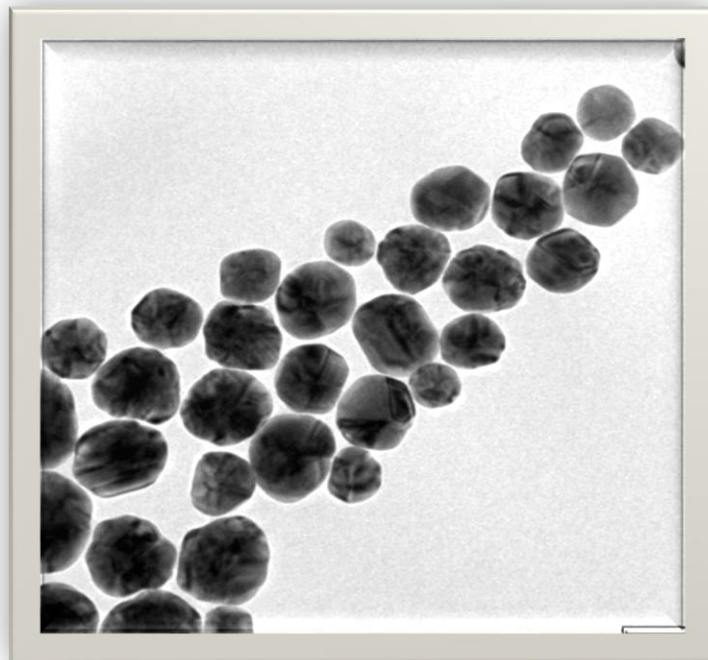




UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

NANOTECNOLOGÍA Y SUS POTENCIALES APLICACIONES EN MICROBIOLOGÍA



AMIN OUAHID HESSISEN



UNIVERSIDAD DE SEVILLA. FACULTAD DE FARMACIA

Trabajo Fin de Grado. Grado en Farmacia.

Revisión bibliográfica

NANOTECNOLOGÍA Y SUS POTENCIALES APLICACIONES EN MICROBIOLOGÍA

Alumno: Ouahid Hessissen, Amin

Tutor: Tahrioui, Ali

Departamento de Microbiología y Parasitología

Sevilla, a 4 de julio de 2016.

Índice

Resumen

1	Introducción	1
2	Objetivos	2
3	Metodología	2
4	Resultados y discusión	4
4.1	Introducción a la nanotecnología y nanociencia	4
4.1.1	Breve historia, concepto y definición de la nanotecnología y nanociencia	4
4.1.2	Concepto de nanopartícula	6
4.2	Biosíntesis de nanopartículas por microorganismos	7
4.2.1	Nanopartículas sintetizadas por bacterias	9
4.2.2	Nanopartículas sintetizadas por levaduras	11
4.2.3	Nanopartículas sintetizadas por hongos	11
4.2.4	Nanopartículas sintetizadas por virus	12
4.2.5	Mecanismos de biosíntesis de nanopartículas por microorganismos a nivel de laboratorio	12
4.3	Principales aplicaciones de la nanotecnología en el campo de la microbiología	14
4.3.1	Uso de las nanopartículas como agentes antimicrobianos	15
4.3.1.1	Aplicación de las nanopartículas en el tratamiento de aguas	15
4.3.1.2	Aplicación de las nanopartículas antimicrobianas en clínica	16
4.3.1.3	Aplicación de las nanopartículas en la industria alimentaria	19
4.3.1.4	Nanopartículas para combatir la resistencia a antibióticos	19
4.3.2	Detección de microorganismos mediante biosensores compuestos por nanopartículas	21
5	Conclusiones	24
6	Bibliografía	26

Resumen

Tanto la nanotecnología como la nanociencia tratan sobre el estudio de materiales y objetos a escala nanométrica. Los nanoobjetos y nanomateriales están constituidos por nanopartículas (NPs). Las NPs son aquella parte diminuta de la materia que presentan una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 nm y 100 nm. La síntesis de NPs se puede llevar a cabo mediante métodos físicos, químicos o biológicos. Estos últimos son respetuosos con el medio ambiente y evitan la producción de químicos tóxicos que en la mayoría de los casos resultan perjudiciales para la salud. Además los métodos biológicos son ventajosos en cuanto a su rentabilidad y bajo consumo energético. Las NPs pueden ser sintetizadas por distintos tipos de microorganismos incluyendo bacterias, levaduras, hongos y virus. Los microorganismos son capaces de sintetizar NPs metálicas, NPs compuestas por óxidos, y NPs con propiedades semiconductoras. En el ámbito de la microbiología, las NPs presentan aplicaciones en áreas muy diversas tales como el tratamiento de aguas (inhibiendo el crecimiento de microorganismos y la formación de biofilms), la microbiología alimentaria (evitando el desarrollo de microorganismos causantes de contaminación alimentaria), la detección de microorganismos (a través de ensayos inmunológicos basados en reacciones específicas antígeno-anticuerpo se puede detectar la presencia de microorganismos en distintas muestras de analito), entre otras. Las NPs se emplean también en el campo clínico como antimicrobianos y para combatir la resistencia a antibióticos debido a su mecanismo de acción particular que difiere de los antibióticos convencionales. Los mecanismos de acción a través de los cuales las NPs actúan como antimicrobianos son muy variados.

Palabras clave: nanociencia, nanotecnología, nanopartículas (NPs), aplicaciones microbiológicas, acción antimicrobiana.

1 Introducción

La nanotecnología es la disciplina científica que se encarga de controlar y caracterizar los átomos y moléculas en el rango dimensional de 1 a 100 nm, con el fin de obtener materiales, dispositivos, y sistemas con nuevas propiedades y funciones debido a su reducida dimensión. Los objetos de tamaño nanométrico son de cien a diez mil veces más pequeños que las células de los mamíferos.

La nanotecnología es uno de los campos que despierta mayor interés en la investigación mundial del siglo XXI. Gracias a sus avances se han desarrollado productos a partir de nanomateriales cuyo objetivo es sustituir materiales y reactivos químicos que puedan resultar costosos o dañinos para el ambiente. Por lo general, son estructuras elaboradas artificialmente a base de carbono y metales como oro, plata, cadmio y selenio, entre otros.

Dentro de un contexto multidisciplinario, uno de los objetivos principales de la nanotecnología es promover el desarrollo humano y mejorar la calidad de vida. La nanotecnología presenta aplicaciones en diversas áreas que incluyen ingeniería, electrónica, medicina, industria farmacéutica, microbiología y medio ambiente, entre otras. Esta nueva disciplina científica proporciona nuevas soluciones en el diagnóstico y prevención del crecimiento de microorganismos, el tratamiento de enfermedades, etc.

La revisión bibliográfica se propuso debido al interés científico que ha despertado la nanotecnología en estos últimos años. Las nanotecnologías juegan un papel fundamental a la hora de abordar los retos identificados en la estrategia de Horizonte 2020 (proyecto de investigación e innovación de la unión europea) para un crecimiento inteligente, sostenible e inclusivo. La financiación para la investigación mundial de nanotecnologías se ha duplicado en los últimos años, pasando de 6.500 millones de euros en 2004 a aproximadamente 12.500 millones de euros en 2008. La participación de la Unión Europea en este dato global ha sido de aproximadamente un cuarto

2 Objetivos

En la última década se han producido enormes avances en el campo de la nanotecnología, de las nanopartículas (NPs) producidas por microorganismos, y sus potenciales aplicaciones. En esta revisión bibliográfica se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Definir los conceptos de nanotecnología, nanociencia, y NPs.
2. Describir los distintos tipos de NPs biosintetizadas por microorganismos.
3. Exponer las principales aplicaciones potenciales de la nanotecnología relacionadas con el área de microbiología.

3 Metodología

Para llevar a cabo este trabajo de revisión bibliográfica que tiene como título “Nanotecnología y sus potenciales aplicaciones en microbiología” se ha llevado a cabo inicialmente una estrategia de búsqueda actualizada en la literatura científica a través del portal web de la biblioteca de la universidad de Sevilla (<http://fama.us.es/>). Las fuentes utilizadas han sido fundamentalmente bases de datos y motores de búsqueda bibliográfica.

A continuación se indica el listado de los recursos empleados para dicho trabajo:

- Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>); es un sistema de búsqueda que ha sido desarrollado por el centro nacional de investigación biotecnológica (NCBI) en la librería nacional de medicina (NLM). Es una base de datos de libre acceso que contiene literatura sobre biomedicina y ciencias de la vida.
- ScienceDirect (<http://www.sciencedirect.com/>); es una base de datos revisada por expertos que contiene libros electrónicos, revistas y títulos que abarcan los campos de la ciencia, tecnología, y medicina.
- Scopus (<https://www.scopus.com/>); es una de las mayores bases de datos de resúmenes. Está especializada en los campos de ciencia, tecnología, medicina, ciencias sociales, artes y humanidades.

- Mendeley (<https://www.mendeley.com/>); es a la vez un gestor de referencias bibliográficas, un lector de PDF, un sistema para almacenar y organizar documentos, un buscador de información científica y una red social académica en la que compartir citas bibliográficas y publicaciones.
- Google Scholar (<https://scholar.google.es/>); es una página web que proporciona acceso a artículos, tesis, libros y resúmenes de las editoriales académicas, sociedades profesionales, depósitos en línea, universidades y otros sitios webs.
- Hindawi Publishing Corporation (<http://www.hindawi.com/>); es una editorial comercial de revistas especializadas que cubren una amplia gama de disciplinas académicas.

Como criterios generales de selección de artículos y/o informes, se ha tenido en cuenta la fecha de publicación de los mismos, evaluándose así la bibliografía más reciente y actualizada.

Para ello se han utilizado las siguientes palabras clave: “Nanotechnology; Nanoscience; Nanoparticles; Antimicrobial nanoparticles; Microbiology; Microorganisms; Nanosensor; Nanoparticle biosynthesis; y Applications of nanoparticles”.

Se han seleccionado inicialmente los documentos que aportaban una visión general sobre el tema. Para ir profundizando en las aplicaciones más específicas se consultó además la bibliografía citada por los autores en los trabajos originales.

Los documentos consultados en la búsqueda bibliográfica fueron ensayos clínicos, artículos y revisiones publicadas en los últimos 10 años. Además se han consultado tesis doctorales y libros.

4 Resultados y discusión

4.1 Introducción a la nanotecnología y nanociencia

4.1.1 Breve historia, concepto y definición de la nanotecnología y nanociencia

La nanotecnología trata sobre las diferentes estructuras de la materia con dimensiones del orden de una milmillonésima parte de un metro. No queda claro en qué momento los humanos comenzaron a aprovechar las ventajas de los materiales de dimensiones nanométricas. Se sabe que en el siglo IV a.C. los vidrieros romanos fabricaban cristales que contenían metales nanométricos. En el Museo Británico de Londres se puede ver un utensilio de ese periodo, llamado la ‘copa de Licurgo’, que contiene nanopartículas (NPs) de oro y plata (Figura 1). El color de la copa varía de verde a rojo intenso cuando se le introduce una fuente luminosa en el interior. También la gran variedad de colores de las vidrieras de las catedrales se deben a la presencia de NPs metálicas en el vidrio. En 1857, Michael Faraday publicó un artículo en la revista transacciones filosóficas de la sociedad real (*Philosophical Transactions of the Royal Society*), en el que trató de explicar cómo las NPs metálicas influyen en el color de las ventanas de las iglesias (Faraday, 1857).



Figura 1. Fotografía de la ‘copa de licurgo’ situada en el museo británico de Londres. Se pueden apreciar diferentes colores en función de la iluminación (a) externa o (b) interna (Horikoshi and Serpone, 2013).

En los años 60 se desarrollaron fluidos magnéticos denominados ferrofluidos, que consisten en NPs magnéticas dispersadas en fluidos. El concepto de nanotecnología fue propuesto en 1974 por el japonés Norio Taniguchi, profesor de la universidad de

ciencias en Tokio. No fue hasta los años 80, con la aparición de los métodos apropiados para fabricar nanoestructuras, cuando tuvo lugar un crecimiento notable de la actividad de investigación. En esta misma década, G. K. Binning y H. Rohrer, en el laboratorio de investigación de IBM en Zurich, desarrollaron la microscopía de barrido efecto de túnel, por lo que recibieron el premio nobel en 1986 (Poole and Owens, 2003). La microscopía de barrido efecto de túnel permitió en su época observar la estructura de la materia en dimensiones nanométricas. En los años 90, Iijima obtuvo nanotubos de carbono y descubrió las propiedades de superconductividad y ferromagnetismo. En esta misma década, se demostró el efecto de campo en un transistor basado en nanotubos de carbono. La producción industrial de nanomateriales vio sus orígenes a inicios del siglo XX. Las NPs de negro de carbón o negro de humo que se obtienen del petróleo, se emplearon para sintetizar neumáticos de caucho en la industria automovilística debido a diversas propiedades, entre ellas, la reducción en peso, resistencia al impacto, y estabilidad térmica. En 1996 varias agencias gubernamentales, bajo la dirección de la ‘Organización Nacional de Ciencias’ (National Science Foundation), organizaron un estudio para evaluar el estado actual de la nanotecnología. A partir de este estudio se concluyó que era necesaria una mayor financiación para que la investigación nanotecnológica siga siendo fructífera. En el año 2000 se creó en Estados Unidos la iniciativa nacional nanotecnológica (National Nanotechnology Initiative). Las altas perspectivas que se empezaron a generar en torno a la nanotecnología dieron lugar al anuncio de una inversión de 497 millones de dólares por el gobierno de los Estados Unidos en 2001 (Horikoshi and Serpone, 2013).

El premio nobel en física Richard Feynman es considerado el padre de la nanotecnología. En 1959 presentó en la Sociedad Americana de Física una conferencia titulada “Hay bastante espacio en el fondo” (“There is a plenty of room at the bottom”) donde especuló sobre las posibilidades de los materiales nanométricos. Feynman exploró la posibilidad de manipular el material en la escala de átomos individuales y moléculas, introduciendo la capacidad creciente de examinar y controlar el material a escalas nanométricas (Feynman, 1960).

La nanotecnología se puede definir como el diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a escala nanométrica (Dowling et al., 2004).

La nanociencia es el estudio de la materia a nivel del nanómetro, escala en la cual las propiedades físicas y químicas de los sistemas difieren de las de los sistemas macroscópicos, convirtiéndolas en únicas (Dowling et al., 2004).

En definitiva, los términos nanotecnología y nanociencia engloban un conjunto de conocimientos y tecnologías comunes en varias disciplinas científicas tradicionales (química, física, tecnología, medicina, ciencias biológicas y ciencias ambientales). Todas ellas tienen en común la dimensión nanométrica de los objetos estudiados. A estos objetos de dimensión nanométrica se les denomina nanopartículas (NPs).

4.1.2 Concepto de nanopartícula

El prefijo nano- procede del latín “nanus” y significa enano. En la ciencia y tecnología se utiliza el sistema internacional de unidades (SI) que emplea el término nano para indicar un factor de 10^{-9} . Un nanómetro (nm) es la milmillonésima parte de un metro, lo que equivale a un tamaño de decenas de miles de veces más pequeño que el diámetro de un cabello humano.

Las NPs son partículas nanoscópicas compuestas por átomos y moléculas cuyas dimensiones son inferiores a 100 nm (Figura 2). Incluyen nanocristales, dendrímeros y puntos cuánticos. A su vez, se pueden dividir en NPs de primera generación (entre 100 y 10 nm) y las de segunda generación (entre 10 y 1 nm). El interés que presentan las NPs se basa en que la reducción de tamaño lleva aparejada nuevas propiedades no presentes normalmente en sus homólogos macroscópicos. Entre estas nuevas propiedades son las siguientes:

- Al reducir el tamaño se permite sintetizar estructuras con mayor relación superficie-volumen, es decir hay mayor cantidad de átomos o moléculas superficiales por unidad de volumen.

- Aparecen propiedades propias de sistemas de tamaño reducido, efecto del tamaño cuántico, ya que están constituidos por un pequeño número de átomos o moléculas. Los efectos cuánticos dominan el comportamiento de la materia a escala nanométrica, afectando a sus propiedades ópticas, eléctricas y magnéticas.

- La forma en la que se distribuyen las moléculas da lugar a diferencias importantes en cuanto a las propiedades mecánicas.

- Las NPs presentan mayor área superficial en comparación con su análogo macroscópico en volumen, por lo que se considera que al disminuir el tamaño se obtiene un nuevo material. Esto hace, que el material sea más reactivo.

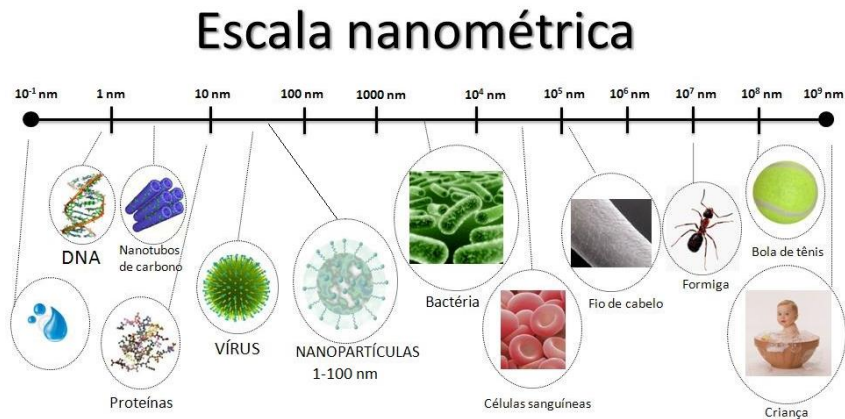


Figura 2. Diferentes estructuras con su tamaño característico y rango de dimensiones que trabaja habitualmente la nanotecnología, entre los 0,1-100 nm. (Imagen editada de (<http://enigmacuantico.com/2015/07/06/como-nos-controlan-nanotecnologia-parte-3/>))

4.2 Biosíntesis de nanopartículas por microorganismos

Las nanopartículas (NPs) se pueden sintetizar mediante diferentes métodos que se pueden clasificar en dos grandes grupos: métodos de síntesis basados en enfoques “bottom-up” y métodos de síntesis basados en enfoques “top-down” (Figura 3). Por una parte, en los denominados métodos “bottom-up” se construyen estructuras complejas a partir de otras más simples mediante, por ejemplo, técnicas de autoensamblado. Por otra parte, en los métodos “top-down” se parte de sistemas de complejidad o tamaño mayores y éstos se van reduciendo hasta alcanzar las dimensiones deseadas. Los métodos más usados, por su rapidez, simpleza y por la calidad de las nanoestructuras obtenidas, son los métodos “bottom-up” (Flores, 2014; Trepiana, 2015).

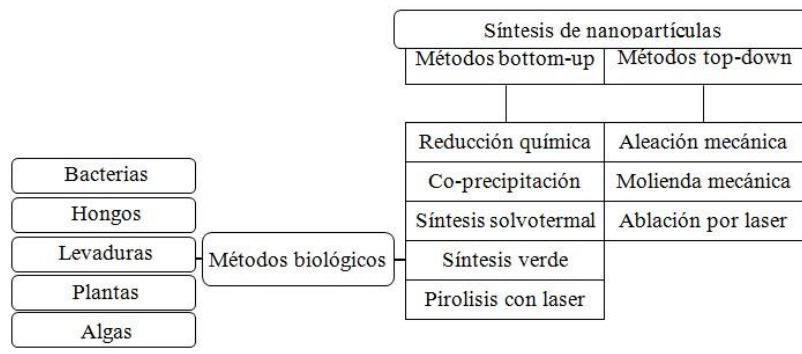


Figura 3. Métodos empleados para la síntesis de NPs (Makarov et al., 2014).

Los métodos utilizados para la obtención de NPs se pueden clasificar también en métodos químicos (reducción del metal, síntesis electroquímica, micelas y micro emulsiones), físicos (condensación con un gas inerte, corte por láser, pirolisis), biológicos (uso de microorganismos como factorías para la síntesis de NPs), o híbridos (una mezcla de los métodos anteriores).

En la literatura se describen un gran número de métodos físicos, químicos, biológicos e híbridos que permiten sintetizar distintos tipos de NPs (Pal et al., 2011). Los métodos físicos y químicos son los más empleados en la síntesis de NPs debido a su potencial para controlar adecuadamente el tamaño, la distribución de tamaño y la forma de las NPs. En los métodos químicos de síntesis de NPs se utilizan agentes reductores y estabilizadores que en ocasiones resultan tóxicos y contaminantes peligrosos que son perjudiciales tanto para el medio ambiente como para la salud humana lo que limita en gran medida sus aplicaciones biomédicas (Zhang et al., 2011). Por lo tanto, el desarrollo de métodos fiables, no tóxicos y respetuosos con el medio ambiente para la síntesis de las NPs es de suma importancia para ampliar sus aplicaciones biomédicas (Li et al., 2011). Una de las opciones para alcanzar este objetivo es el uso de microorganismos para sintetizar NPs mediante procesos enzimáticos (Bhattacharya and Mukherjee, 2008).

En estos últimos años se están empleando los métodos biológicos de síntesis de NPs como alternativa a los métodos clásicos debido a las enormes ventajas que ofrecen (Makarov et al., 2014). Numerosos estudios han descubierto que muchos

microorganismos pueden producir NPs (Tabla 1) (Li et al., 2011; Moghaddam et al., 2015; Zhang et al., 2011).

Tabla 1. Principales tipos de microorganismos productores de NPs (Zhang et al., 2011).

Microorganismos	Nanopartículas	Tamaño (nm)
Bacterias		
<i>Bacillus subtilis</i>	Oro	5-25
	Plata	5-60
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Plata	35-46
<i>Clostridium thermoaceticum</i>	Sulfuro de cadmio	20-200
<i>Idiomarina sp</i>	Plata	26
<i>Pseudomonas sp.</i>	Plata	20-100
<i>Halomonas salina</i>	Oro	30-100
Levaduras		
<i>Candida glabrata</i>	Sulfuro de cadmio	2-12
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Sulfuro de cadmio	1-2
MKY3	Plata	2-5
Hongos		
<i>Verticillium sp.</i>	Plata	25
<i>Fusarium oxysporum</i>	Aleación oro-plata	8-14

4.2.1 Nanopartículas sintetizadas por bacterias

Las bacterias son las que más se han usado para la biosíntesis de nanopartículas (NPs). Los primeros estudios revelan que *Bacillus subtilis 168* es capaz de reducir iones de oro (Au^{3+}) para producir intracelularmente NPs de oro con un tamaño que oscila entre 5 y 25 nm por incubación de las células bacterianas con cloruro de oro (AuCl_3) (Southam and Beveridge, 1996).

La plata es un mineral altamente tóxico para la mayoría de las células microbianas. Sin embargo, se ha descubierto que varias cepas bacterianas son resistentes a la plata e incluso son capaces de acumular hasta un 25% de plata en la pared celular respecto a su peso en seco, lo que sugiere su uso para la recuperación industrial de plata a partir del mineral en sí (Silver, 2003). La cepa bacteriana

Pseudomonas stutzeri AG259, aislada de minas de plata, acumula NPs de plata en la célula con un tamaño medio que oscila entre 35 y 46 nm. También se ha descrito la síntesis de NPs de plata en bacterias halófilas tales como *Idiomarina sp*, que sintetiza intracelularmente NPs de plata con un tamaño medio de 26 nm. *Pseudomonas sp.* 591786 también es capaz de sintetizar NPs de plata con un rango de tamaño que varía entre 20 y 100 nm. *Halomonas salina* produce NPs de oro de manera extracelular con morfología variante en función de si se encuentra en medios ácidos o básicos. Esta síntesis, como también ocurre en otras NPs metálicas, es dependiente de cofactores, en este caso, NADH y la enzima nitrato reductasa.

Las NPs se depositan dentro del espacio periplásmico de las bacterias. El crecimiento celular y las condiciones de incubación de metal pueden ser las razones de la formación de diferentes tamaños de partículas. Aún no se han elucidado los mecanismos de reacción que conducen a esta especie bacteriana a la formación de NPs. La capacidad de los microorganismos para crecer en presencia de concentraciones altas de metal podría ser el resultado de mecanismos específicos de resistencia, tales como los sistemas de flujo de salida, la alteración de la solubilidad y toxicidad por los cambios en el estado redox de los iones metálicos, formación de complejos extracelulares o precipitación de los metales. Recientemente se ha descubierto que las NPs de plata producidas por *P. stutzeri* pueden ser tratadas térmicamente y producir un nanomaterial denominado “cermet” con propiedades ópticas interesantes para su aplicación en la creación de lentes para microscopios, sensores, entre otros instrumentos (Joerger et al., 2000).

Clostridium thermoaceticum es capaz de sintetizar NPs de sulfuro de cadmio en la superficie celular, en presencia de cloruro de cadmio (CdCl_2) y cisteína en el medio de crecimiento (Mandal et al., 2006). Además de las NPs de oro y plata, hay mucha atención puesta en el desarrollo de protocolos para la síntesis de semiconductores (los llamados puntos cuánticos), tales como sulfuro de cadmio (CdS), sulfuro de zinc (ZnS) y sulfuro de plomo (PbS). Estos puntos cuánticos luminiscentes están surgiendo como una nueva clase de materiales para la detección biológica (se conjugan puntos cuánticos semiconductores con moléculas de biorreconocimiento) y la creación de imágenes celulares (Chan et al., 2002).

4.2.2 Nanopartículas sintetizadas por levaduras

Las cepas de levadura presentan varios aspectos positivos que favorecen la síntesis de NPs. Además de su rápido crecimiento en medios de cultivo, son capaces de producir gran cantidad y variedad de enzimas. Estas enzimas permanecerán dentro de la célula o serán expulsadas al exterior y serán las que llevarán a cabo la reducción de los sustratos a NPs. Algunas levaduras son conocidas por su capacidad para producir NPs semiconductoras (Mandal et al., 2006). Entre ellas destaca *Candida glabrata* y *Schizosaccharomyces pombe*, que al ser expuestas a iones de cadmio (Cd^{2+}), producen NPs de sulfuro de cadmio (CdS) intracelulares.

Recientemente se ha descubierto una cepa de levadura tolerante a iones de plata (Ag^+), MKY3, capaz de sintetizar NPs de plata de manera extracelular. La aplicación de estas NPs está pendiente de exploración debido a su particular forma hexagonal (Moghaddam et al., 2015). *Pichia capsulta* es una de las pocas levaduras halófilas capaz de sintetizar NPs de plata de manera extracelular (Srivastava and Kowshik, 2015).

4.2.3 Nanopartículas sintetizadas por hongos

Los hongos presentan varias características que resultan ventajosas para la síntesis biológica de NPs metálicas. Son organismos muy tolerantes y presentan una gran capacidad de bioacumulación metálica. Además son secretores eficaces de enzimas extracelulares. Por otra parte, varias especies de hongos crecen rápidamente y por tanto el cultivo y la producción en el laboratorio resultaría muy simple. Se ha demostrado que los hongos son capaces de sintetizar NPs por las dos vías, intracelular y extracelular, a través de la reducción por enzimas (Moghaddam et al., 2015).

Una de las primeras investigaciones con respecto a la biosíntesis de NPs metálicas por medio de hongos fue llevada a cabo en el hongo filamentoso *Verticillium sp.* Este hongo es capaz de sintetizar NPs de plata de forma intracelular con un tamaño medio de 25 nm y resultaron ser esféricas. En presencia de iones de oro (AuCl_4^-) *Verticillium sp.* también es capaz de sintetizar NPs de oro. Las NPs presentan la misma forma aunque en este caso el tamaño medio es de 20 ± 8 nm. Para que estas NPs puedan ser utilizadas es imprescindible que sean extraídas del interior de la biomasa fúngica. Para ello se

emplean técnicas de ultrasonido o detergentes químicos. No obstante, sería mucho más práctico que los iones metálicos sean sintetizados por un método extracelular, debido a que la extracción de NPs en solución es mucho más económica y sencilla (Li et al., 2011).

El hongo *Fusarium oxysporum*, ha sido ampliamente utilizado para la biosíntesis extracelular de diversos tipos de NPs metálicas. Así se evita el empleo de solventes para la extracción de las NPs. El extracto acuoso de la biomasa fúngica es capaz de reducir los iones de plata y oro a las NPs correspondientes. Lo más probable es que la reducción de los iones de oro y plata se produce debido a las enzimas reductasas que son liberadas por el hongo. Además de NPs metálicas individuales, *F. oxysporum* también es capaz de sintetizar NPs combinadas de oro y plata (Au-Ag). Cuando *F. oxysporum* se expone a soluciones equimolares de ácido tetracloroaurico (HAuCl_4) y nitrato de plata (AgNO_3), se obtienen NPs casi esféricas con un tamaño de entre 8-14 nm. Tan solo se ha reportado la biosíntesis de NPs en un número reducido de hongos halófilos, entre ellos *Thraustochytrium sp.* y *Aspergillus niger*, que también sintetizan NPs metálicas, en este caso de plata (Mandal et al., 2006).

4.2.4 Nanopartículas sintetizadas por virus

Recientemente se ha descubierto que los virus pueden sintetizar NPs. El virus del mosaico del tabaco o TMV se ha modificado genéticamente para que exponga en su superficie un péptido con alta capacidad para unirse y reducir a iones metálicos. Esta modificación genética hace que el virus del mosaico del tabaco pueda sintetizar NPs de oro de 10-40 nm en presencia de iones AuCl_4^- . Las NPs sintetizadas resultaron ser estables y con estructura cristalina (Love et al., 2014).

4.2.5 Mecanismos de biosíntesis de nanopartículas por microorganismos a nivel de laboratorio

Los microorganismos han demostrado que poseen un inmenso potencial en la biosíntesis de NPs ya que son herramientas rentables y respetuosas con el medio ambiente, evitando la producción de químicos tóxicos y la alta demanda de energía necesaria para la síntesis físico-química. Los microorganismos tienen la capacidad de

acumular y detoxificar los metales pesados debido a diversas enzimas reductasas (entre ellas destaca la nitrato reductasa), que son capaces de reducir las sales de metal a NPs metálicas con una aceptable distribución de tamaño (Singh et al., 2016).

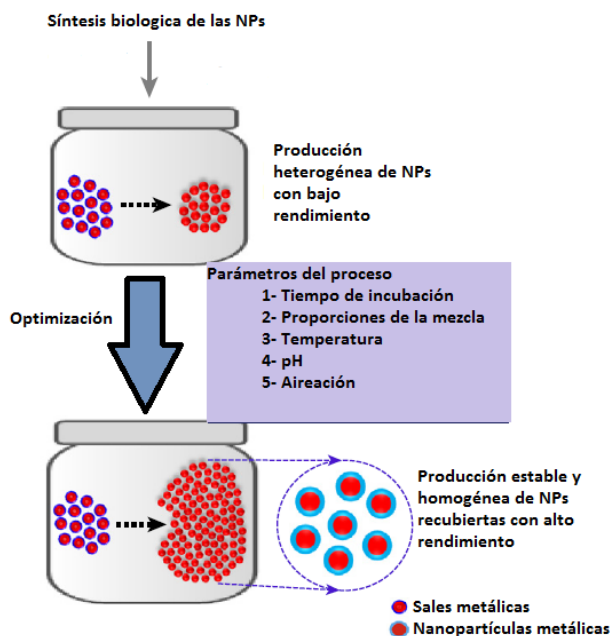


Figura 4. Esquema de producción de NPs biológicas (Singh et al., 2016).

Los microorganismos son capaces de sintetizar NPs extracelularmente o intracelularmente. En la biosíntesis de NPs extracelular, después de hacer crecer los microorganismos durante 1-2 días en un agitador rotatorio bajo condiciones óptimas (incluyendo el pH, la temperatura, los componentes del medio, etc.), el cultivo se centrifuga para separar la biomasa. El sobrenadante obtenido se utiliza para sintetizar NPs mediante la adición de una solución salina metálica a través de un filtro estéril y se incuba de nuevo. La síntesis de NPs se puede controlar mediante la observación de un cambio en el color del medio de cultivo; por ejemplo, para las NPs de oro, el color cambia a morado. Después de la incubación, la mezcla de reacción se puede centrifugar a diferentes velocidades para eliminar componentes del medio o partículas grandes. Finalmente, las NPs se centrifugan a alta velocidad y se lavan con agua o etanol (Figura 4).

En la biosíntesis intracelular de NPs, después de cultivar el microorganismo durante un cierto período de crecimiento óptimo, la biomasa se recoge por centrifugación y se lava con agua estéril. Después se disuelve en una solución

esterilizada por filtración compuesta por agua y la sal del metal. De manera similar a la síntesis extracelular, la mezcla de reacción se controla mediante cambio de color. Después del período de incubación, la biomasa se elimina mediante ciclos repetidos de tratamiento con ultrasonidos, lavado y centrifugación. Estas medidas ayudan a romper la pared celular y permitir que las NPs sean liberadas. A continuación, se centrifuga la mezcla, se lava y se recoge (Ramezani et al., 2010).

El mecanismo que subyace a esta síntesis biológica de NPs aún no está totalmente elucidado, pero se sabe que es dependiente de enzimas y que los genes de resistencia a metales, proteínas, péptidos, cofactores reductores, y moléculas orgánicas tienen papeles significativos al actuar como agentes reductores. Además, proporcionan a las NPs un recubrimiento natural, impidiendo la agregación y ayudando a que sean estables durante un largo tiempo.

Estos procesos de biosíntesis de NPs por microorganismos son lentos y con baja productividad y la recuperación de las NPs requiere un procesamiento. Además, otros problemas relacionados con la síntesis de NPs por microorganismos incluyen el muestreo microbiano, el aislamiento, el cultivo, y el mantenimiento entre otros procesos complejos (Singh et al., 2016).

4.3 Principales aplicaciones de la nanotecnología en el campo de la microbiología.

Las nanopartículas (NPs) tienen aplicaciones en áreas muy diversas tales como la industria automovilística y aeroespacial (detectores de hielo en las de aeronaves, neumáticos de mayor durabilidad, y materiales más ligeros y resistentes), la agroalimentaria (colorantes, emulsionantes, y aditivos), la electrónica (procesadores más pequeños, ordenadores, y células solares), la química (inhibidores de la corrosión, catalizadores multifuncionales, y polvos cerámicos), la farmacéutica (medicamentos y agentes activos, medicamentos de liberación controlada, vacunas, y radiología), y también en el área de la microbiología (antimicrobianos y componentes de biosensores) (Dowling et al., 2004; Singh et al., 2016). A continuación, en los siguientes subapartados se expondrán las principales aplicaciones que presentan las NPs en el

ámbito de la microbiología (Figura 5). Cabe mencionar que en este apartado se han considerado también aplicaciones de NPs que no han sido sintetizadas biológicamente por microorganismos.

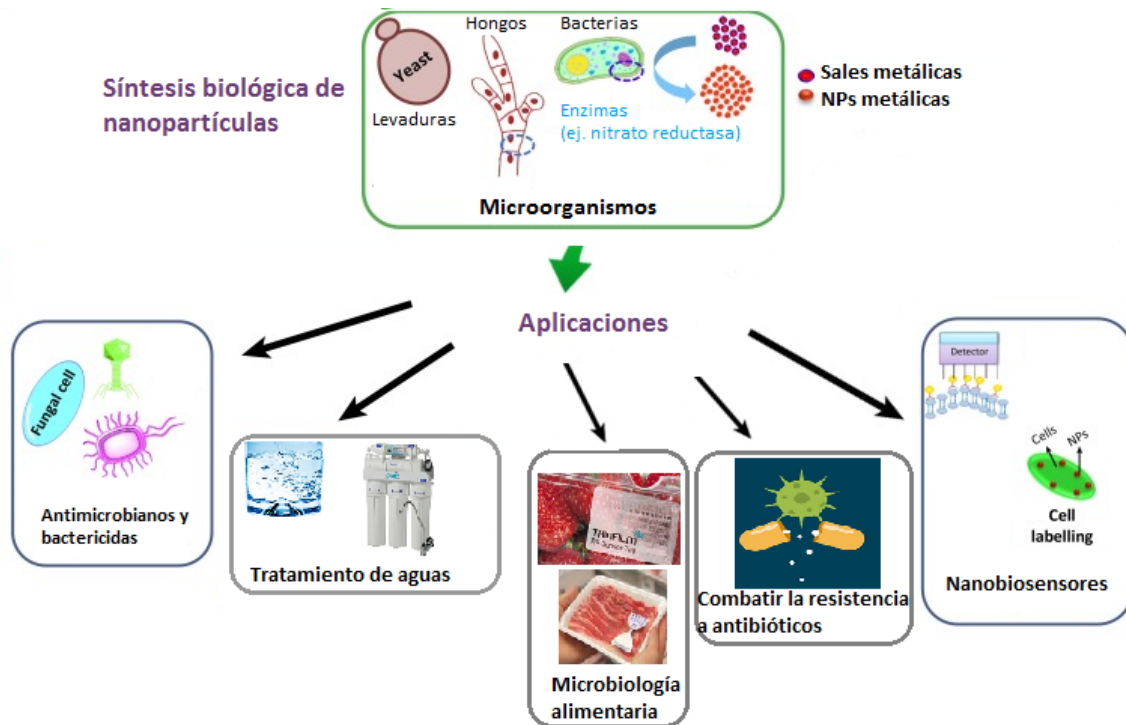


Figura 5. Principales aplicaciones de las NPs en áreas biomédicas (Singh et al., 2016)

4.3.1 Uso de las nanopartículas como agentes antimicrobianos

La capacidad antimicrobiana de las NPs está vinculada a características intrínsecas de las mismas como sus dimensiones nanométricas, que les permite ser internalizadas con mayor facilidad en microorganismos, y la alta relación área/volumen que permite un mayor contacto e interacción con dichos microorganismos. Las NPs de plata y de dióxido de titanio presentan propiedades antimicrobianas que han sido aprovechadas en numerosas aplicaciones, las cuales se detallarán en los siguientes apartados (Kim et al., 2007).

4.3.1.1 Aplicación de las nanopartículas en el tratamiento de aguas

Numerosas sociedades antiguas almacenaban el vino y el agua en recipientes de plata. La actividad antimicrobiana de amplio espectro de la plata y el relativo bajo costo

han hecho que sea un candidato como agente desinfectante activo para el agua en los países en desarrollo. En 2009, la FDA (Food and Drug Administration) modificó la normativa sobre aditivos alimentarios para permitir la adición directa de nitrato de plata (AgNO_3) como desinfectante para el agua embotellada en concentraciones que no excedan los $17 \mu\text{g} / \text{kg}$ (Benn and Westerhoff, 2008).

El potencial de las NPs de plata para la desinfección del agua está siendo explorado ampliamente. Destaca la capacidad de los filtros de polipropileno recubiertos con NPs de plata para eliminar *Escherichia coli* del agua. Se hizo pasar agua que contenía 103 UFC/mL a través de dos filtros, uno de ellos recubierto con NPs de plata y el otro sin recubrir. Después de 7 horas, el agua filtrada con el filtro recubierto no presentaba contaminación microbiana por *E. coli*. Además no se detectó la presencia de NPs de plata en el agua. Los resultados obtenidos se atribuyen al tamaño de poro diminuto del filtro tratado ($1,3 \mu\text{m}$) y a la combinación del efecto bacteriostático y bactericida de las NPs de plata (Heidarpour et al., 2011). En otro estudio (Jain and Pradeep, 2005) evaluaron la eficacia antibacteriana de pequeños fragmentos de espumas de poliuretano sumergidos en una suspensión acuosa de *E. coli* (106 UFC/mL). Parte de los fragmentos de poliuretano presentaban en su estructura NPs de plata. No hubo crecimiento de bacterias en las muestras expuestas a poliuretano con plata en su estructura, mientras que las muestras de poliuretano no tratadas con NPs de plata mostraron un crecimiento sustancial. Además, no se detectó el crecimiento de *E. coli* en la zona donde se colocó la espuma.

El empleo de NPs de plata para el tratamiento de aguas se está implantando en puntos de entrada domésticos en países desarrollados. Numerosos dispensadores de agua en oficinas incorporan filtros cerámicos impregnados con NPs de plata para evitar el crecimiento microbiano y la formación de biofilms (Dankovich and Gray, 2011; Qu et al., 2013).

4.3.1.2 Aplicación de las nanopartículas antimicrobianas en clínica

Más allá de las aplicaciones en el tratamiento de aguas, la plata ha sido utilizada como antiséptico y antimicrobiano. A comienzos del siglo XIX, se usaba nitrato de plata (AgNO_3) para promover la cicatrización de heridas. En los años 40, en plena época de

desarrollo de las penicilinas, se usaba la plata para el tratamiento de las infecciones bacterianas. La principal ventaja que presenta el empleo de NPs de plata como antimicrobiano en clínica es que muy pocos casos de microorganismos resistentes han sido reportados (Morones et al., 2005).

La actividad antimicrobiana de las NPs de plata ha sido descrita en numerosos estudios. Se ha descubierto que las NPs de plata actúan frente a numerosas especies de bacterias de interés clínico: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus* resistente a vancomicina, *S. aureus* resistente a meticilina (Bryaskova et al., 2011; Lok et al., 2007; Morones et al., 2005). Además inhibe el crecimiento del virus VIH (Elechiguerra et al., 2005).

Otra aplicación de las NPs de plata es el recubrimiento de la superficie de los implantes de titanio (empleados en prótesis dentales u ortopédicas). El recubrimiento de los implantes con NPs de plata evita que se produzca crecimiento microbiano en su superficie. Las NPs fueron eficaces evitando la formación de biofilms (Flores, 2014). En otro estudio llevado a cabo por Secinti y colaboradores se utilizaron las NPs de plata para recubrir tornillos de titanio, empleados como dispositivos ortopédicos. Los tornillos de titanio fueron insertados en conejos. Se observó que las NPs eran capaces de inhibir la formación de biofilms. Los conejos que presentaban tornillos sin recubrimiento nanoparticular sí que presentaron desarrollo de biofilm (Secinti et al., 2011).

Un aspecto importante en esta área es el efecto sinérgico que aparece al combinar NPs de plata con los antibióticos convencionales debido a que ambos presentan mecanismos de acción diferentes. Un estudio se llevó a cabo con clindamicina por un lado y NPs de plata asociadas a clindamicina por otro. Las NPs combinadas con clindamicina presentaron menor concentración mínima inhibitoria (CMI), lo que demuestra el efecto sinérgico que resulta de la combinación. Además, la combinación de las NPs con antibióticos convencionales mostro efecto antimicrobiano frente a *S. aureus* resistente a meticilina y *S. epidermidis* (Pelgrift and Friedman, 2013).

Los mecanismos de toxicidad que presentan las NPs de plata no están del todo claros, aunque se sabe que son totalmente diferentes a los de los antibióticos tradicionales. Las NPs atacan a la pared celular bacteriana causando perturbaciones en las funciones de la membrana celular. Se desacopla la cadena de transporte electrónico y se inhibe la respiración celular, provocando finalmente la muerte celular (Flores, 2014). Las NPs una vez en el interior, van a liberar el radical hidroxilo que ataca al ADN muy cerca del núcleo, lo que genera una alteración en las funciones de las proteínas y el ADN (Figura 6).

La hipótesis más aceptada entre los científicos es la de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO intracelulares como el radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) van a causar daños celulares a los lípidos y al ADN, provocando la lisis y muerte celular (Flores, 2014). No es sencillo realizar un análisis comparativo bibliográfico entre los distintos tipos de NPs ya que la acción bactericida dependerá de una amplia variedad de factores entre los que se pueden mencionar: el tamaño y la forma de las NPs, su composición química, el recubrimiento y su carga superficial potencial y la concentración de NPs usada. Se ha demostrado una relación inversa entre el tamaño de las NPs y su actividad antimicrobiana, donde las NPs en el rango de tamaño de 1-10 nm han mostrado tener la mayor actividad antibacteriana (Lok et al., 2007).

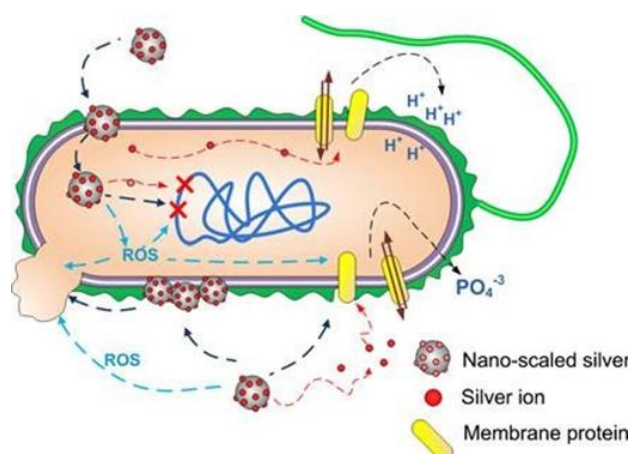


Figura 6. Esquema de la interacción entre NPs de plata y células bacterianas (Trepiana, 2015).

4.3.1.3 Aplicación de las nanopartículas en la industria alimentaria

Las propiedades antimicrobianas de NPs compuestas por otros materiales también han sido descritas en la literatura. Las NPs de dióxido de titanio (TiO_2) presentan propiedades prometedoras, sobre todo en la industria alimentaria. A diferencia de las NPs de plata, las NPs de TiO_2 deben ser fotocatalizadas para ejercer su actividad antimicrobiana y por lo tanto los antimicrobianos basados en TiO_2 sólo ejercen su actividad antimicrobiana una vez activados por radiación UV. Por ejemplo, las NPs de TiO_2 son eficaces frente a patógenos transmitidos por los alimentos comunes, como *Salmonella choleraesuis*, *Vibrio parahaemolyticus*, y *Listeria monocytogenes* bajo iluminación UV pero no en la oscuridad (Kim et al., 2003). Las NPs de TiO_2 se emplean en el envasado de alimentos. El propósito principal del agente antimicrobiano es actuar contra los microorganismos y extender la vida útil, mantener la calidad y garantizar la seguridad del alimento. Se ha descrito que NPs de TiO_2 dispersas en películas de EVOH (Etilen-Vinil-Alcohol, conocido también con el nombre de “papel film”) presentaron propiedades microbicidas eficaces una vez fotoactivadas. La película resultó ser eficaz frente a nueve microorganismos (entre los que destacan *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus sp*, *Bacillus stearothermophilus*) involucrados en el deterioro de alimentos y en intoxicaciones alimentarias (Kubacka et al., 2009). En otro estudio se demostró que al envasar lechuga fresca con películas de polipropileno recubiertas con NPs de TiO_2 se conseguía inhibir el crecimiento de *E. coli* (Chawengkijwanich and Hayata, 2008). En principio, el envasado de alimentos con películas que incorporan NPs de TiO_2 protege además el contenido de los alimentos de los efectos oxidantes de la radiación UV. Esta característica fotoprotectora tan solo está presente a escala nanométrica. Las micropartículas de TiO_2 reflejan la luz visible y UV, sin embargo, a escala nanométrica, el TiO_2 posee la capacidad de dejar pasar la luz visible y bloquear o reflejar la radiación UV (Duncan, 2011).

4.3.1.4 Nanopartículas para combatir la resistencia a antibióticos

La aparición de bacterias resistentes a los antibióticos y a múltiples fármacos supone un desafío crucial para la salud pública. La eliminación de las bacterias resistentes a los antibióticos requiere múltiples medicamentos con un número elevado de efectos secundarios. Como resultado de ello, los tratamientos son costosos y

requieren más tiempo. Las NPs ofrecen una nueva estrategia para hacer frente a las bacterias resistentes a múltiples fármacos (Pelgrift and Friedman, 2013).

Las NPs compuestas por complejos de carbeneo de plata (CCs) tienen una toxicidad eficaz contra los patógenos de importancia médica, tales como *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Acinetobacter baumannii* multirresistente (MRAB), *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* y *Klebsiella pneumoniae* (Hajipour et al., 2012). Las NPs compuestas por CCs resultan eficaces debido a que son capaces de inhibir los mecanismos de biodefensa de estas bacterias a través de los cuales desarrollan resistencia. Además los CCs en NPs biodegradables se evita la acumulación en el tejido diana y también el posible desarrollo de toxicidad a largo plazo (Leid et al., 2012).

Otra alternativa para combatir la resistencia a antibióticos consiste en dirigir las NPs bactericidas al tejido infectado o hacia las bacterias causantes de la infección. De este modo se minimizan los efectos secundarios y se mejora la actividad antibacteriana. En este caso, las NPs multifuncionales pueden ser muy útiles. Por ejemplo, las NPs magnéticas multifuncionales compuestas por Inmunoglobulinas G (IgG)-Fe₃O₄/TiO₂ son capaces de dirigirse a bacterias patógenas y tienen actividad antibacteriana eficaz bajo irradiación UV. La IgG y TiO₂ desempeñan un papel fundamental en la orientación y en las propiedades bactericidas de estas NPs, que resultaron ser tóxicas frente a *Streptococcus pyogenes* (Chen et al., 2008).

Otra de las posibles estrategias es el empleo de NPs liberadoras de óxido nítrico (NO). Estas NPs son capaces de inhibir el crecimiento de numerosas bacterias resistentes a los antibióticos tales como *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, y *Pseudomonas aeruginosa*. La toxicidad de estas NPs depende de la liberación de NO en el tejido diana. Las NPs liberadoras de NO generan especies reactivas de nitrógeno, que conducen a la modificación de proteínas esenciales para las bacterias y alteración de la estructura de la pared. Además de las NPs liberadoras de NO, las NPs de óxido de cinc (ZnO) son tóxicas frente a *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*, ambas bacterias resistentes a meticilina. Estas NPs son capaces de desorganizar y dañar la pared celular y aumentar la permeabilidad, lo que conduce a la muerte celular. La toxicidad de las NPs de ZnO es dependiente de la

concentración puesto que a dosis muy bajas estas NPs presentan una toxicidad muy leve (Huang et al., 2008).

4.3.2 Detección de microorganismos mediante biosensores compuestos por nanopartículas

En 2011, el centro de control de enfermedades (Centers for Disease Control (CDC)) estimó que los patógenos transmitidos por los alimentos causan aproximadamente 48 millones de enfermedades en los EE.UU cada año, 128 000 de los cuales conducen a la hospitalización y 3 000 de los cuales resultan en la muerte. Por lo tanto la capacidad de determinar si los productos alimenticios están contaminados por diversas bacterias, hongos o virus que pueden causar enfermedades transmitidas por los alimentos sigue siendo un objetivo importante en la investigación. Se requieren métodos de detección que sean rápidos, poco costosos y sensibles. La mayoría de los métodos de detección biológica convencionales se basan en ensayos inmunológicos (en interacciones selectivas antígeno-anticuerpo). Los sensores microbianos basados en nanomateriales en general, utilizan la misma estrategia, pero debido a que poseen propiedades ópticas y eléctricas únicas, ofrecen mejoras significativas en la selectividad, velocidad y sensibilidad. Este tipo de sensores emplea la separación inmunomagnética (IMS), que utiliza NPs magnéticas unidas a anticuerpos selectivos en combinación con un imán para separar selectivamente el analito diana de la matriz del alimento antes de la detección. Las NPs resultan especialmente útiles en este sentido, debido a que poseen elevada área superficial y permiten unir gran cantidad de antígenos específicos a su superficie. Los analitos capturados son purificados fácilmente y se someten a técnicas de medición estándar (Duncan, 2011).

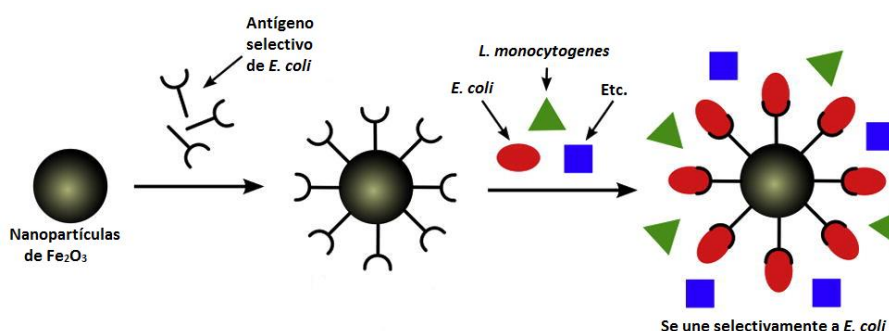


Figura 7. Detección de microorganismos por separación inmunomagnética mediante uso de NPs magnéticas (Duncan, 2011).

Por ejemplo, la unión de NPs magnéticas de óxido de hierro (Fe_2O_3) a anticuerpos selectivos para *Listeria monocytogenes* se puede utilizar para separar de forma eficaz las bacterias diana de la leche contaminada y detectarlas en tiempo real usando PCR (Yang et al., 2007). Un enfoque similar se ha utilizado para aislar *E. coli* a partir de la carne de vaca recién picada con eficiencia de captura superior al 94% y sin ninguna interferencia de otras especies bacterianas ensayadas (Figura 7) (Varshney et al., 2005). Recientemente se ha descubierto que empleando otros nanomateriales se puede detectar directamente al analito sin la necesidad de ensayos biológicos que consuman tiempo. Este tipo de sistemas combinan la tecnología de los inmunoensayos con la detección electroquímica. Es el caso de las NPs de oro (Au), que se emplean en inmunosensores para la detección de *L. monocytogenes*. El sistema consta de tiras de carbono sobre las que se inmovilizan las NPs junto con el antígeno (Figura 8). Cuando hay presencia de contaminación alimentaria, se produce un flujo de electrones en la superficie de la tira que es detectado por un transductor y convertido en señal eléctrica (Davis et al., 2013). Con este sistema se pueden obtener resultados fiables sobre la presencia de contaminación alimentaria en un tiempo inferior a 1 hora. Una tecnología similar a la empleada en este inmunosensor se ha utilizado para detectar otro tipo de microorganismos tales como miembros del género *Bacillus* (Pal et al., 2007), *Salmonella* (Villamizar et al., 2008), *Escherichia* (Lin et al., 2008), así como los virus (Yoon et al., 2008).

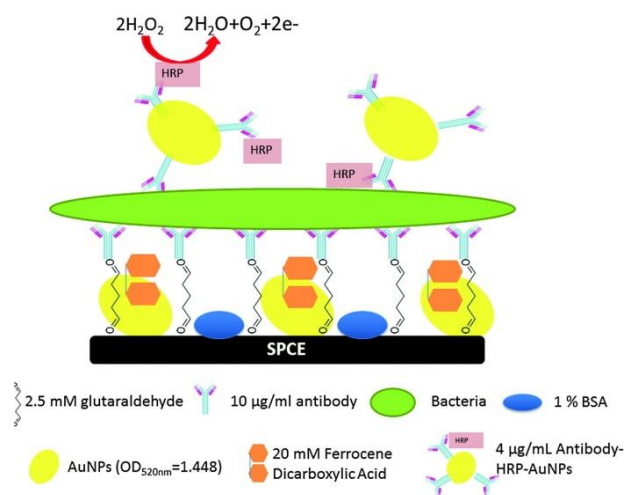


Figura 8. Esquema del inmunosensor compuesto por NPs de oro para la detección de *L. monocytogenes* (Davis et al., 2013).

Una de las ventajas más significativas de estas técnicas altamente sensibles basadas en la nanotecnología es la reducción del tiempo de incubación y medición necesarios para una detección precisa.

5 Conclusiones

- 1- La nanociencia y nanotecnología son dos términos que engloban conocimientos comunes de disciplinas científicas tradicionales. Estas disciplinas tienen en común la dimensión nanométrica de los objetos estudiados, a los cuales se les conoce con el nombre de nanopartículas (NPs).
- 2- Existen distintos métodos de síntesis de NPs. La síntesis biológica de NPs puede llegar a ser más efectiva, eficiente y rentable si se realiza un control adecuado de los parámetros que influyen en la biosíntesis de NPs. Además los métodos biológicos son respetuosos con el medio ambiente.
- 3- En la literatura científica se describe un amplio número de microorganismos que sintetizan NPs. La biosíntesis de NPs por microorganismos se ha descrito en bacterias, hongos, levaduras e incluso en virus. Un amplio porcentaje de los microorganismos descritos sintetizan NPs metálicas.
- 4- En los últimos años se han empezado a desarrollar nanofactorías que llevan a cabo la síntesis biológica de NPs. El proceso por el que se lleva a cabo esta biosíntesis varía en función de si los microorganismos sintetizan las NPs intra o extracelularmente.
- 5- Las NPs se emplean en áreas muy diversas. En el campo de la microbiología destaca el empleo de las NPs como agentes antimicrobianos en clínica. El mecanismo de acción antimicrobiano no se ha elucidado del todo aunque casi todas las hipótesis apuntan a que es debido a la producción de especies reactivas de oxígeno cuyo exceso no es compensado por las células y se produce la muerte celular.
- 6- Además de su aplicación en clínica, las NPs pueden ser empleadas para el tratamiento de aguas, evitando el crecimiento de microorganismos en puntos de uso doméstico. También se emplean en la industria alimentaria, más concretamente en el empaquetado de alimentos, evitando el desarrollo de microorganismos.

- 7- Al presentar mecanismos de acción totalmente diferentes a los antibióticos convencionales, las NPs pueden ser empleadas para combatir la resistencia a antibióticos. En este sentido, se están llevando a cabo muchos avances y descubrimientos.

- 8- Por último, las NPs también se emplean como componentes de biosensores para detectar la presencia de contaminación microbiana en alimentos mediante ensayos inmunológicos a través de la formación de complejos antígeno-anticuerpo.

6 Bibliografía

Benn, T.M., Westerhoff, P., 2008. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environ. Sci. Technol.* 42, 4133–4139.

Bhattacharya, R., Mukherjee, P., 2008. Biological properties of “naked” metal nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 1289–1306.

Bryaskova, R., Pencheva, D., Nikolov, S., Kantardjiev, T., 2011. Synthesis and comparative study on the antimicrobial activity of hybrid materials based on silver nanoparticles (AgNPs) stabilized by polyvinylpyrrolidone (PVP). *J. Chem. Biol.* 4, 185–191.

Chan, W.C.W., Maxwell, D.J., Gao, X., Bailey, R.E., Han, M., Nie, S., 2002. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 40–46.

Chawengkijwanich, C., Hayata, Y., 2008. Development of TiO₂ powder-coated food packaging film and its ability to inactivate *Escherichia coli* in vitro and in actual tests. *Int. J. Food Microbiol.* 123, 288–292.

Chen, W.J., Tsai, P.J., Chen, Y.C., 2008. Functional Fe₃O₄/TiO₂ core/shell magnetic nanoparticles as photokilling agents for pathogenic bacteria. *Small* 4, 485–491.

Dankovich, T.A., Gray, D.G., 2011. Bactericidal paper impregnated with silver nanoparticles for point-of-use water treatment. *Environ. Sci. Technol.* 45, 1992–1998.

Davis, D., Guo, X., Musavi, L., Lin, C.-S., Chen, S.-H., Wu, V.C.H., 2013. Gold nanoparticle-modified carbon electrode biosensor for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Ind. Biotechnol.* 9, 31–36.

Dowling, A., Clift, R., Grobert, N., Hutton, D., Oliver, R., O’neill, O., et al., 2004. Nanoscience and nanotechnologies : opportunities and uncertainties. *London R. Soc. R. Acad. Eng. Rep.* 46, 618–618.

Duncan, T. V., 2011. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors. *J. Colloid Interface Sci.* 363, 1–24.

Elechiguerra, J.L., Burt, J.L., Morones, J.R., Camacho-Bragado, A., Gao, X., Lara, H.H., et al., 2005. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J. Nanobiotechnology* 3, 6.

Faraday, M., 1857. The bakerian lecture: experimental relations of gold (and other metals) to light. *Philos. Trans. R. Soc. London* 147, 145–181.

Feynman, R.P., 1960. There's Plenty of Room at the Bottom. *Eng. Sci.* 23, 22–35.

Flores, C.Y. Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida [Internet]. Universidad nacional de la plata; 2014 [citado: 2016, junio]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10915/34946>

Hajipour, M.J., Fromm, K.M., Akbar Ashkarran, A., Jimenez de Aberasturi, D., Larramendi, I.R. de, Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W.J., et al., 2012. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol.* 30, 499–511.

Heidarpour, F., Wan Ab Karim Ghani, W.A., Fakhru'L-Razi, A., Sobri, S., Heydarpour, V., Zargar, M., et al., 2011. Complete removal of pathogenic bacteria from drinking water using nano silver-coated cylindrical polypropylene filters. *Clean Technol. Environ. Policy* 13, 499–507.

Horikoshi, S., Serpone, N. Introduction to Nanoparticles. En: Horikoshi, S., Serpone, N., editor. *Microwaves in nanoparticle synthesis: fundamentals and applications*. 1° ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2013. p. 1–24.

Huang, Z., Zheng, X., Yan, D., Yin, G., Liao, X., Kang, Y., et al., 2008. Toxicological effect of ZnO nanoparticles based on bacteria. *Langmuir* 24, 4140–4144.

Jain, P., Pradeep, T., 2005. Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. *Biotechnol. Bioeng.* 90, 59–63.

Joerger, R., Klaus, T., Granqvist, C.G., 2000. Biologically produced silver-carbon composite materials for optically functional thin-film coatings. *Adv. Mater.* 12, 407–409.

Kim, B., Kim, D., Cho, D., Cho, S., 2003. Bactericidal effect of TiO₂ photocatalyst on selected food-borne pathogenic bacteria. *Chemosphere* 52, 277–281.

- Kim, J.S., Kuk, E., Yu, K.N., Kim, J.H., Park, S.J., Lee, H.J., et al., 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 3, 95–101.
- Kubacka, A., Ferrer, M., Cerrada, M.L., Serrano, C., Sánchez-Chaves, M., Fernández-García, M., de Andrés, A., et al., 2009. Boosting TiO₂-anatase antimicrobial activity: polymer-oxide thin films. *Appl. Catal. B Environ.* 89, 441–447.
- Leid, J.G., Ditto, A.J., Knapp, A., Shah, P.N., Wright, B.D., Blust, R., et al., 2012. In vitro antimicrobial studies of silver carbene complexes: activity of free and nanoparticle carbene formulations against clinical isolates of pathogenic bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 138–148.
- Li, X., Xu, H., Chen, Z.S., Chen, G., 2011. Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. *J. Nanomater.* 2011, 1-16
- Lin, Y.H., Chen, S.H., Chuang, Y.C., Lu, Y.C., Shen, T.Y., Chang, C.A., et al., 2008. Disposable amperometric immunosensing strips fabricated by Au nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes for the detection of foodborne pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Biosens. Bioelectron.* 23, 1832–1837.
- Lok, C.-N., Ho, C.-M., Chen, R., He, Q.-Y., Yu, W.-Y., Sun, H., et al., 2007. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J. Biol. Inorg. Chem.* 12, 527–34.
- Love, A.J., Makarov, V., Yaminsky, I., Kalinina, N.O., Taliansky, M.E., 2014. The use of tobacco mosaic virus and cowpea mosaic virus for the production of novel metal nanomaterials. *Virology* 449, 133–139.
- Makarov, V. V., Love, A.J., Sinitsyna, O. V., Makarova, S.S., Yaminsky, I. V., Taliansky, M.E., et al., 2014. “Green” nanotechnologies: synthesis of metal nanoparticles using plants. *Acta Naturae* 6, 35–44.
- Mandal, D., Bolander, M.E., Mukhopadhyay, D., Sarkar, G., Mukherjee, P., 2006. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, 485–492.

- Moghaddam, A.B., Namvar, F., Moniri, M., Tahir, P.M., Azizi, S., Mohamad, R., 2015. Nanoparticles biosynthesized by fungi and yeast: a review of their preparation, properties, and medical applications. *Molecules* 20, 16540–16565.
- Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramírez, J.T., et al., 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16, 2346–2353.
- Nam, K.T., Kim, D.-W., Yoo, P.J., Chiang, C.-Y., Meethong, N., Hammond, P.T., et al., 2006. Virus-enabled synthesis and assembly of nanowires for lithium ion battery electrodes. *Science* 312, 885–8.
- Pal, S., Alocilja, E.C., Downes, F.P., 2007. Nanowire labeled direct-charge transfer biosensor for detecting *Bacillus* species. *Biosens. Bioelectron.* 22, 2329–2336.
- Pal, S.L., Jana, U., Manna, P.K., Mohanta, G.P., Manavalan, R., 2011. Nanoparticle: an overview of preparation and characterization. *J. Appl. Pharm. Sci.* 1, 228–234.
- Pelgrift, R.Y., Friedman, A.J., 2013. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 1803–1815.
- Poole, C.P., Owens, F.J. *Introducción a la nanotecnología*. 1ª, Barcelona: Reverté. 2007
- Qu, X., Alvarez, P.J.J., Li, Q., 2013. Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment. *Water Res.* 47, 3931–3946.
- Ramezani, F., Ramezani, M., Talebi, S., 2010. Mechanistic aspects of biosynthesis of nanoparticles by several microbes. *Nanocon* 10, 12–14.
- Secinti, K.D., Özalp, H., Attar, A., Sargon, M.F., 2011. Nanoparticle silver ion coatings inhibit biofilm formation on titanium implants. *J. Clin. Neurosci.* 18, 391–395.
- Silver, S., 2003. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 341–353.
- Singh, P., Kim, Y.J., Zhang, D., Yang, D.C., 2016. Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. *Trends Biotechnol.* 34, 588–599.

Southam, G., Beveridge, T.J., 1996. The occurrence of sulfur and phosphorus within bacterially derived crystalline and pseudocrystalline octahedral gold formed in vitro. *Geochim. Cosmochim. Acta* 60, 4369–4376.

Srivastava, P., Kowshik, M. Biosynthesis of nanoparticles from halophiles. En: Maheshwari, D.K., Saraf, M., editor. *Halophiles: biodiversity and sustainable exploitation*. 6^a ed. Switzerland: Springer Cham; 2015. p. 145-161

Trepiana D. Síntesis de suspensiones de nanopartículas de cobre y quitosano, y evaluación de sus propiedades antimicrobianas frente a *Streptococcus mutans* [Internet]. Santiago, Chile: Universidad de Chile - Facultad de Odontología; 2015 [citado: 2016, junio]. Disponible en: <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/131959>

Varshney, M., Yang, L., Su, X.-L., Li, Y., 2005. Magnetic nanoparticle-antibody conjugates for the separation of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *J. Food Prot.* 68, 1804–11.

Villamizar, R.A., Maroto, A., Rius, F.X., Inza, I., Figueras, M.J., 2008. Fast detection of *Salmonella Infantis* with carbon nanotube field effect transistors. *Biosens. Bioelectron.* 24, 279–283.

Yang, H., Qu, L., Wimbrow, A.N., Jiang, X., Sun, Y., 2007. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by nanoparticle-based immunomagnetic separation and real-time PCR. *Int J Food Microbiol* 118, 132–138.

Yoon, H., Kin, J.H., Lee, N., Kim, B.G., Jang, J., 2008. A novel sensor platform based on aptamer-conjugated polypyrrole nanotubes for label-free electrochemical protein detection. *ChemBioChem* 9, 634–641.

Zhang, X., Yan, S., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2011. Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. *Chemosphere* 82, 489–494.