 0.001 ± 0.0006 UABS; en contraste se pudo determinar que bajó dosis de 1 mg/mL y 2 mg/mL tanto las MNPs, como los NCs no presentan una actividad inhibitoria significativa ($P \geq 0.05$) con respecto al control, sin embargo al realizar la exposición de las biopelículas con dosis de 4 mg/mL de NCs y MNPS se observa la una disminución significativa ($P \leq 0.05$) con respecto al tratamiento control de 0.050 ± 0.005 UABS y 0.046 ± 0.008 UABS respectivamente.



Gráfica 9. **Interacción con biopelículas.** Se realizó la interacción de distintas dosis de NMs con biopelículas de *H. pylori* observando que se induce un decremento significativo de la biopelícula a 2 mg de ZnO (0.036 ± 0.012 UABS), 4 mg de NCs (0.046 ± 0.008 UABS) y 4 mg de MNPs (0.050 ± 0.005 UABS) con respecto al Control (0.352 ± 0.122 UABS).

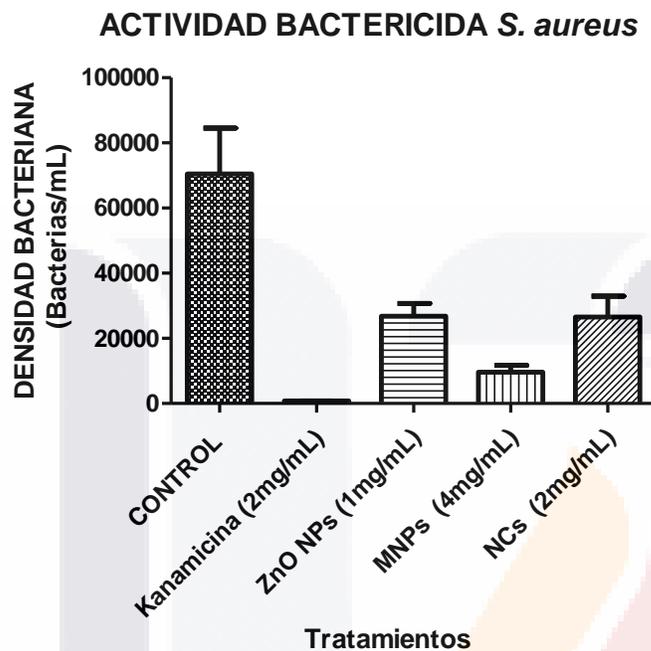
Es importante denotar que a diferencia de las ZnO NPs, los NCs y las MNPs no necesitaron un aumento en la dosis de interacción para ejercer su actividad biocida y bactericida (4 mg/mL), un

estudio realizado por Cotar *et al* (2013) sugiere que este efecto biocida puede estar relacionado con la capacidad de las NPs para unirse a la pared celular y causar la generación de canales que destruyen a las bacterias de la matriz amorfa por choque osmótico o bien por la apertura de estos canales entre los LPs que incorporan la matriz amorfa desestabilizándola y degradando esta estructura por efecto físico; bajo este estudio se puede explicar lo que se observa en las gráfica 9 donde las MNPs generan la eliminación parcial de la biopelícula del pozo, por otra parte Taylor *et al* (2009), sugieren que la actividad biocida de las MNPs es debida a la generación de radicales OH⁻ vía reacción de Fenton, esta liberación de radicales podría generar la despolimerización de los polisacáridos de la matriz amorfa y del ADNe, así como la inhibición de algunas beta lactamasas y la generación de lipoperoxidación, además de observarse una mayor capacidad de unión de las biopelículas a la superficie de las MNPs a comparación de la microplaca; esto último sustenta que la actividad biocida de nuestras MNPs más que deberse a un proceso de inactivación y muerte bacteriana está más relacionada a la interacción de nuestros NMs con los componentes esenciales de la biopelícula ante bajas dosis de nuestro NM, por lo que estos resultados podrían sugerir la implementación de este NM dentro de una aplicación biomédica contra esta estructura de defensa microbiana, generando una mayor eficacia de eliminación del patógeno, a dosis significativamente bajas y con una posible baja toxicidad *in vivo*.

3.4.10. Comparación de efecto bactericida sobre *Staphylococcus aureus*

Una vez determinadas las DMB y DMI de cada NM se procedió a realizar una serie de comparaciones de la actividad microbicida y biocida de cada NM respecto a la eficacia que presentan los antibióticos recomendados para tratar las infecciones de estos patógenos; siguiendo la metodología de las pruebas de interacción con bacterias aisladas de *Staphylococcus aureus*, se inocularon $1 \times 10^5 \pm 1 \times 10^3$ bacterias/ml por 24hrs a 37°C (n = 10) dejando una interacción con distintos tratamientos; un grupo Control sin interacción; un grupo sometido a una dosis de 2 mg/mL de Kanamicina® (de acuerdo a lo establecido en la FEUM, 2015), otro grupo bajo dosis de 1 mg/mL de ZnO NPs, otro con dosis de 2 mg/mL de NCs y un último grupo con dosis de 4 mg/mL de MNPs; como se muestra en la gráfica 10, el grupo tratado con Kanamicina® mostró una alta diferencia significativa ($P \geq 0.01$) al realizar un decremento de la densidad bacteriana correspondiente a 763 ± 32 bacterias/mL respecto al grupo control (70470 ± 14070 bacterias/mL); siendo

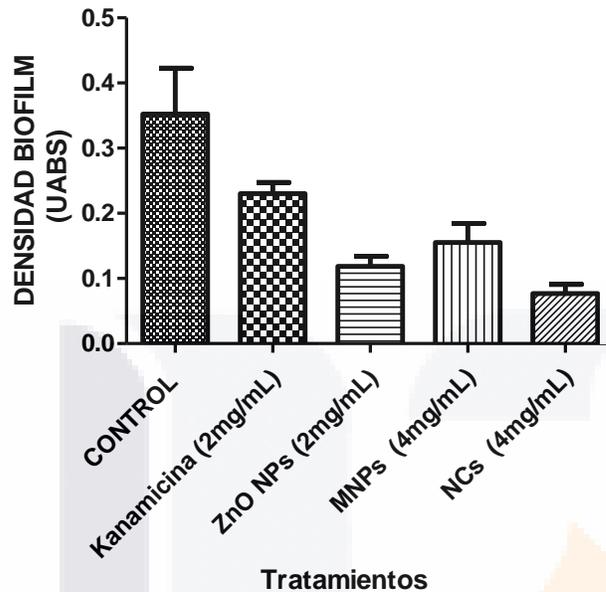
significativamente mayor este efecto bactericida comparado al de las ZnO NPs (31800 ± 600 bacterias/mL), NCs (33200 ± 2163 bacterias/mL) y MNPs (10600 ± 1701 bacterias/mL).



Gráfica 10. **Comparación de actividad bactericida.** Se realizó la interacción de las DMB de cada NM comparando este efecto con el de la Kanamicina sobre bacterias aisladas de *S. aureus* observando que este antibiótico produce un efecto significativamente mayor respecto a los otros grupos de estudio (763 ± 32 bacterias/mL)

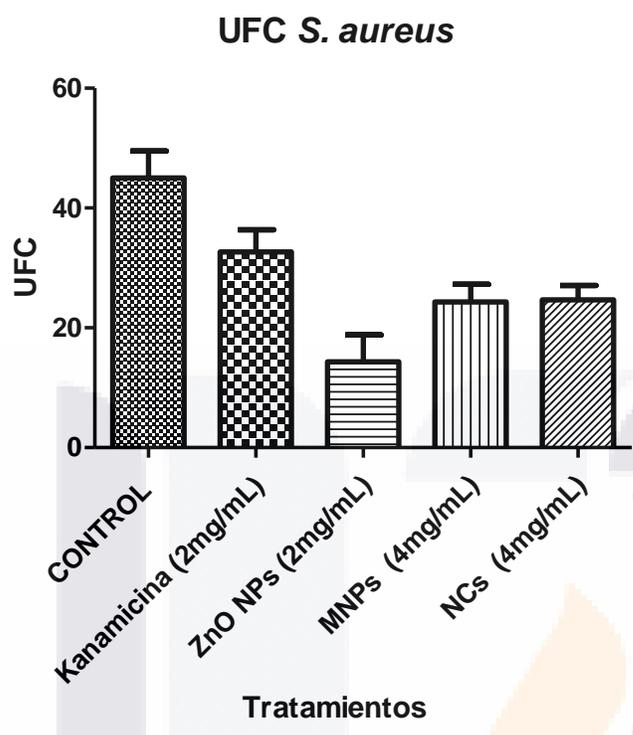
Así mismo se realizó la comparación del efecto de estos NMs y del antibiótico sugerido sobre biopelículas de *Staphylococcus aureus* siguiendo la metodología de las pruebas de interacción con biopelículas, se inocularon $1 \times 10^5 \pm 1 \times 10^3$ bacterias/ml por 24hrs a 37°C ($n = 10$) y realizando la comparación con los anteriores grupos de estudio, dejando una interacción con distintos tratamientos; un grupo Control sin interacción; un grupo sometido a una dosis de 2 mg/mL de Kanamicina®, otro grupo bajo dosis de 2 mg/mL de ZnO NPs, otro con dosis de 4 mg/mL de NCs y un último grupo con dosis de 4 mg/mL de MNPs; como se muestra en la gráfica 11, el grupo tratado con Kanamicina® mostró un pobre decremento de la densidad de la biopelícula correspondiente a 0.230 ± 0.017 UABS, sin mostrar una clara diferencia significativa ($P \leq 0.05$) respecto al grupo control (0.352 ± 0.070 UABS); siendo significativamente menor este efecto biocida comparado al de las ZnO NPs (0.119 ± 0.015 UABS), NCs (0.077 ± 0.014 UABS) y MNPs (0.155 ± 0.029 UABS) las cuales presentaron un efecto significativo ($P \geq 0.05$) sobre el grupo control al reducir claramente la densidad de la biopelícula.

INTERACCION *S. aureus*



Gráfica 11. **Comparación actividad biocida.** Se realizó la interacción de las DMI de cada NM y de la Kanamicina con biopelículas de *S. aureus* observando que se induce un decremento significativo de la biopelícula a 2 mg de ZnO (0.1187 ± 0.026 UABS), 4 mg de NCs (0.077 ± 0.025 UABS) y 4 mg de MNPs (0.155 ± 0.051 UABS) con respecto al Control (0.352 ± 0.122 UABS) y a la kanamicina (0.230 ± 0.017 UABS)

Ulterior al estudio anterior, se procedió a realizar un análisis de la viabilidad bacteriana en la biopelícula posterior a la interacción con los agentes antimicrobianos para observar si estos agentes ejercen un efecto bactericida sobre *Staphylococcus aureus* estando inmersa en la matriz amorfa de la biopelícula, dicho estudio se realizó bajo un inóculo de la biopelícula homogeneizada en medios sólidos de Sal y Manitol bajo una incubación de 24hrs a 37°C (n = 10) para el posterior conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC); como se observa en el gráfica 12 la viabilidad bacteriana encontrada en la biopelícula remanente del grupo tratado con Kanamicina® no mostró un decremento significativo ($P \leq 0.05$) de las UFC de *Staphylococcus aureus* (33 ± 4 UFC), respecto a las UFC de las biopelículas en el grupo control (45 ± 5 UFC); siendo significativamente menor este efecto bactericida en biopelícula respecto al efecto producido por las ZnO NPs (14 ± 5 UFC), NCs (25 ± 2 UFC) y MNPs (24 ± 3 UFC) las cuales presentaron un efecto significativo ($P \geq 0.05$) sobre el grupo control al reducir claramente la cantidad de UFC en el remanente de biopelícula.

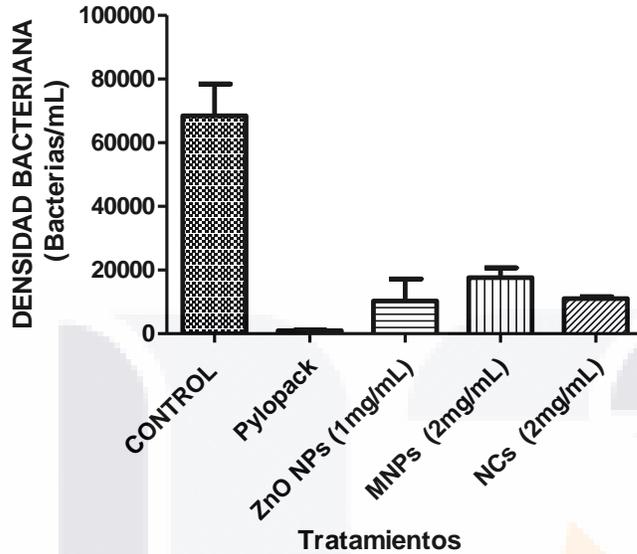


Gráfica 12. **Análisis de UFC.** Se realizó el estudio de las UFC remanentes en las biopelículas de *S. aureus* posterior a la interacción con los agentes antimicrobianos, encontrando un decremento significativo en ZnO NPs (14 ± 5 UFC) NCs (25 ± 2 UFC) y MNPs (24 ± 3 UFC), respecto al control (45 ± 5 UFC) y la kanamicina (33 ± 4 UFC).

3.4.11. Comparación de efecto bactericida sobre *Helicobacter pylori*

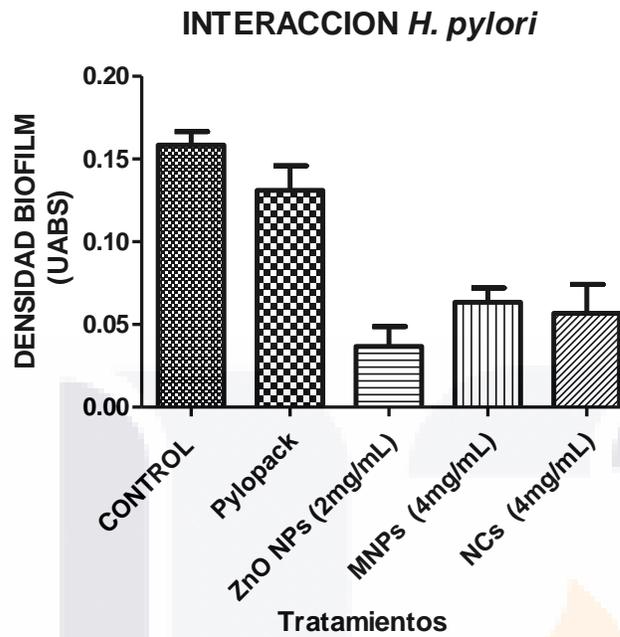
Con la misma finalidad que el estudio de comparación realizado en *Staphylococcus aureus*, se procedió a realizar el mismo ensayo en los remanentes de las biopelículas de *Helicobacter pylori*; siguiendo la metodología de las pruebas de interacción con bacterias aisladas de *Helicobacter pylori*, se inocularon $1 \times 10^5 \pm 1 \times 10^2$ bacterias/ml por 24hrs a 37°C con 40 PSI de CO₂ (n = 10) dejando una interacción con distintos tratamientos; un grupo Control sin interacción; un grupo sometido a una dosis recomendada de Pylopack® (0.5 g/mL de Amoxicilina®, 0.5 g/mL de Claritromocina® y 0.03 g/mL de Lansoprazol), otro grupo bajo dosis de 1 mg/mL de ZnO NPs, otro con dosis de 2 mg/mL de NCs y un último grupo con dosis de 2 mg/mL de MNPs; como se muestra en la gráfica 13, el grupo tratado con Pylopack® mostró un efecto altamente significativo ($P \geq 0.01$) al disminuir casi en su totalidad la densidad bacteriana (996 ± 116 bacterias/mL respecto al grupo control (68470 ± 967 bacterias/mL); siendo significativamente mayor este efecto bactericida ($P \geq 0.05$) comparado al producido por las ZnO NPs (17000 ± 606 bacterias/mL), NCs (11050 ± 595 bacterias/mL) y MNPs (14330 ± 376 bacterias/mL).

ACTIVIDAD BACTERICIDA *H. pylori*



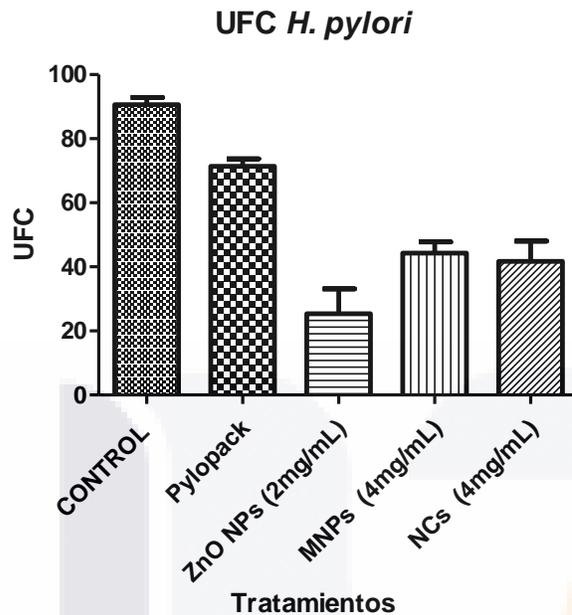
Gráfica 13. **Comparación de actividad bactericida.** Se realizó la interacción de las DMB de cada NM comparando este efecto con el Pylopack sobre bacterias aisladas de *H. pylori* observando que este antibiótico produce un efecto significativamente mayor respecto a los otros grupos de estudio (996 ± 116 bacterias/mL)

De la misma manera se realizó la comparación del efecto de estos NMs y del tratamiento sugerido sobre biopelículas de *Helicobacter pylori* siguiendo la metodología de las pruebas de interacción con biopelículas, se inocularon $1 \times 10^5 \pm 1 \times 10^2$ bacterias/ml por 24hrs a 37°C con 40 PSI de CO₂ (n = 10) y realizando la comparación con los anteriores grupos de estudio, un grupo Control sin interacción; un grupo sometido a una dosis de Pylopack®, otro grupo bajo dosis de 2mg/mL de ZnO NPs, otro con dosis de 4 mg/mL de NCs y un último grupo con dosis de 4 mg/mL de MNPs; como se muestra en la gráfica 14, el grupo tratado con Pylopack® no mostró un decremento significativo ($P \leq 0.05$) de la densidad de la biopelícula (0.131 ± 0.015 UABS) respecto al grupo control (0.158 ± 0.008 UABS); siendo significativamente menor ($P \geq 0.05$) este efecto biocida comparado al producido por las ZnO NPs (0.037 ± 0.012 UABS), NCs (0.057 ± 0.018 UABS) y MNPs (0.063 ± 0.009 UABS) las cuales presentaron un efecto significativo ($P \geq 0.05$) sobre el grupo control al reducir claramente la densidad de la biopelícula.



Gráfica 14. **Comparación actividad biocida.** Se realizó la interacción de las DMI de cada NM y el Pylopack con biopelículas de *H. pylori* observando que se induce un decremento significativo de la biopelícula a 2 mg de ZnO (0.036 ± 0.012 UABS), 4 mg de NCs (0.046 ± 0.008 UABS) y 4 mg de MNPs (0.050 ± 0.005 UABS) con respecto al Control (0.352 ± 0.122 UABS) y el Pylopack (0.131 ± 0.015 UABS)

Ulterior a este estudio, se realizó el análisis de viabilidad bacteriana en la biopelícula posterior a la interacción con antimicrobianos, dicho estudio se realizó bajo un inóculo de la biopelícula homogeneizada en medios sólidos de Agar Sangre_{8%}/Antibiótico_{7%}, incubando los medios por 72hrs a 37°C con 40 PSI de CO₂ (n = 10) y su posterior cuantificación de UFC; como se observa en el gráfica 15, la viabilidad bacteriana encontrada en la biopelícula remanente del grupo tratado con Pylopack® no mostró algún decremento significativo (P ≤ 0.05) de las UFC de *Helicobacter pylori* (71 ± 2 UFC), respecto a las UFC de las biopelículas en el grupo control (91 ± 2 UFC); siendo significativamente menor (P ≥ 0.05) este efecto bactericida dentro de la biopelícula respecto al efecto producido por las ZnO NPs (25 ± 8 UFC), NCs (42 ± 6 UFC) y MNPs (44 ± 3 UFC) las cuales presentaron un efecto significativo (P ≥ 0.05) sobre el grupo control al reducir claramente la cantidad de UFC en el remanente de biopelícula.



Gráfica 15. **Análisis de UFC.** Se realizó el estudio de las UFC remanentes en las biopelículas de *H. pylori* posterior a la interacción con los agentes antimicrobianos, encontrando un decremento significativo en ZnO NPs (25 ± 8 UFC) NCs (42 ± 6 UFC) y MNPs (44 ± 3 UFC), respecto al control (91 ± 2 UFC) y el pylopack (71 ± 2 UFC).

Por otra parte como se puede observar en las gráficas 10 y 13 el efecto antimicrobiano de estos antibióticos comparado con mostrado por los NMs es significativamente mayor en microorganismos en estado planctónico; esto se podría explicar en el caso de los antibióticos aminoglucósidos (Kanamcina) ya que se une a la sub-unidad S30 del ribosoma en *Staphylococcus aureus*, por lo que se puede inhibir la transcripción de ADN bacteriano y por lo tanto la síntesis de proteínas (García, 2013), lo anterior explica esta amplia disminución en la viabilidad encontrada al interaccionar *Staphylococcus aureus* con la Kanamicina; cabe mencionar que mientras este antibiótico muestra un efecto bactericida sobre los mecanismos genéticos de esta bacteria; mientras que nuestro tratamiento postulado con diversos NMs, muestra este decremento en el inóculo inicial dependiendo aparentemente de la interacción de estos NMs con el medio o con algunos componentes de la cadena respiratoria bacteriana; por lo que podría tardar más en mostrar el mismo efecto de inhibición en bacterias aisladas de *Staphylococcus aureus*. Así mismo, es necesario puntualizar que el tratamiento establecido por Pylopack al estar basado en una mezcla de antibióticos beta-lactámicos (Amoxicilina) y macrólidos (Claritromicina); el cual genera un gran efecto de inhibición bacteriana en condiciones *in vitro* (Espinoza; 2005); en el caso del primer antibiótico el efecto que se puede observar en las gráficas anteriores (10, 11 y 12) puede ser explicado debido a que el beta-lactámico realiza la inhibición de la biosíntesis del mucopéptido de la pared celular. Por otra parte el macrólido realiza su actividad antimicrobiana mediante la unión de las subunidades ribosomales S50,

inhibiendo así la síntesis protéica en bacterias planctónicas de *Helicobacter pylori*; por otra parte, como se observa en las gráficas 11 y 12 para las biopelículas de *Staphylococcus aureus* y 14 y 15 para *Helicobacter pylori* el efecto biocida que ejercieron los NMs sobre estas estructuras de resistencia fue mayor con respecto al que presentaron los antibióticos, tanto al disminuir la densidad de la biopelícula como al reducir el inóculo bacteriano remanente dentro de esta estructura; esta resistencia a los antibióticos utilizados puede deberse a varios factores, en primer lugar; Méndez (2011) describe que las bacterias inmersas en estas estructuras poseen una resistencia intrínseca al utilizar la matriz amorfa como una barrera de difusión, donde los grupos funcionales de los antibióticos quedan mezclados e inactivos dentro de los exopolisacáridos de esta estructura evitando así que se unan a sus sitios de acción; así mismo este autor establece que debido a los componentes de esta estructura se generan diversas zonas con microambientes diversos, como pueden ser zonas hipoxicas, lo que podría explicar las diferencias entre los efectos en los tratamientos con antibióticos y NMs; es importante señalar que de acuerdo a lo estimado por la FEUM (2015) los antimicrobianos poseen un mayor efecto bactericida en células aisladas y en fase de crecimiento exponencial, en este sentido, los resultados obtenidos de estas pruebas de interacción demuestran que nuestros NMs bajo estas dosis podrían penetrar esta estructura e interactuar con las bacterias inmersas en la matriz amorfa y a su vez realizar su efecto bactericida por medio de la generación de ROS, lo anterior puede sustentarse por los experimentos realizados por Ansari et al (2015) quienes afirman que debido a su tamaño; estos NMs pueden internalizarse en la matriz amorfa de la biopelícula inhibiendo la producción de exopolisacáridos, resultando en la desestabilización de esta estructura y su subsecuente generación de estrés oxidativo al interactuar con estas células microbianas. De esta manera se postula que estos NMs pueden ser utilizados en aplicaciones biomédicas para la erradicación de esta estructura siendo inocuo para sistemas *in vivo*.

3.5 EFECTO DE LOS NMs *in vivo*:

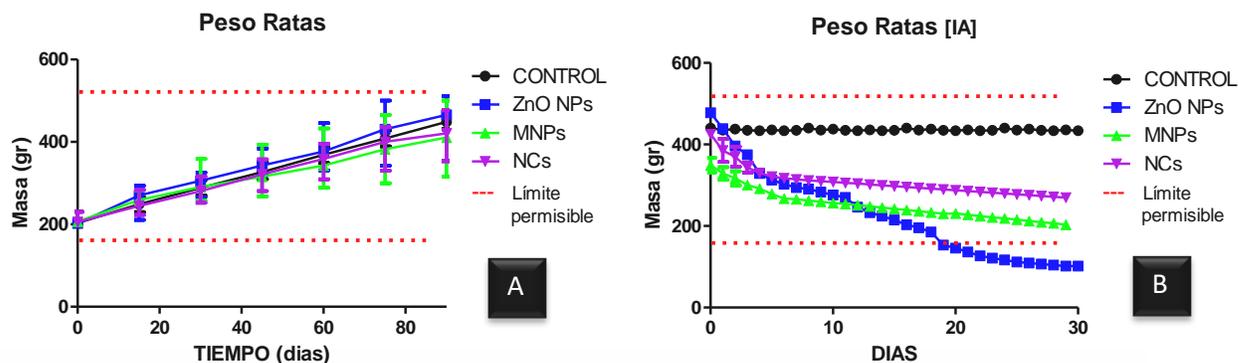
Ulterior a los ensayos de actividad antimicrobiana y biocida se procedió a elucidar la actividad toxicológica de los NMs en ratas Wistar macho bajo una exposición crónica por 90 días; realizando una inoculación intravenosa en la vena caudal media y administrando las DMB de cada NM, realizando una dosis por semana durante 3 meses; así mismo se monitoreo el peso, ingesta de agua, excreción de orina, creatinina, albumina, TGO, TGP, glucosa, bilirrubina directa y total en sangre cada 15 días con el fin de estudiar la función renal y hepática de cada grupo (n =7). Valorando los

mismos parámetros bioquímicos y fisiológicos, se procedió a evaluar el ensayo toxicológico agudo, realizando una inoculación intravenosa en la vena caudal media y administrando 6 mg/Kg de ZnO NPs, 12 mg/Kg de MNPs y 9 mg/Kg de NCs. Las tomas de muestra se realizaron cada 24hrs/30 días (n = 7).

3.5.1. Alteraciones en el peso.

Se observa en la gráfica 16, la comparativa del comportamiento del peso de las ratas entre cada uno de los grupos de estudio crónico y agudo (n=7), donde se observa que en el caso del grupo control crónico el peso de las ratas aumenta de forma gradual ($25 \pm 10\text{gr/día}$) manteniéndose dentro de los valores de referencia ($325 \pm 175\text{gr}$) reportados por Goñi *et al* (2011), así mismo se puede observar el comportamiento de cada NM en la prueba crónica (a) denotando un comportamiento normal dentro de los valores de referencia y un aumento de peso diario promedio semejante al control ($20 \pm 16\text{gr/día}$).

Por otra parte al evaluar los resultados obtenidos de la interacción aguda con los NMs (b) se puede observar un comportamiento distinto al encontrado en la prueba crónica, como se puede observar en la gráfica 16 los organismos modelo control se mantienen en un peso corporal estable ($425 \pm 15\text{gr}$) dentro de los valores de referencia; sin embargo se debe de hacer énfasis en el comportamiento de cada NM 24hrs post-inoculación, donde en el caso de las ZnO NPs se observa un decremento significativo ($P \geq 0.05$) en el peso de las ratas Wistar, se puede notar que este decremento mantiene una tendencia ($35 \pm 12\text{gr/día}$) manteniéndose dentro de los valores de referencia hasta el día 18 post-inoculación donde el peso de los organismos modelo se mantuvo por debajo del límite inferior normal (150gr); manteniendo este comportamiento hasta el día 30 de estudio ($100 \pm 12\text{gr}$). En contraste, se puede observar el comportamiento de las MNPs con un decremento significativo ($P \geq 0.05$) en el peso de estos organismos de estudio respecto al control agudo, se nota una clara tendencia en el decremento del peso de las ratas ($20 \pm 8\text{gr/día}$), sin embargo a diferencia de las ZnO NPs, las ratas tratadas de forma aguda con MNPs mantienen su peso corporal dentro de los valores normales en los 30 días de estudio llegando a un peso mínimo de $200 \pm 5\text{gr}$. Así mismo, se observa en la gráfica 16 el comportamiento de los NCs con un decremento significativo ($P \geq 0.05$) en el peso de estas ratas, respecto al control agudo, se puede observar una clara tendencia en el decremento del peso de las ratas ($15 \pm 3\text{gr/día}$), sin embargo a diferencia de las ZnO NPs y MNPs, las ratas tratadas de forma aguda con NCs logran mantener un peso corporal estable ($310 \pm 5\text{gr}$) dentro de los valores normales en los 30 días de estudio.



Gráfica 16. **Alteraciones en el peso:** Se realizó la interacción crónica y aguda de cada NM en modelos *in vivo* durante 90 y 30 días respectivamente, monitoreando el peso corporal medio de cada tratamiento estudiado, observando que bajo interacciones crónicas (a) los organismos modelo presentan un comportamiento similar a su grupo control, manteniendo su peso dentro de los valores normales (325 ± 175 gr); En contraste, se observan las alteraciones en el peso corporal medio en la interacción aguda (b), denotando que 18 días post-inoculación el grupo tratado con ZnO NPs mantiene su peso por debajo de los valores de referencia (100 ± 12 gr), mientras que los grupos tratados con MNPs y NCs mantienen una tendencia de decremento significativo ($P \geq 0.05$) respecto al control, manteniéndose dentro de los valores de referencia.

Al analizar los resultados obtenidos en la gráfica 16, se observa que al realizar las interacciones crónicas (a) de los NMs con los organismos modelo no se genera un decremento significativo del peso corporal medio respecto al grupo control, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Almansour *et.al.*(2015) quienes realizaron la interacción de ZnO NPs a dosis bajas (2 mg/Kg) via intravenosa durante 30 días; obteniendo un comportamiento normal en la tasa de incremento corporal de las ratas Wistar, sin embargo, estos autores postulan que estas interacciones crónicas generan una disminución en la ingesta de comida hasta del 18% sin generar efecto significativo en el peso de las ratas, estos resultados sugieren la ausencia de daño toxicológico en sistemas *in vivo* por parte de este material. En contraste al observar los resultados obtenidos de la interacción aguda (b) con ZnO NPs, se muestra un decremento altamente significativo y por debajo de los límites normales, estos resultados indican que las ZnO NPs generan un daño toxicológico adverso, lo cual puede estar relacionado a la toxicidad celular resultado de estrés oxidativo y la liberación de ROS; estos resultados se justifican con los obtenidos en la investigación realizada por Pineda *et. al.* (2012) quienes al realizar una administración intravenosa de dosis altas de ZnO NPs (10 mg/Kg) generó la disminución en el peso corporal medio de las ratas, estos autores atribuyen este efecto toxicológico al efecto oxidativo generado por la liberación de iones de este NM y a la inactivación de enzimas metabólicas causando, la pérdida de masa corporal y evitando la generación de nutrientes en el

organismo modelo; por otra parte esta pérdida mórbida de peso puede explicarse por los estudios realizado pos Bailey *et. al.* (2014), Quienes demostraron que las ratas expuestas a dosis altas de ZnO NPs (12 mg/Kg) disminuyen los índices de peso en los órganos más con mayor relevancia fisiológica (Hígado, riñones y corazón), atribuido a la generación de coleostasis 30 días posteriores a la inoculación, por lo que debido a la pérdida de la integridad hepática se puede desencadenar una disminución en el peso normal de los organismos modelo.

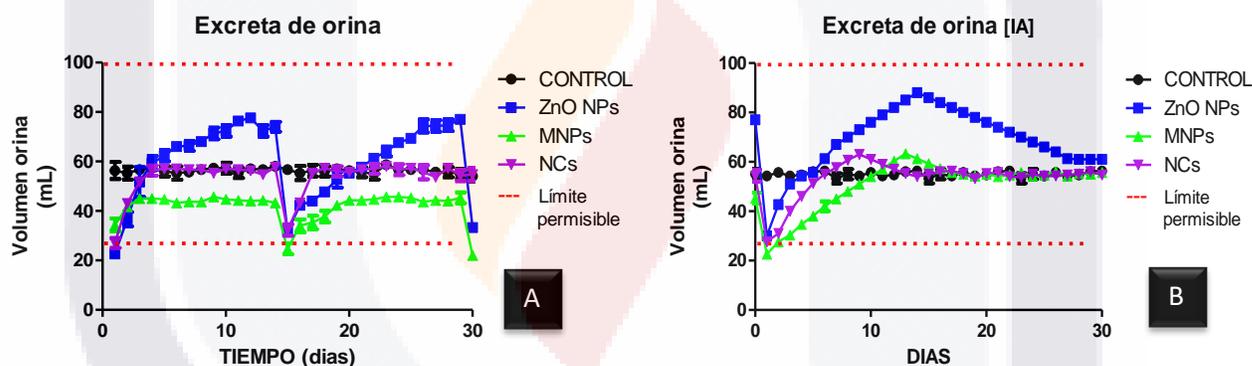
Por otra parte, como se puede observar en la gráfica 16, la interacción crónica **(a)** con MNPs no genera un efecto significativo sobre el peso corporal medio de los organismos modelo, estos resultados sugieren la ausencia de efecto toxicológico aparente bajo estas condiciones de interacción; esto se sustenta con los datos obtenidos de la investigación realizada por Zhang *et. al.* (2013) quienes afirman que debido a que estos NMs están constituidos por un oligoelemento, estos pueden llegar a ser absorbidos en los tejidos y en fluidos corporales, para su posterior uso en la síntesis de ferroproteínas, evitando la pérdida de masa corporal en interacciones a dosis bajas (5 mg/Kg). En contraste, este parámetro morfométrico diverge al realizar la interacción de este NM bajo condiciones agudas **(b)** debido a que disminuye significativamente la tasa de peso respecto al grupo control, sin embargo este se mantiene dentro de los valores de referencia normales; estos resultados pueden sustentarse con la investigación realizada por Sulaiman *et.al.* (2015) quienes al administrar dosis altas de MNPs (3 mg/Kg) observaron alteraciones significativas en el peso corporal y de los órganos internos que atribuyen a la generación de estrés oxidativo mediado por la alta concentración de las NPs, más que a la capacidad de generar toxicidad de este NM. Así mismo, al considerar este efecto sobre el peso corporal posterior a la crónica y aguda de los NMs en sistemas *in vivo*, se puede observar en la gráfica 16 que no existen alteraciones significativas en el peso al realizar la interacción crónica **(a)** y aguda **(b)** con los NCs, estos resultados sugieren que este material no genera efectos toxicológicos adversos bajo ningún tipo de exposición, lo cual podría ser atribuible a la presencia de oligoelementos en bajas concentraciones como lo sugiere Almansour *et.al.*(2015).

3.5.2. Alteraciones en la excreta de orina.

Como se observa en la gráfica 17, se realizó la comparativa del volumen excretado de orina de cada grupo de estudio crónico y agudo ($n=7$), notando que en el caso del grupo control crónico el volumen de orina se mantiene constante ($57 \pm 2\text{ml/día}$) dentro de los valores de referencia ($62.5 \pm 37.5\text{ml}$) reportados por Goñi *et al* (2011), así mismo se puede observar el comportamiento de cada NM en la prueba crónica (a) denotando que, 2 días post-inoculación el grupo tratado con NCs excretaba un volumen promedio de orina significativamente menor ($P \geq 0.05$) respecto al grupo control, aunque dentro de los valores de referencia, en contraste al tercer día post-inoculación se observó un comportamiento normal dentro de los valores de referencia y un volumen de orina similar al grupo control ($54 \pm 5\text{ml/día}$); este comportamiento se observó durante cada administración del tratamiento cada 15 días. Así mismo se puede observar que el grupo tratado con MNPs excretó un volumen promedio de orina ($40 \pm 3\text{ml/día}$) significativamente menor ($P \geq 0.05$) respecto al grupo control posterior a la inoculación del tratamiento, aunque dentro de los valores de referencia; este comportamiento se mantuvo constante durante todo el tratamiento. En contraste, es posible observar que, 2 días post-inoculación el grupo tratado con ZnO NPs excretó un volumen promedio de orina significativamente menor ($P \geq 0.05$) respecto al grupo control, aunque dentro de los valores de referencia, en contraste desde tercer y hasta el catorceavo día post-inoculación se observó una tendencia en el aumento en la excreta de orina ($75 \pm 2\text{ml/día}$) significativamente mayor ($P \geq 0.05$), respecto al control, aunque dentro de los valores de referencia; este comportamiento se observó durante cada administración del tratamiento cada 15 días.

Por otra parte al evaluar los resultados obtenidos de la interacción aguda con los NMs (b) se puede observar un comportamiento distinto al encontrado en la prueba crónica, como se puede observar en la gráfica 17 los organismos modelo control mantienen un volumen de orina estable similar al grupo control crónico ($56 \pm 3\text{ml/día}$) dentro de los valores de referencia; sin embargo se debe de hacer énfasis en el comportamiento de cada NM, donde en el caso de las ZnO NPs, 3 días post-inoculación, se observa un decremento significativo ($P \geq 0.05$), en el volumen de orina, respecto al control, manteniéndose dentro de los valores de referencia, sin embargo, desde el cuarto y hasta el décimo quinto día post-inoculación se observó una tendencia en el aumento en la excreta de orina ($90 \pm 12\text{ml/día}$) significativamente mayor ($P \geq 0.05$), respecto al control, aunque dentro de los valores de referencia; así mismo se observa que, desde el décimo sexto y hasta el treintavo día post-inoculación se generó una tendencia a la normalidad en la excreta de orina ($60 \pm 7\text{ml/día}$). Así

mismo, en el grupo tratado con MNPs, 11 días post-inoculación, se observa un decremento significativo ($P \geq 0.05$), en el volumen de orina, respecto al control, manteniéndose dentro de los valores de referencia, sin embargo, desde el doceavo hasta el décimo sexto día post-inoculación se observó una tendencia en el aumento en la excreta de orina ($58 \pm 5 \text{ ml/día}$) dentro de los valores de referencia; así mismo se observa que, desde el décimo séptimo y hasta el treintavo día post-inoculación se generó una tendencia a la normalidad en la excreta de orina ($54 \pm 2 \text{ ml/día}$). Finalmente, en el grupo tratado con NCs, 5 días post-inoculación, se observa un decremento significativo ($P \geq 0.05$), en el volumen de orina, respecto al control, manteniéndose dentro de los valores de referencia, sin embargo, desde el sexto hasta el noveno día post-inoculación se observó una tendencia en el aumento en la excreta de orina ($55 \pm 1 \text{ ml/día}$) dentro de los valores de referencia; así mismo se observa que, desde el décimo y hasta el treintavo día post-inoculación se generó una tendencia a la normalidad en la excreta de orina ($57 \pm 3 \text{ ml/día}$).



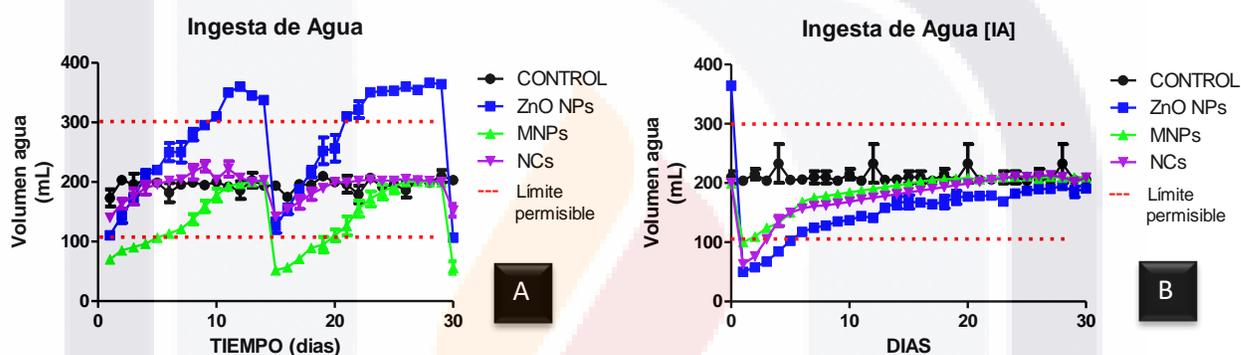
Gráfica 17. **Excreta de orina:** Se evaluó la excreta de orina posterior a la interacción crónica y aguda de cada NM en modelos *in vivo* durante 90 y 30 días respectivamente, observando que bajo interacciones crónicas (a) los organismos tratados con NCs presentan un volumen de orina similar a su grupo control ($54 \pm 5 \text{ ml}$); En contraste, se observa un aumento significativo ($P \geq 0.05$) en el volumen de orina en los organismos inoculados con ZnO NPs ($75 \pm 2 \text{ ml}$) y un decremento significativo ($P \geq 0.05$) en el volumen de orina en los organismos tratados con MNPs ($40 \pm 3 \text{ ml}$). Así mismo se observa que bajo interacciones agudas (b), los organismos tratados con NCs y MNPs presentan un volumen de orina similar a su grupo control ($57 \pm 3 \text{ ml}$ y $54 \pm 2 \text{ ml}$); En contraste, se observa un aumento significativo ($P \geq 0.05$) en el volumen de orina en los organismos tratados con ZnO NPs ($90 \pm 12 \text{ ml}$).

3.5.3. Alteraciones en la ingesta de agua.

Como se observa en la gráfica 18, se evaluó la comparativa del volumen de agua ingerido por cada grupo de estudio (crónico y agudo) ($n=7$), notando que en el caso del grupo control crónico el volumen de agua se mantiene constante ($200 \pm 10\text{ml/día}$) dentro de los valores de referencia ($202.5 \pm 97.5\text{ml}$) reportados por Goñi *et al* (2011), así mismo se puede observar el comportamiento de cada NM en la prueba crónica (a) enfatizando que, 4 días post-inoculación el grupo tratado con NCs ingería un volumen promedio de agua significativamente menor ($P \geq 0.05$) respecto al grupo control, aunque dentro de los valores de referencia, en contraste al quinto día post-inoculación se observó un comportamiento normal dentro de los valores de referencia y una ingesta de agua similar al grupo control ($205 \pm 15\text{ml/día}$); este comportamiento se observó durante cada administración del tratamiento cada 15 días. Así mismo se puede observar que el grupo tratado con MNPs ingerió un volumen promedio de agua ($120 \pm 18\text{ml/día}$) significativamente menor ($P \geq 0.05$) respecto al grupo control durante los 12 días posteriores a la inoculación, normalizando esta ingesta de agua ($200 \pm 8\text{ml/día}$) desde el treceavo hasta el décimo quinto día post-inoculación, respecto al control; este comportamiento se mantuvo constante durante todo el tratamiento. En contraste, es posible observar que, 5 días post-inoculación el grupo tratado con ZnO NPs ingerió un volumen promedio de agua significativamente menor ($P \geq 0.05$) respecto al grupo control, aunque dentro de los valores de referencia, en contraste desde sexto y hasta el catorceavo día post-inoculación se observó una tendencia en el aumento en la ingesta de agua ($350 \pm 16\text{ml/día}$) significativamente mayor ($P \geq 0.05$), respecto al control y por arriba de los valores de referencia; este comportamiento se observó durante cada administración del tratamiento cada 15 días.

Por otra parte al evaluar los resultados obtenidos de la interacción aguda con los NMs (b) se puede observar un comportamiento distinto al encontrado en la prueba crónica, como se nota en la gráfica 18 los organismos modelo control mantienen una ingesta de agua estable similar al grupo control crónico ($203 \pm 5\text{ml/día}$) dentro de los valores de referencia; sin embargo se debe de hacer énfasis en el comportamiento de cada NM, donde en el caso de las ZnO NPs, 6 días post-inoculación, se observa un decremento significativo ($P \geq 0.05$), en la ingesta de agua, respecto al control, manteniéndose por debajo de los valores de referencia, sin embargo, desde el séptimo y hasta el vigésimo día post-inoculación se observó una tendencia en el aumento en la ingesta de agua ($180 \pm 15\text{ml/día}$) significativamente menor ($P \geq 0.05$), respecto al control, aunque dentro de los valores de referencia; así mismo se observa que, desde el vigésimo primer y hasta el treintavo día post-

inoculación se generó una tendencia a la normalidad en la ingesta de agua ($200 \pm 9\text{ml/día}$). Así mismo, en el grupo tratado con MNPs, 12 días post-inoculación, se observa un decremento significativo ($P \geq 0.05$), en el volumen de orina, respecto al control, manteniéndose dentro de los valores de referencia, sin embargo, desde el treceavo y hasta el treintavo día post-inoculación se observó una tendencia a la normalidad en la ingesta de agua ($201 \pm 14\text{ml/día}$). Finalmente, en el grupo tratado con NCs, 15 días post-inoculación, se observa un decremento significativo ($P \geq 0.05$), en el volumen de agua, respecto al control, manteniéndose dentro de los valores de referencia, sin embargo, desde el décimo sexto y hasta el treintavo día post-inoculación se generó una tendencia a la normalidad en la ingesta de agua ($205 \pm 10\text{ml/día}$).



Gráfica 18. **Ingesta de agua:** Se evaluó la ingesta de agua posterior a la interacción crónica y aguda de cada NM en modelos *in vivo* durante 90 y 30 días respectivamente, observando que bajo interacciones crónicas (a) los organismos tratados con NCs presentan un ingesta similar a su grupo control ($203 \pm 5\text{ml}$); En contraste, se observan un aumento significativo ($P \geq 0.05$) en la ingesta en los organismos tratados con ZnO NPs ($350 \pm 16\text{ml}$) y un decremento significativo ($P \geq 0.05$) en la ingesta en los organismos tratados con MNPs ($120 \pm 18\text{ml}$). Así mismo se observa que bajo interacciones agudas (b), los organismos tratados con NCs y MNPs presentan una ingesta de agua similar a su grupo control ($203 \pm 5\text{ml}$ y $200 \pm 9\text{ml}$); En contraste, se observan un decremento significativo ($P \geq 0.05$) en la ingesta en los organismos tratados con ZnO NPs ($180 \pm 15\text{ml}$).

Como se observa en las gráficas 17 y 18, la interacción de los NMs genera distintas alteraciones en la ingesta de agua y excreta de orina, en caso de las interacciones crónicas (a) con ZnO NPs el resultado más significativo fue el aumento por arriba de los valores de referencia en la ingesta de agua, la cual es proporcional a la cantidad de orina excretada, en este sentido este aumento significativo de volumen de agua puede ser explicado por la fisiología propia del Zn, el cual como lo describe Romaña (2014); posterior al ser administradas las ZnO NPs y estar en contacto en un medio acuoso comienza a liberar iones Zn^{+2} , los cuales son absorbidos por las células de la mucosa o α -macroglobulinas aumentando de esta forma la cantidad de secreciones pancreáticas e

intestinales, debida a este aumento de excreciones el cuerpo regula sus niveles de agua para llegar a la homeostasis, lo que se ve reflejado en una mayor ingesta de agua lo que explica el comportamiento observado en la gráfica 18 sin llegar a indicar un daño renal; debido a este aumento de Zn en el organismo la filtración glomerular es modificada para generar una tasa de eliminación de 0.4 – 0.6 mg/24hrs de los iones Zn^{+2} evitando un daño hidrópico hepático por la alta ingesta de agua y la alta concentración de iones Zn^{+2} por medio del aumento en la excreta de orina como se puede observar en la gráfica 17, estos resultados sugieren que no existe efecto toxicológico renal adverso en la interacción crónica con ZnO NPs. Así mismo, al realizar la evaluación de estos parámetros fisiológicos con ZnO NPs bajo una interacción aguda (**b**) se observa un comportamiento distinto respecto a la interacción crónica, debido al bajo volumen de orina excretado respecto al volumen de agua ingerido. esto concuerda con los resultados obtenidos por Oluyomi y Adewumi (2014) quienes atribuyen este comportamiento debido a que a altas concentraciones de iones Zn^{+2} (7 mg/Kg) activa la anhidrasa carbónica, tomando el CO_2 tisular formando una cantidad mayor de agua en el sistema, por lo que el organismo disminuye el requerimiento de ingesta de agua para generar la homeóstasis (gráfica 18), sin embargo debido al aumento de agua corporal derivado de la acción de la anhidrasa la excreta de agua puede mantenerse dentro de los valores de referencia, por lo que esto podría sugerir que esta interacción no genera daño renal, bajo nuestra condiciones de trabajo.

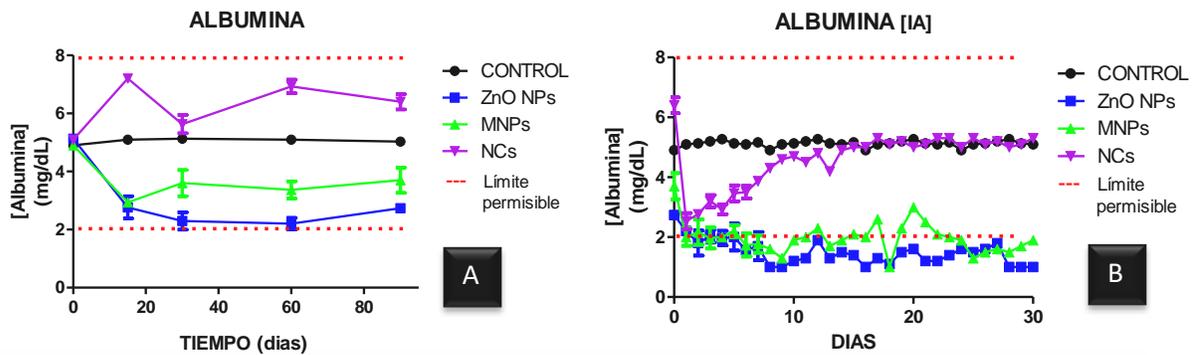
Por otra parte, como se puede observar en las gráficas 17 y 18, la interacción crónica (**a**) y aguda (**b**) con MNPs y NCs no genera un efecto significativo sobre la ingesta de agua y la excreción de orina de los organismos modelo, estos resultados sugieren la ausencia de efecto toxicológico aparente bajo estas condiciones de interacción; esto se sustenta con los datos obtenidos de la investigación realizada por Zhang *et. al.* (2013) quienes afirman que debido a que estos NMs están constituidos por un oligoelemento en bajas concentraciones, estos pueden llegar a ser absorbidos en los tejidos y en fluidos corporales, para su posterior uso en la síntesis de ferroproteínas.

3.5.4. Alteraciones en albumina sérica.

Como se observa en la gráfica 19, se evaluó la comparativa de la concentración sérica de albumina en cada grupo de estudio (crónico y agudo) (n=7), notando que en el caso del grupo control crónico esta concentración se mantiene constante (5 ± 1 mg/dl) dentro de los valores de referencia ($5 \pm$

3mg/dl) reportados por Goñi *et al* (2011), así mismo se puede observar el comportamiento de cada NM en la prueba crónica (**a**) enfatizando que, el grupo tratado con NCs mantenía una concentración sérica de albumina (6.5 ± 1.5 mg/dl) significativamente mayor ($P \geq 0.05$), aunque dentro de los valores de referencia; este comportamiento se observó durante cada administración del tratamiento cada 15 días. Así mismo se puede observar que el grupo tratado con MNPs mantenía una concentración de albumina sérica (3.1 ± 0.8 mg/dl) significativamente menor ($P \geq 0.05$) respecto al grupo control dentro de los valores de referencia; este comportamiento se mantuvo constante durante todo el tratamiento. En contraste, es posible observar que el grupo tratado con ZnO NPs mantuvo una concentración sérica de albumina (2.3 ± 0.5 mg/dl) significativamente menor ($P \geq 0.05$) respecto al grupo control, aunque dentro de los valores de referencia; este comportamiento se observó durante cada administración del tratamiento cada 15 días.

Por otra parte al evaluar los resultados obtenidos de la interacción aguda con los NMs (**b**) se puede observar un comportamiento distinto al encontrado en la prueba crónica, como se nota en la gráfica 19 los organismos modelo control mantienen una concentración de albumina sérica estable similar al grupo control crónico (5 ± 0.6 mg/dl) dentro de los valores de referencia; sin embargo se debe de hacer énfasis en el comportamiento de cada NM, donde en el caso de las ZnO NPs, se observa un decremento altamente significativo ($P \geq 0.05$), en la concentración de albumina (1 ± 0.9 mg/dl), respecto al control, manteniéndose por debajo de los valores de referencia,. Así mismo, en el grupo tratado con MNPs, se observa un decremento significativo ($P \geq 0.05$), en la concentración de albumina (2 ± 1 mg/dl), respecto al control, manteniéndose dentro de los valores de referencia. Finalmente, en el grupo tratado con NCs, se observa una concentración de albumina (5 ± 1 mg/dl) similar al control, manteniéndose dentro de los valores de referencia.



Gráfica 19. **Albumina sérica:** Se evaluó la concentración de albumina sérica posterior a la interacción crónica y aguda de cada NM en modelos *in vivo* durante 90 y 30 días respectivamente, observando que bajo interacciones crónicas (a) los organismos tratados con NCs presentan una concentración significativamente mayor ($P \geq 0.05$) a su grupo control (6.5 ± 1.5 mg/dl); en contraste, se observan una concentración significativamente menor ($P \geq 0.05$) en la albumina sérica en los grupos tratados con ZnO NPs y MNPs (2.3 ± 0.5 mg/dl y 3.1 ± 0.8 mg/dl). Así mismo se observa que bajo interacciones agudas (b), los organismos tratados con NCs presentan una concentración de albumina similar a su grupo control (5 ± 1 mg/dl); En contraste, se observa una concentración significativamente menor ($P \geq 0.05$) en la albumina sérica en los grupos tratados con ZnO NPs y MNPs (1 ± 0.9 mg/dl y 2 ± 1 mg/dl).

Los resultados mostrados en la gráfica 19, denotan un indicativo de posible daño hepático durante la interacción con los distintos NMs, en este caso como se muestra en la interacción crónica (a) para las MNPs y ZnO NPs los valores de albumina disminuyen levemente respecto al grupo control sin embargo se mantienen dentro de los valores de referencia, lo cual podría estar relacionado con el estrés de la manipulación de los organismos modelo o bien como lo describe Chemore (2015) el uso de agentes hipnóticos puede causar una disminución en los niveles de proteínas (en este caso albumina) en suero, por lo que estos resultados sugieren que la interacción crónica con estos NMs no ejerce daño hepático. En contraste se observa que los NCs generan un aumento en la concentración de albumina manteniéndose dentro de los valores de referencia, lo que puede estar atribuido por lo descrito por Rockville (2016), quien atribuye este aumento de albumina sérica a la estimulación hepática (síntesis de *novo*) debido a la presencia de oligoelementos derivados de este NC, sin embargo no es indicativo de un daño hepático.

Por otra parte, se observa en la gráfica 19 que al realizar la interacción aguda (b) de las MNPs y ZnO NPs en sistemas *in vivo* disminuye significativamente la concentración de albumina sérica cerca de los valores inferiores normales, (excepto las ZnO NPS manteniéndose por debajo de los valores normales) lo cual puede estar atribuido al daño hepático producido por el estrés oxidativo en altas dosis de estos NMs, lo cual está sustentado en los experimentos de Oyelola *et. al.* (2015),

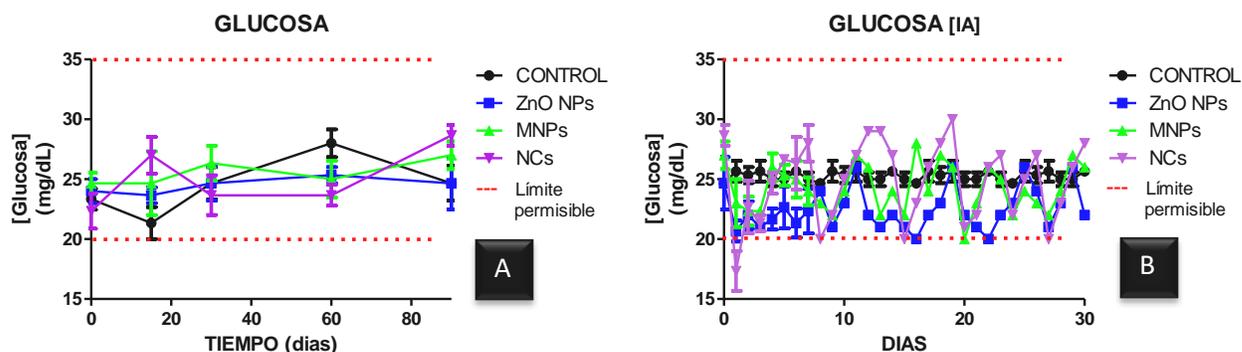
TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

quien describe que al administrar dosis altas de estos NMs (2 mg/Kg y 5mg/Kg) vía intravenosa estos liberan una alta concentración de iones en el citoplasma de los hepatocitos llevándolos a apoptosis y su posterior disminución de síntesis de albumina; por lo que estos resultados sugieren un posible daño hepático bajo nuestras condiciones de estudio. En contraste, se observa que la interacción aguda con NCs no genera cambios significativos respecto al control, similar a lo ocurrido en la interacción crónica, por lo que estos resultados pueden indicar la ausencia de daño hepático en esta interacción.

3.5.5. Alteraciones en glucosa sérica.

Como se observa en la gráfica 20, se evaluó la comparativa de la concentración sérica de glucosa en cada grupo de estudio (crónico y agudo) (n=7), notando que en el caso del grupo control crónico esta concentración se mantiene constante (25 ± 5 mg/dl) dentro de los valores de referencia (27.5 ± 7.5 mg/dl) reportados por Goñi *et al* (2011), así mismo se puede observar el comportamiento de cada NM en la prueba crónica (a) enfatizando que, el grupo tratado con NCs mantenía un concentración sérica de glucosa similar al grupo control (25 ± 3 mg/dl); este comportamiento se observó durante cada administración del tratamiento cada 15 días. De la misma manera se puede observar que el grupo tratado con MNPs mantenía una concentración de glucosa sérica similar al grupo control (25 ± 2 mg/dl); manteniéndose constante durante todo el tratamiento. Igualmente, es posible observar que el grupo tratado con ZnO NPs mantuvo una concentración sérica de glucosa similar al grupo control (24 ± 1 mg/dl) durante cada administración del tratamiento cada 15 días.

Así mismo, al evaluar los resultados obtenidos de la interacción aguda con los NMs (b) se puede observar un comportamiento similar al encontrado en la prueba crónica, como se nota en la gráfica 20 los organismos modelo control mantienen una concentración de glucosa sérica estable similar al grupo control crónico (25 ± 1 mg/dl) dentro de los valores de referencia; mientras que en el grupo tratado con ZnO NPs, se observa un concentración de glucosa similar al grupo control (22 ± 3 mg/dl). De la misma manera, en el grupo tratado con MNPs, se observa una concentración de glucosa equivalente al grupo control (24 ± 2 mg/dl), Finalmente, en el grupo tratado con NCs, se observa una concentración de glucosa (25 ± 4 mg/dl) similar al control.



Gráfica 20. **Glucosa sérica:** Se evaluó la concentración de glucosa sérica posterior a la interacción crónica y aguda de cada NM en modelos *in vivo* durante 90 y 30 días respectivamente, observando que bajo interacciones crónicas (a) los organismos tratados con los tres NMs presentan una concentración similar al grupo control NC: 25 ± 3 mg/dl, MNPs: 25 ± 2 mg/dl y ZnO NPs: 24 ± 1 mg/dl. Igualmente se observa este comportamiento bajo interacciones agudas (b), NC: 25 ± 4 mg/dl, MNPs: 24 ± 2 mg/dl y ZnO NPs: 22 ± 3 mg/dl

Como se puede observar en la gráfica 20, existe un comportamiento similar entre los niveles séricos de glucosa posterior a la interacción crónica (a) y aguda (b) con los tres NMs, se debe notar que en la interacción crónica los tres materiales presentaron niveles de glucosa normal similares al grupo control, lo que postula que esta interacción crónica no despierta un daño hepático aparente, así como posibles patologías como diabetes relacionadas a esta interacción. Por otra parte al analizar los resultados obtenidos de la interacción aguda se puede observar que estos niveles séricos de glucosa se mantienen dentro de los valores normales, sin embargo se encuentran significativamente disminuidos con respecto a los niveles séricos presentes en la prueba crónica; esto puede ser explicado con la investigación realizada de Lee *et. al.* (2015) quienes postulan que tras 30 días de la inoculación intravenosa de dosis altas de ZnO NPs (1 mg/Kg) y MNPs (2 mg/Kg) generan una alteración en el metabolismo de la glucosa, relacionado con la reducción de la transcripción del gen *Nrf2*, debido a la internalización de altas cantidades de iones Fe y Zn, alterando de esta manera la síntesis y liberación de glucosa, sin embargo estos autores postulan que los niveles de LDH no se ven afectados por lo que esta afección solo se ve en la disminución en la liberación de glucosa, sin generar daño pancreático; así mismo esta falta de daño tisular fue reportado por Klim *et. al.* (2015) quienes indican que entre las primeras 6 horas de interacción con ZnO NPs (9 mg/Kg) y MNPs (8 mg/Kg) se genera una reducción en los niveles séricos de los parámetros bioquímicos, en respuesta a la búsqueda de la homeostasis corporal ante altas concentraciones de estos NMs, sin embargo después de este tiempo los niveles de los parámetros bioquímicos se normalizan, como lo podemos

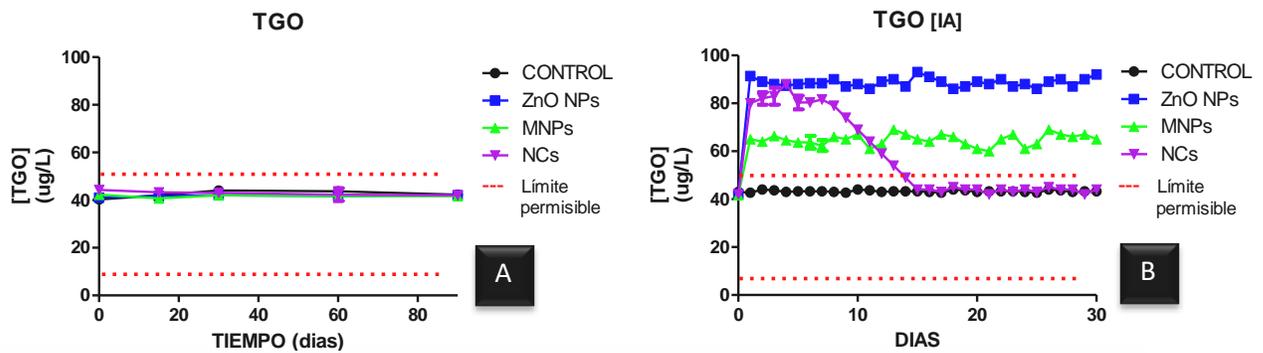
TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

observar en la gráfica 20 (b); así mismo Chen (2016) describe que estos bajos niveles de glucosa pueden deberse a un cambio de fosforilación oxidativa a glucolisis durante los primeros 24 días después de la interacción con dosis altas con NMs ZnO NPs (2 mg/Kg) y MNPs (5 mg/Kg); lo que explica los resultados obtenidos en esta investigación, así mismo basándonos en lo descrito anteriormente, estos resultados pueden indicar la ausencia de daño pancreático en nuestros organismos modelo.

3.5.6. Alteraciones en TGO sérica.

Como se observa en la gráfica 21, se evaluó la comparativa de la concentración sérica de TGO en cada grupo de estudio (crónico y agudo) (n=7), notando que en el caso del grupo control crónico esta concentración se mantiene constante ($40 \pm 1 \mu\text{g/l}$) dentro de los valores de referencia ($30 \pm 20 \mu\text{g/l}$) reportados por Goñi *et al* (2011), así mismo se puede observar el comportamiento de cada NM en la prueba crónica (a) enfatizando que, el grupo tratado con NCs mantenía una concentración sérica de TGO similar al grupo control ($41 \pm 2 \mu\text{g/l}$); este comportamiento se observó durante cada administración del tratamiento cada 15 días. De la misma manera se puede observar que el grupo tratado con MNPs mantenía una concentración de TGO sérica similar al grupo control ($38 \pm 3 \mu\text{g/l}$); manteniéndose constante durante todo el tratamiento. Igualmente, es posible observar que el grupo tratado con ZnO NPs mantuvo una concentración sérica de TGO similar al grupo control ($40 \pm 2 \mu\text{g/l}$) durante cada administración del tratamiento cada 15 días.

Por otra parte, al evaluar los resultados obtenidos de la interacción aguda con los NMs (b) se puede observar un comportamiento diferente al encontrado en la prueba crónica, como se nota en la gráfica 21 los organismos modelo control mantienen una concentración de TGO sérica estable similar al grupo control crónico ($40 \pm 1 \mu\text{g/l}$) dentro de los valores de referencia; mientras que en el grupo tratado con ZnO NPs, se observa una concentración de TGO ($90 \pm 5 \mu\text{g/l}$) significativamente mayor ($P \geq 0.05$) respecto al grupo control, manteniéndose por arriba de los valores de referencia. De la misma manera, en el grupo tratado con MNPs, se observa una concentración de TGO ($60 \pm 3 \mu\text{g/l}$) significativamente mayor ($P \geq 0.05$) respecto al grupo control, manteniéndose por arriba de los valores de referencia. Finalmente, en el grupo tratado con NCs, se observa una concentración de TGO ($41 \pm 2 \mu\text{g/l}$) similar al control 15 post-inoculación, bajo estos parámetros se indica que tanto en los grupos con ZnO NPs como con MNPs se genera un daño tisular aparentemente en hígado.



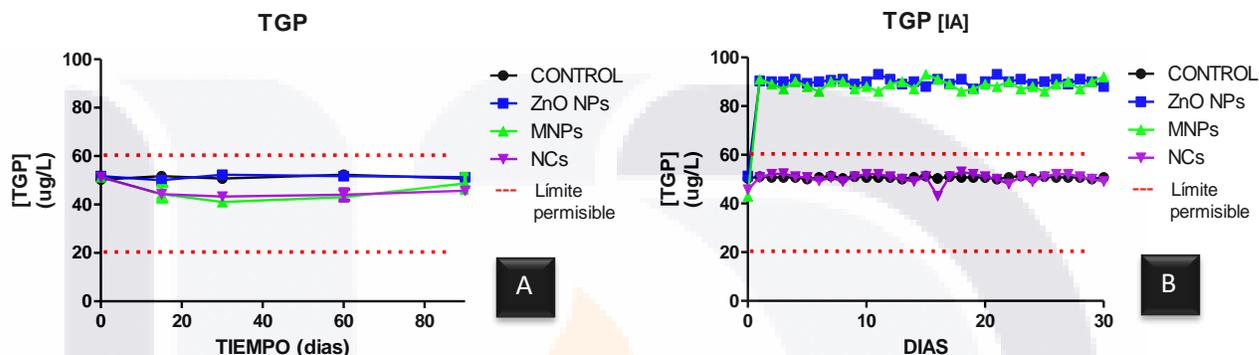
Gráfica 21. **TGO sérica:** Se evaluó la concentración de TGO sérica posterior a la interacción crónica y aguda de cada NM en modelos *in vivo* durante 90 y 30 días respectivamente, observando que bajo interacciones crónicas (a) los organismos tratados con los tres NMs presentan una concentración similar al grupo control NC: $41 \pm 1 \mu\text{g/l}$, MNPs: $38 \pm 3 \mu\text{g/l}$ y ZnO NPs: $40 \pm 2 \mu\text{g/l}$. Así mismo se observa que bajo interacciones agudas (b), los organismos tratados con NCs presentan una concentración de TGO similar a su grupo control ($41 \pm 2 \mu\text{g/l}$) 15 días después de la interacción; en contraste, se observa una concentración significativamente mayor ($P \geq 0.05$) en la TGO sérica en los grupos tratados con ZnO NPs y MNPs ($90 \pm 5 \mu\text{g/l}$ y $60 \pm 3 \mu\text{g/l}$).

3.5.7. Alteraciones en TGP sérica.

Como se observa en la gráfica 22, se evaluó la comparativa de la concentración sérica de TGP en cada grupo de estudio (crónico y agudo) ($n=7$), notando que en el caso del grupo control crónico esta concentración se mantiene constante ($50 \pm 2 \mu\text{g/l}$) dentro de los valores de referencia ($40 \pm 20 \mu\text{g/l}$) reportados por Goñi *et al* (2011), así mismo se puede observar el comportamiento de cada NM en la prueba crónica (a) enfatizando que, el grupo tratado con NCs mantenía un concentración sérica de TGP similar al grupo control ($55 \pm 5 \mu\text{g/l}$); este comportamiento se observó durante cada administración del tratamiento cada 15 días. De la misma manera se puede observar que el grupo tratado con MNPs mantenía una concentración de TGO sérica similar al grupo control ($56 \pm 4 \mu\text{g/l}$); manteniéndose constante durante todo el tratamiento. Igualmente, es posible observar que el grupo tratado con ZnO NPs mantuvo una concentración sérica de TGO similar al grupo control ($51 \pm 1 \mu\text{g/l}$) durante cada administración del tratamiento cada 15 días.

Por otra parte, al evaluar los resultados obtenidos de la interacción aguda con los NMs (b) se puede observar un comportamiento diferente al encontrado en la prueba crónica, como se nota en la gráfica 22 los organismos modelo control mantienen una concentración de TGP sérica estable similar al grupo control crónico ($50 \pm 1 \mu\text{g/l}$) dentro de los valores de referencia; mientras que en el grupo tratado con ZnO NPs, se observa una concentración de TGP ($92 \pm 3 \mu\text{g/l}$) significativamente mayor

($P \geq 0.05$) respecto al grupo control, manteniéndose por arriba de los valores de referencia. De la misma manera, en el grupo tratado con MNPs, se observa una concentración de TGP ($90 \pm 2 \mu\text{g/l}$) significativamente mayor ($P \geq 0.05$) respecto al grupo control, manteniéndose por arriba de los valores de referencia. Finalmente, en el grupo tratado con NCs, se observa una concentración de TGP ($52 \pm 3 \mu\text{g/l}$).



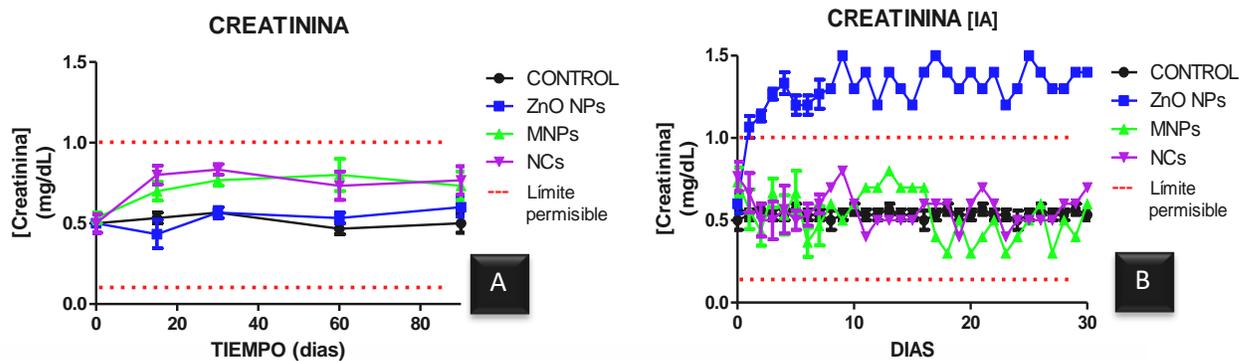
Una constante que se pudo observar en las gráficas 21 y 22 bajo los resultados obtenidos en interacción crónica (a) recae en el comportamiento de los tres NMs en los niveles de TGO y TGP, los cuales se encuentran dentro de los valores de referencia con valores similares a los obtenidos en el grupo control, teniendo en cuenta lo descrito por Bishop (2014), estos niveles de TGO normales postulan que la interacción crónica de estos NMs no generan un daño aparente a nivel tisular, así mismo estos valores normales en TGP indican la ausencia de daño, lo que concuerda con los resultados obtenidos en las gráficas 16 y 19. En contraste, se debe de enfatizar los resultados obtenidos para las pruebas agudas (b) en el monitoreo de TGO y TGP, manteniendo niveles elevados por arriba de los valores de referencia en estos parámetros bioquímicos, bajo la interacción con ZnO NPs y MNPs, encontrando que estos resultados son similares a los descritos por Muthuraman y Doo (2014) quienes tras inocular vía intravenosa altas dosis de ZnO NPs (5 mg/Kg) y MNPs (2 mg/Kg) observaron un incremento del 115.4% (TGO) y 92.3 % (TGP) para ZnO NPs y

125% (TGO) y 97% (TGP) para MNPs, lo cual asociaron directamente a la disfunción mitocondrial derivada por daño hepático asociada a la alta cantidad de iones Zn y Fe resultando en estrés oxidativo; por lo que estos resultados indican que el tratamiento agudo con estos NMs generó un daño toxicológico adverso sobre el parénquima hepático de nuestro organismos modelo. Sin embargo esto no se observa en la interacción con NCs, lo cual puede estar relacionado a la baja concentración de iones presentes en el material, los cuales pudieron solo ser utilizados como bloques de construcción para distintas proteínas sin llegar a desencadenar daño hepático.

3.5.8. Alteraciones en creatinina sérica.

Como se observa en la gráfica 23, se evaluó la comparativa de la concentración sérica de creatinina en cada grupo de estudio (crónico y agudo) ($n=7$), notando que en el caso del grupo control crónico esta concentración se mantiene constante (0.5 ± 0.1 mg/dl) dentro de los valores de referencia (0.55 ± 0.45 mg/dl) reportados por Goñi *et al* (2011), así mismo se puede observar el comportamiento de cada NM en la prueba crónica (a) enfatizando que, el grupo tratado con NCs mantenía un concentración sérica de creatinina similar al grupo control (0.6 ± 0.2 mg/dl); este comportamiento se observó durante cada administración del tratamiento cada 15 días. De la misma manera se puede observar que el grupo tratado con MNPs mantenía una concentración de creatinina sérica similar al grupo control (0.6 ± 0.1 mg/dl); manteniéndose constante durante todo el tratamiento. Igualmente, es posible observar que el grupo tratado con ZnO NPs mantuvo una concentración sérica de creatinina similar al grupo control (0.5 ± 0.2 mg/dl) durante cada administración del tratamiento cada 15 días.

Por otra parte, al evaluar los resultados obtenidos de la interacción aguda con los NMs (b) se puede observar un comportamiento diferente al encontrado en la prueba crónica, como se nota en la gráfica 23 los organismos modelo control mantienen una concentración de creatinina sérica estable similar al grupo control crónico (0.5 ± 0.1 mg/dl) dentro de los valores de referencia; mientras que en el grupo tratado con ZnO NPs, se observa una concentración de creatinina (1.3 ± 0.2 mg/dl) significativamente mayor ($P \geq 0.05$) respecto al grupo control, manteniéndose por arriba de los valores de referencia. De la misma manera, en el grupo tratado con MNPs, se observa una concentración de creatinina (0.3 ± 0.2 mg/dl) similar al grupo control. Finalmente, en el grupo tratado con NCs, se observa una concentración de creatinina (0.5 ± 0.2 mg/dl).



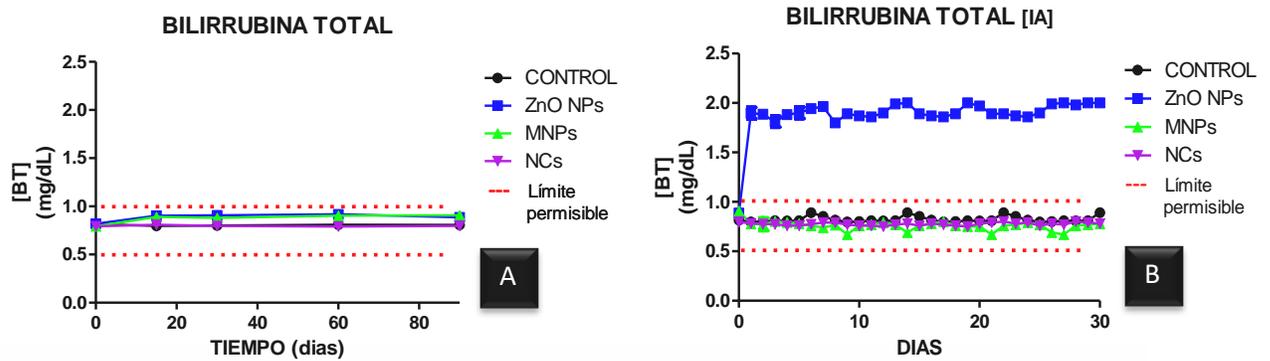
Gráfica 23. **Creatinina sérica:** Se evaluó la concentración de creatinina sérica posterior a la interacción crónica y aguda de cada NM en modelos *in vivo* durante 90 y 30 días respectivamente, observando que bajo interacciones crónicas (a) los organismos tratados con los tres NMs presentan una concentración similar al grupo control NC: 0.6 ± 0.2 mg/dl, MNPs: 0.6 ± 0.1 mg/dl y ZnO NPs: 0.5 ± 0.2 mg/dl Así mismo se observa que bajo interacciones agudas (b), los organismos tratados con NCs y MNPs presentan una concentración de creatinina similar a su grupo control (0.5 ± 0.2 mg/dl y 0.3 ± 0.2 mg/dl); En contraste, se observa una concentración significativamente mayor ($P \geq 0.05$) en la creatinina sérica en los grupos tratados con ZnO NPs (1.3 ± 0.2 mg/dl).

Como se puede observar en la gráfica 23, existe un comportamiento similar entre los niveles séricos de creatinina posterior a la interacción crónica (a) y aguda (b) con MNPs y NCs, se debe notar que en la interacción crónica estos materiales presentaron niveles de glucosa normal similares al grupo control, lo que postula que esta interacción crónica no desencadena un daño muscular aparente, así como posibles patologías renales relacionadas a esta interacción. Por otra parte al analizar los resultados obtenidos de la interacción aguda para ZnO NPs se puede observar que estos niveles séricos de creatinina se mantienen arriba de los valores normales; esto puede ser explicado con la investigación realizada de Costa *et. al.* (2010) quienes postulan que tras la inoculación intravenosa de dosis altas de ZnO NPs (10 mg/Kg) estas podrían causar perturbaciones mitocondriales debido a la interacción electrostática por grupos Tiol entre las proteínas mitocondriales y los iones Zn, reduciendo de esta manera la función mitocondrial, resultando en daño tisular, lo cual se refleja en el incremento de los valores séricos de creatinina, por lo que estos resultados sugieren que existe una respuesta toxicológica adversa muscular ante la interacción aguda con ZnO NPs.

3.5.9. Alteraciones en Bilirrubina Total sérica (BT).

Como se observa en la gráfica 24, se evaluó la comparativa de la concentración de BT en cada grupo de estudio (crónico y agudo) ($n=7$), notando que en el caso del grupo control crónico esta concentración se mantiene constante (0.8 ± 0.1 mg/dl) dentro de los valores de referencia (0.75 ± 0.25 mg/dl) reportados por Goñi *et al* (2011), así mismo se puede observar el comportamiento de cada NM en la prueba crónica (a) enfatizando que, el grupo tratado con NCs mantenía una concentración de BT similar al grupo control (0.8 ± 0.2 mg/dl); este comportamiento se observó durante cada administración del tratamiento cada 15 días. De la misma manera se puede observar que el grupo tratado con MNPs mantenía una concentración de BT similar al grupo control (0.9 ± 0.1 mg/dl); manteniéndose constante durante todo el tratamiento. Igualmente, es posible observar que el grupo tratado con ZnO NPs mantuvo una concentración de BT similar al grupo control (0.9 ± 0.1 mg/dl) durante cada administración del tratamiento cada 15 días.

Por otra parte, al evaluar los resultados obtenidos de la interacción aguda con los NMs (b) se puede observar un comportamiento diferente al encontrado en la prueba crónica, como se nota en la gráfica 24 los organismos modelo control mantienen una concentración de BT estable similar al grupo control crónico (0.8 ± 0.1 mg/dl) dentro de los valores de referencia; mientras que en el grupo tratado con ZnO NPs, se observa una concentración de BT (1.8 ± 0.2 mg/dl) significativamente mayor ($P \geq 0.05$) respecto al grupo control, manteniéndose por arriba de los valores de referencia. De la misma manera, en el grupo tratado con MNPs, se observa una concentración de BT (0.6 ± 0.2 mg/dl) similar al grupo control. Finalmente, en el grupo tratado con NCs, se observa una concentración de creatinina (0.8 ± 0.2 mg/dl).

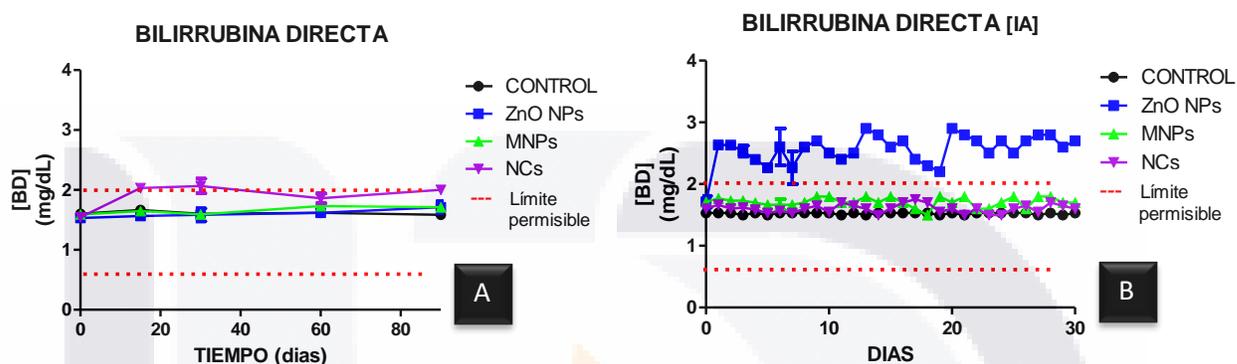


3.5.10. Alteraciones en Bilirrubina Directa sérica (BD).

Como se observa en la gráfica 25, se evaluó la comparativa de la concentración de BD en cada grupo de estudio (crónico y agudo) ($n=7$), notando que en el caso del grupo control crónico esta concentración se mantiene constante (1.5 ± 0.2 mg/dl) dentro de los valores de referencia (1.25 ± 0.75 mg/dl) reportados por Goñi *et al* (2011), así mismo se puede observar el comportamiento de cada NM en la prueba crónica (a) enfatizando que, el grupo tratado con NCs mantenía un concentración de BD similar al grupo control (1.8 ± 0.2 mg/dl); este comportamiento se observó durante cada administración del tratamiento cada 15 días. De la misma manera se puede observar que el grupo tratado con MNPs mantenía una concentración de BD similar al grupo control (1.5 ± 0.1 mg/dl); manteniéndose constante durante todo el tratamiento. Igualmente, es posible observar que el grupo tratado con ZnO NPs mantuvo una concentración de BD similar al grupo control (1.5 ± 0.1 mg/dl) durante cada administración del tratamiento cada 15 días.

Por otra parte, al evaluar los resultados obtenidos de la interacción aguda con los NMs (b) se puede observar un comportamiento diferente al encontrado en la prueba crónica, como se nota en la gráfica 24 los organismos modelo control mantienen una concentración de BD estable similar al grupo control crónico (1.5 ± 0.1 mg/dl) dentro de los valores de referencia; mientras que en el grupo tratado con ZnO NPs, se observa una concentración de BD (2.5 ± 0.3 mg/dl) significativamente

mayor ($P \geq 0.05$) respecto al grupo control, manteniéndose por arriba de los valores de referencia. De la misma manera, en el grupo tratado con MNPs, se observa una concentración de BT (1.6 ± 0.2 mg/dl) similar al grupo control. Finalmente, en el grupo tratado con NCs, se observa una concentración de bilirrubina (1.5 ± 0.2 mg/dl).

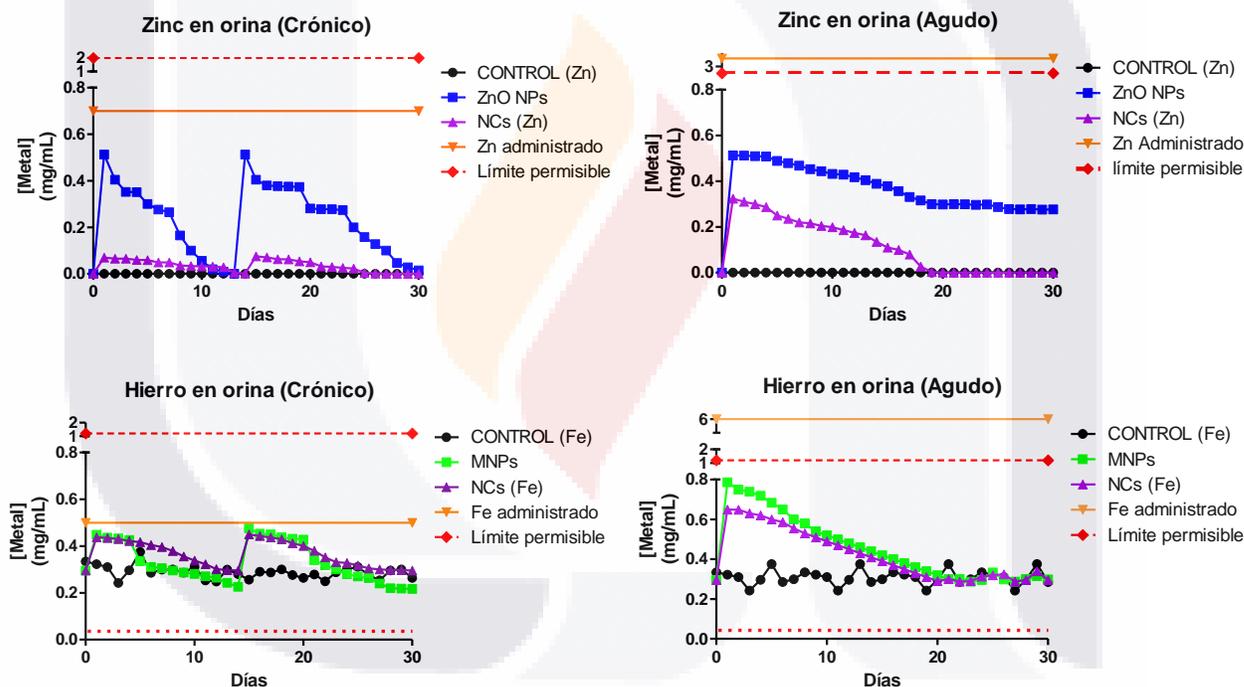


Gráfica 25.**BD**: Se evaluó la concentración de BD posterior a la interacción crónica y aguda de cada NM en modelos *in vivo* durante 90 y 30 días respectivamente, observando que bajo interacciones crónicas (a) los organismos tratados con los tres NMs presentan una concentración similar al grupo control NC: 1.8 ± 0.2 mg/dl, MNPs: 1.5 ± 0.1 mg/dl y ZnO NPs: 1.5 ± 0.1 mg/dl. Así mismo se observa que bajo interacciones agudas (b), los organismos tratados con NCs y MNPs presentan una concentración de BD similar a su grupo control (1.5 ± 0.2 mg/dl y 1.6 ± 0.2 mg/dl); en contraste, se observa una concentración significativamente mayor ($P \geq 0.05$) en la BD en los grupos tratados con ZnO NPs (2.5 ± 0.3 mg/dl).

Se puede observar en las gráficas 24 y 25 que bajo interacciones crónicas (a) de los tres NMs los niveles de BD y BT se encuentran dentro de los valores de referencia con valores similares a los obtenidos en el grupo control, teniendo en cuenta lo descrito por Bishop (2014), estos niveles de BD y BT normales postulan que la interacción crónica de estos NMs no generan un daño aparente a nivel hepático-vesicular, lo que concuerda con los resultados obtenidos en las gráficas 24 y 25. En contraste, se debe de enfatizar los resultados obtenidos para las pruebas agudas (b) en el monitoreo de BD y BT, manteniendo niveles elevados por arriba de los valores de referencia en estos parámetros bioquímicos, bajo la interacción con ZnO NPs, encontrando que estos resultados son similares a los descritos por Baldin (2014) quienes tras inocular vía intravenosa altas dosis de ZnO NPs (15 mg/Kg) observó un incremento del 105% (BD) y 102 % (BT), lo cual asoció directamente a la disfunción hepática derivada a la alta cantidad de iones Zn resultando en estrés oxidativo; por lo que estos resultados indican que el tratamiento agudo con estos NMs generó un daño toxicológico adverso sobre el parénquima hepático de nuestros organismos modelo.

3.5.11. Eliminación de metales por orina

Posterior a los ensayos de actividad toxicológica crónica y aguda de los NMs en ratas Wistar macho; se procedió a contrastar el estudio de excreta de los metales por medio de la orina; con el fin de monitorear una posible bioacumulación de los NMS tanto en pruebas crónicas como agudas; como se observa en la gráfica 26 al realizar la exposición crónica se observa una clara eliminación total de los iones metálicos de cada NM a lo largo de 15 días, demostrando una factible ausencia de daño toxicológico por bioacumulación; por lo contrario se observa que al realizar la interacción aguda de estos NMs no es posible la eliminación total inoculada de estos iones metálicos por la orina en un plazo de 7 días, dando un indicativo de bioacumulación.



Gráfica 26. **Excreción de metales en orina:** Se realizó la interacción de cada NM en modelos *in vivo* de forma aguda y crónica, monitoreando los niveles de los metales en la orina observando un probable efecto de bioacumulación en interacciones agudas con ZnO NPs, sin embargo esto no se observa en la interacción crónica con los demás tratamientos.

Como se observa en la gráfica 26, se evaluó la bioacumulación de iones Fe y Zn posterior a las interacciones crónicas y agudas en sistemas *in vivo*, observando que bajo interacciones crónicas el exceso de estos iones es excretado por orina, hasta llegar a valores similares de grupo control,

posterior a 12 días de interacción, sugiriendo de esta manera la ausencia de bioacumulación de iones en sistemas *in vivo* debido a su baja cantidad dentro del torrente sanguíneo como lo describe Lovern (2008), sin embargo es posible observar que en la interacción aguda a concentración de iones Zn en orina no llegan a normalizarse, lo que sugiere un efecto de bioacumulación de estos NMs, estos resultados concuerdan con la investigación realizada por Owen (2015) quien asegura que esta eliminación parcial de iones es debida a la internalización de los iones en los distintos tejidos o bien puede ser atribuida a la generación de daño tisular por la presencia de altas concentraciones de estos iones en el torrente sanguíneo. En contraste se observa que los iones de Fe en interacciones agudas tiende a normalizarse respecto a los valores del grupo control 20 días post-inoculación, sugiriendo de esta manera que no existe una bioacumulación aparente bajo estas condiciones de estudio.

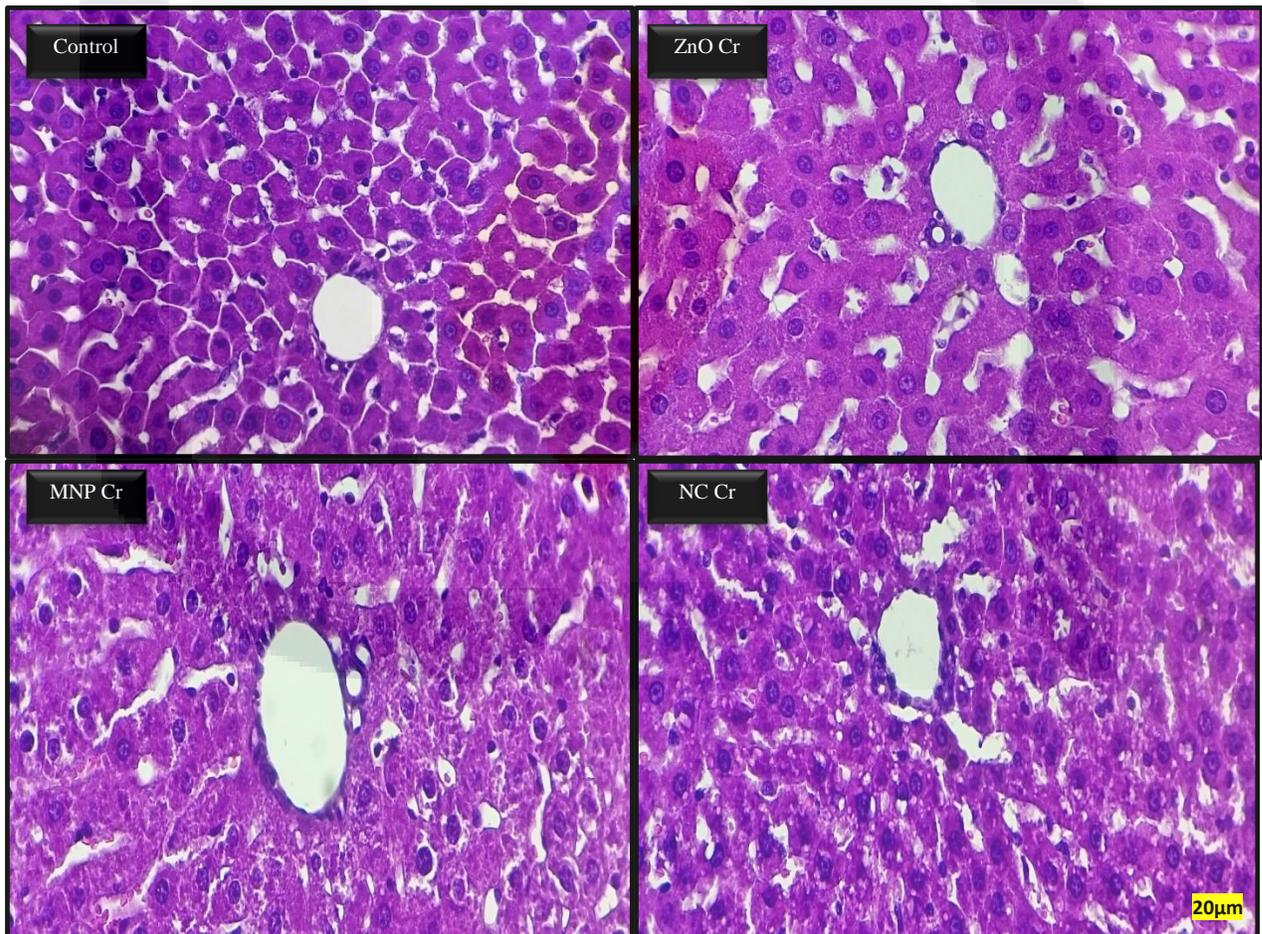
3.5.12. Cambios morfológicos

Posterior a la evaluación de los parámetros bioquímicos, se realizó la comprobación de los mismos por técnica histológica y tinción de Hematoxilina-Eosina; encontrando que la interacción crónica de los NMs no generan algún efecto adverso en los tejidos estudiados (Hígado, riñón, pulmón, corazón y cerebelo); en contraste la interacción aguda de las ZnO NPs y MNPs desencadenó un efecto adverso significativo sobre Hígado, Pulmón y cerebelo; sin embargo los NCs no desencadenaron algún efecto adverso aparente.

3.5.12.1. Hígado

Se observa en la imagen 8, la histología hepática de cada grupo de trabajo donde en caso del grupo control se puede observar una clara distribución normal del acino hepático, con la vena centrilobulillar y las zonas 1, 2 y 3 intactas, esta misma morfología puede observarse en todos los grupos de trabajo bajo exposición crónica, sin embargo al realizar el análisis bajo una exposición aguda se observan diversos cambios en los sujetos tratados con ZnO NPs y MNPs, en el caso de la interacción con ZnO NPs se observa un cambio significativo en la morfología del acino hepático, en primer lugar dentro de la zona 1 se observa una leve dilatación en la vena centrilobulillar, seguida de la presencia de una alta cantidad de vacuolas en el citoplasma de los hepatocitos de la zona 1, indicativo de un estado de degeneración hidrópica; mientras que en zona 2 y 3 no se observan cambios significativos en la morfología hepática, sin embargo se puede observar la presencia de un

fibroma en la periferia de la zona 3 con presencia de fibras de colágeno e infiltrados inflamatorios. Por otra parte en presencia de las MNPs, se observa la presencia de hepatocitos con núcleos atrofiados dentro de la zona 3 del acino hepático, morfología correspondiente a un cuadro inicial de apoptosis celular, por otra parte se observa en la zona 1 de este acino la pérdida total de la organización tisular cerca de la vena centrilobulillar con un gran infiltrado de células de la respuesta inmune (PMNs), así como la presencia de necrosis en los hepatocitos cercanos a este vaso sanguíneo, por otra parte se puede observar que en la zona 2 del acino hepático se encuentran hepatocitos altamente vacuolizados en su citoplasma, lo cual es característico de una degradación tisular hidrópica consecuencia de la necrosis en la zona 1.



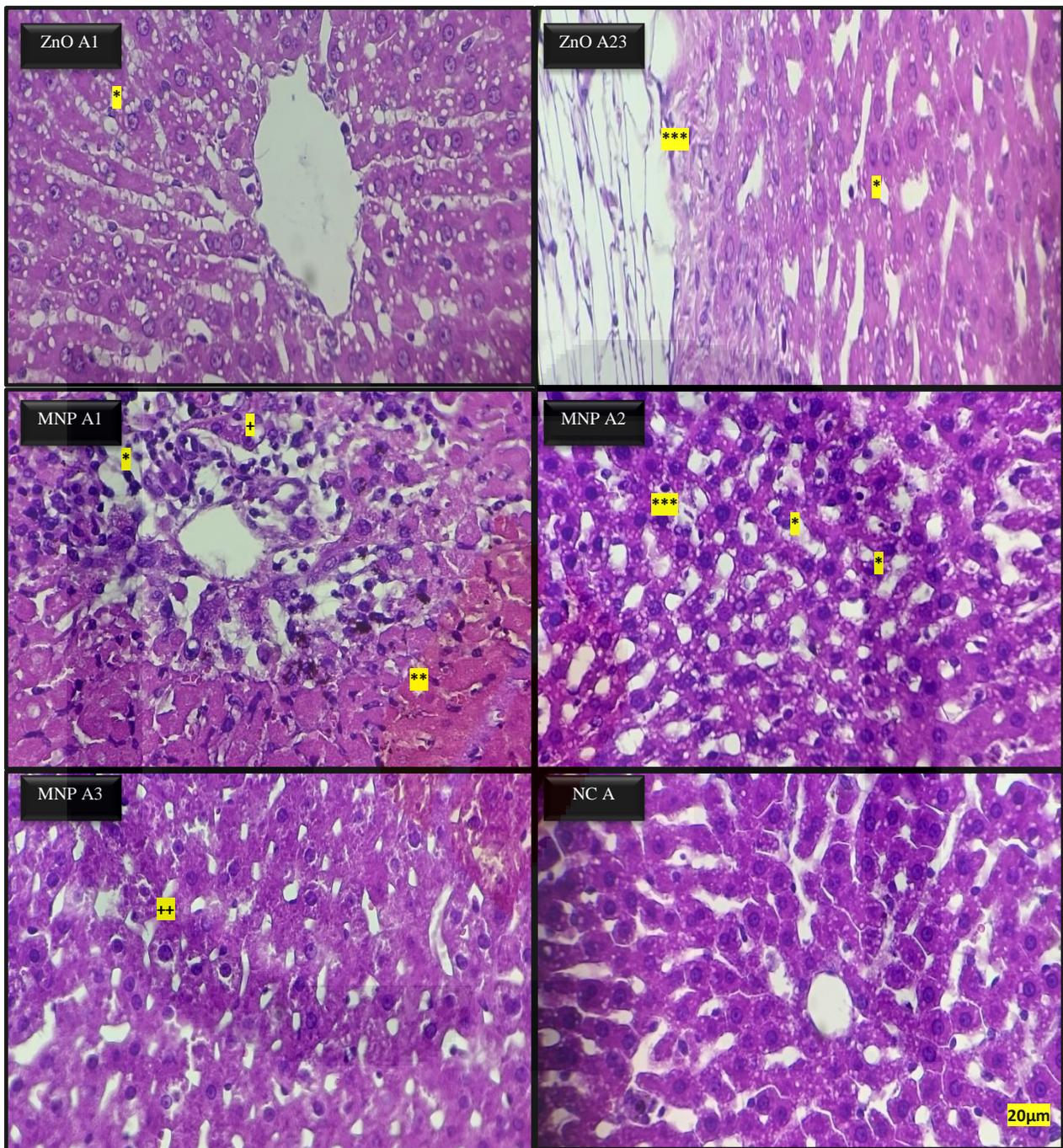


Imagen 8. **Efecto de los NMs en hígado:** Se observan los cambios en la morfología del acino hepático; encontrando que a dosis crónicas (Cr) los NMs no generan alguna modificación histológica; sin embargo se puede apreciar que en tratamientos agudos (A) de ZnO y MNP se generan daños en las zonas 1, 2 y 3, entre los cuales se encuentran la degradación hidrópica (*), necrosis (**), fibrosis (***), pérdida de la organización tisular (+) y presencia de células con núcleos apoptóticos (++)

Como se observa en la imagen 8, la interacción de los NMs con el parénquima hepático genera distintas alteraciones histológicas, siendo afectado principalmente por las MNPs a dosis agudas; lo

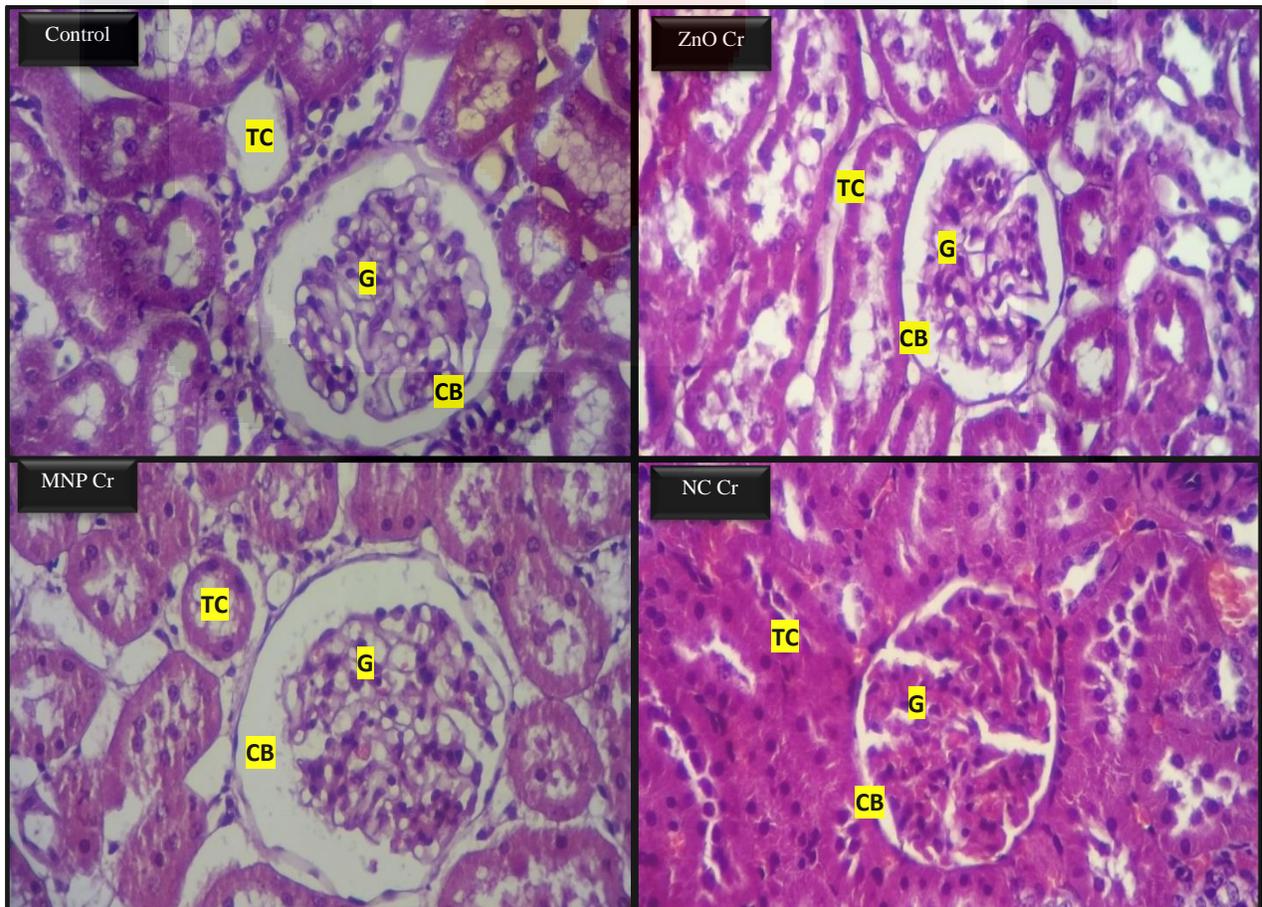
anterior puede ser referido a un daño común asociado a la liberación de ROS y su consecuente estrés oxidativo, generando en este caso un mecanismo principal de toxicidad relacionado con la inflamación, fibrosis y apoptosis (Sadeghi, et al., 2015), así mismo debe de mencionarse que cada NP tiene características físico-químicas muy específicas y se pueden distribuir rápidamente en la totalidad del cuerpo (siempre y cuando tiendan a disolverse) después de la inoculación generando rápidamente el efecto toxicológico; por lo contrario las NPs pueden aglomerarse y precipitar dificultando su difusión sistémica; sin embargo es importante considerar que la mayoría de estos estudios realizados con el fin de explicar el efecto toxicológico adverso, se han llevado a cabo bajo dosis superiores (7.5 mg/Kg) a las utilizadas en esta investigación (Sadeghi, et al., 2015); así mismo (Dissanayake, et al., 2015) describen que la interacción de células Hep G2 a concentraciones elevadas de MNPs (4 mg/Kg) genera condensación nuclear y fragmentación cromosomal, desencadenando daño hidrópico, lo cual se asocia a los resultados obtenidos en intoxicación aguda por MNPs y ZnO NPs; tomando en cuenta otro estudio realizado por (Yang, et al., 2014) se describe que los niveles de hierro sérico incrementan 7 días post-inoculación de altas dosis de MNPs (8 mg/Kg), esto debido posiblemente a que estos NMs liberan los iones de hierro para incorporarse a los procesos metabólicos lo que podría incrementar la actividad citotóxica de estas NPs a dosis altas; por lo contrario (Baratli, et al., 2013) afirman que a dosis bajas de interacción con este NM y posterior al fenómeno de incorporación de estos iones a los procesos metabólicos se generaría un aumento leve en la cantidad de hierro sérico así como un aumento en la concentración de TGO (gráfica 21) y TGP (gráfica 22), sin presencia de daño histológico aparente, indicando que al ser ingresados estos iones al metabolismo hepático se genera un aumento en la síntesis de ferritinas o transferrinas, mediadas por el endotelio hepático y las células de Kupffer; así mismo se aumenta la expresión de receptores de transferrina en macrófagos y linfocitos B en el páncreas; esto concuerda con lo demostrado en las gráficas 19, 21 y 22 donde se observa un incremento en la cantidad de albúmina, TGO y TGP respectivamente, aunque en la imagen 8 no se muestra un daño hepático aparente, indicando que a dosis crónicas de los MNPs y dosis altas de NCs únicamente se puede llegar a estimular una producción de transferrinas sin generar un efecto toxicológico adverso; así mismo el aumento en la expresión de receptores pancreáticos podría ayudar a explicar la estabilidad de los niveles de glucosa durante esta interacción con los NMs; así mismo es importante mencionar que se encontró un daño hepático similar al realizar la interacción aguda con ZnO NPs, como se puede observar en la gráfica 17 los niveles séricos de TGO y TGP se encuentran significativamente

por encima de los límites, indicando un claro daño hepático; lo cual se pudo apreciar en el análisis histológico, estos resultados concuerdan con la investigación realizada por (Yang, et al., 2015) donde la interacción de este NM a dosis altas (9 mg/Kg) generó un gran incremento en la concentración de TGO y TGP, así como la generación de necrosis hepatocelular focalizada, dilatación congestiva de las venas centrilobulillares; lo cual se atribuye a su vez por la liberación de los iones de zinc generando ROS e inhibiendo el sistema antioxidante, así como el estímulo de la expresión de ARNm de grp78, grp94, xbp-1 y pdi-3, generando la autofosforilación de PERK y eIF2a en los hepatocitos, causando daño en el retículo endoplásmico rugoso, desencadenando la degeneración hidrópica y la inflamación observada en la imagen 8; sin embargo, estos autores mencionan que se encontró un aumento en la producción de metaloproteínas posterior a 7 días de la aplicación de estos NMs, lo que podría explicar la ausencia de daño hepático de estas NPs; por otra parte el proceso de necrosis hepática concuerda mejor con los estudios realizados por (Kao, et al., 2012) quienes explican que la interacción con altas dosis de ZnO NPs (10 mg/Kg) genera un daño hepático relacionado a la liberación de los iones zinc, iniciando con la compartimentalización celular de estos iones (fase I) generando cambios en el citosol y en la mitocondria (fase II), de acuerdo a los estudios realizados por estos autores durante la primera fase la fagocitosis de las ZnO NPs puede presentarse como vesículas citoplasmáticas, similar a lo observado en la imagen 8 de nuestra investigación, así mismo es importante mencionar que estas vesículas pueden llegar a fusionarse con preendosomas para formar endosomas donde predomina un pH ácido (5.5) lo que resultaría en la disolución de estas NPs y el acumulo de grandes concentraciones de Zn^{+2} ; debido a este incremento en la fase II las mitocondrias llegan a secuestrar estos iones, generando la despolarización de la membrana mitocondrial, conduciendo a un mecanismo de apoptosis intrínseca culminando en la muerte celular, similar a lo que se observa en nuestros resultados de toxicidad hepática *in vivo* (imagen 8 y gráfica 22). Así mismo debe de notarse que los daños más significativos son encontrados en administraciones altas de MNPs y ZnO NPs; sin embargo al realizar una interacción aguda de los NCs con los organismos modelos no fue posible encontrar algún daño significativo aparente; a pesar de la dosis administrada es necesario comprender la estructura compartida de este NC, el cual se encuentra conformado de concentraciones pequeñas de Fe_3O_4 y ZnO, por lo que se teoriza que estas concentraciones individuales de las NPs son menores inclusive que al realizar la interacción con MNPs y ZnO NPs, por lo que al liberar los iones de cada

NP la cantidad es tan pequeña como una dosis crónica por lo que los resultados de esta interacción aguda son similares a los encontrados con las interacciones crónicas de los NMs individuales.

3.5.12.2. Riñón

Se observa en la imagen 9, la histología de la hemisección renal de cada grupo de trabajo tanto crónico como agudo; así mismo se puede observar en el grupo control las regiones correspondientes a corteza y médula, sin cambios morfológicos adversos aparentes, analizando a detalle las nefronas de cada uno de los grupos se puede observar que no existe un cambio adverso en la morfología de cada uno de los grupos tanto agudo como crónico; en detalle se observan glomérulos renales con una estructura oval bien delimitados por la cápsula de Bowman y una buena relación entre el corpúsculo renal y el espacio de Bowman, así mismo no se observa degradación en la capa visceral de esta cápsula ni desorganización en los podocitos glomerulares, así mismo no se observa ninguna anomalía en los rayos medulares compuestos de los túbulos renales.



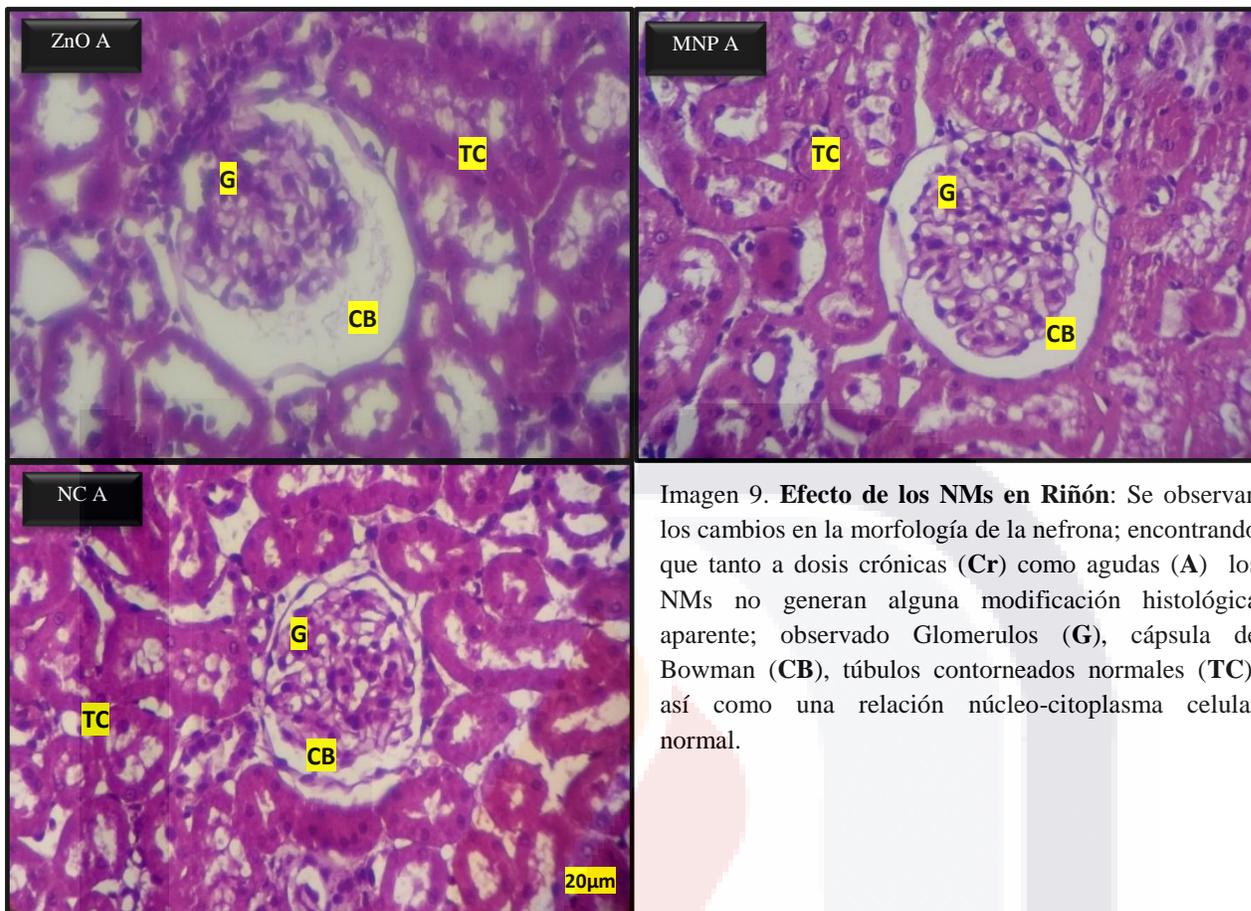


Imagen 9. **Efecto de los NMs en Riñón:** Se observan los cambios en la morfología de la nefrona; encontrando que tanto a dosis crónicas (Cr) como agudas (A) los NMs no generan alguna modificación histológica aparente; observado Glomerulos (G), cápsula de Bowman (CB), túbulos contorneados normales (TC), así como una relación núcleo-citoplasma celular normal.

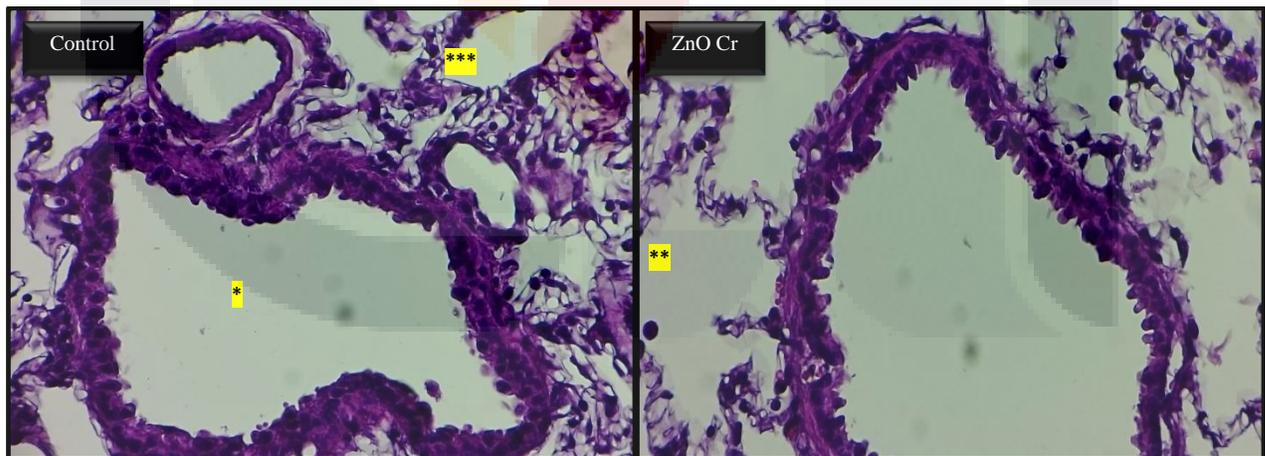
Como se observa en la imagen 9, al realizar el estudio en riñón se demostró la ausencia de efectos toxicológicos adversos tanto en interacciones crónicas como agudas, lo cual discrepa con la información encontrada en la literatura, donde se defiende la generación de daño renal inclusive a dosis pequeñas de cualquier NM; entre estas se encuentra el trabajo realizado por (Xiao, et al., 2016) quienes defienden que la interacción de distintos NMs sin importar concentración o tamaño de la partícula es capaz de generar un daño adverso significativo sobre la homeostasis renal; en este sentido se deben de recalcar algunas diferencias entre estos procedimientos siendo los más recalculables las dosis que se administraron (10 mg/Kg) las cuales son superiores a las utilizadas en nuestro trabajo de investigación (1, 2 y 4 mg/Kg) así mismo el trabajo realizado por (Xiao, et al., 2016) se llevó a cabo con NMs comerciales (Sigma), mientras que en nuestro trabajo estos NMs se sintetizaron por ruta solvotérmica asistida por microondas; en este sentido es necesario notar que los resultados obtenidos en ambas experimentaciones divergen con respecto a la fisiología renal; donde los autores demuestran la presencia de células apoptóticas en los podocitos renales debido a la

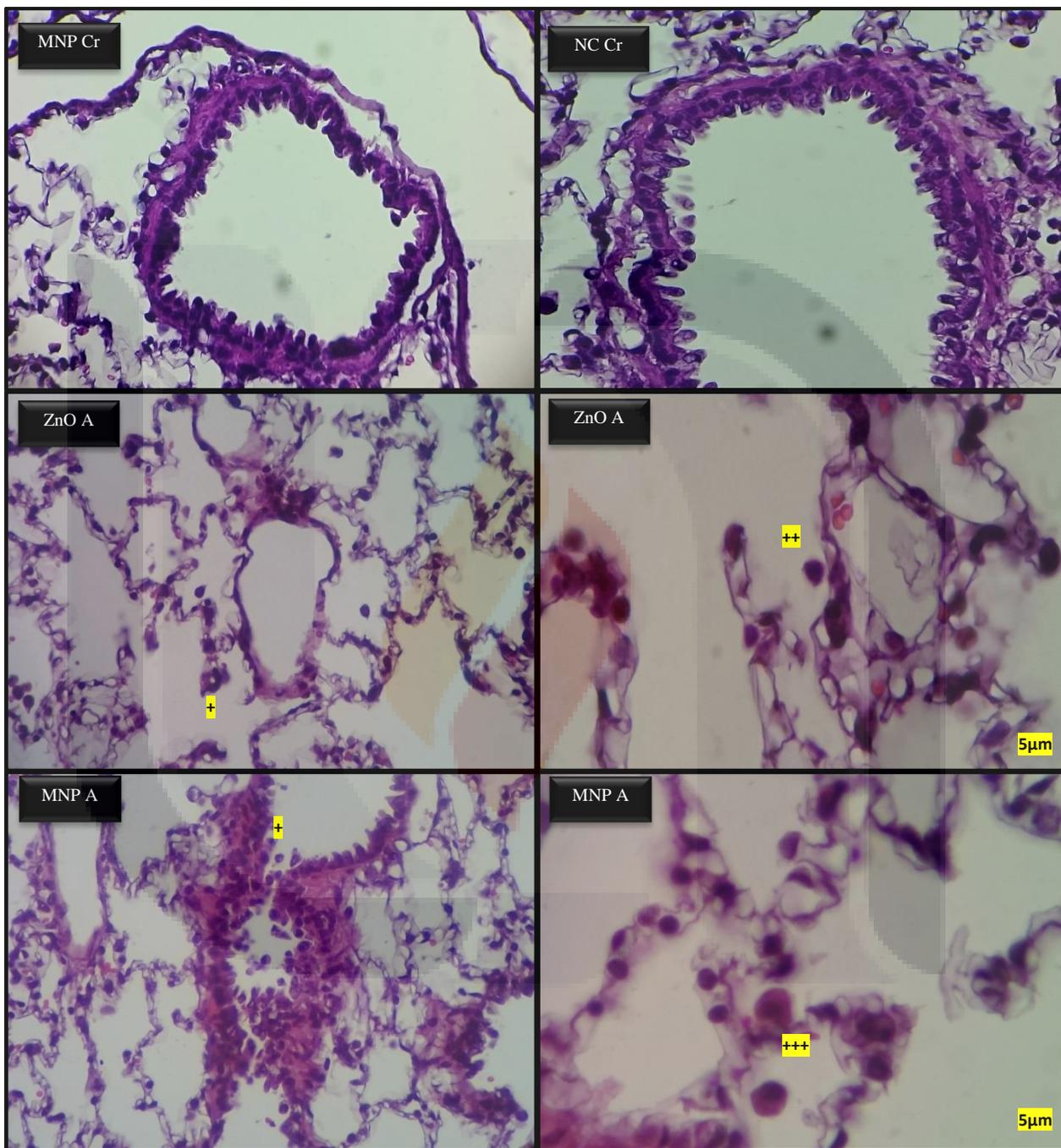
generación intracelular de ROS; así mismo estos autores describen que la actividad citotóxica de los NMs depende en mayor medida a la concentración y tiempo de interacción de estos con los tejidos estudiados, causando la disminución de la viabilidad de las nefronas y disminución significativa en el peso corporal de las ratas así como en la morfología macroscópica de los riñones; sin embargo como se puede observar en los estudios realizados en riñón *in vivo* (imagen 9) no se encuentra ningún cambio adverso aparente en la histología renal tanto en interacciones agudas como crónicas, igualmente no se observaron cambios significativos en la estructura macroscópica de los riñones post-interacción, así mismo como se demuestra en la gráfica 16 (a y b) no se observa un decremento significativo en el peso corporal de las ratas bajo intoxicaciones agudas mientras que en interacciones crónicas se puede observar que el peso de estos modelos de estudio aumenta en una proporción aparentemente normal respecto al grupo control, estos resultados obtenidos en nuestros análisis de toxicología renal, coinciden con los estudios realizados por (Dawei, et al., 2010) quienes indican que los iones Zn^{+2} liberados a partir de ZnO NPs juega una papel importante en la estabilización de la función membranal, favoreciendo la defensa contra la generación de ROS por cualquier otro factor; debido a esto último los autores atribuyen que puede existir un aumento (no significativo) en la actividad enzimática de los organismos modelos, sin existir un daño en los tejidos expuestos a los NMs, esto debido a que el Zn y Fe juegan un papel importante en más de 300 enzimas diferentes encargadas del metabolismo celular; así mismo al incrementar la concentración de estos metales en el torrente sanguíneo podría aumentar la concentración de enzimas antioxidantes, por lo que la interacción de estos NMs con los tejidos podría desencadenar la reparación de las células epiteliales e incrementando la viabilidad de las mismas; así mismo estos autores determinan que la generación de ROS por estos NMs tanto en mitocondria como en retículo endoplásmico es inherente en el metabolismo aerobio celular; lo que podría explicar los resultados obtenidos en nuestros estudios sobre riñón.

3.5.12.3. Pulmón

Se observa en la imagen 10, la histología de las muestras obtenidas de pulmón en cada uno de los tratamientos estudiados realizando el análisis en detalle de los bronquiolos terminales y sus respectivos alveolos, como se puede observar en el grupo control la morfología de estas estructuras funcionales se encuentra normal, encontrado el recubrimiento epitelial del tipo cilíndrico simple, con células caliciformes ocasionales en los bronquiolos más grandes; así como la presencia de

células de Clara eventuales, así mismo se observa una morfología normal en la capa de músculo liso, el cual se encuentra delimitado claramente por una fina capa de tejido conjuntivo fibroelástico; así mismo es posible observar conductos alveolares bien estructurados delimitados por tabiques interalveolares normales y la presencia de evaginaciones formando sacos alveolares normales, así mismo se puede observar la presencia de alveolos compuestos de neumocitos II con una morfología normal; cabe mencionar que esta morfología normal también se observa en los grupos tratados de forma crónica y en el tratamiento agudo con NCs; sin embargo se puede observar un cambio significativo en la morfología pulmonar en los grupos tratados de forma aguda con ZnO NPs y MNPs; en el caso del tratamiento con ZnO NPs se observa una clara desorganización tisular, encontrado rupturas en el tabique interalveolar, desgarre en los alveolos, musculo liso bronquiolar compactado y la presencia de células altamente acidófilas dentro de los conductos alveolares, postulando la atrofia de los neumocitos por este tratamiento. Por otra parte el tratamiento agudo con MNPs demostró la degradación de la pared bronquiolar con presencia de infiltrado inflamatorio (células del polvo); igualmente se demostró la presencia de pérdida en la organización tisular, así como la presencia de células altamente azurofilas con un núcleo altamente dilatado junto a los tabiques interalveolares, postulando una atrofia en macrófagos o neumocitos.





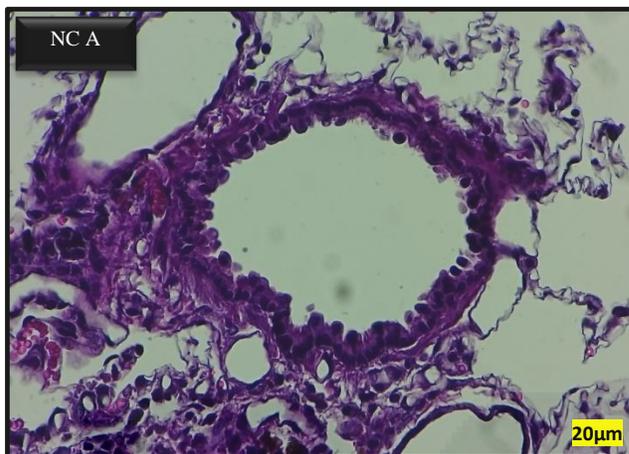


Imagen 10. Efecto de los NMs en Pulmón: Se observan los cambios en la morfología de los bronquiolos (*), alveolos (**); encontrando que a dosis crónicas (Cr) los NMs no generan alguna modificación histológica; sin embargo se puede apreciar que en tratamientos agudos (A) de ZnO y MNP se genera pérdida de la organización tisular (+) y presencia de células azurofilas (++) y acidófilas (+++); nótese que los capilares alveolares se encuentran dilatados (***) por acción del fijador.

Al realizar el estudio de toxicidad *in vivo* sobre tejido pulmonar, fue posible esclarecer la ausencia de algún efecto toxicológico adverso de los NMs sobre los neumocitos a intoxicaciones crónicas, sin embargo cómo se observa en la imagen 10 existen cambios histológicos significativos respecto al control al realizar la intoxicación aguda con ZnO NPs y MNPs, existen diversos estudios que explican y defienden el daño producido a los pulmones por las ZnO NPs, entre ellos el más completo ha sido el análisis realizado por (Weisheng, et al., 2009) quienes demostraron que las ZnO NPs (70nm) administradas vía intravenosa, generan una mayor citotoxicidad debido a la gran superficie de contacto que poseen, así mismo esta citotoxicidad esta mediada por la alta liberación de iones Zn^{+2} los cuales se bio-acumulan generan impurezas metálicas dosis-dependientes que alteran los mecanismos químicos de los neumocitos, por otra parte estos autores demostraron que bajo una interacción aguda de 8 mg/Kg/24hrs la viabilidad de los neumocitos no se veía afectada por el tamaño de la partícula si no por la concentración de la dosis, demostrado un decremento de la viabilidad de los neumocitos de hasta un 85%, lo cual fue atribuido a la perforación de la membrana celular y al aumento significativo en la concentración de ROS y el decremento de GSH, resultando en un daño irreversible en el ADN; debido a este daño en los neumocitos estos autores encontraron el decremento en la síntesis de factor surfactante pulmonar mostrando a los organismos modelos con síntomas de asma y un alto estímulo tusígeno, esto último concuerda con lo encontrado en nuestro estudio donde las ratas intoxicadas de forma aguda con ZnO NPs presentaron problemas respiratorios, fatiga pronunciada y alta generación de mucina nasal, lo cual concuerda con la inhibición de la síntesis de factor surfactante pulmonar postulado por (Weisheng, et al., 2009); igualmente estos autores estipulan que la inhibición en la síntesis de factor surfactante pulmonar se debe la diferencia del tamaño hidrodinámico de las ZnO NPs, el cual es más grande respecto al

tamaño del material nano-estructurado fuera de sistemas acuosos, debido a esto en el interior de los neumocitos se generaron vesículas intracelulares (resultado de la endocitosis de los iones cinc), posteriormente al liberar estos iones podrían generar tres mecanismos probables para la eliminación de este factor; el primero de ellos es la generación de radicales $\text{OH}\cdot$ después de la interacción de los iones Zn^{+2} con la mitocondria de los neumocitos generando el estímulo de los neutrófilos pulmonares, causando su posible migración de estas células inmunes hacia el lumen de los alveolos, así mismo estos radicales podrían generar la atrofia de las células epiteliales pulmonares, las cuales pueden liberarse igualmente hacia el lumen de los alveolos; esta descamación celular es concordante con lo encontrado en nuestros estudios *in vivo* en pulmón de rata (imagen 10) donde algunas células no comunes se encontraban en el lumen alveolar; otro mecanismo toxicológico de estas NPs está descrito al reducir la viabilidad de los neumocitos debido al daño oxidativo hacia el ADN, afectando principalmente a la línea celular A549, por otra parte el último mecanismo postulado por (Weisheng, et al., 2009) radica en el aumento de ROS dentro del citosol provocando la eliminación de distintas proteínas y enzimas funcionales de los neumocitos conduciendo a la inhibición del factor surfactante, de esta manera es posible sustentar los resultados obtenidos en nuestro estudio donde se pueden observar la presencia de células azurofilas en el lumen alveolar posterior a la intoxicación aguda con ZnO NPs, sin embargo estos autores mencionan que la actividad tóxica de estos NMs puede obtenerse desde concentraciones de 0.5 mg/Kg, lo cual no concuerda con los resultados crónicos (1 mg/Kg) debido que bajo estas condiciones de trabajo nuestros organismos modelos no generaron ningún efecto adverso con estas NPs.

Sin embargo los resultados toxicológicos obtenidos en nuestros estudios varían al realizar la intoxicación con MNPs, donde se observa la ausencia de reflejo tusígeno e indicios de asma y fatiga en los organismos modelos, respecto a lo observado en el grupo intoxicado por ZnO NPs; los resultados obtenidos a dosis agudas en este estudio concuerdan con los estudios realizados por (Momayez & Fazilati, 2014) quienes describen una sintomatología aparentemente normal en las ratas Wistar posterior a 14 días de intoxicación (4 mg/Kg) se presentaron signos histológicos adversos como la presencia de hiperemia y hemorragia focal, lo cual se explica por la aglomeración de las MNPs en los espacios interalveolares provocado el depósito de la hemosiderina en el parénquima alveolar, desencadenando inflamación en tejido pulmonar la cual es dependiente del tiempo de exposición al NM, del mismo modo como se puede observar en la imagen 10 al igual que en el estudio de (Momayez & Fazilati, 2014) pudo observarse la presencia de enfisema, perdida en

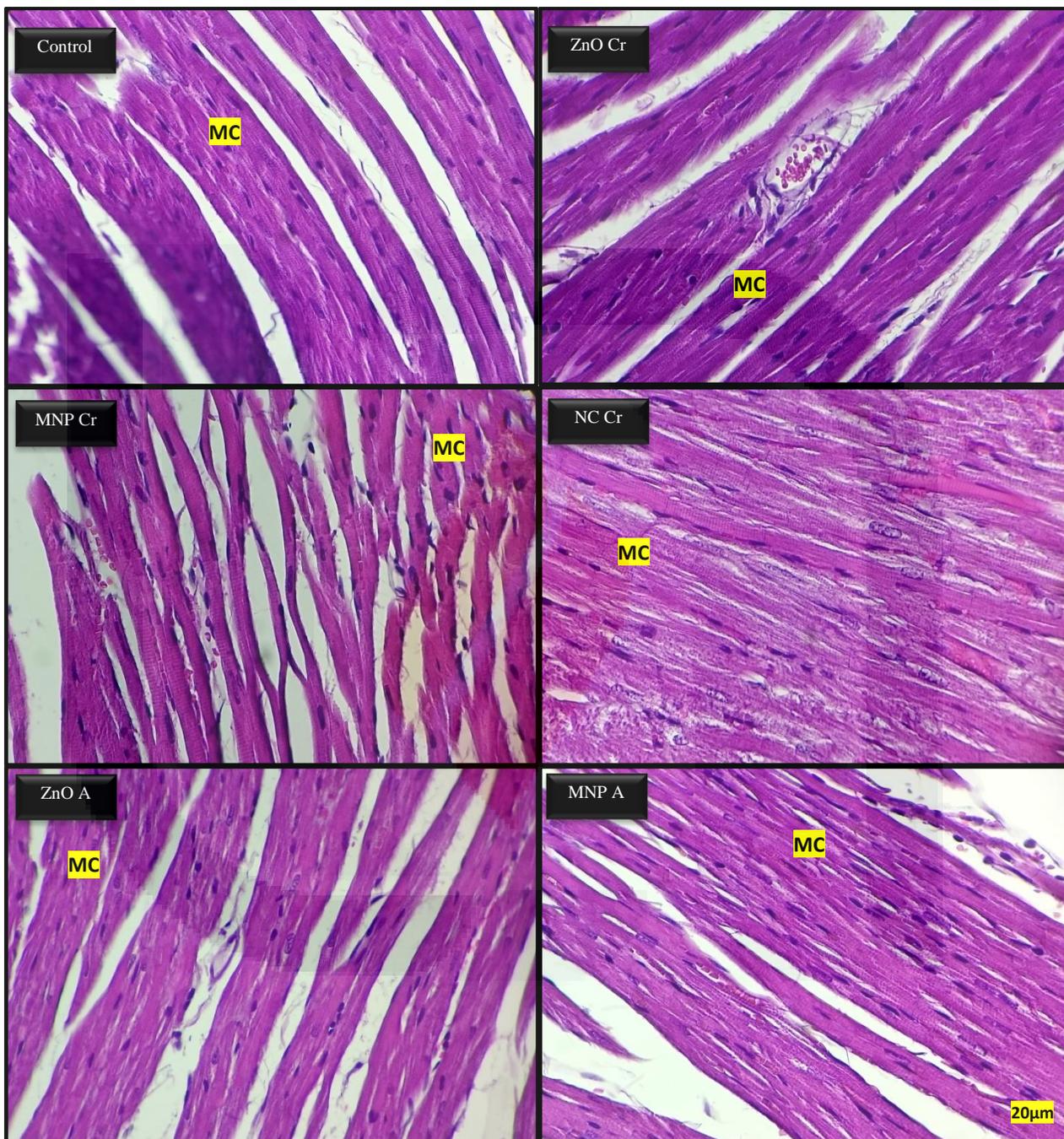
la morfología alveolar y la presencia de neutrófilos, linfocitos y eosinófilos en el lumen alveolar, lo que indica una condición anormal en la integridad pulmonar, debido al tamaño de la partícula, su alta superficie de contacto, propiedades opto-eléctricas y su capacidad catalítica estos autores indican que las MNPs poseen una alta reactividad y rápida distribución en el cuerpo humano, la presencia de los infiltrados en el lumen alveolar puede ser explicado debido a la capacidad de defensa de este órgano para evitar la aglomeración de altas concentraciones de este NM en el tejido por lo que los neumocitos intentan regresar las MNPs al torrente sanguíneo, explicando de esta manera el enfisema y las células anormales encontradas en la imagen 10, sin embargo estos autores justifican la pérdida de la conformación alveolar gracias al tamaño de la NP por lo que es más sencilla su internalización en la membrana de los neumocitos, donde podrían disociarse en iones Fe^{+3} y generar lipoperoxidación de las membranas generando la pérdida de la forma alveolar; por otra parte la inflamación pulmonar podría estar mediada por la aglomeración de este NM en el tejido pulmonar, generando la activación de los macrófagos pulmonares, lo cuales al fagocitar las MNPs sufrirían cambios en su cito-esqueleto debido a la generación de ROS, posteriormente estos macrófagos modificados podrían ser los responsables de los cambios de la capilaridad, permeabilidad y en el aumento de los tiempos de coagulación sanguínea en tejido pulmonar. Por otra parte los estudios realizados por (Eun-Jung, et al., 2015) contrastan con las pruebas obtenidas en nuestro estudio bajo interacciones crónicas con MNPs, quienes determinan que existe daño a nivel pulmonar al realizar la interacción de este órgano con una dosis crónica de MNPs (4 mg/Kg); esto lo basan considerando la carga negativa de la superficie membranal podría generar una unión electrostática con la MNP facilitando la fagocitosis de este NM por el neumocito y la formación de ROS en esta célula pulmonar, de igual forma estos autores atribuyen que debido a la forma esférica de las MNPs es más sencilla su interacción con el ADN generando mutaciones específicas en el gen hemo-oxigenasa 1 el cual sirve como agente antioxidante en la fase G1 de la mitosis; debido a esta mutación la generación de estrés oxidativo se induce durante todo el ciclo celular (24hrs) incrementando de esta manera el número de células apoptóticas y favoreciendo la formación de tejido necrótico debido al aumento en la expresión del gen Chi3L1 y YKL-40 (resultado de la mutación en G1), por otra parte debido a esta forma esférica de las MNPs los niveles de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , TNF- α , e IL-6) se ven incrementados debido a la activación excesiva de los linfocitos Th2 y el incremento en la distribución de linfocitos T citotóxicos y linfocitos B, lo que podría desencadenar un efecto de neo-antígeno y generar un respuesta autoinmune en contra de los

neumocitos generando el daño tisular; sin embargo como se puede observar en este estudio (imagen 10) bajo una intoxicación crónica similar a la estudiada por (Eun-Jung, et al., 2015) no se observaron cambios adversos en la morfología pulmonar, debido a esto se postula que las MNPs generan un efecto toxicológico adverso en tejido pulmonar cuando la dosis es mayor debido a que el hígado es incapaz de metabolizar estas MNPs o disociarlas por completo para la síntesis de ferroproteínas.

De igual manera como observamos en las pruebas crónicas de ZnO NPs y MNPs sobre tejido pulmonar, en esta investigación fue posible encontrar la falta de efecto toxicológico adverso al dejar interaccionar los NCs de forma crónica y aguda con este órgano blando; como se observa en la imagen 10 no existen cambios aparentes en la morfología alveolar y tampoco se encuentran infiltrados en el lumen de los alveolos, así como la ausencia de hiperplasia o pérdida de la integridad de los tabiques alveolares, además los organismos modelo no presentaron alguna sintomatología aparente como asma, fatiga o alto grado de mucina, lo que podría indicar que las concentraciones de Zn^{+2} y Fe^{+3} son muy bajas dentro del NC como para poder llegar a generar un daño alveolar, igualmente se estima que estas bajas concentraciones de iones liberadas por el NC puedan ser utilizadas por el mismo tejido pulmonar como sustento metabólico, como para reparar daños en la membrana celular, como lo mencionan (Dawei, et al., 2010).

3.5.12.4. Corazón

Se observa en la imagen 11, la histología de las muestras obtenidas de corazón en cada uno de los tratamientos estudiados realizando el análisis en detalle de las tres capas cardíacas sin encontrar anomalías en la morfología cardíaca respecto al grupo control, al realizar el estudio en endocardio se encuentra una composición normal de epitelio escamoso simple y tejido conjuntivo fibroelástico, con algunos fibroblastos dispersos; por otra parte al realizar el análisis histológico del miocardio se observaron miocitos cardíacos aparentemente normales dispuestos en espiral, siendo posible observar las bandas musculares en este tejido; por último al realizar el análisis del epicardio se pudo observar una disposición normal de epitelio escamoso simple, demostrando de esta manera que los NMs (tanto en tratamientos crónicos como agudos) no generan un efecto adverso aparente sobre este órgano.



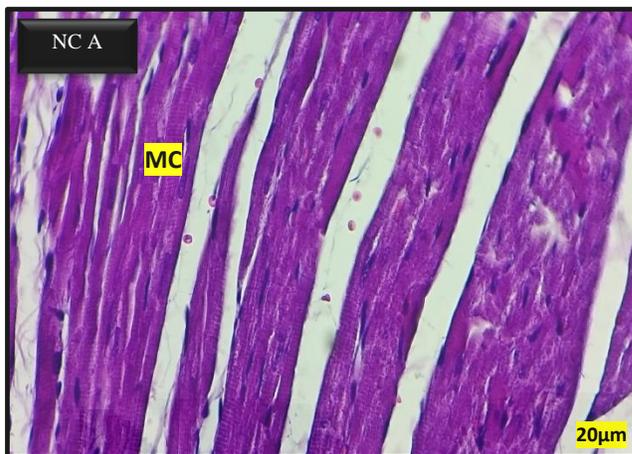


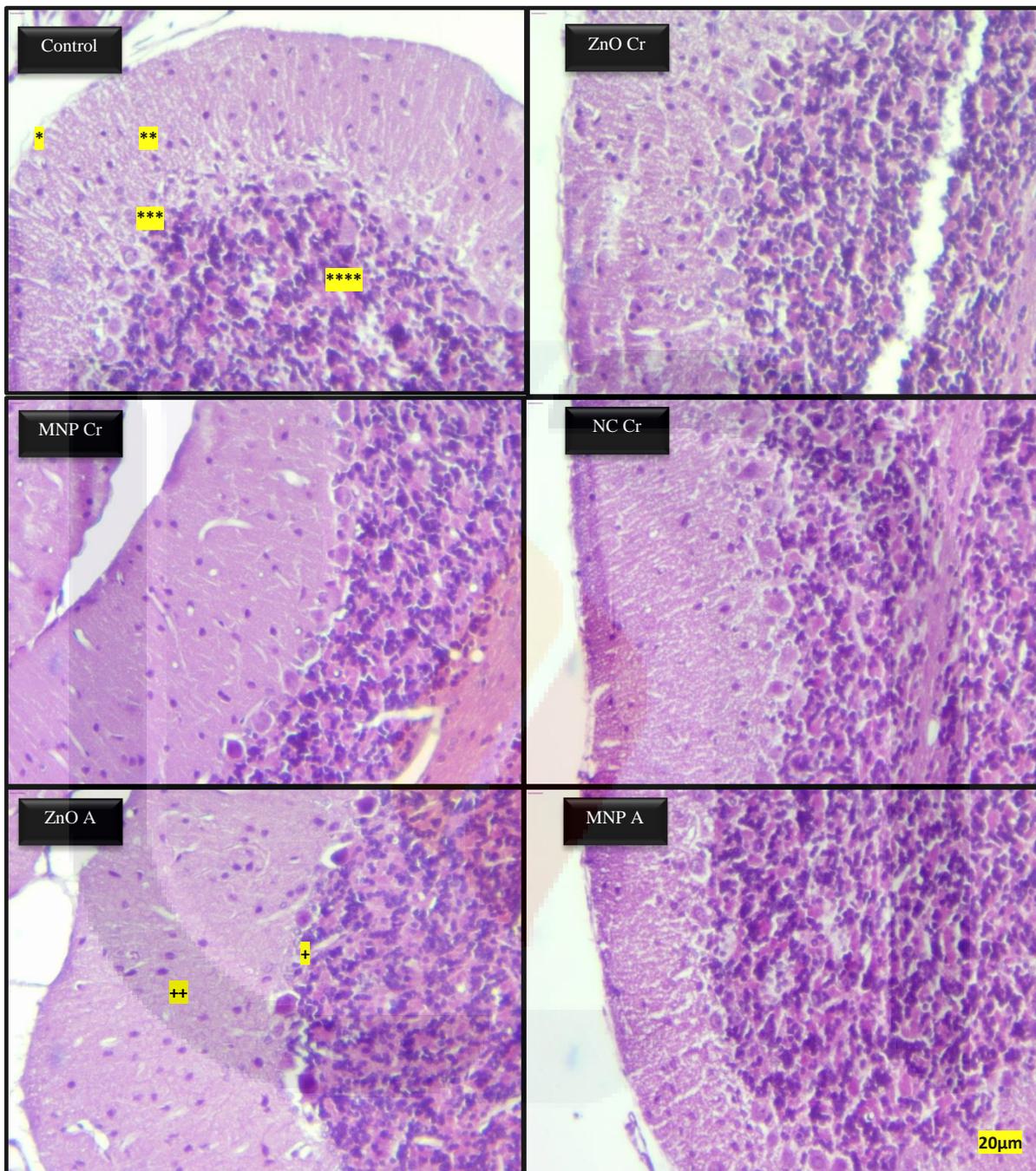
Imagen 11. **Efecto de los NMs en Corazón:** Se observan los cambios en la morfología del miocardio; encontrando que tanto a dosis crónicas (**Cr**) como agudas (**A**) los NMs no generan alguna modificación histológica aparente; observado miocitos estriados cardiacos (**MC**) y bandas cardiacas normales, así como una relación núcleo-citoplasma celular normal.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en los anteriores estudios se puede esclarecer que los daños tisulares por toxicidad mediada por NMs únicamente se presentan en órganos con alta irrigación (sin pasar antes por el hígado), a dosis altas y a una interacción aguda, por lo que se supone que el efecto toxicológico en el corazón debería ser evidente sin embargo como se aprecia en la imagen 11 la interacción aguda y crónica de estos NMs con el tejido cardiaco no mostró algún cambio patológico aparente respecto al grupo control; estos resultados concuerdan con lo obtenido por (Lijie, et al., 2010) quienes reportan que las MNPs no generan un efecto significativo sobre los canales de potasio $KCNQ_1$ en el músculo cardiaco de ratas, debido a que la interacción de las MNPs sobre las membranas y los canales de potasio dependientes de voltaje de los miocitos mejora la repolarización del ritmo cardíaco lo que podría llegar a facilitar una adaptación en los cambios cardiacos mediados por otros factores externos; estos autores indican que las MNPs actúan como un estimulante beta-adrenérgico, por lo que podría reducir las arritmias hasta en un 80%, debido a esto se podría explicar la ausencia de daño en el tejido cardiaco; por otra parte (Lijie, et al., 2010) indican que las ZnO NPs podrían llegar a activar los receptores β -adrenérgicos llegando a regular los canales iónicos vía PKA o por su unión directa con el AMPc de estos canales, desencadenando la fosforilación y regulación de los potenciales de acción cardiacos posterior a la inoculación de estos NMs (3 mg/Kg), de esta manera se puede justificar la similitud de los grupos intoxicados con estos NMs con el grupo control, ya que se favorece la actividad fisiológica cardiaca normal con este tratamiento tanto crónico como agudo; sin embargo estudios realizados por (Yosra, et al., 2013) contrastan con los análisis obtenidos en nuestra investigación, debido a que los autores postulan la facilidad de las MNPs y ZnO NPs para trasladarse del torrente sanguíneo hacia el interior de los miocitos cardiacos, realizando distintos tipos de afecciones dependiendo de la concentraciones de

los iones en el medio, tamaño de la partícula y su superficie de contacto, la presencia de grupos reactivos e inclusive la histogénesis de las células que están interactuando; en este sentido los autores marcan la principal ruta de daño cardíaco mediada por ROS, debido que posterior a la internalización de los NMs en lo miocitos, estas tienden a interaccionar con las mitocondrias, realizando un daño irreversible en la cadena respiratoria celular, desencadenando la generación de células apoptóticas y su consecuente generación de arritmias, sin embargo se debe de aclarar que estas pruebas fueron realizadas en sistemas *in vitro* bajo una dosis única (ZnO NPS: 4 mg/Kg; MNPs: 2 mg/Kg), así mismo se debe denotar la ausencia de algún cuadro patológico en la histología cardíaca al realizar las pruebas con NCs tanto en intoxicaciones agudas como crónicas por lo que estos resultados sugieren que los NMs no llegan a generar un efecto significativo en el complejo IV de la cadena respiratoria celular, concordando con los resultados obtenidos por (Lijie, et al., 2010) basados en la histología cardíaca (imagen 11), pruebas bioquímicas (graficas 21 y 23) y los cuadros clínicos macroscópicos observados en el organismo modelo así como en la anatomía normal presentada en los corazones extraídos de las ratas.

3.5.12.5. Cerebelo

Se observa en la imagen 12, la histología de las muestras obtenidas de cerebelo en cada uno de los tratamientos estudiados realizando el análisis en detalle de las tres capas de la corteza cerebelosa, notando que con excepción del tratamiento agudo con ZnO NPs, este órgano no presenta algún cambio significativo en su morfología respecto al control, encontrando así que en los otros grupos se aprecia una morfología aparentemente normal con presencia de sustancia gris plegada en circunvoluciones, las cuales se encuentran protegidas por epitelio simple integrando la piamadre sin daño aparente, así mismo se puede apreciar la morfología integra de la capa molecular con células estelares normales, así como la presencia de una capa de células de Purkinje con prolongaciones dendríticas hacia la capa molecular y delimitando la capa molecular de la capa granulosa; así mismo puede apreciarse una morfología aparentemente sin daños en la capa granulosa; donde se pueden apreciar los glomérulos cerebelosos, así como células granulosas pequeñas. Por otra parte al realizar el análisis morfológico en el tratamiento agudo con ZnO NPs, se puede observar la pérdida de la organización o inclusive la ausencia de la piamadre, del mismo modo se observa la presencia de máculas esféricas ampliamente distribuidas por la capa molecular.



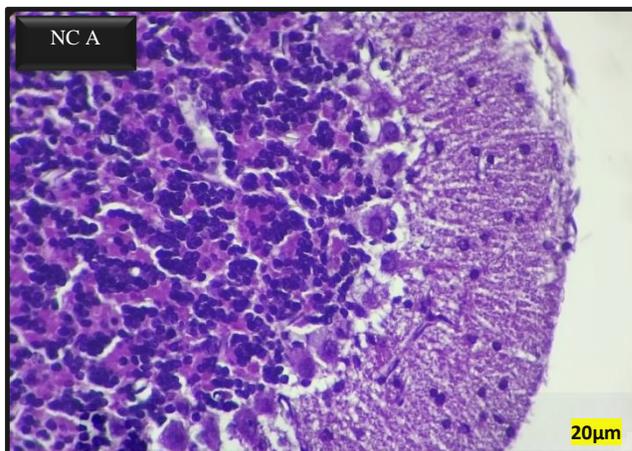


Imagen 12. **Efecto de los NMs en Cerebelo:** Se observan los cambios en la morfología de las capas de la corteza cerebelar, piamadre(*), molecular (**), células de Purkinje (***) y granulosa (****); encontrando que a dosis crónicas (Cr) los NMs no generan alguna modificación histológica; sin embargo se puede apreciar que en tratamientos agudos (A) de ZnO se genera pérdida de la piamadre (+) y presencia de máculas anormales en capa molecular (++)

Finalmente, las pruebas de toxicidad *in vivo* sobre cerebelo demostraron ausencia de daño tisular bajo intoxicaciones crónicas de los tres NMs; igualmente esta ausencia de afecciones histológicas se presentó en las interacciones agudas de MNPs y NCs resultando en estos tratamientos una histología aparentemente normal respecto a lo encontrado en el grupo control; sin embargo como se puede observar en la imagen 12 al realizar la interacción aguda de las ZnO NPs con el tejido cerebelar se presentan cambios anormales en la morfología de la zona molecular, estos resultados podrían respaldarse en los estudios realizados por (Tin-Tin & Hidekazu, 2011) quienes afirman que esta interacción es una de las causas primarias en la generación de tumores cerebrales primarios debido a que este NM es capaz de cruzar la barrera hemato-encefálica, donde posteriormente podrán liberar su forma iónica al interactuar con el fluido cerebro-espinal, debido a esta disociación los autores indica el posible daño de las células neurales debida a la facilidad de los iones Zn^{+2} para ingresar por la membrana neural; en este sentido se debe de enfatizar la alta vulnerabilidad del cerebelo ante el estrés oxidativo debido a la escasa presencia de antioxidantes y su alta concentración de lípidos y proteínas; debido a esto (Tin-Tin & Hidekazu, 2011) afirman que, posterior a la internalización de los iones Zn^{+2} en la zona molecular podrían generar una alta concentración de radicales libres debido a la activación microglial y su posterior toxicidad por ROS; por otra parte estos autores indican que al cruzar hacia la zona molecular, estas NPs podrían aumentar los niveles de $IL-1\alpha$, $TNF-\alpha$, y el factor de transcripción $NF-\kappa\beta$, ocasionando inflamación en tejido nervioso y probablemente desencadenando enfermedades como la ataxia, resultados que concuerdan con la sintomatología presentada en algunos organismos modelo tratados con ZnO NPs, sin embargo el cambio más notorio en la intoxicación aguda por ZnO NPs se da en la atrofia sufrida en las células de la zona molecular, las cuales son confundidas por macrófagos propios del cerebelo, sin embargo

los anteriores autores indican que estos cambios morfológicos se debe a la disminución en los niveles de ARNm y el decremento de los receptores NMDA para citocinas pro-inflamatorias, desencadenando el aumento de la masa celular así como el soma neural, lo cual concuerda con lo observado en la imagen 12 de nuestros resultados.





DISCUSIONES

4.1 SÍNTESIS DE NMs:

Estos resultados sugieren que la síntesis de NCs únicamente fue posible mediante la mezcla de 1 mol de ZnO NPs previamente sintetizadas y 1 mol de Hierro (III) acetilacetato, bajo reacción solvotérmica activada por microondas), Hong *et al* (2008) explicaron que esto se debía a que partiendo de MNPs, estas perderían sus propiedades magnéticas debido a su oxidación de Fe_3O_4 a Fe_2O_3 , por lo que al mezclar las ZnO NPs con Hierro (III) acetilacetato y someterlo a síntesis solvotérmica se genera un NC con núcleo de ZnO y cubierta de Fe_3O_4 , con una mayor dispersión y homogeneización en medios acuosos en comparación a los otros NMs (Wei *et al*; 2011), sin necesidad de usar algún agente estabilizador como lo postulan Beltran *et al* (2010).

4.2 Caracterización de materiales nano-estructurados

Así mismo se pudo determinar exitosamente la fase cristalina de cada NM; en el caso de las ZnO NPs se observó el difractograma característico de cristales hexagonales de Wurtzita, sin embargo se pueden apreciar máximos de intensidad anormales, los cuales pueden ser explicados debido a la presencia de bajas proporciones molares de contaminantes, coincidiendo con los reportado por Faisal *et al* (2012), por otra parte, al realizar el análisis DRX de MNPs, el difractograma concuerda con la estructura cristalina cúbica de la magnetita respecto a las cartas cristalográficas, concordando con lo reportado por Herrera (2013), aunque con dispersión en los máximos de intensidad debida la presencia de impurezas, como lo describen Aliahmad *et al* (2013), sin embargo estos resultados indican la síntesis de materiales nano-estructurados con una fase cristalina clara y semejante a la que los reportes indican, con lo que se pudo realizar una comparativa confiable entre nuestros resultados y los obtenidos por otros investigadores.

En base a esto al interpretar el análisis cristalográfico para NCs se observó un difractograma característico de cada uno de los NMs que lo constituyen, donde los máximos pertenecientes a la fase cristalina hexagonal de ZnO poseen una mayor intensidad respecto al Fe_3O_4 , sugiriendo que los cristales de ZnO se encuentran formando un núcleo con coraza de Fe_3O_4 , tomando en cuenta el estudio realizado por Romčević *et al* (2008).

Finalmente al realizar el estudio de espectrometría Raman, espectros difusos, en el caso de ZnO NPs una banda Raman característica, con un ligero corrimiento hacia la izquierda de esta banda,

indicando la presencia de fases micro-estructuradas de este material como lo describe Nejati *et al* (2011); de igual manera se observan estos cambios en los espectros realizados para la caracterización de MNPs, sin embargo estas bandas son características para la el estado de oxidación y la fase cristalina de la maghemita; posiblemente debido a la oxidación de las MNPs, un mal procesamiento de la muestra, un largo periodo de exposición de las MNPs al ambiente sin llevar acabo la caracterización, entre otras, en este sentido Hanesch (2009) describe que de estas NPS con los láseres logra la oxidación de la muestra observando un espectro de Fe_2O_3 . Por otra el estudio realizado en los NCs se observa un espectro difuso, sin embargo los estudios realizados por Romčević *et al* (2008), concuerdan con el espectro Raman obtenido, señalando la presencia de impurezas; así mismo detalla que debido a la posible oxidación de las MNPs a Fe_2O_3 , los picos de espectro concuerdan con un NC de $\text{ZnO@Fe}_2\text{O}_3$.

4.3 Formación de biopelículas:

La formación de biopelículas tanto para *Helicobacter pylori* como *Staphylococcus aureus* se ve claramente beneficiada al enriquecer los cultivos con Glucosa (3%) respecto a las biopelículas formadas en medios estándar o con otros nutrientes (peptona 5%), esto debido a que las biopelículas se caracterizan por la capacidad de las bacterias para producir una excesiva red de exopolisacáridos altamente hidratados, como lo describen Satrk *et al* (2012). Por otra parte es importante señalar que la formación óptima de biopelículas se realiza bajo diluciones 1:40, basado en el estudio de Zhao *et al* (2012), quien estipula que uno de los factores determinantes para la formación de una biopelícula se encuentra en la fase de crecimiento exponencial de las bacterias, la cual es favorecida por la cantidad de nutrientes, pH, actividad acuosa, temperatura y el espacio físico; en contraste como se puede observar en los mismos resultados bajo altas diluciones la formación de biopelícula es nula; como lo describen Meng *et al* (2014) una baja concentración de bacterias en un microambiente no favorece la formación de biopelículas debido a la alta carga metabólica a la cual se enfrenta la bacteria pasando a un estado de latencia el cual morfológicamente puede ser detectado como una apariencia cocobacilar (observada durante las primeras 12 horas de cultivo en nuestro estudio).

Por otra parte como lo describe Carron *et al* (2006) las biopelículas se caracterizan por disminuir su actividad metabólica, su tasa de crecimiento y disminuir su susceptibilidad a agentes antimicrobianos mientras entran a un estado sésil; dicha disminución de actividad metabólica pudo ser corroborada al tomar una alícuota de las biopelículas formadas así como de los medios acuosos

para realizar las distintas pruebas bioquímicas de identificación; este fenómeno puede ser descrito por lo postulado por Stark *et al* (2012), ya que aseveran que este estado sénil las bacterias dentro de las biopelículas es transitorio; las cuales una vez son liberadas de las biopelículas estas pueden rápidamente pasar a un estado metabólico activo.

4.4 Interacción con NMs:

Con el fin de incrementar la resistencia a distintos mecanismos de defensa específicos y no específicos, las bacterias tienden a utilizar la formación de biopelícula como una estructura compleja de resistencia, lo anterior se pudo elucidar al evaluar la actividad microbicida de los NMs frente a bacterias planctónicas y biopelículas; pese a la clara diferencia en la actividad microbicida de las ZnO NPs frente a las MNPs y a los NCs, el ZnO posee actividad microbicida inclusive en su estado macroscópico, en contraste de las MNPs las cuales únicamente expresan esta actividad al estar dentro de la nanoescala; igual para los NCs, es importante señalar que el mecanismo bactericida de cada NM no está totalmente comprendido, pero se propone que está relacionado con la estructura física de la NP o bien a la capacidad que tiene el NM para liberar iones desde su superficie (Seil *et al*; 2012). En contraste las MNPs al ser materiales inertes para las bacterias podrían realizar la liberación de iones metálicos los cuales interaccionarían con los componentes de la pared y membrana bacterianos, (Webster *et al*; 2012).

Sin embargo en la actualidad se ha demostrado que las bajas concentraciones de ZnO NPs pueden llegar a producir grandes cantidades de peróxido de hidrógeno; inhibiendo múltiples actividades de la células bacterianas, como la glucólisis, la translocación de protones y tolerancia ácida (Dimkpa *et al*; 2012) proponiendo de esta manera un mecanismo bactericida para nuestro resultados a esta DMB y sus efectos posteriores al incrementar la dosis de este NM.

Así mismo, es importante resaltar que el Fe₃O₄ no es considerado dentro del área farmacológica como un agente bactericida, sin embargo al estar nano-estructurado es capaz de reducir significativamente la densidad bacteriana a una DMB significativamente baja (4mg/Kg), es importante resaltar que una de las características principales en conferir la toxicidad microbiana recae en su diámetro, morfología y su potencial zeta; así mismo al poseer propiedades magnéticas

estas podrían ser manipuladas con campos magnéticos externo para dirigir el tratamiento al foco de la infección. Se ha propuesto que el mecanismo bactericida de estas MNPs está relacionado a la generación de ROS (Hong *et al*; 2014) generando en primera instancia la internalización de este NM al citosol bacteriano y su interacción con la mitocondria para la posterior lisis bacteriana;

Como sugieren nuestros resultados, los NCs de ZnO@Fe₃O₄ presentan una mayor capacidad bactericida respecto a las MNPs, suponiendo de esta manera que al realizar la cubierta del ZnO con Fe₃O₄ la susceptibilidad de las bacterias aumenta significativamente (Prabhu *et al*; 2015), así mismo las cargas positivas de estos NCs al liberar iones podrían generar una interacción electrostática con la carga negativa de las bacterias presente en las proteínas membranales, generando daño celular, por otra parte debido a que el ZnO es un material semiconductor con ancho de banda prohibida convencional y de acuerdo a Gordon *et al* (2011) al estar en forma de NCs con el Fe₃O₄, permitiendo que a radiaciones con luz visible uno de los electrones de la banda de valencia se mueva hacia la banda de conducción de las ZnO NPs provocando una carga parcialmente positiva (h⁺), debido a esto estos NCs, podrían reaccionar con los grupos hidroxilos libres en el medio acuoso, generando radicales OH[•] con los que las bacterias podrían ser lisadas.

Por otra parte, al estimular estos NMs bajo luz visible se pudo observar un incremento significativo en la actividad microbicida; haciendo énfasis en los resultados obtenidos con los NCs, estos resultados pueden explicarse con los ensayos realizados por Kekha *et al* (2010), quienes postulan que al realizar una mezcla de del ZnO con un agente magnético podría aumentar significativamente su eficiencia fotocatalítica hasta en un 45%; es decir que los NCs podrían ser capaz de reaccionar al interactuar con la luz visible, indicando que el ancho de banda prohibida del ZnO disminuye al ser dopado con Fe₃O₄; es decir que los niveles en la banda de conducción aumentan directamente proporcional a la concentración del grupo acarreador (ZnO), mientras que el Fe₃O₄ reduce la energía de transición en la banda de valencia, así como el aumento en la generación de ROS al ser estimuladas con luz visible.

Las biopelículas son una estructura compleja cuya principal función es la de conferir resistencia a las bacterias inmersas dentro de la matriz amorfa, esto se corroboró con el incremento en la dosis de cada NM (excepto Fe₃O₄) para ocasionar una disminución significativa en la densidad óptica de las biopelículas; lo cual puede ser atribuido a la protección conferida por la matriz extracelular aumentado la probabilidad de viabilidad celular respecto a la interacción con bacterias planctónicas,

se ha reportado que las ZnO NPs ejercen su actividad biocida a través de la liberación de iones metálicos y la subsecuente inhibición de la actividad enzimática dentro de la biopelícula (Tarek *et al*; 2013).

Es importante denotar que a diferencia de las ZnO NPs y los NCs, las MNPs no necesitaron un aumento en la dosis de interacción para ejercer su actividad biocida, un estudio realizado por Cotar *et al* (2013) sugiere que este efecto biocida puede estar relacionado con la capacidad de estas NPs para unirse a la pared celular y causar la generación de canales que destruyen la matriz amorfa por choque osmótico desestabilizándola y degradando esta estructura por efecto físico, por otra parte Taylor *et al* (2009), sugieren que la actividad biocida de las MNPs es debida a la generación de radicales OH⁻ generando la despolimerización de los polisacáridos de la matriz amorfa y del ADNe, así como la inhibición de algunas beta lactamasas y la generación de lipoperoxidación.

Por otra parte los NCs lograron un efecto biocida similar a las ZnO NPs debido a la necesidad de incrementar la dosis para generar un efecto de disminución significativo; como lo describe López *et al* (2010) las biopelículas son capaces de alterar tanto el pH como el medio interno de la matriz amorfa con el fin de evitar un efecto nocivo contra las bacterias que las conforman, explicando de esta manera el requerimiento de una dosis mayor para observar el cambio deseado; como se explicó con la interacción de los NCs con las bacterias aisladas, este NM es relativamente novedoso y muchos de sus mecanismo de acción están poco estudiados, sin embargo uno de los mecanismos que más se asemeja a lo observado en nuestra investigación, fueron los ensayos realizados por Cotar *et al* (2013) quienes describen la unión de este material a la membrana celular generando daños a la misma y generando canales, fungiendo el papel de una molécula acarreadora y desacoplante de las principales defensas de la biopelícula, postulando un mecanismo de acción *in vitro*.

Por otra parte el efecto antimicrobiano de los antibióticos comparado con los NMs es significativamente mayor en microorganismos en estado planctónico; debido a que los antibióticos muestran un efecto adversos sobre los mecanismos genéticos de estas bacterias; mientras que nuestros tratamientos con NMs, muestran un decremento en el inóculo inicial dependiendo de la interacción de estos con el medio o con algunos componentes de la cadena respiratoria bacteriana; por lo que podría tardar más en mostrar el mismo efecto de inhibición en bacterias planctónicas.

Por otra parte, el efecto biocida que ejercieron los NMs sobre estas estructuras de resistencia fue mayor respecto al ejercido por los antibióticos, tanto al disminuir la densidad de la biopelícula como al reducir el inóculo bacteriano remanente dentro de esta estructura, es significativamente mayor; esta resistencia a los antibióticos utilizados puede deberse a lo descrito por Méndez (2011) donde las bacterias inmersas en estas estructuras poseen una resistencia intrínseca al utilizar la matriz amorfa como una barrera de difusión, donde los grupos funcionales de los antibióticos quedaran inactivos; en este sentido, los resultados obtenidos de estas pruebas de inhibición de biopelículas sugieren que nuestros NMs bajo estas dosis podrían penetrar esta estructura e interactuar con las bacterias inmersas en la matriz amorfa y a su vez realizar su efecto bactericida por medio de la generación de ROS, lo anterior puede sustentarse por los experimentos realizados por Ansari et al (2015) quienes afirman que debido a su tamaño; estos NMs pueden internalizarse en la matriz amorfa de la biopelícula inhibiendo la producción de exopolisacáridos, resultando en la desestabilización de esta estructura y su subsecuente generación de estrés oxidativo al interactuar con estas células microbianas.

4.5 Análisis in vivo:

Respecto al estudio realizado en ratas Wistar macho, y someterlas a interacción crónica y aguda de estos NMs, se observó el efecto esperado dentro de la investigación, debido a la ausencia de actividad toxicológica adversa bajo interacciones crónicas y la interacción aguda con los NCs, se debe enfatizar que la mayor parte del daño toxicológico se observó de forma localizada en Hígado, Pulmón y Cerebelo, encontrando un daño mayor producido por las ZnO NPs bajo interacción aguda en estos últimos órganos, siendo el Hígado afectado principalmente por las MNPs a dosis agudas; lo anterior puede ser referido a un daño común asociado a la generación de ROS y su consecuente estrés oxidativo, generando en este caso un mecanismo principal de toxicidad relacionado con la inflamación, fibrosis y apoptosis (Sadeghi, et al., 2015), así mismo debe de mencionarse que cada NP tiene características físico-químicas muy específicas y se pueden distribuir rápidamente en la totalidad del cuerpo después de la inoculación generando rápidamente el efecto toxicológico.

Por otra parte al realizar el estudio en riñón se demostró la ausencia de efectos toxicológicos adversos tanto en interacciones crónicas como en agudas, lo cual discrepa con la información

encontrada en la literatura, donde se defiende la generación de daño renal inclusive a dosis pequeñas de cualquier NM; entre estas se encuentra el trabajo realizado por (Xiao, et al., 2016) quienes postulan que la interacción de distintos NMs sin importar concentración o tamaño de la partícula es capaz de generar un daño adverso significativo sobre la homeostasis renal. Ulteriormente al realizar el estudio de toxicidad *in vivo* sobre tejido pulmonar, fue posible esclarecer la ausencia de algún efecto toxicológico adverso de los NMs sobre los neumocitos a intoxicaciones crónicas, sin embargo existen cambios histológicos significativos respecto al control al realizar la intoxicación aguda con ZnO NPS y MNPs, existen diversos estudios que explican y defienden el daño producido a los pulmones por las NPs, entre ellos el más completo ha sido el análisis realizado por (Weisheng, et al., 2009) quienes demostraron que los NMs generan una mayor citotoxicidad debido a la gran superficie de contacto que poseen, disminuyendo la viabilidad de los neumocitos hasta un 85%, lo cual fue atribuido a la perforación de la membrana celular y al aumento significativo en la concentración de ROS y el decremento de GSH, resultando en un daño irreversible en el ADN.

Finalmente, las pruebas de toxicidad *in vivo* sobre cerebelo demostraron ausencia de daño tisular bajo intoxicaciones crónicas de los tres NMs; igualmente esta ausencia de afecciones histológicas se presentó en las interacciones agudas de MNPs y NCs resultando en estos tratamientos una histología aparentemente normal respecto a lo encontrado en el grupo control; sin embargo la interacción aguda de las ZnO NPs con el tejido cerebelar se presentan cambios anormales en la morfología de la zona molecular, estos resultados podrían respaldarse en los estudios realizados por (Tin-Tin & Hidekazu, 2011) quienes afirman que esta interacción es una de las causas primarias en la generación de tumores cerebrales primarios debido a que este NM es capaz de cruzar la barrera hemato-encefálica.



CONCLUSIONES

- Se logró la síntesis de MNPs, ZnO NPs y NCs por ruta solvotérmica activada por microondas.
- Se logró optimizar las condiciones de síntesis para MNPs y NCs.
- Se logró caracterizar los NMs por medio de SEM, EDS, DRX y Raman
- Se encontró que los materiales sintetizados poseían una fase cristalina definida.
- Los materiales sintetizados por ruta solvotérmica activada por microondas generan cristales con un diámetro encontrado dentro de la nano-escala.
- Los NCs poseen una morfología compartida al incorporar la fase cristalina del ZnO y Fe₃O₄.
- Se generaron cultivos monoxenicos de *Staphylococcus aureus* y *Helicobacter pylori*.
- Se formaron biopelículas estables de *Staphylococcus aureus* y *Helicobacter pylori*.
- Se determinaron las condiciones óptimas de formación de biopelículas en medio suplementado.
- Se determinaron las DMI y DMB para cada NM.
- Los aspectos microambientales (pH, temperatura, nutrientes etc...) favorecen el crecimiento y formación de biopelículas *in vitro*.
- La composición química, el tamaño, morfología de la partícula y el potencial zeta están entre las variables más relevantes que afectan la actividad bactericida de los NMs.
- La actividad bactericida de los NMs presenta una relación dosis-dependiente.
- Los NCs de ZnO@Fe₃O₄ son un NM altamente versátil a pesar de su poca aplicación dentro de la rama de la biomedicina.
- Los NCs incrementan su actividad bactericida al estar en interacción bajo luz visible.
- Los NMs poseen menor actividad bactericida que los antibióticos al interaccionar con la forma planctónica de la bacteria.
- Los NMs ejercen una mayor actividad bactericida que los antibióticos al interaccionar con biopelículas de estas bacterias.
- La interacción crónica de los NMs con los organismos modelos no genera daños toxicológicos adversos en los parámetros bioquímicos.
- La interacción crónica de los NMs con los organismos modelo no genera daño histológico en hígado, riñón, pulmón, corazón y cerebelo.

- La interacción aguda de ZnO NPs y MNPs genera un incremento en la concentración enzimática y decremento en los parámetros fisiológicos.
- La interacción aguda de ZnO NPs y MNPs con los organismos modelo genera daño tisular en hígado y pulmón
- Dosis altas de ZnO NPs generan daños morfológicos en la zona molecular del cerebelo.
- Ningún tipo de interacción de los NCs con los organismos modelo genera daños aparentes.
- Debido a su alta actividad bactericida y su nula actividad toxicológica se recomienda los NCs como un tratamiento paliativo opcional a los antibióticos.
- La interacción aguda de las ZnO NPs podría generar un efecto de bioacumulación debido a la baja tasa de eliminación por orina.



GLOSARIO

A

Abiótica

Que no permite que haya vida. · 25

Aclorhidria

Estado clínico donde la producción del ácido gástrico del estómago es inexistente · 16

Adverso

Que es contrario, negativo o desfavorable. · 7

Agudo

Enfermedad que tiene un inicio y un fin claramente definidos y es de corta duración. · 7

Alelo

Cada una de las formas alternativas que puede tener un mismo gen que se diferencian en su secuencia y que se puede manifestar en modificaciones concretas de la función de ese gen · 18

Amiloidea

Que es rico en azúcar y se deposita en un tejido durante la amilosis. · 27

Anisotropía

Que ofrece distintas propiedades cuando se examina o ensaya en direcciones diferentes. · 33

Antiferromagnético

Ordenamiento magnético de todos los momentos magnéticos de una muestra, durante la aplicación de un campo magnético, en la misma dirección. · 10

Anti-fúngico

Toda sustancia que tiene la capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos · 10

Antígeno

Sustancia que al introducirse en el organismo induce en este una respuesta inmunitaria, provocando la formación de anticuerpos. · 17

Apoptosis

Muerte celular programada o provocada por el mismo organismo, con el fin de autocontrolar su desarrollo y crecimiento, está desencadenada por señales celulares controladas genéticamente. · 38

B

Bactericida

Que destruye las bacterias. · 7

Bacteriocina

Toxina proteica sintetizada por una bacteria con el fin de inhibir el crecimiento de bacterias similares o de cepas cercanas. · 21

Bacteriostático

Sustancia que dificulta la reproducción bacteriana · 49

Biocida

Que destruye biopelículas · 7

Biocompatibilidad

Capacidad de un material para no interferir ni degradar el medio biológico en el cual es utilizado. · 7

Biomasa

Cantidad total de materia viva presente en una comunidad o ecosistema. · 25

Biopelícula

Ecosistema microbiano organizado, conformado por uno o varios microorganismos asociados a una superficie viva o inerte, con características funcionales y estructuras complejas. · 7

Biótica

De los organismos vivos o relacionado con ellos. · 25

C

Campo magnético

Magnitud vectorial que representa la intensidad de la fuerza magnética. · 10

Carbohidrato

Sustancia orgánica sólida, blanca y soluble en agua, que constituye las reservas energéticas de las células animales y vegetales · 17

Catalítico

Variación en la velocidad de una reacción química producida por la presencia de un catalizador. · 11

Cepa

Variante fenotípica de una especie o, incluso, de un taxón inferior, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias. · 17

Citosol

Líquido que se localiza dentro de las células. · 18

Coercitividad

Intensidad de campo magnético para regresar a cero la magnetización del material · 34

Condensación

Cambio de estado de la materia que se encuentra en forma gaseosa a forma líquida. · 12

Consensus

Acuerdo o conformidad en algo de todas las personas que pertenecen a una colectividad. · 14

Cromosoma

Órgano en forma de filamento que se halla en el interior del núcleo de una célula eucariota y que contiene el material genético · 18

Crónico

Que se padece a lo largo de mucho tiempo. · 7

Cuántico

Cantidad de energía · **9**

D

Degradación hidrópica

Presencia de vacuolas en el citoplasma celular por el incremento en la osmosis · **7**

Depleción

Pérdida de algún elemento imprescindible para el buen funcionamiento de organismo · **26**

Diamagnético

Propiedad de los materiales que consiste en repeler los campos magnéticos · **10**

Dispepsia

Trastorno de la digestión que aparece después de las comidas y cuyos síntomas más frecuentes son náuseas, pesadez y dolor de estómago, ardor y flatulencia. · **17**

Dominio magnético

Agrupación de imanes permanentes elementales (dipolos magnéticos). · **10**

Dosis

Cantidad de un medicamento o una droga que se ingiere en una toma. · **7**

E

Electrogénico

Transporte iónico que implica el movimiento neto de carga a través de la membrana. · **18**

Embebido

Absorber un cuerpo sólido algún líquido · **25**

Endosoma

Orgánulo de las células animales y fúngicas delimitados por una sola membrana · **18**

Enterotoxina

Producto del metabolismo de ciertas cepas de células o bacilos que posee un grado de tóxico para el organismo humano. · **20**

Epidemiología

Parte de la medicina que estudia el desarrollo epidémico y la incidencia de las enfermedades infecciosas en la población. · **15**

Epítopo

Porción de una macromolécula que es reconocida por el sistema inmunitario · **29**

Espacio periplásmico

Espacio comprendido en las bacterias Gram- negativas entre las membranas interna y externa y al

inmediatamente adyacente a la membrana interna en el caso de las bacterias Gram-positivas. · **22**

Especies Reactivas de Oxígeno

Moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada. · **19**

Espectrofotometría

Medición de la cantidad de energía radiante que absorbe o transmite un sistema químico en función de la longitud de onda · **7**

Estequiometría

Mide las proporciones cuantitativas o relaciones de masa de los elementos químicos que están implicados · **37**

Etiología

Parte de la medicina que estudia el origen o las causas de las enfermedades. · **14**

Exotérmico

Que se produce con desprendimiento de calor. · **12**

Exotoxina

Toxina secretada extracelularmente por un microorganismo como bacterias, protozoos y algunos hongos y algas. · **20**

F

Ferrimagnético

Fenómeno físico en el que se produce ordenamiento magnético de todos los momentos magnéticos de modo que no todos los momentos magnéticos de una muestra están alineados en la misma dirección y sentido. · **10**

Ferromagnético

Propiedad del hierro, el cobalto, el níquel y otros materiales de adquirir una fuerte imantación. · **10**

Fisiología

Conjunto de propiedades y funciones de los órganos y tejidos del cuerpo de los seres vivos. · **25**

Flagelo

Apéndice móvil con forma de látigo presente en muchos organismos unicelulares y en algunas células de organismos pluricelulares. · **14**

G

Gastritis

Inflamación de la mucosa del estómago. · **14**

Gen constitutivo

Se expresa como resultado de la interacción entre la ARN polimerasa y el promotor, sin necesidad de regulación adicional · **18**

Genotipo

Conjunto de los genes que existen en el núcleo celular de cada individuo. · **18**

Glucocalix

Término genérico que se refiere al material polimérico extracelular compuesto por proteínas y carbohidratos producido por algunas bacterias y células como las epiteliales de las superficies mucosas. · **14**

H

Hacinamiento

Acumular o amontonar las cosas sin ningún orden · **15**

Hemólisis

Destrucción de los hematíes o glóbulos rojos de la sangre que va acompañada de liberación de hemoglobina. · **77**

Hidrólisis

Descomposición de sustancias orgánicas por acción del agua. · **12**

Hidróxido

Compuestos químicos formados por un metal, y varios aniones hidroxilos · **12**

Hipertermia

Aumento de la temperatura del cuerpo por encima de lo normal. · **10**

Histológico

Sección fina de un tejido biológico adherida sobre un portaobjetos y generalmente coloreada con alguna tinción específica para resaltar una parte de la estructura. · **7**

Histopatológico

Estudio histológico de los tejidos enfermos. · **14**

Homeostasis

Conjunto de fenómenos de autorregulación, conducentes al mantenimiento de una relativa constancia en la composición y las propiedades del medio interno de un organismo. · **30**

I

Imagenología

Conjunto de técnicas y procesos usados para crear imágenes del cuerpo humano, o partes de él, con propósitos clínicos o para la ciencia médica · **10**

in vitro

Técnica para realizar un determinado experimento en un tubo de ensayo. · **7**

in vivo

Experimentación hecha dentro o en el tejido vivo de un organismo · **7**

Inhibición

Impedir o reprimir · **7**

Inmunosuprimido

Disminución o anulación de la respuesta inmunológica del organismo mediante tratamiento médico. · **23**

Ion

Partícula cargada eléctricamente constituida por un átomo o molécula · **18**

Isogénico

Organismo que tiene el mismo conjunto de genes. · **28**

L

Lectina

Proteína que se une a azúcares con una elevada especificidad para cada tipo distinto. · **27**

Liposoma

Acumulación de lípidos en el citoplasma de algunas células que se mantiene suspendida en forma de grasa invisible · **42**

Lisis

Proceso de ruptura de la membrana celular que produce la salida del material intracelular. · **21**

M

Metabolito

Producto que queda después de la descomposición (metabolismo) de un fármaco por parte del cuerpo. · **25**

Microaerófilo

Niveles de oxígeno muy inferiores a los que se encuentran en la atmósfera de la tierra · **14**

Mimetismo molecular

Similaridad antigénica entre moléculas no emparentadas como ocurre en la fiebre reumática y otras enfermedades · **17**

Momento magnético

Cantidad que determina la fuerza que el imán puede ejercer sobre las corrientes eléctricas y el par que un campo magnético ejerce sobre ellas. · **10**

Morbilidad

Cantidad de personas que enferman en un lugar y un período de tiempo determinados en relación con el total de la población. · **26**

Morfología

Parte de la biología que trata de la forma de los seres vivos y de su evolución. · **14**

N

Nanobioteconología

Rama de la nanotecnología con aplicaciones o usos biológicos y bioquímicos · **9**

Nanocompósito

Incorporación química de dos nanomateriales · **7**

Nanomaterial

Material con propiedades morfológicas más pequeñas que 1 µm en al menos una dimensión · **7**

Nanométrico

Medida de longitud que equivale a la milmillonésima parte del metro. · **7**

Nanopartícula

Partícula nanoscópica con por lo menos una dimensión menor que 100nm. · **7**

Nanotecnología

Tecnología que se dedica al diseño y manipulación de la materia a nivel de átomos o moléculas, con fines industriales o médicos, entre otros. · **9**

Necrosis

Muerte de las células y los tejidos de una zona determinada de un organismo vivo. · **46**

Nosocomial

Que se contrae durante la estancia en un medio hospitalario. · **25**

O

Operón

Unidad genética funcional formada por un grupo o complejo de genes capaces de ejercer una regulación · **26**

Opsonización

Proceso por el que se marca a un patógeno para su ingestión y destrucción por un fagocito. · **38**

Optoelectrónico

Material cuyo funcionamiento está relacionado directamente con la luz. · **7**

Organometálico

Compuesto en el que los átomos de carbono de un ligando orgánico forman enlaces covalentes con un átomo metálico. · **12**

Osmótico

Difusión que tiene lugar entre dos líquidos o gases capaces de mezclarse a través de un tabique o membrana semipermeable. · **18**

P

Paliativo

Que sirve para atenuar o suavizar los efectos de una cosa negativa, como un dolor, un sufrimiento o un castigo. · **52**

Paramagnético

Propiedad de las sustancias que, colocadas en un campo magnético, toman una imantación positiva proporcional al campo. · **10**

Parénquima

Tejido esencial de determinados órganos, como los pulmones, el hígado o los riñones. · **7**

Patógeno

Que causa o produce enfermedad. · **7**

Perfusión

Introducción lenta y continuada de una sustancia medicamentosa o de sangre en un organismo u órgano por vía intravenosa, subcutánea o rectal. · **67**

Periferal

Localizado fuera · **26**

Planctónico

Crecimiento bacteriano aislado y no sujeto a estructuras. · **24**

Plásmido

Moléculas de ADN extracromosómico circular que se replican y transmiten independientes del ADN cromosómico. · **21**

Prostético

De la prótesis · **25**

Proteasa

Enzima que rompe los enlaces de las proteínas. · **22**

Protoplasto

Célula de planta, bacteria u hongo que ha perdido total o parcialmente su pared celular · **21**

Q

Quimioprofilaxis

Conjunto de medidas que se toman para proteger o preservar de las enfermedades y que consiste en la administración de sustancias químicas. · **23**

Quimiotáctico

Sustancia que induce a determinadas células a migrar hacia el órgano diana. · **17**

R

Radical libre

Especie química, en general es extremadamente inestable y, por tanto, con gran poder reactivo por poseer un electrón desapareado · **19**

Radio de Bohr

5.291 772 0859×10⁻¹¹ m. · **9**

REDOX

Reacción de reducción-oxidación · **42**

Reservorio

Organismo que aloja virus, bacterias u otros microorganismos que pueden causar una enfermedad contagiosa y que puede propagarse hasta producir una epidemia. · **16**

Resonancia Magnética Nuclear

Fenómeno físico basado en las propiedades mecánico-cuánticas de los núcleos atómicos. · **10**

S

Safranina

Colorante biológico, de contraste que se utiliza en la Tinción de Gram para proporcionar un color violeta más intenso a las bacterias Gram+ y tinte de rosa a las bacterias G- · **7**

Secretar

Elaborar y expulsar una glándula una sustancia que el organismo utiliza con un fin · **22**

Semiconductor

Elemento que se comporta como un conductor o como un aislante dependiendo de diversos factores, como por ejemplo el campo eléctrico o magnético, la presión, la radiación que le incide, o la temperatura del ambiente en el que se encuentre. · **7**

Septicemia

Infección grave y generalizada de todo el organismo debida a la existencia de un foco infeccioso en el

interior del cuerpo del cual pasan gérmenes patógenos a la sangre. · **23**

Seroepidemiológico

Estudio o análisis de muestras de sangre o suero de una población definida · **15**

Simbiosis

Asociación íntima de organismos de especies diferentes para beneficiarse mutuamente en su desarrollo vital. · **24**

Solvotérmico

Proceso de síntesis sometido a altas temperaturas con solventes orgánicos · **7**

Sonicar

Aplicación de la energía del sonido (generalmente ultrasonidos) para agitar las partículas de una muestra · **66**

Spin

Sentido de rotación del electrón alrededor de su propio eje. · **34**

Supurativo

Formar o echar pus una herida. · **23**

Surfactante

Agentes químicos "activos en superficie" · **21**

T

Tintorial

Propio de los tintes, pigmentos o sustancias colorantes. · **20**

Tisular

De los tejidos del organismo o relacionado con ellos. · **38**

Toxicidad

Capacidad de alguna sustancia química de producir efectos perjudiciales sobre un ser vivo · **7**

U

Úlcera péptica

Lesión de la piel o membrana mucosa con forma crateriforme · **14**

V

Virulencia

Grado de la capacidad de un microorganismo para producir una enfermedad. · **16**

W

Wurtzita

Una de las formas cristalinas del sulfuro de cinc · **11**

Z

Zwitterión

Compuesto químico que es eléctricamente neutro pero que tiene cargas formales · **41**





BIBLIOGRAFÍA

- Archer, N., Mazaitis, M., Costerton, W., Leid, J., Powers, M., & Shirtliff, M. (2011). Staphylococcus aureus biofilms: Properties, regulation and roles in human disease. *Virulence*, 2(5), 445 - 459.
- Azam, A., Ahmed, A., Oves, M., Khan, M., Habib, S., & Memic, A. (2012). Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *International Journal of Nanomedicine*, 2(7), 6003–6009.
- Baek, M., Chung, H.-E., Yu, J., Lee, J.-A., Kim, T.-H., Oh, J.-M., et al. (2012). Pharmacokinetics, tissue distribution, and excretion of zinc oxide nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 3(7), 3081–3097.
- Bai, X., Li, L., Liu, H., Tan, L., Liu, T., & Meng, X. (2015). Small Molecule ligand Solvothermal Synthesis of ZnO nanoparticles and Anti-infection Application in vivo. *Applied Materials & Interfaces*, 3, 1 -33.
- Beltran-Huarac, J., Singh, S., Tomar, M., Peña, S., Rivera, L., & Perales-Perez, O. (2010). Synthesis of Fe₃O₄/ZnO Core-shell Nanoparticles for Photodynamic Therapy Applications. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*, 6(4), 1 - 6.
- Boles, B., & Horswill, A. (2011). Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends Microbiol*, 19(9), 449–455.
- Boles, B., & Horswill, A. (2008). agr-Mediated Dispersal of Staphylococcus aureus Biofilms. *PLOS PATHOGENS*, 4(4), 1 -13.
- Charlton, J., Pearl, V., Denotti, A., Lee, J., Swaminathan, S., Scindia, Y., et al. (2015). Biocompatibility of ferritin-based nanoparticles as targetedMRI contrast agents. *Nanomedicine*, 1, 1 -12.
- CHICEA, D. (2014). USING AFM TOPOGRAPHY MEASUREMENTS IN NANOPARTICLE SIZING. *Romanian Reports in Physics*, 66(3), 778–787.
- CHICEA, D., NEAMTU, B., CHICEA, R., & CHICEA, L. (2010). THE APPLICATION OF AFM FOR BIOLOGICAL SAMPLES IMAGING. *Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 5(4), 1015-1022.

- Cole, S., Harwood, J., Lee, R., She, R., & Guiney, D. (2004). Characterization of Monospecies Biofilm Formation by *Helicobacter pylori*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 4, 3124–3132.
- CRAMTON, S., GERKE, C., SCHNELL, N., NICHOLS, W., & GOTZ, F. (2000). The Intercellular Adhesion (ica) Locus Is Present in *Staphylococcus aureus* and Is Required for Biofilm Formation. *INFECTION AND IMMUNITY*, 67(10), 5427–5433.
- Dawei, A., Zhisheng, W., & Anguo, Z. (2010). Protective Effects of Nano-Zno on the Primary Culture Mice Intestinal Epithelial Cells in in vitro Against Oxidative Injury. *World Journal of Agricultural Sciences*, 6(2), 149-153.
- Dimkpa, C., Zeng, J., McLean, J., Britt, D., Zhan, J., & Anderson, A. (2012). Production of Indole-3-Acetic Acid via the Indole-3-Acetamide Pathway in the Plant-Beneficial Bacterium *Pseudomonas chlororaphis* O6 Is Inhibited by ZnO Nanoparticles but Enhanced by CuO Nanoparticles. *Applied and Environmental Microbiology*, 12, 1404–1410.
- Fernández, K. (2013). *Síntesis y Caracterización de Nanopartículas Magnéticas*. Guanajuato: CIO.
- Fux, C., Wilson, S., & Stoodley, P. (2004). Detachment Characteristics and Oxacillin Resistance of *Staphylococcus aureus* Biofilm Emboli in an In Vitro Catheter Infection Model. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 186, 4486–4491.
- García, J., Abellán, G., Carrillo, A., & Linares, N. (2007). *Nanomateriales para aplicaciones avanzadas*. Alicante: San Vicente.
- Gião, M., Azevedo, N., Wilks, S., Vieira, M., & Keevil, C. (2008). Persistence of *Helicobacter pylori* in Heterotrophic Drinking-Water Biofilms. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 74(19), 5898–5904.
- Goh, K.-L., Chan, W.-K., Shiota, S., & Yamaoka, Y. (2011). Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection and Public Health Implications. *Helicobacter*, 16(1), 1–9.
- Gordona, T., Perlsteina, B., Houbarab, O., Felnerc, I., Baninb, E., & Margela, S. (2011). Synthesis and characterization of zinc/iron oxide composite nanoparticles and their antibacterial properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 374, 1- 8.

Hanley, C., Layne, J., Punnoose, A., Reddy, K., Coombs, I., Coombs, A., et al. (2008). Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles. *Nanotechnology*, 29(1), 1 -20.

Herrera, F. (2013). *SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE ÓXIDOS MAGNÉTICOS NANOESTRUCTURADOS*. AGUASCALIENTES: UAA.

Hong, J.-S., Park, M.-K., Kim, M.-S., Lim, J.-H., Park, G.-J., Maeng, E.-H., et al. (2014). Prenatal development toxicity study of zinc oxide nanoparticles in rats. *International Journal of Nanomedicine*, 2, 159–171.

Hong, T.-K., Tripathy, N., Son, H.-J., Ha, K.-T., Jeong, H.-S., & Hahn, Y.-B. (2013). A comprehensive in vitro and in vivo study of ZnO nanoparticles toxicity. *Journal of Materials Chemistry*, 1, 2985 - 2992.

Hurley, K., Ring, H., Kang, H., Klein, N., & Haynes, C. (2015). Characterization of Magnetic Nanoparticles in Biological Matrices. *Analytical chemistry*, 87, 11611 - 11620.

Hussein, S., EL-Senosi, Y., El-Dawy, K., & Baz, H. (2015). PROTECTIVE EFFECT OF ZINC OXIDE NANOPARTICLES ON OXIDATIVE STRESS IN EXPERIMENTAL - INDUCED DIABETES IN RATS. *Journal of Nanoscale*, 2, 1 - 17.

Kao, Y.-Y., Chen, Y.-C., Cheng, T.-J., Chiung, Y.-M., & Liu, P.-S. (2012). Zinc Oxide Nanoparticles Interfere With Zinc Ion Homeostasis to Cause Cytotoxicity. *TOXICOLOGICAL SCIENCES*, 2(125), 462–472.

Kim, C.-S., Nguyen, H.-D., Ignacio, R., Kim, J.-H., Cho, H.-C., Maeng, E., et al. (2014). Immunotoxicity of zinc oxide nanoparticles with different size and electrostatic charge. *International Journal of Nanomedicine*, 49, 195–205.

Krishnan, K. (2010). Biomedical Nanomagnetism: A Spin Through Possibilities in Imaging, Diagnostics, and Therapy. *IEEE Trans Magn*, 46(7), 2523–2558.

Kumar, A., Jena, P., Behera, S., Lockey, R., Mohapatra, S., & Mohapatra, S. (2010). Multifunctional Magnetic Nanoparticles for Targeted Delivery. *Nanomedicine*, 6(1), 64–69.

- Kumar, C., & Mohammad, F. (2011). Magnetic Nanomaterials for Hyperthermia-based Therapy and Controlled Drug Delivery. *Adv Drug Deliv Rev.*, 63(9), 789–808.
- Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., et al. (2008). Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.*, 108, 2064–2110.
- Lebeaux, D., Chauhan, A., Rendueles, O., & Beloin, C. (2013). From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *pathogens*, 2, 288-356.
- Lee, J.-H., Kim, J.-w., & Cheon, J. (2013). Magnetic Nanoparticles for Multi-Imaging and Drug Delivery. *Mol. Cells*, 35, 274-284.
- Lee, J.-H., Kim, Y.-G., Cho, M., & Lee, J. (2014). ZnO nanoparticles inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence factor production. *Microbiological Research*, 169, 888–896.
- Leid, J., Shirtliff, M., Costerton, J., & Stoodley, P. (2002). Human Leukocytes Adhere to, Penetrate, and Respond to *Staphylococcus aureus* Biofilms. *INFECTION AND IMMUNITY*, 70(11), 6339–6345.
- Leuba, K., Durmus, N., Taylor, E., & Webster, T. (2013). Short communication: carboxylate functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) for the reduction of *S. aureus* growth post biofilm formation. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 731–736.
- López, D., Vlamakis, H., & Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harbor*, 2, 1 -11.
- Miller, J., Neubig, R., Clemons, C., Kreider, K., Wilber, J., Young, G., et al. (2013). Nanoparticle Deposition onto Biofilms. *Ann Biomed Eng.*, 41(1), 53–67.
- Mohammadi, A., Barikan, M., & Barmar, M. (2012). Fabrication and characterization of Magnetic Fe₃O₄/polyurethane nanocomposites. *International Journal on Nanostructures*, 15(07), 12 - 14.

- Monireh, M., & Mohammad, F. (2014). The effects of Pulmonary administration of Fe₂O₃ Nanoparticles on the Lung Tissue in Wistar Rat. *International Research Journal of Biological Sciences*, 3(7), 1-5.
- Moormeier, D., Bose, J., Horswill, A., & Bayles, K. (2014). Temporal and Stochastic Control of Staphylococcus aureus Biofilm Development. *MBIO*, 5(5), 1 - 12.
- Moos, P., Olszewski, K., Honegger, M., Cassidy, P., Leachman, S., Woessner, D., et al. (2011). Responses of human cells to ZnO nanoparticles: a gene transcription study. *Metallomics*, 3(11), 1 -28.
- Moyat, M., & Velin, D. (2014). Immune responses to Helicobacter pylori infection. *World J Gastroenterol*, 20(19), 5583-5593.
- Niemirowicz, K., Surel, U., Wilczewska, A., Mystkowska, J., Piktel, E., Gu, X., et al. (2015). Bactericidal activity and biocompatibility of ceragenin-coated magnetic nanoparticles. *Journal of Nanobiotechnology*, 1(5), 13 - 32.
- O Raemy, D., Grass, R., Stark, W., Schumache, C., Clift, M., Gehr, P., et al. (2012). Effects of flame made zinc oxide particles in human lung cells - a comparison of aerosol and suspension exposures. *Raemy et al. Particle and Fibre Toxicology*, 9(33), 1 - 18.
- Pan, H., Zhang, Y., He, G.-X., Katagori, N., & Chen, H. (2014). A comparison of conventional methods for the quantification of bacterial cells after exposure to metal oxide nanoparticles. *Microbiology*, 1(4), 1 -11.
- Park, E.-J., Oh, S., Lee, S., Lee, K., Kim, Y., Lee, B.-S., et al. (2015). Chronic pulmonary accumulation of iron oxide nanoparticles induced Th1-type immuneresponse stimulating the function of antigen-presenting cells. *Environmental Research*, 143, 138–147.
- Posselt, G., Backert, S., & Wessler, S. (2013). The functional interplay of Helicobacter pylori factors with gastric epithelial cells induces a multi-step process in pathogenesis. *Cell Communication and Signaling*, 11(77), 1 -14.

- Rasmussen, J., Martinez, E., Louka, P., & Wingett, D. (2010). Zinc Oxide Nanoparticles for Selective Destruction of Tumor Cells and Potential for Drug Delivery Applications. *Expert Opin Drug Deliv*, 7(10), 1063–1077.
- Roesler, B., Rabelo-Gonçalves, E., & Zeitune, J. (2014). Virulence Factors of *Helicobacter pylori*: A Review. *Clinical Medicine Insights: Gastroenterology*, 7, 9 -17.
- Sadeghia, L., Tanwirb, F., & Babadic, V. (2015). In vitro toxicity of iron oxide nanoparticle: Oxidative damages on HepG2 cells. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 67, 197 - 203.
- Salah, N., Habib, S., Khan, Z., Memic, A., Azam, A., Alarfa, E., et al. (2011). High-energy ball milling technique for ZnO nanoparticles as antibacterial material. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 863–869.
- Schlorf, T., Meincke, M., Kossel, E., Glüer, C.-C., Jansen, O., & Mentlein, R. (2012). Biological Properties of Iron Oxide Nanoparticles for Cellular and Molecular Magnetic Resonance Imaging. *Int. J. Mol. Sci*, 12, 12-23.
- Shen, C.-C., Liang, H.-J., Wang, C.-C., Liao, M.-H., & Jan, T.-R. (2012). Iron oxide nanoparticles suppressed T helper 1 cell-mediated immunity in a murine model of delayed-type hypersensitivity. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 2729–2737.
- Smith, S., O'Morain, C., & McNamara, D. (2014). Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori* in times of increasing antibiotic resistance. *World J Gastroenterol*, 20(29), 9912-9921.
- Smolensky, E., Park, H.-Y., Berquó, T., & Pierre, V. (2011). Surface Functionalization of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for MRI Applications – Effect of Anchoring Group and Ligand Exchange Protocol. *Contrast Media Mol Imaging*, 6(4), 189–199.
- Sun, C., Lee, J., & Zhang, M. (2008). Magnetic Nanoparticles in MR Imaging and Drug Delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 60(11), 1252–1265.
- Teske, S., & Detweiler, C. (2015). The Biomechanisms of Metal and Metal-Oxide Nanoparticles' Interactions with Cells. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 12, 1112-1134.

- Uzar, N., Abudayyak, M., Akcay, N., Algun, G., & Ozhan, G. (2015). Zinc oxide nanoparticles induced cyto- and genotoxicity in kidney epithelial cells. *Toxicol Mech Methods*, 1, 1 - 6.
- Vatansever, F., de Melo, W., Avci, P., Vecchio, D., Sadasivam, M., Gupta, A., et al. (2013). Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species - bactericidal antibiotics, photodynamic therapy and beyond. *FEMS Microbiol Rev*, 7(6), 955–989.
- Wang, J., Meng, G., Tao, K., Feng, M., Zhao, X., Li, Z., et al. (2012). Immobilization of Lipases on Alkyl Silane Modified Magnetic Nanoparticles: Effect of Alkyl Chain Length on Enzyme Activity. *PLOS ONE*, 7(8), 1 - 8.
- Wang, L., Luo, J., Shan, S., Crew, E., Yin, J., Zhong, C.-J., et al. (2011). Bacterial inactivation using silver-coated magnetic nanoparticles as functional antimicrobial agents. *Anal Chem.*, 83(22), 8688–8695.
- Wang, Y.-X., Xuan, S., Port, M., & Idee, J.-M. (2013). Recent Advances in Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Cellular Imaging and Targeted Therapy Research. *Current Pharmaceutical Design*, 19, 6575-6593.
- Wong, F., Rayner-Hartley, E., & Byrne, M. (2014). Extraintestinal manifestations of *Helicobacter pylori* : A concise review. *World J Gastroenterol*, 20(34), 11950-11961.
- Xue, J., Luo, Z., Li, P., Ding, Y., Cui, Y., & Wu, Q. (2014). A residue-free green synergistic antifungal nanotechnology for pesticide thiram by ZnO nanoparticles. *SCIENTIFIC REPORTS*, 4, 1 - 9.
- Zhao, S., Lin, X., Zhang, L., Sun, L., & Li, J. (2012). THE IN VIVO INVESTIGATION OF Fe₃O₄-NANOPARTICLES ACUTE TOXICITY IN MICE. *Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communications*, 24(3), 229 - 235.
- Zou, Y., Liu, P., Liu, C.-H., & Zhi, X.-T. (2015). Doxorubicin-loaded mesoporous magnetic nanoparticles to induce apoptosis in breast cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 69, 355–360|.

- Abbasalipourkabar, R., Moradi, H., Zarei, S., Asadi, S., Salehzadeh, A., Ghafourikhosroshahi, A., et al. (2015). Toxicity of zinc oxide nanoparticles on adult male Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*, *84*, 154-160.
- Adamcakova-Dodd, A., Stebounova, L., Kim, J., Vorrink, S., Ault, A., O'Shaughnessy, P., et al. (2014). Toxicity assessment of zinc oxide nanoparticles using sub-acute and sub-chronic murine inhalation models. *Particle and Fibre Toxicology*, *11*(15), 1 - 15.
- Adamus-Białek, W., Kubiak, A., & Czerwonka, G. (2015). Analysis of uropathogenic *Escherichia coli* biofilm formation under different growth conditions. *BIOCHIMICA POLONICA*, *62*, 1 - 6.
- Alzahrani, S., Lina, T., Gonzalez, J., Pinchuk, I., Beswick, E., & Reyes, V. (2014). Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells. *World J Gastroenterol*, *20*(36), 12767-12780.
- Ansari, M., Khan, H., Khan, A., Cameotra, S., & Alzohairy, M. (2015). Anti-biofilm efficacy of silver nanoparticles against MRSA and MRSE isolated from wounds in a tertiary care hospital. *Indian Journal of Medical Microbiology*, *3*(1), 101-109.
- Azam, A., Ahmed, A., Oves, M., Khan, M., Habib, S., & Memic, A. (2012). Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *International Journal of Nanomedicine*, *7*, 6003–6009.
- Baratli, Y., Charles, A.-L., Wolff, V., Tahar, L., Smiri, L., Bouitbir, J., et al. (2013). Impact of iron oxide nanoparticles on brain, heart, lung, liver and kidneys mitochondrial respiratory chain complexes activities and coupling. *Toxicology in Vitro*, *27*, 2142–2148.
- Beltran-Huarac, J., Singh, S., Tomar, M., Peña, S., Rivera, L., & Perales-Perez, O. (2010). Synthesis of Fe₃O₄/ZnO Core-shell Nanoparticles for Photodynamic Therapy Applications. *Mater. Res. Soc. Symp*, *1257*, 1 -6.
- Beltran-Huarac, J., Tomar, M., Singh, S., Perales-Perez, O., Rivera, L., & Peña, S. (2010). Multifunctional Fe₃O₄/ZnO core-shell nanoparticles for photodynamic therapy. *Nanotech*, *3*(2), 405 - 409.

- Boles, B., Thoendel, M., Roth, A., & Horswill, A. (2015). Identification of Genes Involved in Polysaccharide-Independent *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. *PLOS ONE*, 5(4), 1-9.
- Boles, B., Thoendel, M., Roth, A., & Horswill, A. (2010). Identification of Genes Involved in Polysaccharide-Independent *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. *PLoS ONE*, 5(4), 1-9.
- Bondarenko, O., Juganson, K., Ivask, A., Kasemets, K., Mortimer, M., & Kahru, A. (2013). Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. *Arch Toxicol*, 8(7), 1181–1200.
- Campoli, E., Di Bartolomeo, S., Grande, R., Di Giulio, M., & Cellini, L. (2010). Effects of Extremely Low-Frequency Electromagnetic Fields on *Helicobacter pylori* Biofilm. *Curr Microbiol*, 60, 412 - 418.
- Carron, M., Tran, V., Sugawa, C., & Coticchia, J. (2006). Identification of *Helicobacter pylori* Biofilms in Human Gastric Mucosa. *The Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 6, 72 - 78.
- Cervadoro, A., Giverso, C., Pande, R., Sarangi, S., Preziosi, L., Wosik, J., et al. (2013). Design Maps for the Hyperthermic Treatment of Tumors with Superparamagnetic Nanoparticles. *PLOS ONE*, 8(2), 1 - 14.
- Chakraborti, S., Bhattacharya, S., Chowdhury, R., & Chakrabarti, P. (2013). The Molecular Basis of Inactivation of Metronidazole-Resistant *Helicobacter pylori* Using Polyethyleneimine Functionalized Zinc Oxide Nanoparticles. *PLOS ONE*, 8(8), 1 - 9.
- Chatterjee, S., Bandyopadhyay, A., & Sarkar, K. (2011). Effect of iron oxide and gold nanoparticles on bacterial growth leading towards biological application. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(34), 1 - 7.
- Chertok, B., David, A., & Yang, V. (2010). Polyethyleneimine-modified iron oxide nanoparticles for brain tumor drug delivery using magnetic targeting and intra-carotid administration. *Biomaterials*, 31(24), 6317–6324.

- Chew, S., Kundukad, B., Seviour, T., van der Maarel, J., Yang, L., Rice, S., et al. (2014). Dynamic Remodeling of Microbial Biofilms by Functionally Distinct Exopolysaccharides. *MBIO*, 5(4), 1 -11.
- CHICEA, D. (2010). Nanoparticles and nanoparticle aggregates sizing by DLS and AFM. *OPTOELECTRONICS AND ADVANCED MATERIALS – RAPID COMMUNICATIONS*, 4(9), 1310 - 1315.
- CHICEA, D., INDREA, E., & CRETU, M. (2012). Assessing Fe₃O₄ nanoparticle size by DLS, XRD and AFM. *JOURNAL OF OPTOELECTRONICS AND ADVANCED MATERIALS*, 14(6), 460 - 466.
- Chifiriuc, M., Grumezescu, A., Andronescu, E., Ficai, A., Cotar, A., Grumezescu, V., et al. (2013). Water dispersible magnetite nanoparticles influence the efficacy of antibiotics against planktonic and biofilm embedded *Enterococcus faecalis* cells. *Anaerobe*, 22, 14-19.
- Chiu, W., Poisim, K., Cloke, M., Isa, D., Lim, H., Tan, T., et al. (2010). Heterogeneous Seeded Growth: Synthesis and Characterization of Bifunctional Fe₃O₄/ZnO Core/Shell Nanocrystals. *J. Phys. Chem*, 114, 8212 - 8218.
- Cho, W.-S., Kang, B.-C., Lee, J., Jeong, J., Che, J.-H., & Seok, S. (2013). Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration. *Particle and Fibre Toxicology*, 10(9), 1 - 9.
- Cho, W.-S., Duffin, R., Howie, S., Scotton, C., Wallace, W., MacNee, W., et al. (2011). Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of Zn²⁺ dissolution inside lysosomes. *Particle and Fibre Toxicology*, 8(27), 1 -16.
- Choi, S.-J., & Choy, J.-H. (2014). Biokinetics of zinc oxide nanoparticles: toxicokinetics, biological fates, and protein interaction. *International Journal of Nanomedicine*, 2, 261–269.
- Chwalibog, A., Sawosz, E., Hotowy, A., Szeliga, J., Mitura, S., Mitura, K., et al. (2015). Visualization of interaction between inorganic nanoparticles and bacteria or fungi. *International Journal of Nanomedicine*, 5, 1085–1094.

- Cotar, A., Grumezescu, A., Huang, K.-S., Voicu, G., Chifiriuc, C., & Radulescu, R. (2013). Magnetite nanoparticles influence the efficacy of antibiotics against biofilm embedded *Staphylococcus aureus* cells. *Biointerface research in applied chemistry*, 3(2), 559-565.
- Dissanayake, N., Current, K., & Obare, S. (2015). Mutagenic Effects of Iron Oxide Nanoparticles on Biological Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 23482-23516.
- Du, Y., Lai, P., Leung, C., & Pong, P. (2013). Design of Superparamagnetic Nanoparticles for Magnetic Particle Imaging (MPI). *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 18682-18710.
- Dunne, C., Dolan, B., & Clyne, M. (2014). Factors that mediate colonization of the human stomach by *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol*, 20(19), World J Gastroenterol.
- Dwivedi, S., Wahab, R., Khan, F., Mishra, Y., Musarrat, J., & Al-Khedhairi, A. (2014). Reactive Oxygen Species Mediated Bacterial Biofilm Inhibition via Zinc Oxide Nanoparticles and Their Statistical Determination. *PLOS ONE*, 9(11), 1 - 9.
- Folkesson, A., Haagensen, J., Zampaloni, C., Sternberg, C., & Molin, S. (2008). Biofilm Induced Tolerance towards Antimicrobial Peptides. *PLOS ONE*, 3(4), 1 - 11.
- FRANKELI, R. B., & BLAKEMORE, R. P. (2010). Precipitation of Fe₃O₄ in magnetotactic bacteria. *Nanoscale*, 2, 1 - 8.
- GAO, J., GU, H., & XU, B. (2009). Multifunctional Magnetic Nanoparticles: Design, Synthesis, and Biomedical Applications. *Accounts of chemical research*, 42(8), 1097-1107.
- García, A., Salas-Jara, M., Herrera, C., & González, C. (2014). Biofilm and *Helicobacter pylori* : From environment to human host. *World Journal Gastroenterology*, 20(19), 5632-5638.
- García, A., Salas-Jara, M., Herrera, C., & González, C. (2014). Biofilm and *Helicobacter pylori* : From environment to human host. *World J Gastroenterol*, 20(19), 5632-5638.
- Gaupp, R., Ledala, N., & Somerville, G. (2012). Staphylococcal response to oxidative stress. *CELLULAR AND INFECTION MICROBIOLOGY*, 2, 33 - 51.
- Gro, C., Büscher, K., Romanus, E., Helm, C., & Weitschies, W. (2002). CHARACTERIZATION OF A FERROFLUID BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY AND PHOTON

CORRELATION SPECTROSCOPY AFTER MAGNETIC FRACTIONATION. *European Cells and Materials*, 3(2), 163-166.

Gunalan, S., Sivaraj, R., & Rajendran, V. (2012). Green synthesized ZnO nanoparticles against bacterial and fungal pathogens. *Progress in Natural Science:Materials International*, 6(22), 693 - 701.

Hagymási, K., & Tulassay, Z. (2014). Helicobacter pylori infection: New pathogenetic and clinical aspects. *World J Gastroenterol*, 20(21), 6386-6399.

Hanley, C., Thurber, A., Hanna, C., Punnoose, A., Zhang, J., & Wingett, D. (2009). The Influences of Cell Type and ZnO Nanoparticle Size on Immune Cell Cytotoxicity and Cytokine Induction. *Nanoscale*, 4, 1409–1420.

Hauser, A., & Ozer, E. (2014). *Pseudomonas aeruginosa*. Massachusetts: Cubist Pharmaceuticals.

Hestvik, E., Tylleskar, T., Kaddu-Mulindwa, D., Ndeezi, G., Grahnquist, L., Olafsdottir, E., et al. (2010). RHesealriccho arbtcalecter pylori in apparently healthy children aged 0-12 years in urban Kampala, Uganda: a community-based cross sectional survey. *Gastroenterology*, 10(62), 147-230.

Hong, J.-S., Park, M.-K., Kim, M.-S., Lim, J.-H., Park, G.-J., Maeng, E.-H., et al. (2014). Effect of zinc oxide nanoparticles on dams and embryo–fetal development in rats. *International Journal of Nanomedicine*, 2, 145–157.

Hong, R., Zhang, S., Di, G., Li, H., Zheng, Y., Ding, J., et al. (2008). Preparation, characterization and application of Fe₃O₄/ZnO core/shell magnetic nanoparticles. *Materials Research Bulletin*, 43, 2457 - 2468.

Hussein-Al-Ali, S. H., El Zowalaty, M., Kura, A., Geilich, B., Fakurazi, S., Webster, T., et al. (2014). Antimicrobial and Controlled Release Studies of a Novel Nystatin Conjugated Iron Oxide Nanocomposite. *BioMed Research International*, 31, 1 -13.

Ierardi, E., Giorgio, F., Losurdo, G., Di Leo, A., & Principi, M. (2013). How antibiotic resistances could change Helicobacter pylori treatment: A matter of geography? *World J Gastroenterol*, 19(45), 8168-8180.

- Isolation and characterisation of putative adhesins from *Helicobacter pylori* with affinity for heparan sulphate proteoglycan. (n.d.).
- Issa, B., Obaidat, I., Albiss, B., & Haik, Y. (2013). Magnetic Nanoparticles: Surface Effects and Properties Related to Biomedicine Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*, 21266-21305.
- Jan, T., Iqbal, J., Ismail, M., Zakaullah, M., Naqvi, S., & Badshah, N. (2013). Sn doping induced enhancement in the activity of ZnO nanostructures against antibiotic resistant *S. aureus* bacteria. *International Journal of Nanomedicine*, *38*, 3679–3687.
- Kaittanis, C., Santra, S., & Perez, J. (2009). The role of nanoparticle valency in the nondestructive magneticrelaxation-mediated detection and magnetic isolation of cells in complex media. *J Am Chem Soc.*, *131*(35), 12780–12791.
- Khan, S., Ahamed, M., Musarrat, J., & Al-Khedhairi, A. (2014). Anti-biofilm and antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against the oral opportunistic pathogens *Rothia dentocariosa* and *Rothia mucilaginosa*. *Eur J Oral Sci*, *122*, 397–403.
- Kim, M.-H., Yamayoshi, I., Mathew, S., Liln, H., Nayfach, J., & Simon, S. (2013). Magnetic nanoparticle targeted hyperthermia of cutaneous *Staphylococcus aureus* infection. *Ann Biomed Eng*, *41*(3), 598–609.
- Kolhatkar, A., Jamison, A., Litvinov, D., Willson, R., & Lee, T. (2013). Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci*, *14*, 5977-16009.
- Kucheryavy, P., He, J., John, V., Maharjan, P., Spinu, L., Goloverda, G., et al. (2013). Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Variable Size and an Iron Oxidation State as Prospective Imaging Agents. *Langmuir*, *29*(2), 710–716.
- Kulkarni, R., Antala, S., Wang, A., Amaral, F., Rampersaud, R., LaRussa, S., et al. (2012). Cigarette Smoke Increases *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation via Oxidative Stress. *Infection and Immunity*, *80*(11), 3804–3811.

- Lin, W., Xu, Y., Huang, C.-C., Ma, Y., Shannon, K., Chen, D.-R., et al. (2009). Toxicity of nano- and micro-sized ZnO particles in human lung epithelial cells. *NANOPARTICLES AND OCCUPATIONAL HEALTH*, 11, 25–39.
- Lina, T., Alzahrani, S., Gonzalez, J., V Pinchuk, I., Beswick, E., & Reyes, V. (2014). Immune evasion strategies used by *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol*, 20(36), 12753-12766.
- Liu, L., Chen, B., Teng, F., Shi, L., Jing, N., Wang, L., et al. (2010). Effect of Fe₃O₄-magnetic nanoparticles on acute exercise enhanced KCNQ1 expression in mouse cardiac muscle. *International Journal of Nanomedicine*, 1, 109 - 106.
- López, J., Espinoza-Beltran, F., Zambrano, G., Gómez, M., & Prieto, P. (2012). Caracterización de nanopartículas magnéticas de CoFe₂O₄ y CoZnFe₂O₄ preparadas por el método de coprecipitación química. *Revista Mexicana de Física*, 58, 293–300.
- Lopez, J., Gonzalez, F., Bonilla, F., Zambrano, G., & Gomez, M. (2010). SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF Fe₃O₄ MAGNETIC NANOFUID. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 30, 60 - 66.
- Lu, J., Turnbull, L., M. Burke, C., Liu, M., Carter, D., Schlothauer, R., et al. (2014). Manuka-type honeys can eradicate biofilms produced by *Staphylococcus aureus* strains with different biofilm-forming abilities. *PeerJ*, 3, 1 -25.
- Lu, W., Liu, G., Gao, S., Xing, S., & Wang, J. (2008). Tyrosine-assisted preparation of Ag/ZnO nanocomposites with enhanced photocatalytic performance and synergistic antibacterial activities. *Nanotechnology*, 18(10), 1 -10.
- Lu, X., Weakley, A., Aston, D., Rasco, B., Wang, S., & Konkel, M. (2012). Examination of nanoparticle inactivation of *Campylobacter jejuni* biofilms using infrared and Raman spectroscopies. *Appl Microbiol*, 113(4), 952–963.
- Mahmoudi, M., Sahraian, M., Shokrgozar, M., & Laurent, S. (2011). Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Promises for Diagnosis and Treatment of Multiple Sclerosis. *Chemica Neuroscience*, 2, 118–140.

- Markides, H., Rotherham, M., & ElHaj, J. (2012). Biocompatibility and Toxicity of Magnetic Nanoparticles in Regenerative Medicine. *Journal of Nanomaterials*, 6, 1 - 10.
- McBain, S., Yiu, H., & Dobson, J. (2008). Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 2, 169 - 180.
- Myszka, K., & Czaczyk, K. (2013). Mechanisms Determining Bacterial Biofilm Resistance to Antimicrobial Factors. Poland: Poznań University of Life Sciences.
- Núñez-Anita, R., Acosta-Torres, L., Vilar-Pineda, J., Martínez-Espinosa, J., de la Fuente-Hernández, J., & Castaño, V. (2014). Toxicology of antimicrobial nanoparticles for prosthetic devices. *International Journal of Nanomedicine*, 4(9), 3999–4006.
- Oleastro, M., & Ménard, A. (2013). The Role of Helicobacter pylori Outer Membrane Proteins in Adherence and Pathogenesis. *Biology*, 2, 1110-1134.
- Ortega, J., Barrón-González, P., Gracia-Pinilla, M., Pérez, E., López-Aldrete, A., & Menchaca, J.-L. (2014). Biological samples observed in vitro by Atomic Force Microscopy: Morphology and Elastic Properties. *Microscopy: advances in scientific research and education*, 13, 131 - 141.
- Papavlassopoulos, H., Mishra, Y., Kaps, S., Paulowicz, I., Abdelaziz, R., Elbahri, M., et al. (2014). Toxicity of Functional Nano-Micro Zinc Oxide Tetrapods: Impact of Cell Culture Conditions, Cellular Age and Material Properties. *PLOS ONE*, 9(1), 1 - 13.
- Paraje, M. (2015). Antimicrobial resistance in biofilms. *Science against microbial pathogen*, 5, 1 - 8.
- Percival, S., & Suleman, L. (2014). Biofilms and Helicobacter pylori : Dissemination and persistence within the environment and host. *World Journal Gastrointest Pathophysiology*, 5(3), 122-132.
- Percival, S., & Suleman, L. (2014). Biofilms and Helicobacter pylori : Dissemination and persistence within the environment and host. *World J Gastrointest Pathophysiol*, 5(3), 122-132.

- Petrochenko, P., Skoog, S., Zhang, Q., Comstock, D., Elam, J., Goering, P., et al. (2013). Cytotoxicity of cultured macrophages exposed to antimicrobial zinc oxide (ZnO) coatings on nanoporous aluminum oxide membranes. *Biomatter*, 3(3), 1 -7.
- Pich, O., & Merrell, D. (2013). The ferric uptake regulator of *Helicobacter pylori*: a critical player in the battle for iron and colonization of the stomach. *Future Microbiol*, 8(6), 1 -22.
- Prabhu, Y., Rao, K., Kumari, B., Kumar, V., & Pavani, T. (2015). Synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles and its antibacterial application. *Int Nano Lett*, 5(8), 85 - 92.
- Ragab, D., & Rohani, S. (2013). Cubic Magnetically Guided Nanoaggregates for Inhalable Drug Delivery: In Vitro Magnetic Aerosol Deposition Study. *PharmSciTech*, 14(3), 973 - 993.
- Rahimi, M., Wadajkar, A., Subramanian, K., Yousef, M., Cui, W., Hsieh, J.-T., et al. (2010). In vitro evaluation of novel polymer-coated magnetic nanoparticles for controlled drug delivery. *Nanomedicine*, 6(5), 672–680.
- Rahimi, M., Wadajkar, A., Subramanian, K., Yousef, M., Cui, W., Hsieh, J.-T., et al. (2010). In vitro evaluation of novel polymer-coated magnetic nanoparticles for controlled drug delivery. *Nanomedicine*, 6(5), 672–680.
- Rana, S., & Kalaichelvan, P. (2013). Ecotoxicity of Nanoparticles. *Hindawi Publishing Corporation*, 5, 1 - 11.
- Rasmussen, J., Martinez, E., Louka, P., & Wingett, D. (2010). Zinc Oxide Nanoparticles for Selective Destruction of Tumor Cells and Potential for Drug Delivery Applications. *Expert Opin Drug Deliv*, 7(9), 1063–1077.
- Rekha, K., Nirmala, M., Manjula, G., & Anukaliani, A. (2010). Structural, optical, photocatalytic and antibacterial activity of zinc oxide and manganese doped zinc oxide nanoparticles. *Physica*, 405, 3180–3185.
- Roesler, B. M., Rabelo-Gonçalves, E. M., & Zeitune, J. M. (2014). Virulence Factors of *Helicobacter pylori*: A Review. *Clinical Medicine Insights: Gastroenterology*, 2, 1 -1 9.

ROMO, C. (2014). "EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS ÓXIDOS METÁLICOS TiO_2 , TiO_2-Ag y TiO_2-Fe^{+3} , NANOESTRUCTURADOS IN VITRO E IN VIVO". AGUASCALIENTES: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES.

Roychowdhury, A., Mishra, A., Pati, S., & Das, D. (2012). Synthesis and Characterization of Multifunctional Fe_3O_4-ZnO nanocomposite. *AIP Conference Proceedings*, 12(14), 283 - 284.

Ruiz-Bustos, E., Ochoa, L., Wadstrom, T., & Ascencio, F. (2001). ISOLATION AND CHARACTERISATION OF PUTATIVE ADHESINS FROM HELICOBACTER PYLORI WITH AFFINITY FOR HEPARAN SULPHATE PROTEOGLYCAN. *Journal of Microbiology*, 50, 215 - 222.

Sadeghi, L., Yousefi, B., & Espanani, H. (2015). Toxic effects of the Fe_2O_3 nanoparticles on the liver and lung tissue. *Journal Citation Reports*, 110(5), 373 – 378.

Salama, N., Hartung, M., & Müller, A. (2013). Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nat Rev Microbiol*, 11(6), Nat Rev Microbiol.

Sambanthamoorthy, K., Schwartz, A., Nagarajan, V., & O Elasri, M. (2008). The Role of *msa* in *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. *BMC Microbiology*, 147, 2180-8-221.

Sandhu, A., Handa, H., & Abe, M. (2010). Synthesis and applications of magnetic nanoparticles for biorecognition and point of care medical diagnostics. *Nanotechnology*, 21, 1 - 22.

Sathyanarayanan, M., Balachandranath, R., Srinivasulu, Y., Kannaiyan, S., & Subbiahdoss, G. (2013). The Effect of Gold and Iron-Oxide Nanoparticles on Biofilm-Forming Pathogens. *ISRN Microbiology*, 13, 1 -5.

Schwartz, M., Hunter, L., Huebner, M., Lieske, J., & Miller, V. (2009). Characterization of biofilm formed by human-derived nanoparticles. *Nanomedicine*, 4(8), 931–941.

Schwartz, M., Hunter, L., Huebner, M., Lieske, J., & Miller, V. (2009). Characterization of biofilm formed by human-derived nanoparticles. *Nanomedicine*, 4(8), 931–941.

- Seija, V. (2014). Género *Staphylococcus*. In UNAM (Ed.), *Etiopatogenia microbiológica* (pp. 257 - 271). México: Mc Grawll Hill.
- Seil, J., & Webster, T. (2012). Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 2767–2781.
- Seil, J., & Webster, T. (2012). Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. *International Journal of Nanomedicine*, 2(7), 2767–2781.
- Settles, M., Etzrodt, M., Kosanke, K., Schiemann, M., Zimmermann, A., Meier, R., et al. (2011). Different Capacity of Monocyte Subsets to Phagocytose Iron-Oxide Nanoparticles. *PLOS ONE*, 6(10), 1 - 9.
- Singh, S., Barick, K., & Bahadur, D. (2014). Inactivation of Bacterial Pathogens under Magnetic Hyperthermia using Fe₃O₄-ZnO Nanocomposite. *Powder Technology*, 14, 1 -27.
- Smith, S., O'Morain, C., & McNamara, D. (2014). Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori* in times of increasing antibiotic resistance. *World Journal Gastroenterology*, 20(29), 9912-9921.
- Stark, R., Gerwig, G., Pitman, R., Potts, L., Williams, N., Greenman, J., et al. (1999). Biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *Letters in applied microbiology*, 28, 12 -126.
- Stewart, P. (2002). Mechanism pf antibiotic resitance in bacterial biofilms. *Intenational Journal of Medic Microbiology*, 292, 1 - 7.
- Sun, J., Zhuo, S., Yang, Y., Weng, J., Li, X., & Li, M. (2016). Synthesis and characterization of biocompatible Fe₃O₄ nanoparticles. *Wiley InterScience*, 3(37), 333 - 343.
- Sutton, S. (2011). Determination of Inoculum for Microbiological Testing. *MICROBIOLOGY TOPICS*, 15, 49 - 54.
- Tartaj, P., Morales, M., Veintemillas-Verdaguer, S., González-Carreño, T., & Serna, C. (2003). The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *JOURNAL OF PHYSICS D: APPLIED PHYSICS*, 36, R182–R197.

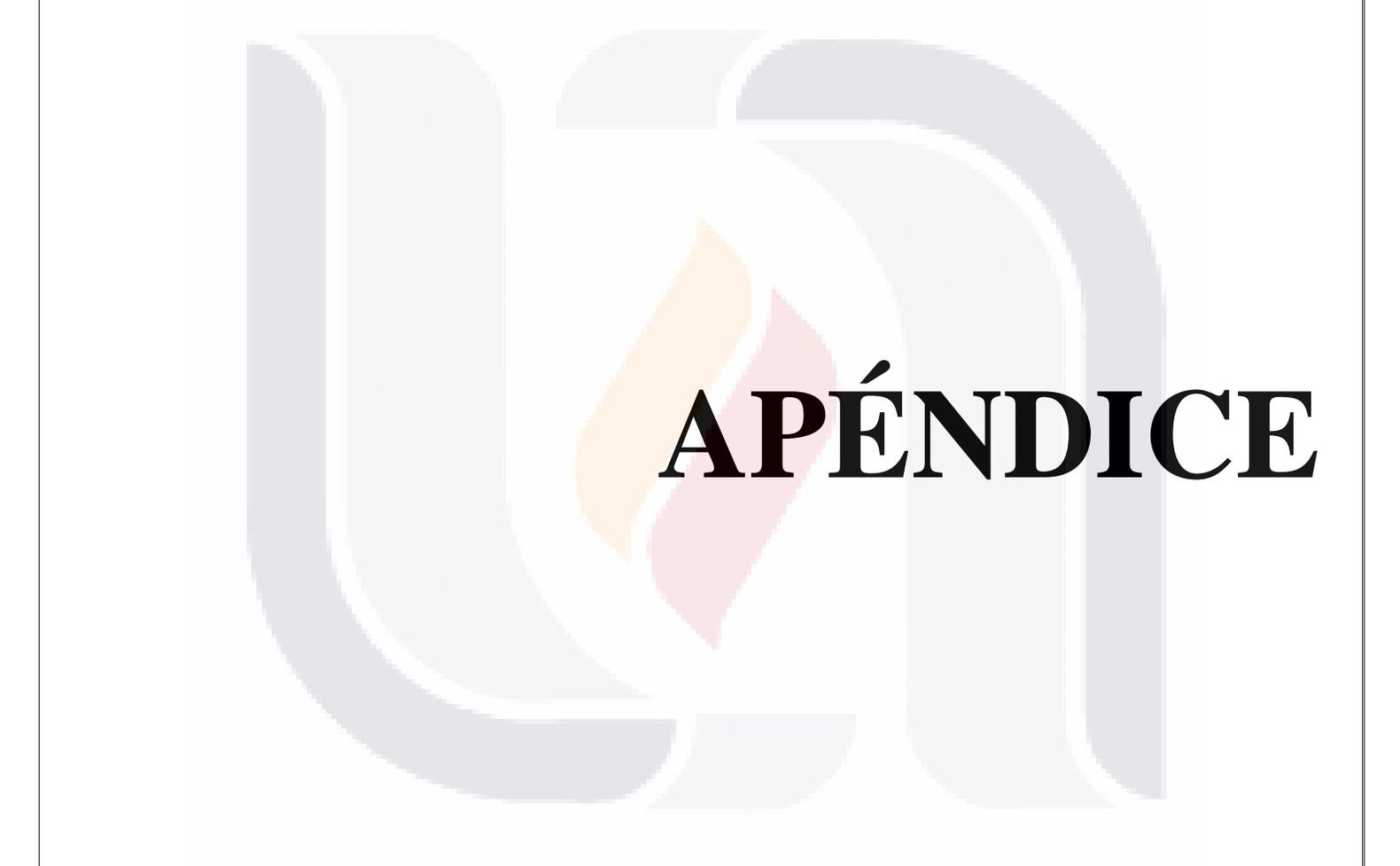
- Taylor, E., & Webster, T. (2009). The use of superparamagnetic nanoparticles for prosthetic biofilm prevention. *International Journal of Nanomedicine*, 4, 145–152.
- Testerman, T., & Morris, J. (2014). Beyond the stomach: An updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World J Gastroenterol*, 20(36), 12781-12808.
- Thomas, R., Park, I.-K., & Jeong, Y. (2013). Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Multimodal Imaging and Therapy of Cancer. *Int. J. Mol. Sci*, 14, 15910-15930;.
- Thurlow, L., Hanke, M., Fritz, T., Angle, A., Aldrich, A., Williams, S., et al. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo. *J Immunol*, 186(11), 6585–6596.
- Tran, N., Mir, A., Mallik, D., Sinha, A., Nayar, S., & Webster, T. (2010). Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Nanomedicine*, 5, 277–283.
- Tran, N., Mir, A., Mallik, D., Sinha, A., Nayar, S., & Webster, T. (2010). Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Nanomedicine*, 5, 277–283.
- Vaseem, M., Umar, A., & Hahn, Y.-B. (2010). ZnO Nanoparticles: Growth, Properties, and Applications. *American Scientific Publishers*, 5, 1 -36.
- Veisheh, O., Gunn, J., & Zhang, M. (2010). Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Adv Drug Deliv*, 62(3), 284–304.
- Wade, K. (2012). *Chemical Kinetics*. Chicago: Laboratory Kinetics.
- Wahajuddin, & Arora, S. (2012). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles:magnetic nanoplatforms as drug carriers. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 3445–3471.
- Watanabe, M., Yoneda, M., Morohashi, A., Hori, Y., Okamoto, D., Sato , A., et al. (2013). Effects of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles on A549 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 15546-15560.

- Wei, Y., Han, B., Hu, X., Lin, Y., Wang, X., & Deng, X. (2011). Synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles and their magnetic properties. *Procedia Engineering*, 27, 632 - 637.
- Win-Shwe, T.-T., & Fujimaki, H. (2011). Nanoparticles and Neurotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 6267-6280.
- Xiao, L., Liu, C., Chen, X., & Yang, Z. (2016). Zinc oxide nanoparticles induce renal toxicity through reactive oxygen species. *Food and Chemical Toxicology*, 90, 76e83.
- Xie, Y., He, Y., Irwin, P., Jin, T., & Shi, X. (2011). Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Zinc Oxide Nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 77(7), 2325–2331.
- Yallapu, M., Othman, S., Curtis, E., Gupta, B., Jaggi, M., & Chauhan, S. (2011). Multi-functional Magnetic Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging and Cancer Therapy. *Biomaterials*, 32(7), 1890–1905.
- Yamaoka, Y. (2010). Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 7(11), 629–641.
- Yang, L., Kuang, H., Zhang, W., Aguilar, Z., Xiong, Y., Lai, W., et al. (2014). Size Dependent Biodistribution and Toxicokinetics of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles in Mice. *Nanoscale*, 7, 1 - 45.
- Yang, X., Shao, H., Liu, W., Gu, W., Shu, X., Mo, Y., et al. (2015). Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress are involved in ZnO nanoparticle-induced hepatotoxicity. *Toxicology Letters*, 234, 40 - 49.
- Yi, N., Liu, Q., Liu, J., He, B., Cui, L., Li, Z., et al. (2013). Silver Nanoparticle Exposure Attenuates the Viability of Rat Cerebellum Granule Cells through Apoptosis Coupled Rat Cerebellum Granule Cells through Apoptosis Coupled Rat Cerebellum Granule Cells through Apoptosis Coupled to Oxidative Stress. *SMALL NANO MICRO*, 9(9), 1831 - 1841.
- Yigit, M., Moore, A., & Medarova, Z. (2012). Magnetic Nanoparticles for Cancer Diagnosis and Therapy. *Pharm Res.*, 25(5), 1180–1188.

Yonezawa, H., Osaki, T., Hanawa, T., Kurata, S., Ochiai, K., & Kamiya, S. (2013). Impact of *Helicobacter pylori* Biofilm Formation on Clarithromycin Susceptibility and Generation of Resistance Mutations. *PLO ONE*, 8(9), 1 -9.

Yonezawa, H., Osaki, T., Hanawa, T., Kurata, S., Ochiai, K., & Kamiya, S. (2013). Impact of *Helicobacter pylori* Biofilm Formation on Clarithromycin Susceptibility and Generation of Resistance Mutations. *PLOS ONE* /, 8(9), 1 - 9.

Yonezawa, H., Osaki, T., Kurata, S., Fukuda, M., Kawakami, H., Ochiai, K., et al. (2009). Outer Membrane Vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are Involved in Biofilm Formation. *Microbiology*, 9(197), 1 -12.



APÉNDICE

• PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Preparación del medio de cultivo Agar Sangre C/S antibiótico

| Reactivos | Cantidad |
|-------------------|----------|
| Agar Base Sangre | 12 gr |
| Sangre de borrego | 24 mL |
| Vancomicina | 5 mg |
| Cefosolodina | 2.5 mg |
| Anfotericina | 2.5 mg |
| Agua destilada | 240 mL |
| pH de la solución | 7.2 |

Preparación del medio de cultivo ICC / ICC suplementado

| Reactivos | Cantidad |
|--------------------------------|----------|
| Caldo Infusión Cerebro Corazón | 8 gr |
| Glucosa | 3 gr |
| Agua destilada | 100 mL |
| pH de la solución | 7.4 |

Preparación de PBS 1X

| Reactivos | Cantidad |
|--------------------|----------|
| Fosfato monobásico | 190 ml |
| Fosfato Bibásico | 810 ml |

Preparación del Reactivo de Safranina

| Reactivos | Cantidad |
|----------------|----------|
| Safranina | 10 mg |
| Agua destilada | 100 mL |

Solución de lavado

| Reactivos | Cantidad |
|----------------|----------|
| Procaina | 2 gr |
| Heparina | 3 mL |
| NaCl | 8 gr |
| Agua destilada | 1000 mL |

Solución de Fijado

| Reactivos | Cantidad |
|--------------------|----------|
| Fosfato monobásico | 90 ml |
| Fosfato Bibásico | 810 ml |
| Formaldehido | 100 ml |

Tinción HE

| Reactivos | Tiempo (min) |
|--------------------|--------------|
| Xilol | 1 |
| Etanol 100% | 1 |
| Etanol 100% | 1 |
| Etanol 96% | 1 |
| Agua Destilada | 1 |
| Hematoxilina | 3 |
| Hematoxilina | 3 |
| Agua | 1 |
| Agua | 1 |
| Carbonato de litio | 1 |
| Agua | 1 |
| Etanol 96% | 1 |
| Eosina | 3 |
| Etanol 96% | 1 |
| Etanol 96% | 1 |
| Etanol 96% | 1 |
| Etanol 100% | 1 |
| Etanol 100% | 1 |
| Xilol | 1 |
| Xilol | 1 |
| Xilol | 1 |

Determinación Glucosa Clima Plus

1. Condiciones del ensayo:

Longitud de onda: 505 nm (490-550)

Temperatura. 37°C / 15-25°C

2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
3. Mezclar en tubo de ensaye

| | Blanco | Patrón | Muestra |
|---------------|--------|--------|---------|
| Reactivo (mL) | 1 | 1 | 1 |
| Patrón (µL) | -- | 1 | -- |
| Muestra (µL) | -- | -- | 1 |

4. Mezclar e incubar 10 minutos a 37°C o 30 min a temperatura ambiente (15-25°C).
5. Realizar lectura en equipo.

Determinación Creatinina Clima Plus

1. Condiciones del ensayo:

Longitud de onda: 492 nm (490 – 510)

Temperatura..... 37°C / 15-25°C

2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a blanco reactivo.
3. Mezclar en tubo de ensaye

| | Blanco | Patrón | Muestra |
|---------------|--------|--------|---------|
| Reactivo (mL) | 1 | 1 | 1 |
| Patrón (µL) | -- | 100 | -- |
| Muestra (µL) | -- | -- | 100 |

4. Mezclar e incubar 1 minuto a 37°C o 3 min a temperatura ambiente (15-25°C).
5. Realizar lectura en equipo.

Determinación Albumina Clima Plus

1. Condiciones del ensayo:

Longitud de onda: 600 nm

Temperatura. 37°C / 15-25°C

2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
3. Mezclar en tubo de ensaye

| | Blanco | Patrón | Muestra |
|---------------|--------|--------|---------|
| Reactivo (mL) | 1 | 1 | 1 |
| Patrón (µL) | -- | 1 | -- |
| Muestra (µL) | -- | -- | 1 |

4. Mezclar e incubar 1 minutos a 37°C o 10 min a temperatura ambiente (15-25°C).
5. Realizar lectura en equipo.

Determinación TGO Clima Plus

1. Condiciones del ensayo:

Longitud de onda: 340 nm

Temperatura. 37°C

2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
3. Mezclar en tubo de ensaye

| | Blanco | Patrón | Muestra |
|---------------|--------|--------|---------|
| Reactivo (mL) | 1 | 1 | 1 |
| Patrón (µL) | -- | 100 | -- |
| Muestra (µL) | -- | -- | 100 |

4. Mezclar e incubar 3 minutos a 37°C
5. Realizar lectura en equipo.

Determinación TGP Clima Plus

1. Condiciones del ensayo:

Longitud de onda: 340 nm

Temperatura. 37°C

2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
3. Mezclar en tubo de ensaye

| | Blanco | Patrón | Muestra |
|---------------|--------|--------|---------|
| Reactivo (mL) | 1 | 1 | 1 |
| Patrón (µL) | -- | 100 | -- |
| Muestra (µL) | -- | -- | 100 |

4. Mezclar e incubar 3 minutos a 37°C
5. Realizar lectura en equipo.

Determinación Bilirrubina Total y Directa Clima Plus

1. Condiciones del ensayo:

Longitud de onda: 555 nm

Temperatura. 25°C

2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
3. Mezclar en tubo de ensaye

| | Blanco | B. total | Blanco | B. directa |
|---------------------------|--------|----------|--------|------------|
| Reactivo 1 (Directa) (mL) | -- | -- | 1.5 | 1.5 |
| Reactivo 2 (Total) (mL) | 1.5 | 1.5 | -- | -- |
| R3 (µL) | -- | 50 | -- | 50 |
| Muestra | 100 | 100 | 100 | 100 |

4. Mezclar e incubar 3 minutos a 37°C
5. Realizar lectura en equipo.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

**DEPARTAMENTOS DE QUÍMICA, MICROBIOLOGÍA, MATEMÁTICAS Y
FÍSICA**

**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA
TOXICIDAD Y BIOACTIVIDAD DE MATERIALES NANO-
ESTRUCTURADOS DE ZnO, Fe₃O₄ Y ZnO@Fe₃O₄**

PRESENTA:

LAQB. CÉSAR EDUARDO DÍAZ DE LEÓN MACÍAS

PARA OBTENER EL GRADO EN:

MAESTRO EN CIENCIAS: AREÁ DE TOXICOLOGÍA

TUTOR:

Dra. en C. ILIANA ERNESTINA MEDINA RAMÍREZ

ASESORES:

Dr. en C. RODLFO GONZÁLEZ SEGOVIA;

Dr. en C. JORGE EDUARDO MACÍAS DÍAZ

Aguascalientes, Ags. 21 de noviembre de 2016