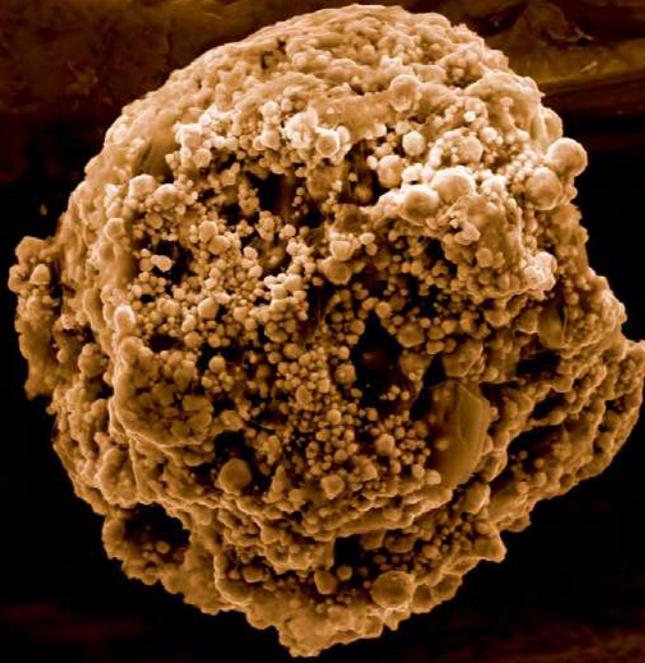


A scanning electron microscope (SEM) image showing a dense collection of copper nanoparticles. The particles are spherical and vary in size, with some appearing as small dots and others as larger, more complex clusters. The overall appearance is a textured, golden-brown surface against a dark background.

EXPERIMENTO N°2

VALIDACIÓN DE LAS CAPACIDADES ANTIMICROBIANAS DE LAS
NANOPARTÍCULAS DE COBRE EN CONTRASTE CON SUS EXCIPIENTES



I. BREVE DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

- Una vez probadas las capacidades antimicrobianas de las nanopartículas generadas en Aintech, se procedió a definir la contribución de los excipientes de las formulaciones. Nuevamente se cultivaron 2 cepas de bacterias, E. coli (Gram -) y S. aureus (Gram +). De esta forma se probó la efectividad de las nanopartículas en las 2 configuraciones de membrana citoplasmática que distinguen a grandes rasgos a las distintas especies bacterianas. Se probaron distintos formatos de entrega de las nanopartículas al medio: sensidiscos y mezclado en el medio. Las formulaciones nanopartículas utilizadas fueron: CETRIMIDA y Control (-) CETRIMIDA.



II. METODOLOGÍA

A CONTINUACIÓN SE DESCRIBEN LOS DETALLES DEL PROTOCOLO PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO:

Preparación de bacterias.

- Se tomó una cepa criopreservada y se cultivó en 10mL de caldo LB durante 20 a 24 hrs.
- Se realizó un segundo pasaje en caldo LB de 20 a 24 hrs.
- Tras esto se sembró 3 diluciones seriadas de 1:10.000 a 1:1.000.000, para realizar conteo de UFC, en un volumen total de 1mL.
- 250 microlitros (uL) de cada dilución será sembrado directamente en placas de agar LB sin aditivos.

ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

-Las muestras de nanopartículas CETRIMIDA y CETRIMIDA (-) se probaron por 2 métodos:



SENSIDISCOS

Utilizando papel whatman N°1 autoclavado se confeccionó discos de papel de 5mm de diámetro en los que se cargaron 10uL de diluciones, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, de las dos muestras.

- Los discos fueron colocados sobre un césped bacteriano (una superficie homogénea de crecimiento bacteriano), sembrado desde 250uL de cultivo bacteriano FD 1:1 de E. coli y S. Aureus, que fue dejado reposar durante 60min a temperatura ambiente.

- La actividad antimicrobiana se cuantificó en relación al diámetro de la frontera de inhibición generada por el sensidisco.



MEZCLADO EN EL MEDIO

Se preparó placas de agar LB mezclada con muestras CETRIMIDA y CETRIMIDA(-) homogenizada previo a gelificar. Los volúmenes utilizados se adecuaron de forma que cada placa quedó con un factor de dilución de 1:50; 1:75 y 1:150. Tras gelificar se sembró 250uL de factor de dilución 10^{-5} de E. coli y S.

III. RESULTADOS

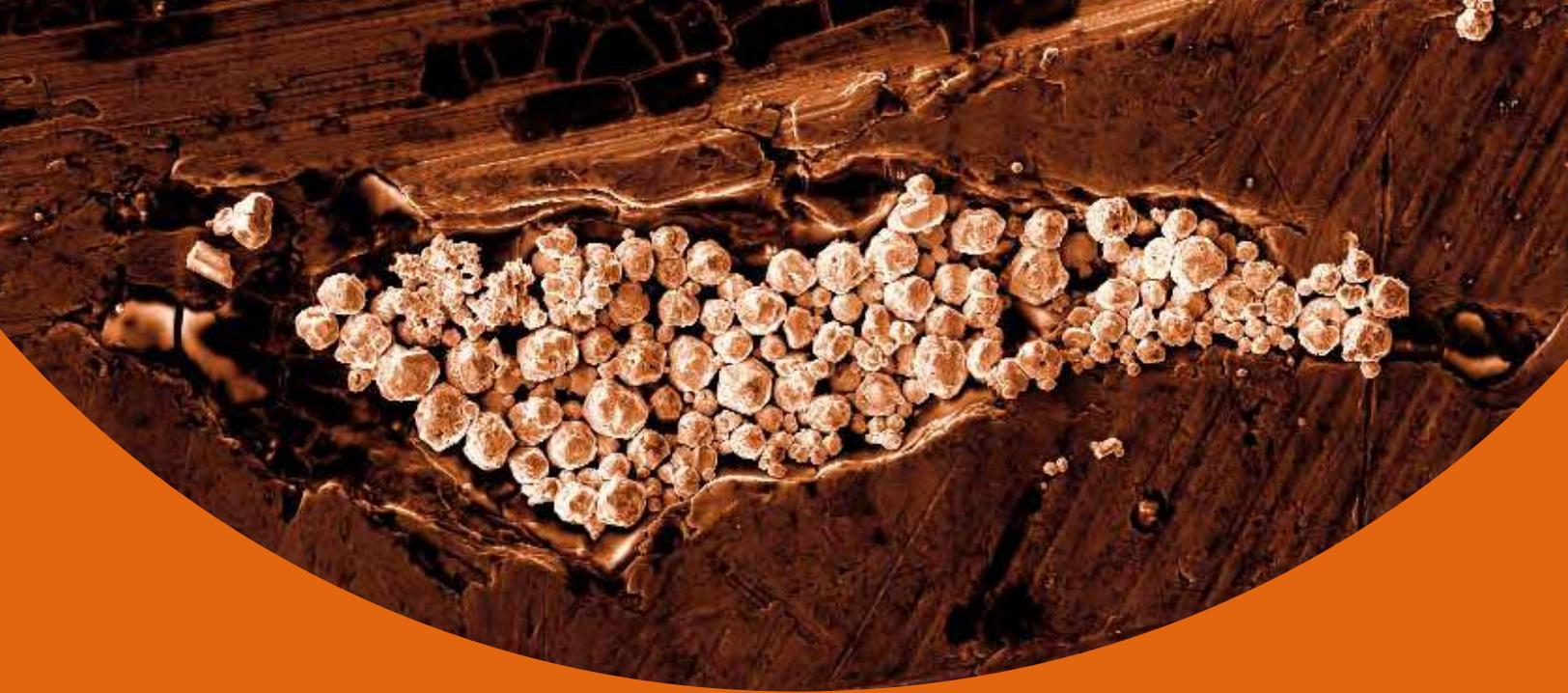
CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS

Las UFCs fueron contadas en el Factor de Dilución: 10^{-6} , dando valores de 19 UFC (*S. aureus*) y 266 UFC (*E. coli*). Esto se traduce en concentraciones iniciales de 76M UFC/mL y 1064M UFC/mL

Figura 1



Figura 1. Diluciones Seriadas de cultivos microbianos. Derecha: *E. coli* (1:1.000.000) Izquierda: *S. aureus* (1:1.000.000)



NANOPARTÍCULAS DISPERSAS EN MEDIO NUTRITIVO

E. coli solo presentó crecimiento en la dilución 1:150 de CETRIMIDA(-), en concentraciones de colonias demasiado numerosas para ser contadas. (Figura 2).

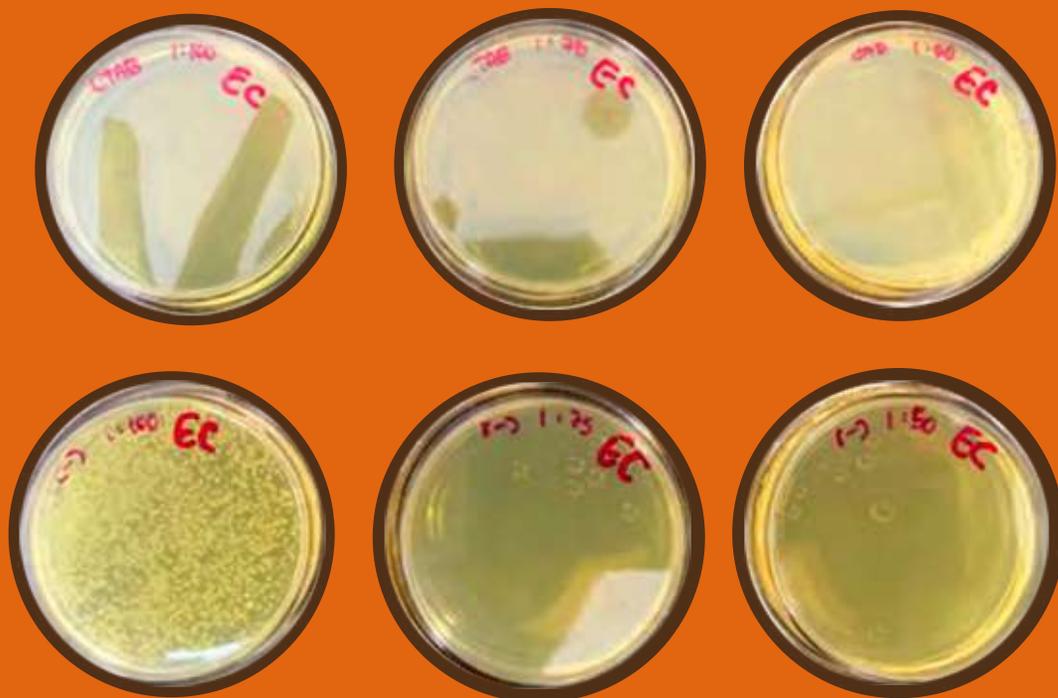


Figura 2. Cultivo de *E. coli* en diluciones de Nanopartículas en medio de cultivo. De Izquierda a derecha: diluciones 1:150 ; 1:75 y 1:50. Fila superior: Nanopartículas CETRIMIDA. Fila inferior: Control negativo CETRIMIDA (Sin cobre).



NANOPARTÍCULAS DISPERSAS EN MEDIO NUTRITIVO

-*S. aureus* no presentó crecimiento en ninguna dilución de ambas formulaciones. (Figura 3)

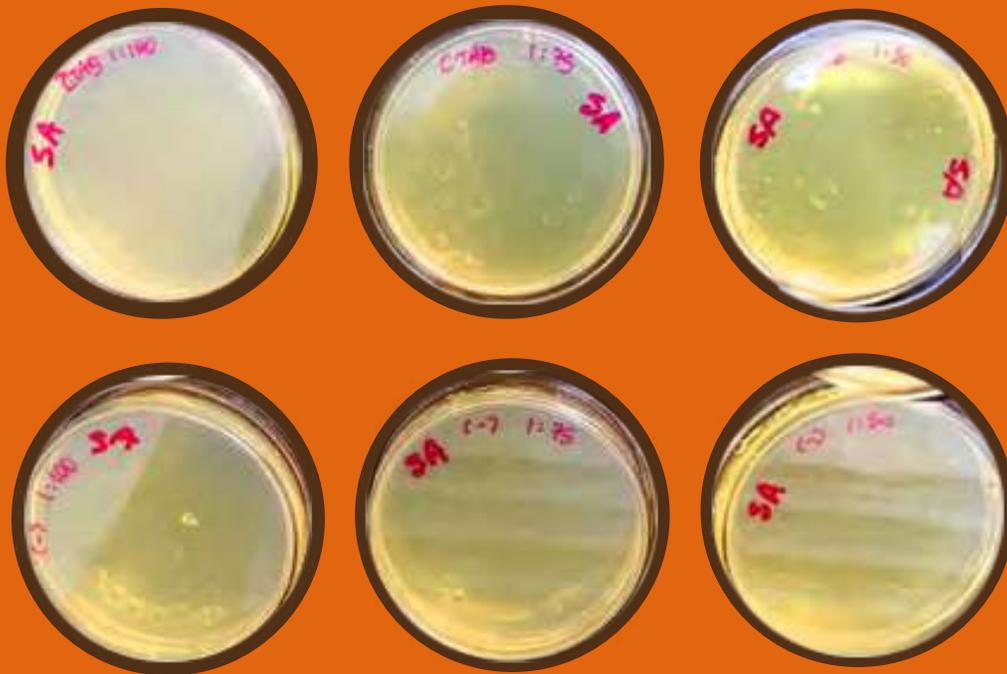


Figura 3. Cultivo de *S. aureus* en diluciones de Nanopartículas en medio de cultivo. De izquierda a derecha: diluciones 1:150 ; 1:75 y 1:50. Fila superior: Nanopartículas CETRIMIDA. Fila inferior: Control negativo CETRIMIDA (Sin cobre).

SENSIDISCOS

- Ambas cepas bacterianas mostraron fronteras de inhibición de forma irregular dendrítica por ambas formulaciones.
- *S. aureus* mostró una sensibilidad por ambas formulaciones, que se mantuvo de forma proporcional a lo largo de todas las diluciones, exceptuando la dilución 1:1, posiblemente por error experimental u otra variable. (Figura 4)



Figura 4. Sensidiscos con diluciones de izq a der: 1:1 ; 1:2 , 1:4 ; 1:8 ; 1:16. En césped bacteriano de *S. aureus*. (+): CETRIMIDA, (-): Negativo CETRIMIDA.

SENSIDISCOS

E. coli mostró mayor sensibilidad por la formulación de CETRIMIDA en comparación con su negativo. Los “halos de inhibición” se mantuvieron visibles hasta la dilución 1:4 de CETRIMIDA. (Figura 5).

- Las áreas de superficie se estimaron utilizando el software ImageJ, utilizando la técnica de “Circle fitting” obtenido para las distintas condiciones un aproximado, dada la conformación dendrítica del halo de inhibición. (Tabla 1.)



Figura 5. Sensidiscos con diluciones de izq a der: 1:1 ; 1:2 , 1:4 ; 1:8 ; 1:16. En césped bacteriano de *E. coli*. (+): CETRIMIDA, (-): Negativo CETRIMIDA.

	1:1		1:2		1:4		1:8		1:16	
	CTAB	(-)								
S.aureus	1,015	0,849	1,893	1,721	2,829	1,254	2,682	0,916	4,006	0,888
E.coli	0,676	0,508	0,761	0,426	0,555	0,468	0,401	0,418	0,348	0,377

Tabla 1. Area en centímetros cuadrados de los halos de inhibición de sensibiliscos, calculado por "circle fitting".



IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

- Los experimento permitieron observar una diferencia en la actividad bacteriostática de los formulados de nanopartículas respecto a sus controles sin cobre. Esta diferencia de actividad es más evidente en las diluciones de formulación en medio de cultivo sólido. Los ensayos de difusión en sensidiscos mostraron resultados menos concluyentes, posiblemente por la influencia de surfactantes sobre la difusión en el hidrogel de agar, afectando el patrón usualmente circular del halo de inhibición. Sin embargo, cualitativamente se observa un mayor efecto bacteriostático en los sensidiscos con contenido de nanopartículas, para ambas bacterias. Con esta evidencia se concluye que el surfactante CETRIMIDA tiene una actividad bacteriostática intrínseca, pero que la presencia de cobre en la formulación extiende la capacidad a mayores diluciones.

