



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

Diseño de un nanosistema inteligente para la liberación  
controlada de farnesol y su evaluación como tratamiento  
antimicrobiano

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Herrero González, Angela

Tutor/a: Bernardos Bau, Andrea

Cotutor/a: Reyes Torres, Miguel

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica  
i del Medi Natural



Instituto Interuniversitario de Reconocimiento  
Molecular y Desarrollo Tecnológico

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural  
Universitat Politècnica de València (ETSEAMN)

# Diseño de un nanosistema inteligente para la liberación controlada de farnesol y su evaluación como tratamiento antimicrobiano

TRABAJO FINAL DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Autor: Ángela Herrero González

Tutor: Prof. Dña. Andrea Bernardos Bau

Cotutor: D. Miguel Reyes Torres

CURSO ACADÉMICO 2022-2023

Valencia, Julio de 2023

**Título:** Diseño de un nanosistema inteligente para la liberación controlada de farnesol y su evaluación como tratamiento antimicrobiano.

**Autor:** Ángela Herrero González.

**Localidad y fecha:** Valencia, Julio de 2023.

**Tutor académico:** Prof. Dña. Andrea Bernardos Bau.

**Cotutor:** D. Miguel Reyes Torres.

## Resumen

La resistencia antimicrobiana, definida como la capacidad de un microorganismo para sobreponerse a los efectos inhibitorios de los compuestos antimicrobianos, es uno de los principales problemas de salud pública actualmente. Se estima que las infecciones causadas por microorganismos resistentes a los antibióticos podrán llegar a superar en número de muertes anuales a las principales causas de muerte hoy en día, como pueden ser las cardiopatías o el cáncer. En el caso de las bacterias, la capacidad intrínseca que tienen para evolucionar rápidamente en condiciones adversas les permite desarrollar mecanismos de resistencia para superar de forma muy eficaz a los nuevos antibióticos que surgen. De este modo, desde que se descubrió la penicilina en 1928, se han ido describiendo bacterias resistentes a los distintos antibióticos, al poco tiempo de entrar estos en circulación. Para solventar esta problemática, se han desarrollado numerosas alternativas al uso de antibióticos: ya sean (i) antimicrobianas, como el uso de compuestos naturales o de péptidos antimicrobianos, o (ii) no antimicrobianas, que se basan en potenciar la acción de otros mecanismos de eliminación de las bacterias, como es la inmunoterapia o el uso de moléculas adyuvantes para inhibir los mecanismos de resistencia. En este escenario, en el presente trabajo se ha desarrollado una alternativa antimicrobiana, como es el uso de un componente de aceite esencial, el farnesol, para el tratamiento de distintas bacterias. Para solventar algunas de las desventajas típicas de los componentes de aceites esenciales, como son la baja solubilidad en agua, la elevada reactividad y la alta volatilidad, el farnesol se ha encapsulado en una nanopartícula mesoporosa de sílice de tipo MCM-41. Para conseguir un efecto específico en presencia de bacterias, se ha funcionalizado la nanopartícula con una puerta molecular proteica, la  $\epsilon$ -polilisina, que permite la liberación controlada específica en presencia de las proteasas secretada por las bacterias. El sistema nanoparticulado ha demostrado tener una gran actividad antimicrobiana frente a las bacterias gram-positivas del estudio (*Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*), a diferencia de contra las gram-negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), lo que puede deberse a las diferencias existentes en la estructura de sus paredes bacterianas. Además, con el propósito de encontrar una explicación a las diferencias observadas en el efecto antimicrobiano frente a gram positivas y gram negativas, se ha explorado el mecanismo de acción del farnesol frente a estas bacterias.

Este trabajo se relaciona con el Objetivo de Desarrollo Sostenible (ODS) 3 de la Agenda 2030: garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades. Esto se debe a que la nanomedicina, en concreto la utilización de nanopartículas con fines antimicrobianos, tiene como objetivo principal reducir la resistencia a los antibióticos, una de las amenazas a la salud pública actual.

**Palabras clave:** Antimicrobiano natural | componentes de aceites esenciales | nanopartículas mesoporosas de sílice | bacterias | microorganismos | liberación controlada | puertas moleculares.

## Abstract

Antimicrobial resistance, defined as the ability of a microorganism to overcome the inhibitory effects of antimicrobial compounds, is one of the major public health problems today. It is estimated that infections caused by antibiotic-resistant microorganisms may exceed the number of annual deaths of the main causes of death today, such as heart disease or cancer. In the case of bacteria, their intrinsic ability to evolve rapidly under adverse conditions, allows them to develop resistance mechanisms to overcome very effectively the new antibiotics that emerge. Thus, since penicillin was discovered in 1928, bacteria resistant to different antibiotics have been described shortly after they entered circulation. In order to solve this problem, numerous alternatives to the use of antibiotics have been developed: either (i) antimicrobial, such as the use of natural compounds or antimicrobial peptides, or (ii) non-antimicrobial, which are based on enhancing the action of other mechanisms of elimination of bacteria, such as immunotherapy or the use of adjuvant molecules to inhibit resistance mechanisms. In this scenario, in the present work, an antimicrobial alternative has been developed, such as the use of an essential oil component, farnesol, for the treatment of different bacteria. To solve some of the typical disadvantages of essential oil components, such as low water solubility, high reactivity and high volatility, farnesol has been encapsulated in a mesoporous silica nanoparticle MCM-41 type. To achieve a specific effect in the presence of bacteria, the nanoparticle has been functionalized with a protein molecular gate,  $\epsilon$ -polylysine, which allows the specific controlled release in the presence of proteases secreted by bacteria. The nanoparticle system has shown high antimicrobial activity against the gram-positive bacteria of the study (*Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*), but different activity against the gram-negative ones (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*), which may be due to the differences in the structure of their bacterial walls. In addition, in order to find an explanation for the differences observed in the antimicrobial effect against gram-positive and gram-negative bacteria, the mechanism of action of farnesol against these bacteria has been explored.

This work is related to the sustainable development goal (SDG) 3 of the 2030 Agenda: ensuring healthy lives and promoting well-being for all at all ages. This is because nanomedicine, specifically the use of nanoparticles for antimicrobial purposes, aims to primarily reduce antibiotic resistance, which is one of the current public health threats.

**Keywords:** Natural antimicrobials | essential oil components | molecular gates | silica mesoporous nanoparticles | bacteria | microorganism | controlled release.

## AGRADECIMIENTOS:

Agradecer en primer lugar a mi tutores, Miguel y Andrea. Miguel, gracias por invertir tanto de tu tiempo en mí y en este proyecto implicándote al máximo. Gracias por enseñarme a trabajar en un laboratorio, confiar en mí, tener la paciencia infinita de repetirme las cosas las veces que fuera necesario y estar disponible 24/7 para absolutamente cualquier cosa. Sin una figura como tú, esta tarea hubiera sido muchísimo más difícil. Andrea, muchísimas gracias por realizar una revisión tan exhaustiva hasta que todo estuviera perfecto, por tu disponibilidad y disposición para ayudar siempre. Gracias por acogerme en vuestro laboratorio y darme la oportunidad de trabajar en un grupo de tan alto nivel en el que he aprendido muchísimo.

De igual modo, gracias a todo el equipo del laboratorio, a Angy, Serena, María, gracias por cuidarnos a Laura y a mí, por los consejos, ayuda y escucha en todo. Gracias Lucía, Santi y Yoel por ayudar a crear un ambiente óptimo en el laboratorio y en el que es difícil aburrirse. Hemos aprendido mucho de todos vosotros. No puedo olvidarme de mi compañera Laura, qué suerte haber coincidido contigo, porque a pesar de no llevarnos durante la carrera, gracias a este trabajo, me llevo una buena amiga.

Gracias a mis amigas de toda la vida, por celebrar siempre mis éxitos como si fueran suyos y alegrarse tantísimo por mí, a pesar de no saber explicar ni qué es lo que hago. De igual modo, no puedo estar más agradecida a mis amigos de carrera. Gracias por hacer los momentos duros menos agrios, por hacerme siempre creer que 'en peores plazas hemos toreado' y sobre todo por crear tantos recuerdos juntos que vivirán en mi mente siempre. Con vosotros, estos cuatro años se han hecho cortos y me llevo una familia para toda la vida, nos vemos en la siguiente etapa. Por último, gracias Félix por hacer siempre todo lo que ha estado en tu mano por ayudarme en cualquier cosa, por la comprensión y los ánimos incondicionales durante estos cuatro años. Gracias por hacer el camino más agradable, fácil y confiar en mí incluso cuando yo no era capaz.

Por encima de todo gracias a mis padres, que han hecho siempre todo lo que ha estado en su mano y más para facilitarme la vida lo máximo posible y que yo solo tuviera que preocuparme por estudiar.

# ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS .....	1
1.1.1	Mecanismos de resistencia .....	2
1.2	ANTIMICROBIANOS.....	3
1.3	NANOTECNOLOGÍA .....	5
2.	OBJETIVOS.....	7
3.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	8
3.1	REACTIVOS Y CEPAS BACTERIANAS .....	8
3.2	CULTIVO DE BACTERIAS .....	8
3.3	SÍNTESIS MCM-41 .....	8
3.4	ENCAPSULACIÓN DE FARNESOL EN MCM-41 (MCM-FOH) .....	9
3.5	FUNCIONALIZACIÓN DE MCM-41-FOH (MCM-FOH-iNCO) Y UNIÓN DE LA PUERTA MOLECULAR (MCM-FOH-EPL).....	9
3.6	MÉTODOS GENERALES DE CARACTERIZACIÓN E INSTRUMENTOS.....	9
3.7	CUANTIFICACIÓN DE LA CANTIDAD DE FARNESOL ENCAPSULADO: EXTRACCIÓN FORZADA.....	10
3.8	ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	10
3.9	EVALUACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN .....	12
3.9.1	Cuantificación de daño de membrana por absorción de cristal violeta .....	12
3.9.2	Microscopía confocal .....	12
3.9.3	Microscopía electrónica de alta resolución de barrido de emisión de campo (HRFESEM) .....	13
3.9.4	Ensayo de modulación de la actividad respiratoria mediante la tasa de reducción de resazurina 13	
3.10	Análisis estadístico .....	14
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	14
4.1	SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DEL SISTEMA DE LIBERACIÓN (MCM-41) .....	14
4.2	CÁLCULO DE LA CANTIDAD DE FARNESOL ENCAPSULADA EN MCM-FOH-EPL .....	18
4.3	ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA .....	18
4.4	EVALUACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN .....	20
4.4.1	Cuantificación de daño de membrana por absorción de cristal violeta .....	20
4.4.2	Microscopía confocal .....	21
4.4.3	Microscopía electrónica de alta resolución de barrido de emisión de campo (HRFESEM) .....	23
4.4.4	Ensayo de modulación de la actividad respiratoria mediante la tasa de reducción de resazurina 25	
5.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS .....	27
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	29
7.	ANEXO I.....	33

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo del procedimiento de síntesis de la MCM-41. Adaptación de [53].	6
Figura 2: Representación esquemática de un material mesoporoso de sílice cargado y funcionalizado con puertas moleculares para su uso en liberación controlada. Adaptación de [50]	6
Figura 3: Representación de la apertura de la puerta molecular y liberación de carga. Creado en Biorender.com	7
Figura 4: (A) Datos de la curva de calibrado de farnesol en hexano; (B) Curva de calibrado de farnesol en hexano: medida de la absorbancia a distintas concentraciones del compuesto.	10
Figura 5: Esquema representativo del ensayo de MIC.	11
Figura 6: Esquema representativo del proceso de síntesis y carga de la nanopartícula final MCM-FOH-EPL. Creado en Biorender.com	14
Figura 7: Difractograma de rayos X en polvo de los sólidos MCM-41 'as made', MCM-41 calcinada y MCM-FOH-EPL.	15
Figura 8: Imágenes al TEM de (A) MCM-41 calcinada con medida del diámetro del poro y del diámetro de la NP; (B) Visualización de la estructura hexagonal del poro MCM-41 calcinada.	16
Figura 9: Espectroscopía de infrarrojos de los distintos compuestos resultantes de las etapas de síntesis.	17
Figura 10: (A) Valores de potencial Z para cada etapa de síntesis de MCM-FOH-EPL. (B) Representación de la medida de potencial Z.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 11: Resultados de los ensayos de MIC. (A) Valores de MIC para cada una de las bacterias, se incluyen los $\mu\text{g/mL}$ de farnesol necesarios para inhibir el crecimiento para ambos tratamientos (FOH libre y MCM-FOH-EPL); (B) Representación gráfica de los valores de MIC. *En el caso de <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. coli</i> , el valor de la MIC supera los 5000 $\mu\text{g/mL}$ .	19
Figura 12: Representación de la cuantificación de daño a la membrana mediante absorción con cristal violeta en (A) <i>P. aeruginosa</i> (B) <i>E. coli</i> (C) <i>S. epidermidis</i> (D) <i>S. aureus</i> en función de la concentración de farnesol libre.	20
Figura 13: Imágenes de microscopía confocal de <i>E. coli</i> (A) Sin tratamiento; (B) Tratadas con 1250 $\mu\text{g/mL}$ de farnesol; (C) Tratadas con 2500 $\mu\text{g/mL}$ de farnesol; (D) Tratadas con 5000 $\mu\text{g/mL}$ de farnesol.	21
Figura 14: Imágenes de microscopía confocal de <i>P. aeruginosa</i> (A) Sin tratamiento; (B) Tratadas con 312,5 $\mu\text{g/mL}$ de farnesol; (C) Tratadas con 1250,0 $\mu\text{g/mL}$ de farnesol; (D) Tratadas con 5000,0 $\mu\text{g/mL}$ de farnesol.	22
Figura 15: Imágenes de microscopía confocal de <i>S. epidermidis</i> (A) Sin tratamiento (B) Tratadas con 78,125 $\mu\text{g/mL}$ de farnesol (C) Tratadas con 156,250 $\mu\text{g/mL}$ de farnesol (D) Tratadas con 312,500 $\mu\text{g/mL}$ de farnesol.	23
Figura 16: Imágenes de microscopía confocal de <i>S. aureus</i> (A) Sin tratamiento (B) Tratadas con 31,25 $\mu\text{g/mL}$ de farnesol (C) Tratadas con 62,50 $\mu\text{g/mL}$ de farnesol (D) Tratadas con 125,00 $\mu\text{g/mL}$ de farnesol.	23
Figura 17: Imágenes de HRFESM de (A) <i>P. aeruginosa</i> en ausencia de tratamiento (control); (B) <i>P. aeruginosa</i> tratada con 1000 $\mu\text{g/mL}$ de MCM-FOH-EPL.	24
Figura 18: Imágenes de HRFESM de (A) <i>S. aureus</i> en ausencia de tratamiento (control); (B) <i>S. aureus</i> tratado con 400 $\mu\text{g/mL}$ de MCM-FOH-EPL; (C) <i>S. aureus</i> tratado con 1000 $\mu\text{g/mL}$ de MCM-FOH-EPL; (D) <i>S. epidermidis</i> en ausencia de tratamiento (control); (E) <i>S. epidermidis</i> tratado con 400 $\mu\text{g/mL}$ de MCM-FOH-EPL; (F) <i>S. epidermidis</i> tratado con 1000 $\mu\text{g/mL}$ de MCM-FOH-EPL.	25
Figura 19: Representación del porcentaje de reducción de resazurina en: (A) <i>P. aeruginosa</i> ; (B) <i>E. coli</i> ; (C) <i>S. epidermidis</i> ; (D) <i>S. aureus</i> .	26

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Alternativas a los antibióticos.	4
Tabla 2: Cepas empleadas en el estudio.	8
Tabla 3: Medida de la absorbancia a distintas concentraciones de [MCM-FOH-EPL]	18

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

OMS	Organización mundial de la salud
AMR	Resistencia a los antimicrobianos
ARG	Genes de resistencia a los antibióticos
MDR	Bacterias multirresistentes
XDR	Bacterias extensamente resistentes
PDR	Bacterias panresistentes
HGT	Transferencia horizontal de genes
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EO	Aceite esencial
EOC	Componente de los aceites esenciales
FOH	Farnesol
NP	Nanopartícula
MSN	Nanopartículas mesoporosas de sílice
MCM	Mobil Composition of Matter
TEOS	Tetraetilortosilicato
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
EPL	$\epsilon$ -polilisina
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
MHB	Medio Müller-Hinton-Broth
CFU	Unidades formadoras de colonias
iNCO	3-trietoxisililpropil isocianato
ACN	Acetonitrilo
TEA	Trietilamina
PDXR	Difracción de rayos X en polvo
FTIR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
CV	Cristal violeta
HRFESEM	Microscopía electrónica de alta resolución de barrido de emisión de campo

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

La resistencia antimicrobiana (AMR, por sus siglas en inglés) ocurre cuando los microorganismos tienen o desarrollan la habilidad para sobreponerse a la acción inhibitoria que ejercen los fármacos contra ellos. Esto puede ser ocasionado a través de mutaciones cromosómicas que se dan de manera aleatoria a lo largo de la vida de los microorganismos o debido a mecanismos de distinta naturaleza, como la transferencia horizontal genética, que, en última instancia, producirán cambios genotípicos y fenotípicos que llevarán a la resistencia antimicrobiana [1]. Por lo tanto, se trata de un fenómeno natural que se desarrolla gracias a la fácil y rápida adaptación de los microorganismos a distintos ambientes [2]. Las mutaciones relevantes surgirán por presión selectiva positiva, y serán favorecidas debido a su capacidad para conferir resistencia a los microorganismos que las adquieren [3]. Estas mutaciones permiten a los microorganismos propagarse sin sufrir los efectos de los fármacos y, con el tiempo, se vuelven predominantes en la población.

Estos fármacos se denominan como antimicrobianos y son definidos por la OMS como sustancias empleadas para prevenir y tratar infecciones en humanos, animales y plantas [4]. En esta categoría se incluyen los antibióticos, antifúngicos, antivirales y antihelmínticos, según si se utilicen para tratar bacterias, hongos, virus o protozoos, respectivamente. Por tanto, los antibióticos son aquellos fármacos capaces de reducir y controlar la presencia bacteriana. La era moderna de los antibióticos dio comienzo en 1928 con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming [5]. Desde entonces, los antibióticos son considerados como uno de los avances terapéuticos más exitosos de la historia, ya que han sido clave para el desarrollo de la medicina moderna y han salvado millones de vidas. Sin embargo, se han identificado resistencias a casi todos los antibióticos que han sido utilizados hasta la actualidad [6]. Esto provoca una pérdida en la efectividad de los tratamientos y supone una amenaza para la salud global, ya que han surgido un número creciente de infecciones difícilmente tratables mediante los métodos convencionales y se ha producido un incremento de la morbilidad, la mortalidad, y de los costes de los tratamientos de estas infecciones [7]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha catalogado la resistencia a los antibióticos como una de las diez principales amenazas para la salud pública, junto con problemas como la contaminación del aire y el cambio climático [8]. Se estima que la ineficacia de los antibióticos podría resultar en la pérdida de diez millones de vidas para el año 2050 [9]. Sin embargo, a pesar de que hoy en día la resistencia antimicrobiana se encuentra propagándose rápidamente a escala global, los mecanismos moleculares que generan resistencias se identificaron incluso antes de que la penicilina fuera descrita [10].

Cabe destacar que se han observado fenómenos de resistencia a los antibióticos en bacterias ubicadas en lugares remotos, donde no ha habido intervención humana directa. Por ello, tanto los genes que permiten la biosíntesis de antibióticos, como los que confieren resistencias, se encuentran en proceso de evolución desde hace billones de años [11]. En consecuencia, los antibióticos y la resistencia a estos desempeñan un papel crucial en la naturaleza, por ejemplo, la presencia de antibióticos en concentraciones subinhibitorias actúan como moléculas de señalización apoyando el proceso de quorum sensing, que se basa en la producción, detección y respuesta de moléculas extracelulares por parte de las bacterias como modo de comunicación entre ellas y la formación de biofilms [5], que son definidos como poblaciones bacterianas insertadas en una matriz autogenerada que les confiere resistencia.

Aunque la producción intrínseca de antimicrobianos por las propias bacterias ha sido un factor que ha contribuido a la evolución de genes de resistencia a antibióticos (ARGs, por sus siglas en inglés), no es la única responsable de la rápida propagación de estos factores a través de las cepas, especies y ambientes, observada desde la introducción de los antimicrobianos como agentes terapéuticos [12]. El uso excesivo y mala administración de antibióticos en la práctica clínica, agroalimentaria e industrial ha agravado el problema preexistente y ha contribuido al incremento de la permanencia de estos en el ambiente. Por ejemplo, los

antibióticos son empleados en la industria ganadera como profilácticos y promotores del crecimiento en la cría de animales, como aditivos en la agricultura y, en el ámbito de la salud, resulta frecuente no completar la pauta de administración por parte de los pacientes, lo que lleva a infecciones mal tratadas que reaparecen siendo resistentes al tratamiento [13], [14].

En consecuencia, la exposición de manera continuada de los microorganismos a los antimicrobianos ha acelerado la evolución de los mecanismos de resistencias y expandido el repertorio de genes de resistencia a antibióticos presentes en los reservorios naturales [14]. Según el número de antibióticos a los que es resistente la bacteria, podemos clasificarlas en multirresistentes (MDR), extensamente resistentes (XDR) e incluso bacterias no susceptibles a ninguna categoría antimicrobiana (panresistentes, PDR) [15].

### 1.1.1 MECANISMOS DE RESISTENCIA

Entre los distintos tipos de resistencia se distinguen la resistencia intrínseca, la adquirida y la adaptativa [10].

La resistencia intrínseca consiste en la habilidad para resistir a la acción de un antibiótico específico debido a las características funcionales o estructurales de la bacteria. Existen mecanismos de resistencia intrínseca de distinta naturaleza: el ejemplo más simple de este tipo de resistencia es la ausencia de una diana susceptible en la bacteria para un antibiótico específico [16]. Otro ejemplo típico en bacterias gram negativas ocurre cuando la composición y estructura química del antibiótico no puede penetrar a través de la membrana bacteriana externa [17].

Por otra parte, la resistencia adquirida afecta a bacterias que eran previamente sensibles a un determinado antibiótico [10]. Se basa en la plasticidad génica propia de las bacterias que les permite responder a una amplia gama de amenazas ambientales, incluida la presencia de moléculas antibióticas que ponen en peligro su existencia. De este modo, el desarrollo de resistencia adquirida puede ser resultado de una acumulación de mutaciones genómicas puntuales que confieren ventaja evolutiva, o debido a la adquisición externa de genes de resistencia obtenidos a partir de organismos resistentes presentes en el ambiente [18]. Así, las nuevas células resistentes sobreviven y se dividen, dando lugar a una progenie de células resistentes [19].

La adquisición de ADN foráneo mediante transferencia horizontal de genes (HGT, por sus siglas en inglés) es uno de los principales causantes del desarrollo de la resistencia adquirida. Clásicamente, las bacterias adquieren material genético externo por HGT mediante tres estrategias principales: conjugación, transformación y transducción [20]. La conjugación es el método más importante de transferencia horizontal, al ser el más eficiente. Implica el contacto célula-célula mediante adhesinas o pili formados en la superficie a través de los cuales se produce la transferencia de plásmidos de una célula donante a una célula receptora. Por otra parte, la transformación se basa en la incorporación, integración mediante recombinación y expresión funcional de fragmentos desnudos de DNA extracelular. Por último, en la transducción, los bacteriófagos, virus que infectan a bacterias, median la transferencia de ADN bacteriano encapsulado en la cápside viral desde una célula dadora a una célula aceptora [18].

Por último, la resistencia adaptativa se define como la resistencia a uno o más antibióticos inducida por señales específicas del entorno tales como estrés, estado de crecimiento, pH, etc. A diferencia de la resistencia adquirida y la intrínseca, esta resistencia es transitoria y permite a las bacterias responder de manera rápida y efectiva a la presencia de antibióticos, volviendo al estado original sensible una vez que la señal ha cesado. Surge debido a la modulación de la expresión génica mediante cambios epigenéticos en respuesta a los cambios ambientales [10], [14]. Un ejemplo de esto es la persistencia bacteriana. Las células persistentes son una subpoblación de bacterias tolerantes a los antibióticos de manera transitoria debido a que detienen su metabolismo en presencia del agente externo, hasta que cesa la acción de este. La aparición de estas células establece una población heterogénea y con ello se incrementan las posibilidades de adaptación a los cambios del entorno [21].

Generalmente, las alteraciones que conducen a resistencias antimicrobianas afectan a las vías de acción de los antibióticos. Como resultado, los mecanismos de resistencia pueden catalogarse según la ruta bioquímica responsable dicha resistencia, siendo las más frecuentes las (i) modificaciones químicas de la molécula antimicrobiana, (ii) prevención de que el antibiótico alcance su diana, (iii) cambios en las dianas y (iv) resistencia debido a los procesos adaptativos celulares [18].

Las alteraciones químicas en el antibiótico (i) se basan en la acción de enzimas capaces de modificar químicamente la molécula antimicrobiana. Las reacciones bioquímicas más frecuentes que llevan a la modificación del fármaco incluyen la acetilación, fosforilación y adenilación, que consiste en la adición de adeninas. Independientemente de la reacción, se provocará una interferencia estérica que disminuirá la afección del fármaco por su objetivo. Por otra parte, las bacterias previenen de que el antibiótico alcance su diana (ii) mediante el empleo de bombas de flujo que transportan de manera activa el antibiótico hacia el exterior [16]. Así mismo, se disminuye la afinidad de las dianas por la droga (iii) mediante mutaciones en estas o mediante modificaciones enzimáticas [10]. Por último, en el 'target bypass' (iv), se sustituye la diana original por otra estructuralmente similar, pero con menor afinidad por el antibiótico, lo que provoca que el antibiótico pierda efectividad y derive en la supervivencia de la bacteria.

## 1.2 ANTIMICROBIANOS

Hasta ahora, todos los antibióticos que se han introducido en la práctica clínica poseen una vida útil limitada. Cuando un nuevo compuesto es introducido, resultará efectivo en primer lugar. Sin embargo, eventualmente se ejercerá una presión selectiva hacia la supervivencia de una pequeña población de bacterias con mecanismos de resistencia para el compuesto, haciendo que este pierda su eficacia. Es por ello por lo que se pone de manifiesto la necesidad emergente de nuevos enfoques para superar la resistencia a los antibióticos, así como la búsqueda de alternativas a los antimicrobianos convencionales.

Se pueden establecer dos grandes grupos de alternativas a los antibióticos (Tabla 1) entre los que se distinguen las alternativas antimicrobianas, que tienen como objetivo la muerte patógeno o la inhibición de su crecimiento, es decir, que ejercen una acción directa sobre el microorganismo, y las alternativas no antimicrobianas, que ejercen una acción indirecta contribuyendo a la debilitación del patógeno. Por ejemplo, estos se centran en promover la actuación del sistema inmunológico del huésped o el aumento de la actividad de otros antimicrobianos [22].

Para combatir a los patógenos AMR con alternativas no antimicrobianas, se encuentran en desarrollo las vacunas basadas en mRNA que inducen la amplificación de proteínas recombinantes o antígenos [23] o vacunas con microorganismos atenuados [24], que prepararán al sistema inmune del huésped para una futura infección. También se encuentra en estudio la utilización de probióticos, que ayudan a reestablecer el balance de especies bacterianas en el intestino [25]. Otra alternativa en investigación es la terapia adyuvante, compuestos con poca actividad antimicrobiana o carentes de ella que estimulan la acción de los antibióticos, ayudando así a eliminar resistencias [26].

Dentro de las alternativas antimicrobianas se distinguen: la terapia con bacteriofagos (virus específicos para bacterias), que infectan selectivamente a las bacterias infecciosas manteniendo la integridad de las bacterias comensales gracias a la especificidad de diana de los bacteriófagos [27]; los péptidos antimicrobianos, que son un grupo de proteínas pequeñas que disrumen las membranas celulares [13], [14]. ; la utilización de enzimas antimicrobianas que puede emplear su capacidad proteolítica, oxidativa o de degradación de polisacáridos para atacar de manera directa a los patógenos [28] y por último, los compuestos naturales, que están siendo investigados como adyuvantes o en monoterapia, debido a propiedades como la inhibición del fenómeno de quorum sensing o la disrupción de la formación de biofilms [29].

**Tabla 1:** Alternativas a los antibióticos.

	<i>Alternativas</i>	<i>Referencias</i>
<b>No antimicrobianas</b>	Vacunas	[23], [24], [30]
	Probióticos	[25]
	Terapia adyuvante	[26]
<b>Antimicrobianas</b>	Bacteriófagos	[7], [27]
	Péptidos antimicrobianos	[27]
	Enzimas antimicrobianas	[28], [31]
	Compuestos naturales	[32], [33]

Dentro de los compuestos naturales destacan los aceites esenciales (EOs, por su siglas en inglés), que han sido empleados desde los inicios de la humanidad en el ámbito de la medicina debido a sus propiedades biológicas bactericidas, antifúngicas, antiinflamatorias y antioxidantes, entre otros [34]. Estos están formados por los componentes de aceites esenciales (EOCs, por sus siglas en inglés), que son sintetizados en los plastos o en el citoplasma de las plantas. Se caracterizan por tener actividad antimicrobiana, debida a sus propiedades químicas, en especial a los grupos fenólicos, aromáticos o grupos alcohol [33].

Respecto a su actividad antimicrobiana, se ha demostrado su acción contra protozoos, hongos y predominantemente bacterias, mostrando un poder antibacteriano más efectivo en bacterias gram positivas en comparación con las bacterias gram negativas [35]. Esto puede justificarse debido a que las bacterias gram negativas suelen verse menos afectadas por los productos naturales a causa de la presencia de la membrana externa [34]. Particularmente, en bacterias gram positivas, poseen un amplio rango de acciones inhibitorias contra los patógenos bacterianos, ya que son capaces de penetrar en los lípidos de la membrana plasmática debido a su naturaleza lipofílica y alterar significativamente su estructura, establecer asociaciones con los lípidos bacterianos que causan la pérdida de la integridad de los componentes celulares. También presentan otros mecanismos de acción intracelulares, como son el provocar estrés oxidativo e interrumpir la respiración celular o disminuir el potencial de membrana de las mitocondrias, afectando al ciclo del calcio [36]. Todo ello, deriva en la muerte de la bacteria [37].

Entre los distintos EOCs, se encuentra el farnesol (FOH), un alcohol sesquiterpénico ( $C_{15}H_{26}O$ ) que puede ser obtenido por síntesis orgánica o biológica. Cabe destacar que también puede ser secretado como un subproducto de la vía sintética de esteroides en *Candida albicans*. En este caso, actúa como molécula inmunomoduladora y de comunicación mediante quorum sensing [38]. También se encuentra presente en aceites esenciales derivados de plantas como la rosa, la melisa o la citronela [39].

Sin embargo, a pesar de presentarse los EOCs como una buena alternativa a los antibióticos, presentan muchas limitaciones que les impiden convertirse en una alternativa real en la actualidad. Algunas de estas desventajas son que no son estables cuando se exponen a factores como el calor, la humedad o la luz, son muy poco solubles en agua, y presentan una gran volatilidad [33]. Debido a su farmacocinética, son rápidamente metabolizados, derivando en una vida media corta y en una baja biodisponibilidad [40] y en última instancia, sus efectos reales son más débiles que los de los compuestos sintéticos [33].

Por suerte, todas estas desventajas se pueden solventar mediante el uso de la encapsulación de los EOCs en nanopartículas porosas (NPs). Las NPs protegen el cargo y evita que se volatilice, incrementan su solubilidad y estabilidad, evitan la acción de enzimas hidrolíticas y permiten la liberación controlada del cargo en presencia del estímulo que se desee [40]. En consecuencia, este sistema se presenta como una alternativa a los antimicrobianos convencionales contribuyendo a paliar el fenómeno creciente de resistencia a los antibióticos.

### 1.3 NANOTECNOLOGÍA

La nanotecnología, en su definición rígida, se basa en el diseño, caracterización y aplicación de materiales, estructuras y sistemas, controlando que su tamaño se encuentre a nanoescala[41]. En los últimos 40 años, ha emergido como un campo multidisciplinar en crecimiento exponencial debido a sus múltiples áreas de aplicación tales como la medicina, la agroalimentación, los cosméticos, la óptica o la electrónica[42]

En el ámbito farmacéutico, los tratamientos convencionales penetran de manera limitada en los distintos tipos celulares, poseen una baja retención y se encuentran condicionados por el desarrollo de resistencias[43]. Por ello, resulta necesario el desarrollo de nuevas perspectivas, en concreto, la nanotecnología ha surgido en las últimas dos décadas como una nueva aproximación para el desarrollo de nuevas terapias [44]. En este contexto, los nanofármacos diseñados a partir de nanomateriales podrían conferir ventajas en comparación con la terapia actual. Esto es debido a que las partículas comprendidas en este rango de tamaño (10-1000 nm) presentan ventajas basadas en sus propiedades fisicoquímicas, que son muy diferentes a las propiedades que poseen las partículas macroscópicas [43]. Por ello, la utilización de nanofármacos podría permitir sobrevenir algunos de los problemas actuales como: mejora de la liberación de fármacos poco solubles en agua, la liberación dirigida de fármacos de manera específica según distintos tipos celulares y tejidos o la co-entrega de dos o más fármacos permitiendo terapias combinadas. En consecuencia, las tecnologías de liberación de fármacos basados en nanomateriales han recibido un interés considerable, debido a la entrega de fármacos a los tejidos y células de manera efectiva, eficaz y con una reducción de los efectos secundarios [45].

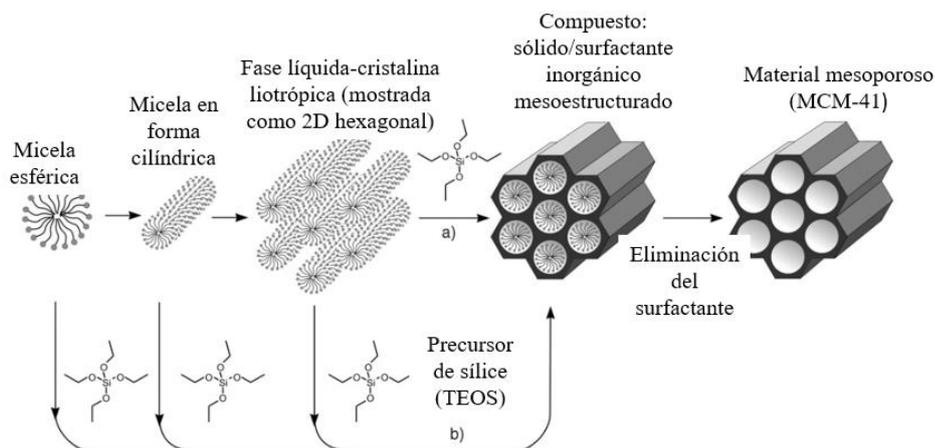
Las nanopartículas (NPs) se definen como dispersiones de partículas o partículas sólidas orgánicas o inorgánicas de tamaño que se encuentra en el rango de 10-1000 nm[46]. Los sistemas terapéuticos que emplean NPs se basan en la encapsulación del compuesto en una matriz polimérica, con el propósito de lograr una administración más precisa. Estas NPs típicamente poseen un tamaño superior a 100 nm y un sistema ordenado de poros que permite la carga de compuestos en su interior [43]. Algunas de las aplicaciones potenciales de las NPs en medicina son: el tratamiento de distintos tipos de cáncer evitando la utilización de quimioterapia, el tratamiento de infecciones causadas por cepas de bacterias multirresistentes, la inhibición de la formación de biofilms y el diagnóstico de enfermedades [47].

Entre los distintos tipos de nanopartículas, se pueden distinguir las NPs orgánicas y las inorgánicas. Algunos ejemplos de nanopartículas orgánicas son los nanotubos de carbono o los dendrímeros, estas, presentan una elevada biocompatibilidad. Por otra parte, dentro de las nanopartículas inorgánicas se encuentran aquellas sintetizadas a partir de materiales de sílice mesoporosa o nanopartículas metálicas. En concreto, los materiales de sílice mesoporosa, se definen como materiales sólidos con estructura porosa, cuyos tamaño de poros está comprendido entre 2 y 50 nm y se distribuyen de manera ordenada a lo largo del material [41]. Concretamente, las nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNs) se han postulado como vehículo farmacológico novedoso y prometedor debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas como su elevada área de superficie específica (ratio superficie a masa), su volumen de carga, su notable estabilidad química y térmica y su capacidad de adsorber moléculas en su superficie, permitiendo su funcionalización con moléculas terapéuticas o puertas moleculares [48]. Estas propiedades permiten realizar una liberación controlada en la localización deseada y en presencia de un estímulo concreto.

Dentro de la familia de los materiales mesoporosos de sílice, destaca la MCM-41 (Mobil Composition of Matter No.41), cuya primera utilización se remonta a 1992 por parte de científicos de la compañía Mobil Oil Corporation. Desde su descubrimiento, se han efectuado numerosos avances en el control y la modificación de sus propiedades [49]. Además, cabe destacar que la síntesis de la MCM-41 es simple, escalable y económica [50] , tal y como se explica a continuación.

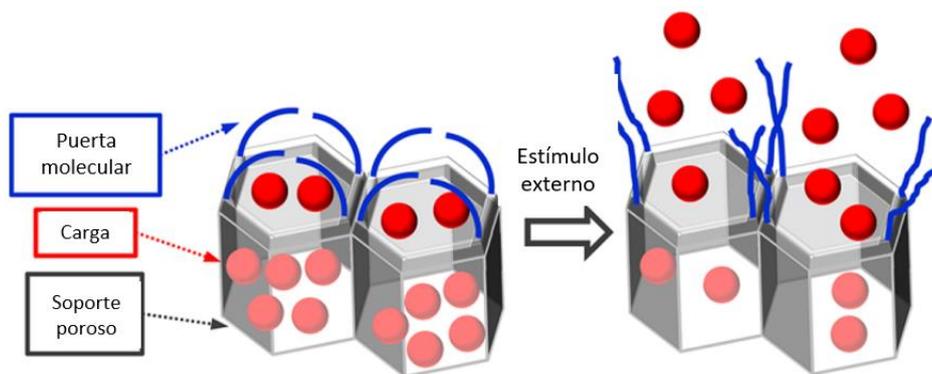
El procedimiento de síntesis de la MCM-41, se fundamenta en un proceso 'sol-gel' que implica la conversión de monómeros en solución (sol) en una red sólida (gel). La síntesis del sistema se basa en la condensación de

tetraetil ortosilicado (TEOS), empleado como precursor de la sílice, en presencia de surfactantes catiónicos en condiciones básicas. El surfactante utilizado es el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), que actúa como ‘template’ formando supermicelas, que sufrirán una reordenación en el espacio a unas condiciones de presión y temperatura específicas. A continuación, se adicionará el precursor de sílice al medio de reacción, lo que provoca la polimerización por condensación formando una red de enlaces siloxano. Por último, se llevará a cabo la eliminación del surfactante, que se puede llevar a cabo mediante la calcinación de las MSNs, o por extracción del surfactante en medio ácido, dejando libres los poros de la nanopartícula, y susceptibles a ser cargados [51] (Figura 1).



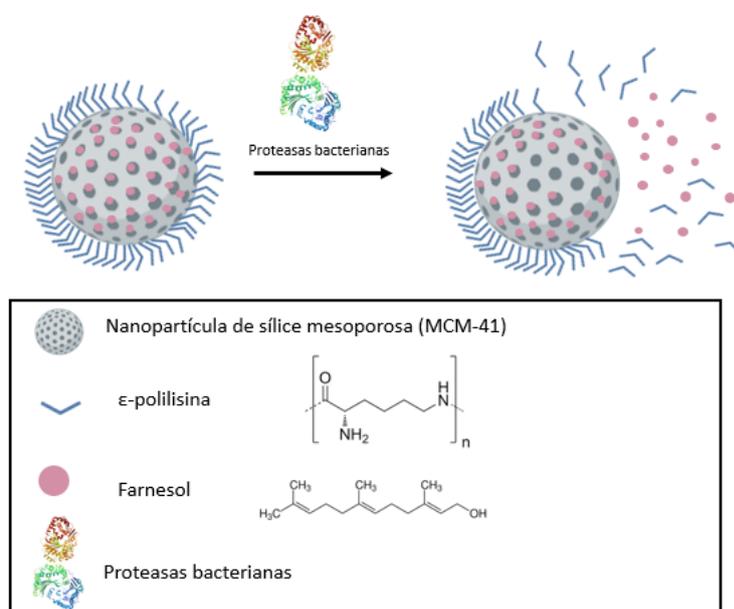
**Figura 1:** Mecanismo del procedimiento de síntesis de la MCM-41. Adaptación de [53].

Concretamente, las MCM-41 pueden ser funcionalizadas con moléculas orgánicas en su superficie que actúan como puertas moleculares o ‘gated materials’. Esta aproximación se basa en la encapsulación y liberación controlada de fármacos en las NPs mesoporosas de sílice, gracias a la utilización de moléculas orgánicas funcionalizadas en la superficie de los materiales de sílice mesoporosa actuando como puertas moleculares que evitan la liberación de los fármacos y que únicamente permiten la entrega del fármaco contenido en la NP en respuesta a un estímulo específico [52]. Entre los distintos estímulos se encuentran: pH, enzimas hidrolíticas, especies redox o características de la diana del tratamiento (Figura 1). La composición de estos materiales se basa principalmente en dos subunidades: (i) un soporte inorgánico poroso donde se realizará la carga del fármaco y (ii) entidades moleculares o supramoleculares que son funcionalizadas en la superficie externa de la NP, que actuarán como puerta molecular [53].



**Figura 2:** Representación esquemática de un material mesoporoso de sílice cargado y funcionalizado con puertas moleculares para su uso en liberación controlada. Adaptación de [50]

Estos materiales van a ser utilizados en este proyecto, donde se ha diseñado una alternativa a los antibióticos, basada en la utilización de un EOC, el farnesol, con el objetivo de tratar distintas bacterias gram positivas (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*) y gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*). Con el propósito de superar las limitaciones comunes asociadas a los aceites esenciales, como son su alta reactividad, su alta volatilidad y su baja solubilidad en agua, se ha llevado a cabo la encapsulación del farnesol dentro de una nanopartícula mesoporosa de sílice de tipo MCM-41. Por otra parte, para lograr un efecto específico en presencia de estas bacterias, se ha funcionalizado la nanopartícula con una puerta molecular proteica, la  $\epsilon$ -polilisina (EPL). Esto, permitirá una retención en la liberación del farnesol y una liberación controlada en presencia de las proteasas secretadas por las bacterias, que degradarán la puerta, permitiendo la liberación controlada del cargo (Figura 3). Adicionalmente, con el propósito de entender las diferencias observadas en el efecto antimicrobiano frente a gram positivas y gram negativas, se ha caracterizado el mecanismo de acción del farnesol frente a las bacterias del estudio.



**Figura 3:** Representación de la apertura de la puerta molecular y liberación de carga. Creado en Biorender.com

## 2. OBJETIVOS

Debido al panorama actual de resistencia a los antibióticos, el objetivo principal de este proyecto es la elaboración de una alternativa antimicrobiana basada en la utilización de nanopartículas que permita la liberación controlada de farnesol en presencia de proteasas secretadas por bacterias.

Los objetivos específicos de este proyecto se centran en:

1. Desarrollar y caracterizar un sistema de liberación específica y controlada basado en nanopartículas de tipo MCM-41 con fines antimicrobianos.
2. Estudiar la actividad y eficacia del farnesol libre y encapsulado, como alternativa a los antibióticos convencionales.
3. Caracterizar el mecanismo de acción del farnesol libre frente a las bacterias.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 REACTIVOS Y CEPAS BACTERIANAS

Los reactivos químicos y disolventes empleados fueron obtenidos a partir de fuentes comerciales y se emplearon sin purificación adicional a menos que se especifique lo contrario.

Las cepas bacterianas que se utilizaron en este trabajo se obtuvieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). En este trabajo se han utilizado las siguientes bacterias (Tabla 2): *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) ATCC 35984, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ATCC 47085 y *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922.

**Tabla 2:** Cepas empleadas en el estudio.

<b>Bacteria</b>	<b>Referencia</b>	<b>Tipo de bacteria</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>Riesgo biológico</b>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 35984	Gram positiva	Müller-Hinton Broth	Riesgo 1
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Gram positiva	Müller-Hinton Broth	Riesgo 2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 47085, PAo1	Gram negativa	Müller-Hinton Broth	Riesgo 2
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Gram negativa	Müller-Hinton Broth	Riesgo 1

#### 3.2 CULTIVO DE BACTERIAS

Los cultivos de cada bacteria se iniciaron a partir de un cultivo primario almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  en el medio indicado por la casa comercial (CECT) con un 10% de glicerol, para evitar la formación de cristales que pudiesen dañar las células. Se rascó la superficie del glicerinado con un asa de siembra estéril y se resuspendió en un tubo falcon de 15 mL con 10 mL de Müller-Hinton Broth (MHB); se incubaron los tubos a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 16 h a 120 rpm de agitación. Con el fin de obtener colonias aisladas para crecer los cultivos posteriores, se sembraron las distintas bacterias en placas de agar (1,5 % p/v) de MHB estériles mediante el método de cuádruple estría.

Para la preparación de los cultivos a partir de los cuales se realizaron ensayos de actividad antimicrobiana y caracterización del mecanismo de acción, se inocularon 10 mL de MHB con una colonia aislada de las placas previamente crecidas. Los inóculos resultantes se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 18 horas con agitación de 120 rpm para obtener cultivos con una concentración de bacterias de aproximadamente  $10^8$  unidades formadoras de colonias por mL (CFU/mL). En función de los requerimientos de cada ensayo, se diluyeron los cultivos para obtener las concentraciones de bacterias deseadas.

#### 3.3 SÍNTESIS MCM-41

La síntesis de las nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNs) tipo MCM-41 se basa en la utilización de TEOS como precursor inorgánico de la sílice y de CTAB como surfactante catiónico. En un vaso de precipitados de 1 L, se disolvió 1,00 g de CTAB 99% (2,74 mmol) en 480 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada, calentando a  $50^{\circ}\text{C}$  en agitación (500 rpm) para disolver el surfactante. Con el objetivo de basificar el medio, se adicionaron 3,5 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 2 M y se aumentó la temperatura a  $80^{\circ}\text{C}$  con la misma agitación. Se cubrió el recipiente con un vidrio de reloj para minimizar la evaporación del disolvente y evitar la disminución del volumen durante la reacción.

Alcanzados los  $80^{\circ}\text{C}$ , se añadieron 5 mL de TEOS 98% (25,7 mmol) gota a gota (aproximadamente  $5\text{ mL min}^{-1}$ ) y se aumentó la agitación (800 rpm). La mezcla resultante, se agitó durante 2 h a  $80^{\circ}\text{C}$ . En este tiempo, la disolución incolora y transparente, se tornará de color blanco. Transcurrido este tiempo, se dejó enfriar a

temperatura ambiente, se centrifugaron las nanopartículas durante 20 minutos a 9500 rpm y se realizaron lavados con agua desionizada hasta obtener un pH neutro (pH 6-7). El sólido obtenido se secó en estufa a 70°C obteniendo las nanopartículas 'as made'. Por último, con el objetivo de eliminar el CTAB del interior de los poros, las nanopartículas se calcinaron siguiendo un programa de temperatura que aumenta la temperatura de 25°C a 550°C durante 5 horas y 30 minutos, obteniendo el sólido MCM-41 calcinado y con los poros disponibles para poder encapsular los compuestos de interés.

### **3.4 ENCAPSULACIÓN DE FARNESOL EN MCM-41 (MCM-FOH)**

Para encapsular el farnesol en el interior de las nanopartículas MCM-41 calcinadas se utilizó el método de adsorción de vapor. Para ello, se pesaron 100 mg de nanopartículas calcinadas y se añadieron junto con 100 mg de farnesol (113 µL, 0,5 mmol) en un vial de cromatografía tapado. Se dejó agitando vigorosamente durante toda la noche a 40 °C. Como resultado, el farnesol se carga en los poros de las nanopartículas gracias a la elevada volatilidad que presentan los EOCs. El resultado de la síntesis serán las nanopartículas cargadas con farnesol (MCM-FOH).

### **3.5 FUNCIONALIZACIÓN DE MCM-41-FOH (MCM-FOH-INCO) Y UNIÓN DE LA PUERTA MOLECULAR (MCM-FOH-EPL)**

El procedimiento de funcionalización de la superficie de la MCM-41 cargada consta de dos pasos. En primer lugar, se funcionalizó con un trietoxisilano con un grupo isocianato (iNCO) terminal. A continuación, se unió la puerta molecular, que en este caso fue la ε-polilisina (EPL), formando un enlace covalente entre el grupo isocianato del iNCO y la EPL.

Para ello, se disolvieron 50 µl (0,20 mmol) de farnesol en 3 mL de acetonitrilo (ACN). A continuación, se añadieron a la disolución 100 µl de 3-trietoxisililpropil isocianato (17,53 mmol) y 100 mg MCM-FOH. Se dejó incubando durante 5:30 h en agitación a temperatura ambiente. Tras este tiempo, la disolución se secó al vacío, obteniendo nanopartículas cargadas con farnesol y con el grupo isocianato en la superficie (MCM-FOH-iNCO).

Para el anclaje de la puerta molecular a MCM-FOH-iNCO, se disolvieron 100 mg de ε-polilisina (0,025 mmol) en 2,25 mL de agua. A continuación, las nanopartículas obtenidas en el paso anterior (MCM-FOH-iNCO) se resuspendieron en 4,5 mL de ACN y 30 µl de farnesol (0,12 mmol), que se adiciona en exceso con el objetivo de evitar que el contenido de la nanopartícula salga hacia el exterior, es decir, que se descargue. Esta disolución se mezcló junto con la disolución de EPL y se homogenizó con el sonicador brevemente. A continuación, se adicionaron 150 µl de trietilamina (TEA) (1,13 mmol), que se emplea como base para catalizar la formación del enlace urea entre el grupo isocianato y los grupos amina de la EPL y se incubó durante 3 h a temperatura ambiente en agitación suave. Transcurrido este tiempo, se llevaron a cabo 3 lavados con agua destilada y se secó a vacío. Una vez secas, se obtuvieron las nanopartículas finales cargadas y funcionalizadas (MCM-FOH-EPL).

### **3.6 MÉTODOS GENERALES DE CARACTERIZACIÓN E INSTRUMENTOS**

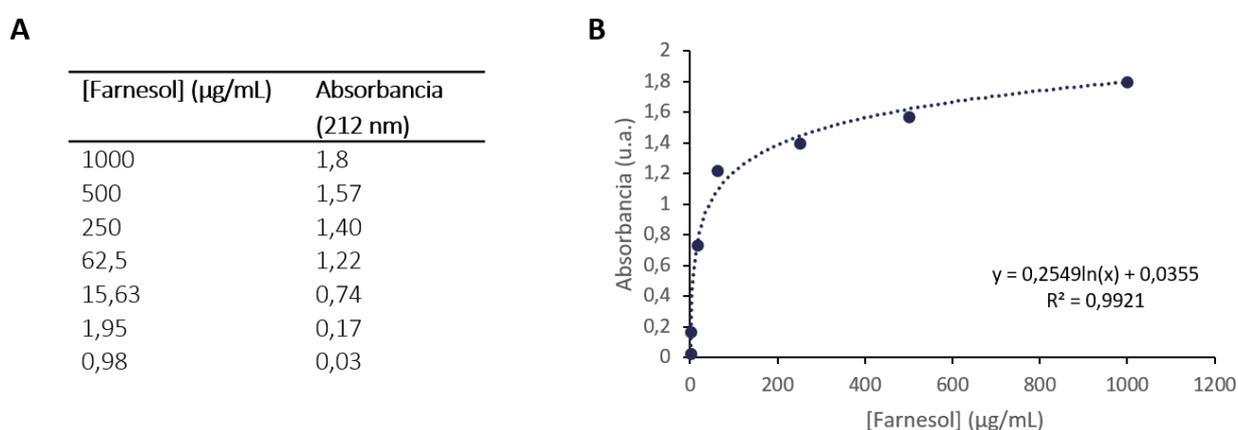
Las nanopartículas obtenidas se caracterizaron mediante los procedimientos estándar de caracterización de sólidos, entre los que se incluyen la difracción de rayos X en polvo (PDXR), potencial zeta, espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). La medida de la difracción por rayos X (PXDR) se llevó a cabo con un difractómetro D8 Advance Seifert 3000TT empleando radiación CuKα en ángulos bajos ( $1,5 < 2\theta < 8$ ). Las medidas de potencial zeta se realizaron empleando el ZetaSizer Nano ZS (Malvern). Por otra parte, la espectroscopía de infrarrojos se empleó el espectrómetro FTIR de Bruker modelo Tensor 27. Por último, para obtener las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se empleó el modelo JEM-1400 Flash de 120 kV.

### 3.7 CUANTIFICACIÓN DE LA CANTIDAD DE FARNESOL ENCAPSULADO: EXTRACCIÓN FORZADA

Con el objetivo de determinar la concentración de farnesol encapsulado en el sólido MCM-FOH-EPL, se realizó una liberación forzada a partir de dos disoluciones de concentraciones diferentes conocidas de MCM-FOH-EPL (2000  $\mu\text{g/mL}$  y 5000  $\mu\text{g/mL}$ ) en hexano. Para ello, se suspendieron las nanopartículas necesarias para conseguir las concentraciones deseadas en 1 mL de hexano y se incubaron durante 24 h, con agitación vigorosa (1000 rpm) a 25 °C, con el objetivo de extraer toda la carga de farnesol de las nanopartículas. Posteriormente, se centrifugó durante 7 minutos a 12500 rpm y se midió la absorbancia del sobrenadante a 212 nm (Tabla 3). Las medidas de UV-visible se llevaron a cabo en un espectrofotómetro JASCO V-650.

Paralelamente, se realizó una curva de calibrado empleando farnesol disuelto en hexano a concentraciones conocidas 1000  $\mu\text{g/mL}$ - 0,98  $\mu\text{g/mL}$  mediante diluciones seriadas  $\frac{1}{2}$ . En la Figura 4A se muestran los datos correspondientes a la curva de calibrado y en la Figura 4B se observa la curva de calibrado.

Empleando la curva de calibrado del farnesol libre y las medidas de absorbancia obtenidas para cada concentración de nanopartículas MCM-FOH-EPL, se obtuvo la concentración de farnesol por mg de MCM-FOH-EPL



**Figura 4:** (A) Datos de la curva de calibrado de farnesol en hexano; (B) Curva de calibrado de farnesol en hexano: medida de la absorbancia a distintas concentraciones del compuesto.

### 3.8 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La medida de la actividad antimicrobiana del farnesol libre y del farnesol encapsulado (MCM-FOH-EPL) se determinó mediante la obtención de la concentración mínima inhibitoria (MIC). Estos datos nos permitirán establecer la concentración mínima a la que se inhibe el crecimiento de los microorganismos, que no implica la muerte de estos.

Para llevar a cabo el cálculo de las MIC, se partió de un cultivo fresco de la bacteria de elección obtenido mediante el procedimiento descrito en el apartado 4.2. Para el ensayo se utilizó una placa de 96 pocillos para el tratamiento con farnesol y otra placa para el tratamiento del farnesol encapsulado (MCM-FOH-EPL). En la Figura 5 se representa el uso de la placa de 96 pocillos para los ensayos con farnesol libre y con farnesol encapsulados.

Para llevar a cabo el ensayo, en la placa de 96 pocillos, se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de MHB en los pocillos exteriores. Esto, sirvió como control de evaporación, asegurando que la concentración de los pocillos de estudio no varíe evitando su evaporación, y como control negativo. El control positivo contó únicamente con bacterias (columna 2). En la parte superior de la columna 11, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  del tratamiento (bien farnesol libre o MCM-FOH-EPL) únicamente a los tres pocillos superiores a una concentración 2x de la deseada (en una placa farnesol libre y en otra placa del farnesol encapsulado MCM-FOH-EPL), ya que al añadir la bacteria al final del

experimento se diluye a la mitad la concentración de todos los pocillos. En el resto de las columnas, se añadieron 100 µl de medio para realizar diluciones seriadas ½ del tratamiento hasta la columna 3, en la que se descartaron los últimos 100 µl.

Por una parte, para la obtención de los valores de MIC de las MCM-FOH-EPL sobre las bacterias gram positivas (*S. epidermidis*, *S. aureus*) y gram negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*), se suspendieron las NPs MCM-FOH-EPL en medio MHB a una concentración 2x de la concentración inicial deseada y se realizaron diluciones seriadas ½ pasando 100 µl de una columna a la anterior. El intervalo de concentraciones empleado fue de 2000-3,91 µg/mL para *S. aureus* y *S. epidermidis* y 5000- 9,77 µg/mL para *E. coli* y *P. aeruginosa*. Estas concentraciones fueron probadas de manera empírica hasta determinar una concentración inicial que inhibiera el crecimiento bacteriano en alguno de los pocillos de la placa, en el caso de las bacterias gram positivas.

En el caso del farnesol libre, se empleó el mismo procedimiento descrito con anterioridad. Las concentraciones empleadas fueron 2000-3,91 µg/mL para *S. aureus* y 5000- 9,77 µg/mL para *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. epidermidis*.

Una vez hechas las diluciones del tratamiento, se adicionaron 100 µl de cultivo a cada uno de los pocillos a una concentración de 10<sup>6</sup> CFU/mL.

Por último, todas las placas se incubaron a 37 °C durante 18h. Para revelar las placas y establecer la MIC, se añadieron 30 µl de resazurina (0,015 % p/v) esterilizada mediante filtración a través de un filtro de 0,22 µm en cada pocillo y se dejaron incubar a 37 °C durante 2 horas. La resazurina es un colorante que actúa como indicador redox, de modo que, durante este tiempo, las bacterias activas reducen la resazurina (inicialmente de color azul) a resorufina (color rosa), aportando una medida cuantitativa directa de la actividad metabólica bacteriana. Se consideró la MIC a la concentración más baja de compuesto en la que no se podía observar cambio de color de la resazurina. La determinación de esta concentración se llevó a cabo mediante evaluación visual.

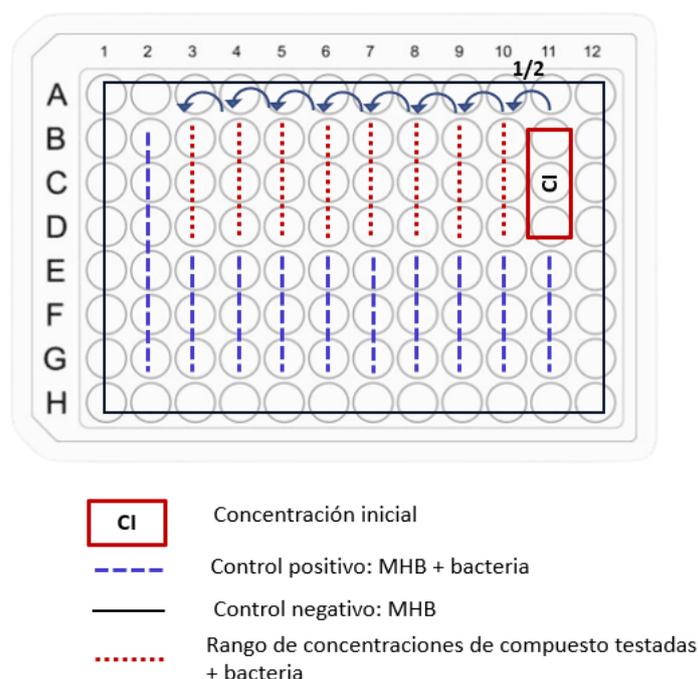


Figura 5: Esquema representativo del ensayo de MIC.

### 3.9 EVALUACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN

#### 3.9.1 CUANTIFICACIÓN DE DAÑO DE MEMBRANA POR ABSORCIÓN DE CRISTAL VIOLETA

Con el objetivo de determinar si se produce daño en la membrana de los microorganismos tras el tratamiento con farnesol libre, se empleó el colorante cristal violeta, un compuesto capaz de penetrar a través de la membrana bacteriana, en aquellas células en las que se ha alterado la permeabilidad de esta. De este modo, aquellas bacterias cuya membrana se encuentre alterada serán capaces de incorporar el colorante en el interior celular tiñéndose así de color violeta. Por el contrario, aquellas que no presenten daños, no serán capaces de absorberlo, y ese, quedará en el medio, por lo que las bacterias no se teñirán.

Por lo tanto, en este ensayo será empleado para determinar si el compuesto libre produce alteraciones a nivel de la membrana externa bacteriana.

Para la realización de este ensayo se creció un cultivo de bacterias en medio líquido MHB el día anterior, tal y como se indica en el apartado 4.2. A continuación, para cada bacteria, en una placa de 96 pocillos se hicieron diluciones seriadas  $\frac{1}{2}$  de farnesol libre suspendido en medio MHB. El rango de concentraciones finales empleadas fue desde 2000-3,91  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para *S. aureus* y 5000-9,77  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. epidermidis*. Finalmente, se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de cada bacteria a cada uno de los pocillos y se incubó durante 18h a 37 °C.

Trascurrido el tiempo de tratamiento, el contenido de cada pocillo se pasó a eppendorfs de 1,5 mL, se centrifugaron durante 5 minutos a 9500 rpm y se retiró el sobrenadante con el objetivo de eliminar el medio de cultivo. Se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de una disolución de cristal violeta (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en agua destilada a cada uno de los eppendorfs, se resuspendieron las bacterias tras el tratamiento con farnesol libre y se dejó incubar durante 15 minutos a 37 °C. A continuación, se centrifugaron los eppendorfs durante 15 min a 9500 rpm y se midió la absorbancia del sobrenadante en un espectrofotómetro UV/Vis a 590 nm. En el sobrenadante obtenido, se podrá determinar cuánto cristal violeta ha sido absorbido por las bacterias, que se quedarán al fondo del pellet. Las medidas de UV-visible se llevaron a cabo en un espectrofotómetro JASCO V-650.

Los datos se expresaron en porcentaje de cristal violeta absorbido, empleando la siguiente fórmula:

$$\% CV = 100 - \left[ \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia CV}} \right] \cdot 100$$

#### 3.9.2 MICROSCOPÍA CONFOCAL

Con el propósito de investigar el mecanismo de acción del farnesol libre, se utilizó la técnica de microscopía confocal para observar y evaluar la viabilidad de las poblaciones bacterianas según la integridad de la membrana celular.

Para la obtención de imágenes se utilizó un microscopio Leica TCS SPE. Se creció un cultivo de cada una de las bacterias del estudio y se trataron con farnesol libre con el procedimiento indicado en el apartado 4.9.1. Las imágenes fueron tomadas tras 24 h de tratamiento.

Las concentraciones a visualizar se transfirieron a eppendorfs para realizar una tinción bacteriana. El kit empleado fue Baclight LIVE/dead, formado por el fluoroforo SYTO9 ( $\lambda_{\text{ex/em}} = 480/500 \text{ nm}$ ), que tiñe las células, cuya membrana se encuentra intacta, de verde y por yoduro de propidio ( $\lambda_{\text{ex/em}} = 490/635 \text{ nm}$ ), que tiñe las células, cuya membrana externa se encuentra alterada, de rojo. A continuación, se visualizó la muestra a 63x aumentos con aceite de inmersión, excitando con los láseres de isocianato de fluoresceína (FITC) ( $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ ) y rodamina ( $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$ ).

### 3.9.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE ALTA RESOLUCIÓN DE BARRIDO DE EMISIÓN DE CAMPO (HRFESEM)

Para evaluar el mecanismo de acción de la nanopartícula MCM-FOH-EPL sobre las estructuras externas de las bacterias de estudio se tomaron imágenes de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo de alta resolución (HRFESEM). Para ello, se creció un cultivo de cada una de las bacterias del estudio tal y como se explica en el apartado 4.2. A continuación, se diluyó el cultivo para tener una densidad de células de  $10^6$  CFU/mL y se trataron las bacterias con distintas concentraciones MCM-FOH-EPL en MHB (0, 400 y 1000  $\mu\text{g/mL}$ ). Los cultivos tratados se incubaron durante 18 h, a 37 °C. Las concentraciones del ensayo fueron elegidas al encontrarse en el en el rango de concentraciones sub y suprainhedoras para las bacterias gram positivas.

Para la preparación de la muestra se dispusieron 20  $\mu\text{l}$  de cultivo a la concentración deseada en una placa de 2x2 cm de acero inoxidable pulido y se dejó secar en la estufa. La muestra se fijó durante 1 h con glutaraldehído 3 % y se lavó tres veces con agua destilada. Con el objetivo de deshidratar la muestra, se sumergió en un gradiente de etanol a concentraciones crecientes (10/20/30/40/50/70/80/90/100 %) durante 10 minutos por cada concentración. Por último, se dejó secar la muestra en la estufa para poder visualizarla al microscopio Zeiss modelo Ultra 55.

### 3.9.4 ENSAYO DE MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD RESPIRATORIA MEDIANTE LA TASA DE REDUCCIÓN DE RESAZURINA

Con el fin de observar cambios en la actividad respiratoria en las bacterias, se empleó la resazurina, ya que, si las bacterias son metabólicamente activas, serán capaces de reducir la resazurina (color azul) a resorufina (color rosa), y la velocidad de transformación será proporcional a la actividad respiratoria.

El tratamiento se llevó a cabo de manera idéntica al protocolo descrito en el punto 4.9.1. En este caso, se realizaron los tratamientos por duplicado para realizar mediciones de la actividad respiratoria a tiempos distintos: tiempo inicial de adición de resazurina ( $T_0$ ) y tiempo en el que se visualice el cambio de color de azul a rosa ( $T_1$ ), que corresponde con la reducción de resazurina a resorufina.

Trascurridas 18 h tras el tratamiento de farnesol libre en las cuatro bacterias descritas en el apartado anterior, se transfirió el contenido de cada uno de los pocillos a eppendorfs, para posteriormente añadir 30  $\mu\text{l}$  de resazurina (0,015% p/v) en agua destilada previamente esterilizada por filtración con un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ . Los eppendorfs correspondientes a  $T_0$  se centrifugaron inmediatamente después de adicionar la resazurina durante 7 minutos a 12500 rpm, se recuperó el sobrenadante y se midió la fluorescencia en el espectrofotómetro a  $\lambda_{\text{ex}} = 540 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$ . Las medidas de fluorescencia se realizaron con un espectrofotómetro JASCO FP-8500.

Por otra parte, el resto de eppendorfs, se dejaron incubando en agitación a 37°C hasta que se observó un cambio de color en la resazurina en los viales tratados ( $T_1$ ). Con esto, nos aseguramos de que, si no se produce cambio no sea por falta de tiempo de incubación. Tras ello, se centrifugaron durante 7 minutos a 12500 rpm, se recuperó el sobrenadante y se midió la fluorescencia con los parámetros especificados anteriormente.

Los datos se expresaron en porcentaje de reducción de resazurina en función de la concentración de tratamiento, empleando la siguiente fórmula:

$$\Delta \text{Reducción resazurina} = \frac{\Delta \text{fluorescencia}}{\Delta \text{tiempo}}$$

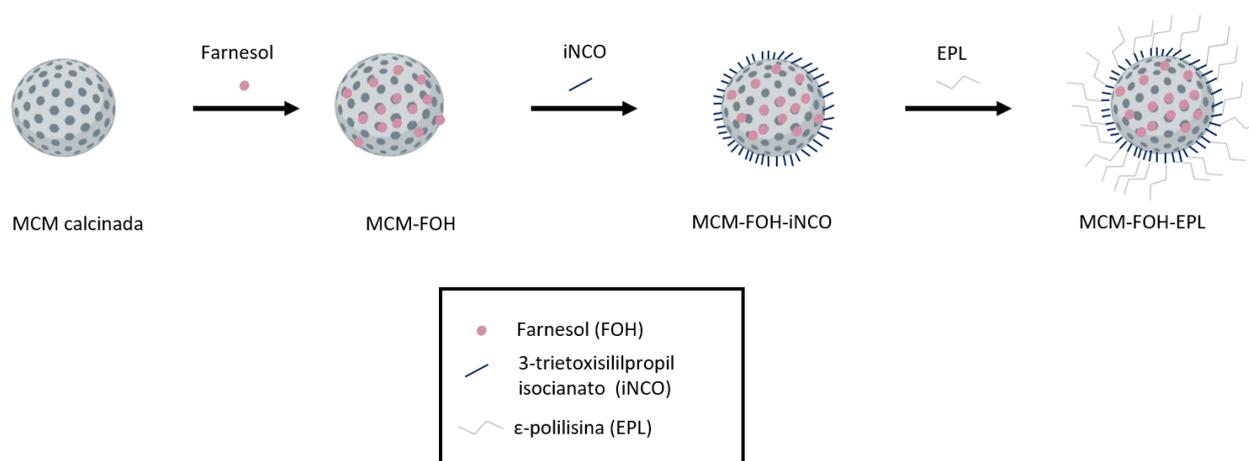
### 3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los ensayos de MIC han sido realizados por triplicado (N=3) para comprobar la reproducibilidad de los resultados obtenidos. Cabe destacar que en el ensayo de MIC, en cada placa multipocillo había tres réplicas del tratamiento, lo que resulta en N=9. Para la representación de los datos, se emplean los valores de la media y las barras de error indican la desviación típica de las medias.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DEL SISTEMA DE LIBERACIÓN (MCM-41)

El objetivo principal es comprobar que se ha llevado a cabo una correcta síntesis de la nanopartícula final a través de los distintos pasos de síntesis (Figura 6). De este modo, se podrá seguir el proceso de síntesis asegurando que se lleva a cabo una correcta formación del enlace urea que permite la unión entre el grupo isocianato y las aminas de la EPL. Así, la correcta formación de este enlace permite la apertura de la puerta molecular en presencia de las proteasas secretadas por las bacterias.



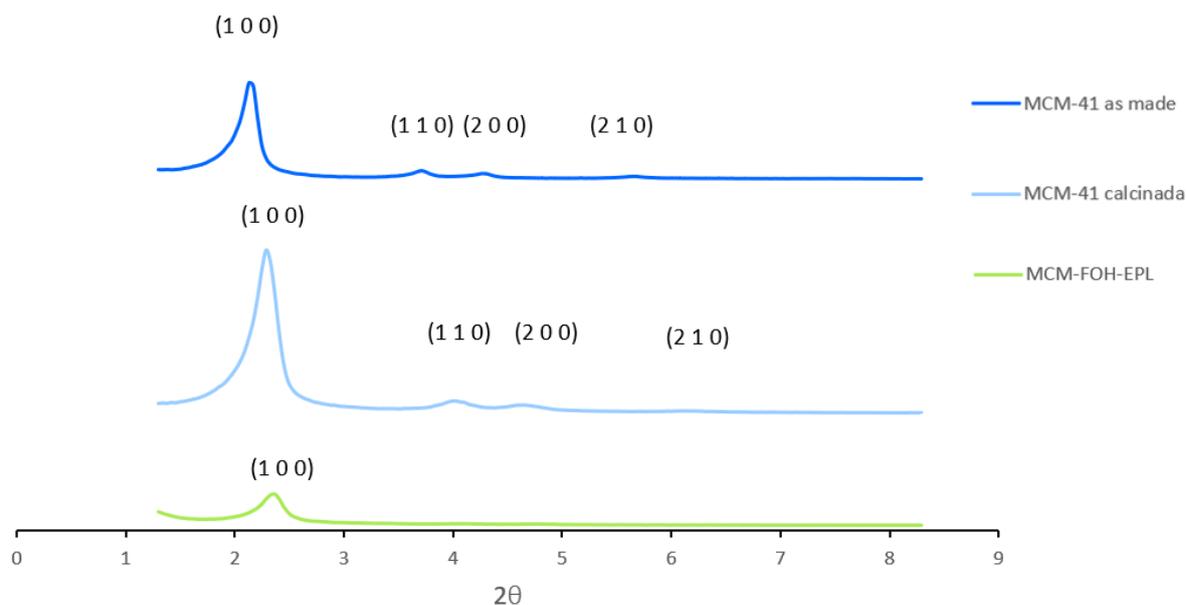
**Figura 6:** Esquema representativo del proceso de síntesis y carga de la nanopartícula final MCM-FOH-EPL. Creado en Biorender.com

Para comprobar la correcta síntesis y carga de la nanopartícula diseñada, se procedió a la caracterización del material mediante las técnicas de difracción de rayos X, espectroscopía de infrarrojos, medida del potencial Z y microscopía electrónica de transmisión.

La técnica de difracción de rayos X es una técnica no destructiva empleada para la caracterización de materiales cristalinos. Se basa en el análisis del patrón de difracción de rayos X al incidir el haz sobre una muestra en polvo. En este caso, será empleada para comprobar la evolución del sistema a lo largo del proceso de síntesis y el ordenamiento de la estructura porosa.

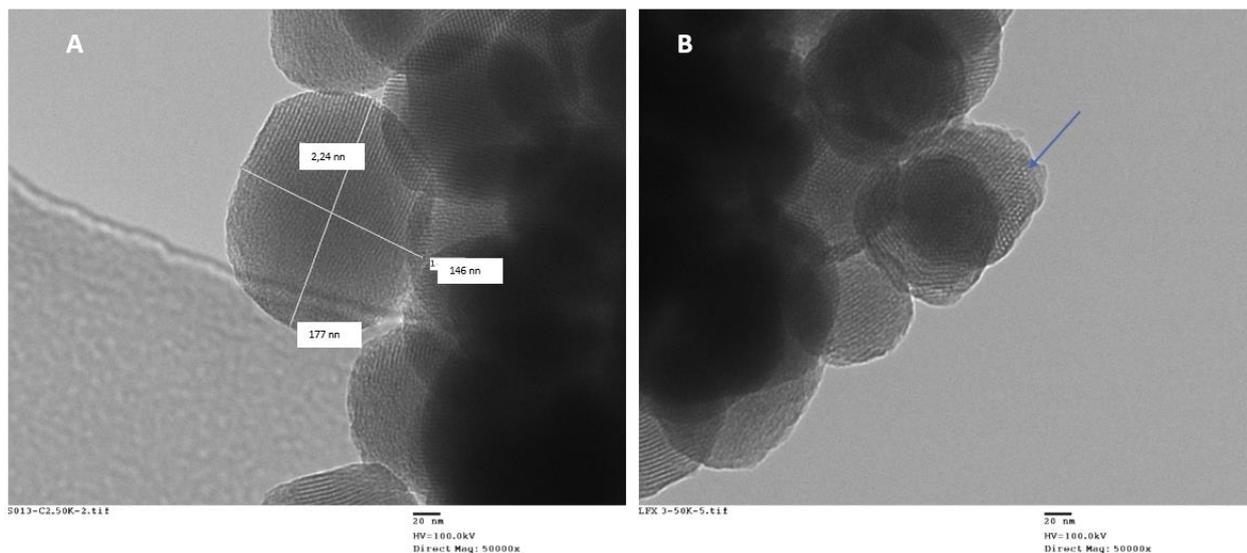
Concretamente, la NP MCM-41 puede entenderse como una estructura empaquetada hexagonal con poros bidimensionales que da lugar a un difractograma característico formado por cuatro conjuntos de planos, los denominados planos de Bragg (100), (110), (200), (210). La Figura 7 arriba confirma la estructura hexagonal ordenada, debido a la presencia de estos planos característicos. Tras calcinarse la muestra, se produce la eliminación del surfactante, y esto provoca la contracción del sólido. En el caso del difractograma del medio de la Figura 7, se observa un desplazamiento de los planos y un ensanchamiento de los planos (110) y (200), debido a la condensación de los grupos silanol (Si-OH) de la superficie del material y la contracción de la mesoestructura por la calcinación. El difractograma de la nanopartícula final MCM-FOH-EPL (Figura 7 abajo)

confirma que se mantiene la estructura del soporte, ya que se observa la presencia del pico correspondiente al plano de difracción (100). Al igual que en la nanopartícula calcinada, este pico muestra un desplazamiento en comparación con la MCM-41 en su estado original (“as made”), debido a que el proceso de carga y funcionalización se lleva a cabo después de la calcinación de la nanopartícula. Por lo tanto, se puede concluir que estos procesos no han modificado la estructura de la nanopartícula. También es importante destacar que los planos correspondientes a (100) y (200) no son visibles en el difractograma de la nanopartícula final MCM-FOH-EPL, debido a la obstrucción de los poros del material causada por la carga de farnesol y la funcionalización de la EPL.



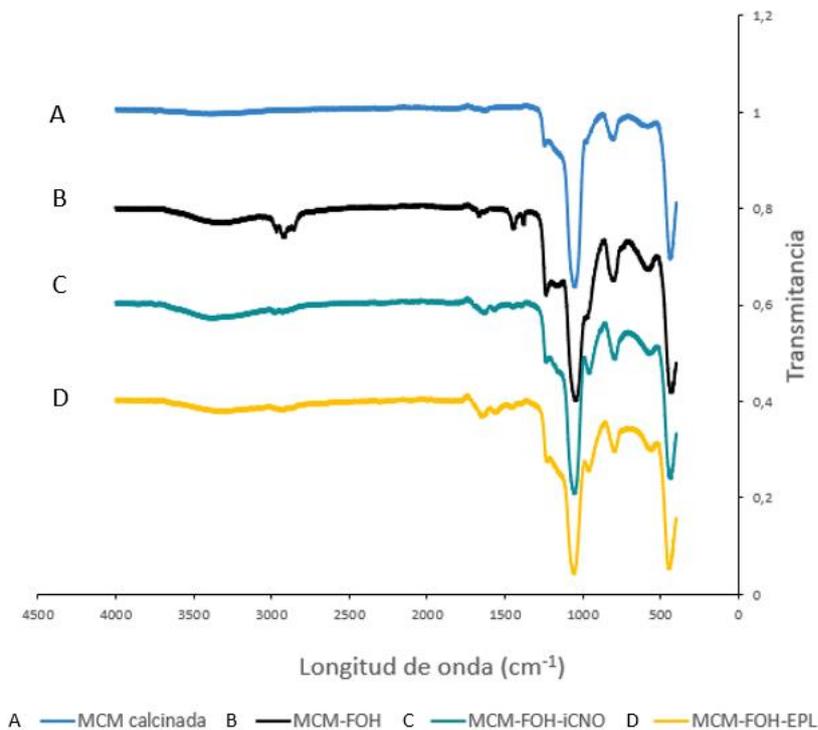
**Figura 7:** Difractograma de rayos X en polvo de los sólidos MCM-41 ‘as made’, MCM-41 calcinada y MCM-FOH-EPL.

Respecto a la microscopía electrónica de transmisión, TEM, es una técnica basada en los fenómenos físico-atómicos que se producen cuando un haz de electrones con aceleración colisiona frente a una muestra. La imagen se formará a partir de los electrones que son capaces de atravesar el sólido. En este trabajo, el TEM se emplea para obtener imágenes de las NPs que aporta información sobre su tamaño, morfología externa y tamaño y geometría de los poros. En la Figura 8A, donde se muestra una imagen de TEM de las NPs MCM-41 calcinadas, se aprecia como el diámetro de la nanopartícula se encuentra comprendido entre 146-177 nm, mientras que el diámetro del poro es de 2,24 nm. Por lo tanto, se verifica que las nanopartículas de tipo MCM-41 calcinadas presentan una estructura esférica, el diámetro de su poro se encuentra entre 1-10 nm y su diámetro total es de aproximadamente 100 nm, lo que corresponde con los datos bibliográficos para este tipo de NPs. En la Figura 8B, también nanopartículas de tipo MCM-41 calcinadas, se contempla que los canales se disponen de forma hexagonal en el interior de la nanopartícula, característica típica de las MCM-41.



**Figura 8:** Imágenes al TEM de (A) MCM-41 calcinada con medida del diámetro del poro y del diámetro de la NP; (B) Visualización de la estructura hexagonal del poro MCM-41 calcinada.

Por otro lado, la espectroscopía infrarroja se fundamenta en la obtención de un espectro que refleja las vibraciones moleculares obtenidas a partir de las vibraciones características de cada enlace químico. El espectro resultante es distintivo de cada muestra y permite su identificación. La sílice MCM-41 calcinada presenta un espectro asociado a los enlaces Si-O-Si, Si-O-R y Si-OH. En la Figura 9A se muestra el espectro de MCM-41 calcinada típico, donde se puede visualizar en  $3500\text{ cm}^{-1}$  el estiramiento del enlace Si-OH. Se puede visualizar la vibración correspondiente al agua adsorbida a aproximadamente  $1600\text{ cm}^{-1}$ . En  $1400\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$  se puede visualizar las vibraciones de los enlaces Si-O-Si ( $1060\text{ cm}^{-1}$ ) y Si-OH. Por último, el estiramiento Si-O se puede visualizar a  $435\text{ cm}^{-1}$ . A continuación, se analiza el IR de la MCM-41 cargada con farnesol (Figura 9B) y se observa que se ha realizado correctamente la carga con farnesol debido a la presencia de picos en  $3000\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a los grupos -OH del farnesol. También se analiza el IR de la MCM-41 cargada con farnesol y funcionalizada con el isocianato y puede observarse la aparición de vibraciones en la zona de espectro de  $1700\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$  relacionadas con el anclaje del isocianato (Figura 9C). Cabe destacar que en los distintos pasos del procedimiento de síntesis mostrado en la Figura 9B y 9C, se puede observar que aparece un espectro similar, por lo que la estructura no se ha alterado a lo largo del proceso de síntesis de la NP final. Por último, en la nanopartícula final MCM-FOH-EPL (Figura 9D) se puede observar el grupo carbonilo de la lisina a  $1715\text{ cm}^{-1}$  mientras que las bandas observadas a  $2971$  y  $2874\text{ cm}^{-1}$  corresponden a las vibraciones de los grupos  $\text{-CH}_2\text{-}$  de la cadena de aminoácidos.



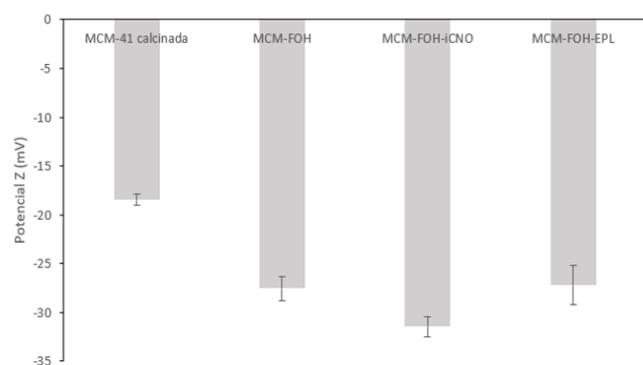
**Figura 9:** Espectroscopía de infrarrojos de los distintos compuestos resultantes de las etapas de síntesis.

A continuación, se realizaron las medidas del potencial Z de los distintos materiales a estudio. La medida de potencial Z aporta información sobre la carga superficial y se define como la diferencia de potencial eléctrico entre el medio de dispersión (fase móvil) y las partículas que se encuentran en este (fase estacionaria). En este trabajo fue empleado para hallar información sobre los cambios de carga superficial a lo largo de las distintas etapas de síntesis. Los datos de potencial Z obtenidos para cada etapa de síntesis, se recogen en la Figura 10A. Todas las medidas fueron realizadas por triplicado.

**A**

Partícula	Potencial Z (mV)
MCM-41 calcinada	$-18,47 \pm 0,55$
MCM-FOH	$-27,53 \pm 1,24$
MCM-FOH-iNCO	$-31,43 \pm 1,04$
MCM-FOH-EPL	$-27,20 \pm 2,00$

**B**



**Figura 10:** (A) Valores de potencial Z para cada etapa de síntesis de MCM-FOH-EPL. (B) Representación de la medida de potencial Z.

Al examinar la Figura 10B, que corresponde a una representación de los datos de potencial Z obtenidos para cada una de las etapas de la síntesis, se puede observar que las NPs iniciales de MCM-41 calcinadas presentan un potencial negativo debido a la presencia de grupos silanolato en su superficie. Después, el procedimiento

de carga con farnesol hace que continuemos teniendo potencial negativo debido a los silanolatos de la superficie, ya que el farnesol se encuentra cargado en los poros. Respecto a la formación de la nanopartícula MCM-FOH-iNCO, se obtiene un potencial Z negativo debido a los grupo isocianato de la superficie después de la unión a la MCM-41. Por último, al anclar la puerta molecular de la  $\epsilon$ -polilisina, las aminas de la EPL interaccionarán con el grupo isocianato para formar un enlace urea. Por lo tanto, únicamente quedarán libres los grupos carboxilo terminal de la  $\epsilon$ -polilisina, lo que resulta potencial Z similar al sólido con iNCO.

#### 4.2 CÁLCULO DE LA CANTIDAD DE FARNESOL ENCAPSULADA EN MCM-FOH-EPL

Para poder comparar los resultados que se obtengan en los estudios de actividad antimicrobiana entre el sistema final (MCM-FOH-EPL) y el farnesol libre, es necesario conocer la cantidad de carga de las partículas. A partir de la ecuación obtenida de la curva de calibrado realizada en el apartado 4.7 (Figura 4) y la medida de absorbancia de farnesol procedente de la extracción forzada a partir de las dos disoluciones de concentraciones diferentes de MCM-FOH-ELP (5000 y 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Tabla 3), se ha determinado la cantidad de farnesol encapsulado por cada  $\mu\text{g}$  de nanopartícula completa (MCM-FOH-EPL).

Cabe destacar que el farnesol libre actúa de forma polinomial, esto se debe a que es un aceite y por lo tanto, es soluble en el hexano.

El valor medio de carga de farnesol obtenido fue 0,163  $\mu\text{g}$  de farnesol por cada  $\mu\text{g}$  de MCM-FOH-EPL. Teniendo en consideración esta relación, podrá determinarse la cantidad de farnesol que inhibe el crecimiento de las bacterias en los tratamientos con MCM-FOH-EPL posteriores.

**Tabla 3:** Medida de la absorbancia a distintas concentraciones de [MCM-FOH-EPL]

[MCM-FOH-EPL] ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	[FOH] ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Absorbancia (212 nm)
5000	815	1,71
2000	326	1,54

#### 4.3 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

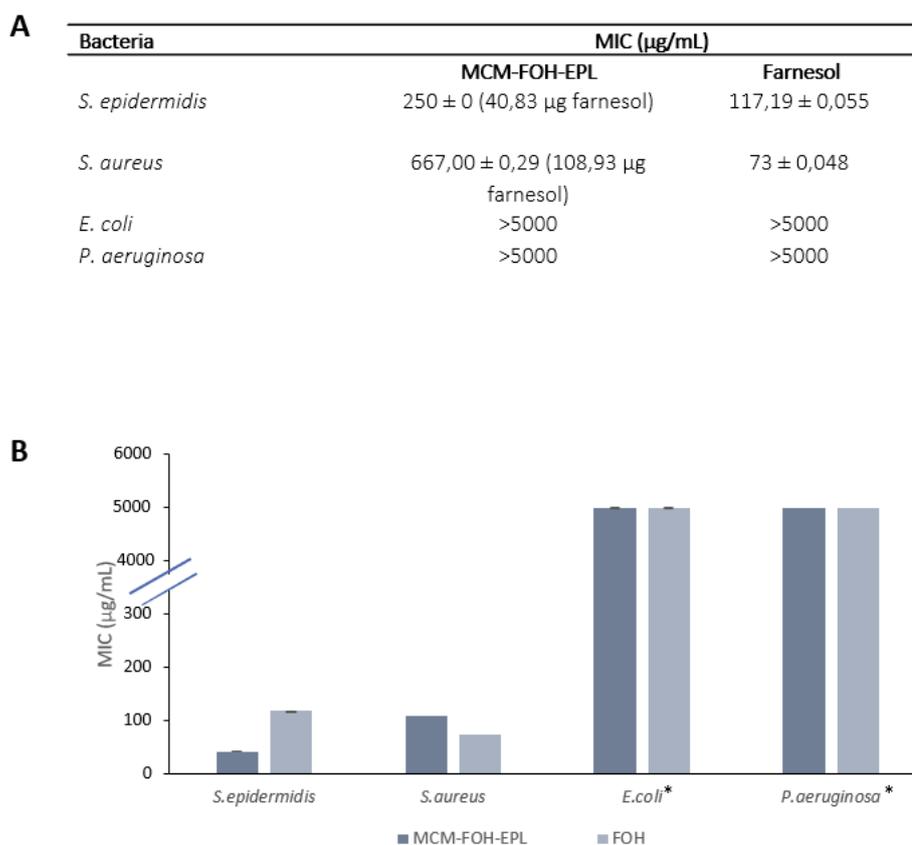
Para analizar la actividad antimicrobiana del farnesol libre y de la MCM-FOH-EPL, se determinó la concentración mínima de tratamiento a la que se inhibe el crecimiento del microorganismo (MIC). Los valores de la MIC tras el tratamiento para cada una de las bacterias se recogen en la Figura 11. Esto, nos permite comparar los valores de MIC del tratamiento con farnesol libre y con MCM-FOH-EPL.

En el caso del tratamiento con MCM-FOH-EPL (Figura 11A), no se pudo determinar la MIC en las bacterias gram negativas, ya que por mucho que se aumentase la concentración, no se observaba inhibición del crecimiento, por lo que se denominó como superior a 5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ya que esta fue la mayor concentración probada en los ensayos. Por el contrario, en el caso de las gram positivas sí que fue posible determinar la concentración a la que el tratamiento inhibió su crecimiento tras 18 h. Para *S. epidermidis* se obtuvo un valor de MIC de farnesol encapsulado en MCM-FOH-EPL de 40,83  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mientras que para *S. aureus*, se situó en 108,93  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Por lo tanto, se muestra que el compuesto es más efectivo contra *S. epidermidis* que contra *S. aureus* al inhibirse el crecimiento de *S. epidermidis* a menores concentraciones del tratamiento. Esto podría deberse a que *S. epidermidis* podría secretar mayor cantidad de proteasas que permitieran una mejor apertura de la puerta molecular de la EPL.

En el caso del tratamiento con farnesol libre (Figura 11A), tampoco se pudo determinar la MIC para las bacterias gram negativas, situándose en valores superiores a 5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Por el contrario, en bacterias gram positivas, el tratamiento fue más efectivo en *S. aureus* (73  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) que en *S. epidermidis* (117,19  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), a

diferencia del tratamiento con MCM-FOH-EPL, ya se requiere menor concentración de farnesol para inhibir el crecimiento de *S. aureus* que de *S. epidermidis*.

Comparando ambos tratamientos (Figura 11B), se observa que ninguno de los tratamientos resulta eficaz para *E. coli* como para *P. aeruginosa*, ya sea utilizando farnesol libre o farnesol encapsulado en nuestro sistema MCM-FOH-EPL. Sin embargo, se evidencia una mejora en el tratamiento con farnesol encapsulado en *S. epidermidis*, en comparación con el farnesol libre. En el caso de *S. aureus*, ocurre lo contrario, el tratamiento con farnesol libre resulta más efectivo que el farnesol encapsulado, ya que presenta un valor de MIC mayor en el caso del tratamiento con MCM-FOH-EPL. Esto podría deberse a que *S. aureus* podría secretar una menor cantidad de proteasas, lo que impidiera la correcta apertura de la puerta molecular, por ello, el tratamiento con MCM-FOH-EPL, resultaría menos efectivo.



**Figura 11:** Resultados de los ensayos de MIC. (A) Valores de MIC para cada una de las bacterias, se incluyen los  $\mu\text{g/mL}$  de farnesol necesarios para inhibir el crecimiento para ambos tratamientos (FOH libre y MCM-FOH-EPL); (B) Representación gráfica de los valores de MIC. \*En el caso de *P. aeruginosa* y *E. coli*, el valor de la MIC supera los 5000  $\mu\text{g/mL}$

Por lo tanto, entre las bacterias estudiadas, se muestran distintos resultados en función de su naturaleza estructural. Se corrobora que las bacterias gram negativas son más resistentes al tratamiento, mientras que las bacterias gram positivas sí que son susceptibles a los distintos tratamientos estudiados. *S. epidermidis* y *S. aureus* son bacterias gram positivas que cuentan con una capa gruesa de peptidoglicano y carecen de membrana lipídica externa. Por el contrario, *E. coli* y *P. aeruginosa*, bacterias gram negativas, tienen una capa delgada de peptidoglicano rodeada por una membrana lipídica externa [54]. Esto demuestra que la presencia de la doble membrana en bacterias gram negativas, influye a la hora de la incorporación del tratamiento, tanto en el caso del farnesol libre como en el caso de MCM-FOH-EPL, haciéndolas más resistentes a este. Para intentar demostrar esto, se ha caracterizado parte del mecanismo de acción del farnesol, principalmente el efecto sobre las estructuras externas de las bacterias, tanto gram positivas como gram negativas.

## 4.4 EVALUACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN

### 4.4.1 CUANTIFICACIÓN DE DAÑO DE MEMBRANA POR ABSORCIÓN DE CRISTAL VIOLETA

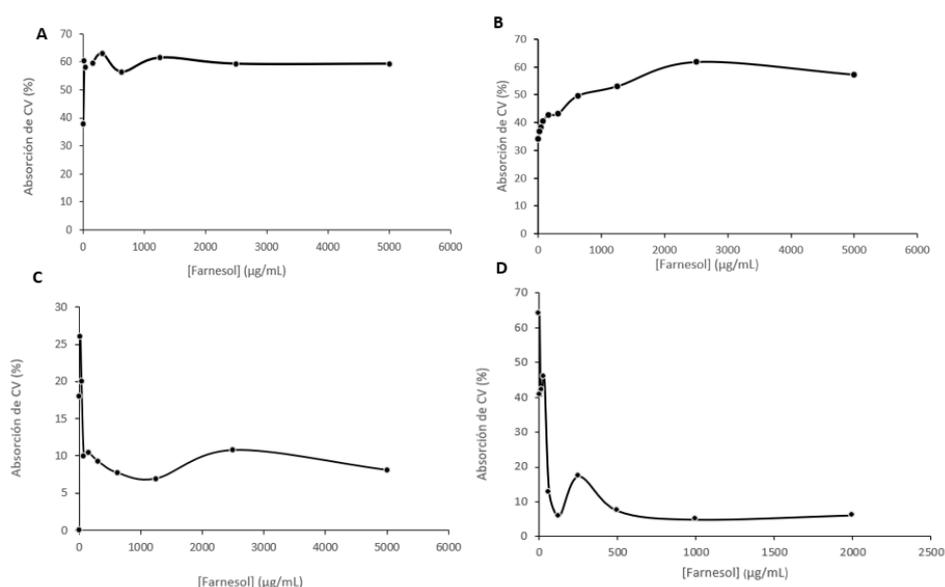
El cristal violeta (CV) es un compuesto químico que se emplea como colorante e indicador de pH. Este compuesto es capaz de penetrar en a través de la membrana bacteriana en aquellas células en las que se ha alterado la permeabilidad. Por lo tanto, en este ensayo será empleado como una estimación indirecta para comprobar si el mecanismo de acción del farnesol está relacionado con la modulación de la permeabilidad de la pared bacteriana.

En el caso de las bacterias gram negativas, debido a la falta de determinación de la MIC en el ensayo anteriormente descrito, todos los datos de absorción de cristal violeta corresponden a concentraciones subinhibitorias. Al examinar la Figura 12A y 12B, donde se observa el porcentaje de absorción de CV respecto a la concentración de farnesol libre en *P. aeruginosa* y *E. coli* respectivamente, se puede observar que a medida que aumenta la concentración de tratamiento, el porcentaje de absorción de cristal violeta también aumenta, lo que indica un incremento en la permeabilidad de la membrana. Además, comparando *E. coli* y *P. aeruginosa* entre sí, se puede determinar que *P. aeruginosa* es más sensible a bajas concentraciones de farnesol (19,53-625  $\mu\text{g/mL}$ ), debido a que se requiere una menor concentración de farnesol para llegar al mismo porcentaje de absorción de CV que en *E. coli*. Por ejemplo, para alcanzar un 60% de absorción de CV, se requerirán 312,5  $\mu\text{g/mL}$  de farnesol en el caso de *P. aeruginosa* y 2500  $\mu\text{g/mL}$  en el caso de *E. coli*.

Por otra parte, en las bacterias gram positivas (*S. aureus* y *S. epidermidis*), se pudo determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC), lo que permite realizar un análisis diferenciado para concentraciones subinhibitorias y suprainhibitorias.

En el caso de *S. epidermidis*, cuya MIC para el farnesol libre es de 117,19  $\mu\text{g/mL}$ , para concentraciones subinhibitorias, se produce un aumento en la absorción de cristal violeta (Figura 12C), lo que indica un incremento en la permeabilidad de la membrana. Por otro lado, en concentraciones suprainhibitorias, se evidencia una disminución en el porcentaje de absorción de cristal violeta (CV).

En *S. aureus*, la MIC se encuentra en 72,92  $\mu\text{g/mL}$ . Para concentraciones subinhibitorias (7,81-62,5  $\mu\text{g/mL}$ ), se observa una disminución en el porcentaje de absorción de cristal violeta (Figura 12D). Por otro lado, a concentraciones suprainhibitorias (62,5- 2000  $\mu\text{g/mL}$ ), también se evidencia una disminución en el porcentaje de absorción de cristal violeta.



**Figura 12:** Representación de la cuantificación de daño a la membrana mediante absorción con cristal violeta en (A) *P. aeruginosa* (B) *E. coli* (C) *S. epidermidis* (D) *S. aureus* en función de la concentración de farnesol libre.

Tomando en consideración los resultados obtenidos, se concluye que en el caso de las bacterias gram negativas, se produce un aumento de la absorción de cristal violeta a concentraciones subinhibitorias, esto, indicaría un aumento de la permeabilidad de membrana por el daño ocasionado por el tratamiento con farnesol. Cabe destacar que la mayoría de las bacterias, siguen estando vivas, ya que se trata de un ensayo a concentraciones subinhibitorias

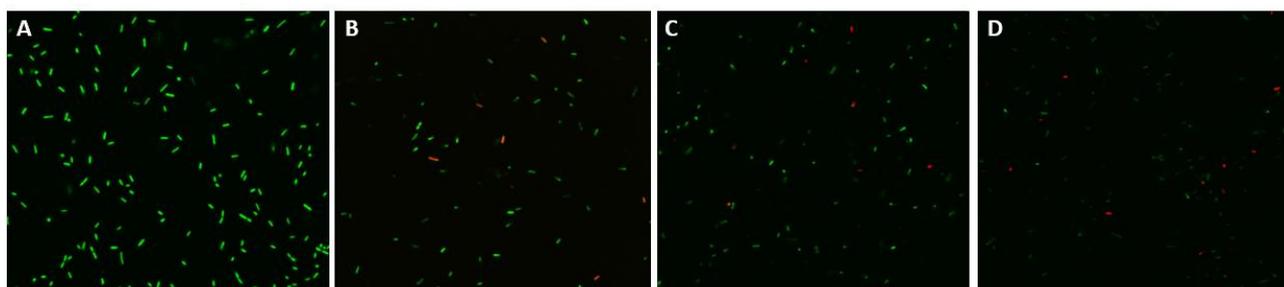
Por el contrario, en gram positivas, concretamente en *S. epidermidis*, se produce un aumento de la permeabilidad de membrana a concentraciones subinhibitorias. Esto implica que, aunque no se inhibe el crecimiento bacteriano, el farnesol sí ejerce su acción sobre la membrana de *S. epidermidis*, permitiéndoles una mayor captación de cristal violeta. La disminución del porcentaje de absorción a concentraciones suprainhibitorias se encuentra relacionada con la muerte de las bacterias, ya que, al lisarse, pierden su capacidad de absorción de cristal violeta. En el caso de *S. aureus*, la disminución de captación de absorción de cristal violeta se produce tanto a concentraciones subinhibitorias como suprainhibitorias, la hipótesis planteada es que se deba a un disminución en el número de células debido a la muerte de estas. Esto, posteriormente, fue demostrado con las imágenes de microscopía confocal.

Con el objetivo de reforzar los resultados obtenidos se llevó a cabo un experimento de microscopía confocal.

#### 4.4.2 MICROSCOPÍA CONFOCAL

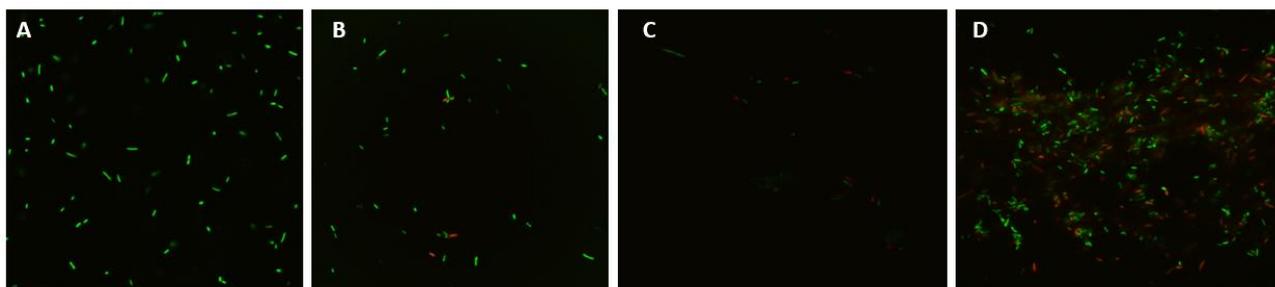
La microscopía confocal permite obtener imágenes de un único plano confocal. Se basa en el principio de que este microscopio es capaz de eliminar la luz procedente de los planos fuera del foco. En este caso, esta técnica es empleada para comprobar la integridad de membrana de las bacterias tras el tratamiento con farnesol libre a diferentes concentraciones. Al emplear la tinción bacteriana Baclight LIVE/dead, se comprobará la viabilidad de las poblaciones bacterianas, de modo que aquellas con la membrana alterada se teñirán de yoduro de propidio adquiriendo un color rojo mientras que las que tengan la membrana intacta se teñirán de SYTO9 adquiriendo coloración verde. De este modo, se podrán corroborar los resultados obtenidos en el ensayo de cristal violeta.

En el caso de la bacteria *E. coli*, tal y como se observa en la Figura 13A, en ausencia de tratamiento todas las células son viables ya que presentan color verde, lo que estaría indicando un crecimiento normal. A medida que se incrementa la concentración del tratamiento (Figura 13B y Figura 13C), se observa un aumento en el número de teñidas con yoduro de propidio (rojas). Esto se debe a un incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática tras el tratamiento con farnesol. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en el ensayo de cuantificación de daño de la membrana mediante cristal violeta. Por último, en la Figura 13D, después de aplicar el tratamiento con la concentración máxima de farnesol probada (5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), se observa un aumento en el número de células muertas en comparación con el número de bacterias vivas, pero aún se encuentran presentes. Esto confirma que las concentraciones utilizadas son subinhibitorias, es decir, no son suficientes para inhibir completamente el crecimiento bacteriano.



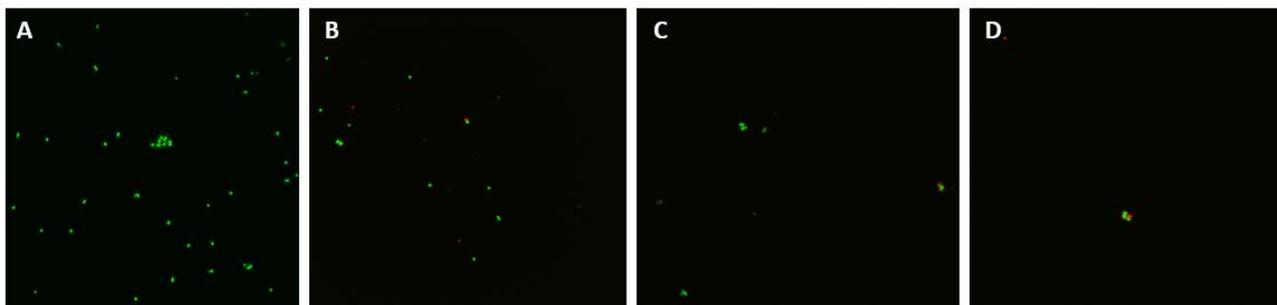
**Figura 13:** Imágenes de microscopía confocal de *E. coli* (A) Sin tratamiento; (B) Tratadas con 1250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de farnesol; (C) Tratadas con 2500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de farnesol; (D) Tratadas con 5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de farnesol.

En la bacteria *P. aeruginosa*, al ser también una bacteria de tipo gram negativa se observa la misma tendencia que *E. coli*, lo que, de nuevo, corrobora los resultados obtenidos en el ensayo de cristal violeta. En la Figura 14A, al no estar tratada todas las bacterias presentan su máxima viabilidad y crecimiento. A medida que aumenta la concentración de farnesol (Figura 14B, 14C y 14D), se incrementa la permeabilidad de membrana debido a la acción de este, lo que derivará en la aparición de bacterias teñidas de rojo, y, por consiguiente, con ambas membranas dañadas. Por último, en la Figura 14D, a concentraciones máximas de tratamiento (5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), la proporción de bacterias muertas respecto a las bacterias vivas es mucho mayor que en el caso de las concentraciones de tratamiento de 312,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 1250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Cabe destacar que se visualizan más células totales en la Figura 14D que en la 14C debido al campo escogido, pero, se muestra una mayor proporción de células muertas con respecto de las vivas en el caso de la Figura 14D. Es importante resaltar que todavía se observa crecimiento bacteriano, lo que indica que la concentración utilizada sigue siendo subinhibitoria.



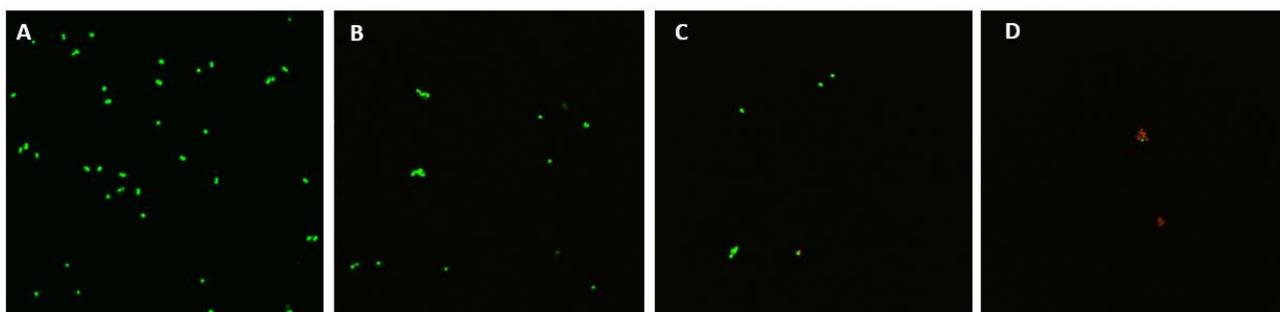
**Figura 14:** Imágenes de microscopía confocal de *P. aeruginosa* (A) Sin tratamiento; (B) Tratadas con 312,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de farnesol; (C) Tratadas con 1250,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de farnesol; (D) Tratadas con 5000,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de farnesol.

En *S. epidermidis*, al tratarse de una bacteria gram positiva y haberse determinado la MIC del farnesol (117,19  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), se observará un comportamiento diferencial en función de si se realiza tratamiento a concentraciones subinhibitorias o suprainhibitorias. La Figura 15A, presenta una viabilidad celular máxima, ya que todas las células se encuentran teñidas de SYTO9. En el caso de la Figura 15B, cuya concentración de tratamiento es de 78,125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , al tratarse de una concentración subinhibitoria, se visualiza cómo empiezan a aparecer algunas células dañadas, pero estas, son muy inferiores al número de células vivas, lo que estaría indicando un aumento en la permeabilidad de la membrana interna, incrementando el daño a las bacterias. Esto, concuerda con el incremento en la absorción de cristal violeta mostrado en la Figura 12C. Por el contrario, a concentraciones suprainhibitorias (156,250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 312,500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), tal y como se muestra en la Figura 15C y la Figura 15D respectivamente, se observa una disminución notable en el número de células debido a la inhibición del crecimiento de estas bacterias o lisis de estas, que, al encontrarse totalmente desintegradas, ya no aparecerán en el plano. Por lo tanto, esto derivaría en una disminución de la absorción de cristal violeta, como refleja el último tramo de la Figura 12C (156,250-5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).



**Figura 15:** Imágenes de microscopía confocal de *S. epidermidis* (A) Sin tratamiento (B) Tratadas con 78,125 µg/mL de farnesol (C) Tratadas con 156,250 µg/mL de farnesol (D) Tratadas con 312,500 µg/mL de farnesol.

En el caso de *S. aureus*, cuya MIC para el farnesol es de 72,92 µg/mL, se observa en la Figura 16A una viabilidad máxima debido a la falta de tratamiento. A concentraciones subinhibitorias (31,25 µg/mL), como se muestra en la Figura 16B, se produce una notable disminución en el número de bacterias, lo que concuerda con la disminución en la cantidad de cristal violeta absorbido mostrado en la Figura 12D, que estaría debiéndose a la disminución del número de células vivas. A concentraciones suprainhibitorias (62,50 µg/mL y 125 µg/mL), como se muestra en la Figura 16C y Figura 16D, también se observa una disminución en el número de células vivas. Sin embargo, en la Figura 16D, se observa una proporción mucho mayor de células con daño en la membrana en comparación con las células con la membrana intacta.



**Figura 16:** Imágenes de microscopía confocal de *S. aureus* (A) Sin tratamiento (B) Tratadas con 31,25 µg/mL de farnesol (C) Tratadas con 62,50 µg/mL de farnesol (D) Tratadas con 125,00 µg/mL de farnesol.

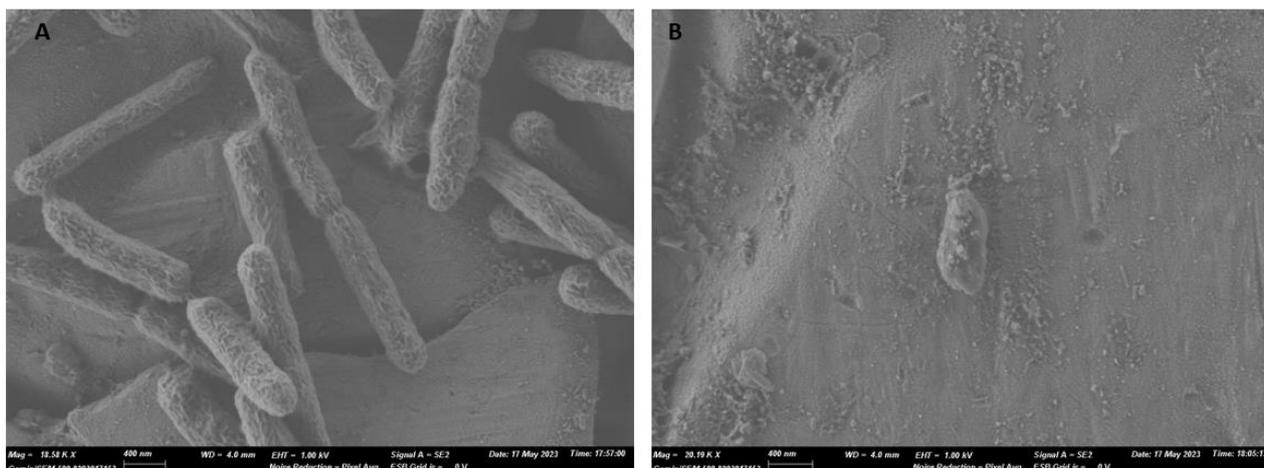
Como conclusión, de lo expuesto anteriormente, se puede deducir que las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal confirman los datos obtenidos a partir del ensayo de cuantificación de daño de membrana mediante cristal violeta. También se observa que a concentraciones subinhibitorias se produce un aumento en el daño a la membrana interna de las bacterias, ya que para que el yoduro de propidio entre a la célula es necesario que atraviese todas las barreras externas, siendo la membrana interna, en última instancia, la que impediría la entrada del compuesto si estuviese intacta.

#### 4.4.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE ALTA RESOLUCIÓN DE BARRIDO DE EMISIÓN DE CAMPO (HRFESEM)

El HRFESM una técnica que proporciona información detallada sobre la superficie de la muestra a analizar. Se basa en la emisión de un haz de electrones que barren la muestra, generando diversos tipos de señales que son capturadas por detectores. En este caso, el FESEM fue empleado para comprobar el mecanismo de acción del tratamiento MCM-FOH-EPL sobre las estructuras externas de las bacterias y determinar las diferencias existentes entre bacterias gram positivas y gram negativas tras el tratamiento. Esto es posible gracias a la gran

resolución de las técnicas de microscopía electrónica, ya que nos permiten ver diferencias muy sutiles para facilitar el estudio del mecanismo de acción.

Tal y como se puede visualizar en la Figura 17A, que muestra una imagen obtenida mediante HRFESEM de *P. aeruginosa*, se puede visualizar como en ausencia de tratamiento, esta, no presenta ningún daño en la membrana, como cabría esperar al tratarse de un control. Cabe destacar que la superficie arrugada de la bacteria se debe a fallos en el proceso de fijación, ya que al no permanecer el glutaraldehído el suficiente tiempo como para deshidratar la membrana externa y al realizar el gradiente de alcohol para deshidratar la superficie de manera progresiva, la superficie ha colapsado, mostrando así un aspecto arrugado. Por el contrario, tras un tratamiento con 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de MCM-FOH-EPL (Figura 17B), a pesar de no inhibirse el crecimiento de la bacteria se puede visualizar una alteración en la pared bacteriana y la morfología de la célula.



**Figura 17:** Imágenes de HRFESEM de (A) *P. aeruginosa* en ausencia de tratamiento (control); (B) *P. aeruginosa* tratada con 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de MCM-FOH-EPL.

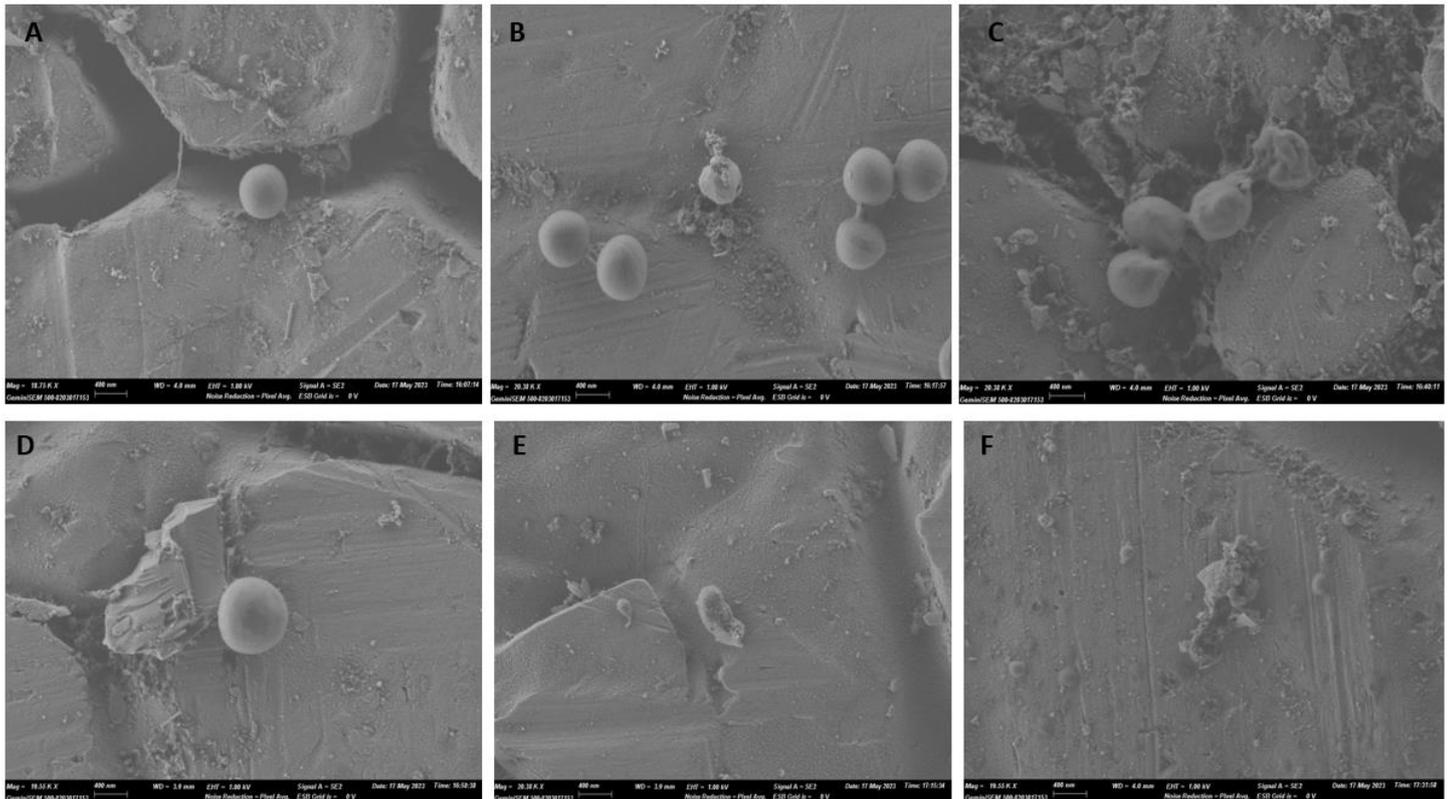
A continuación, de igual modo, se realiza el mismo tratamiento (MCM-FOH-EPL) a las mismas concentraciones (0, 400 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a las bacterias gram positivas del estudio con el objetivo de determinar si se puede encontrar alguna diferencia entre bacterias gram positivas y gram negativas a nivel de membrana.

Se puede comprobar que tanto para *S. aureus* (Figura 18A) como para *S. epidermidis* (Figura 18D), en ausencia de tratamiento, ambas membranas permanecen intactas.

Centrándonos en *S. aureus*, cuya MIC tras el tratamiento con MCM-FOH-EPL es 667,00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , se puede visualizar cómo en la Figura 18B, el tratamiento con una concentración subinhibitoria (400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) del compuesto tiene un efecto sobre *S. aureus* presente en el medio. No obstante, también se observan células vivas, por lo que se concluye que a concentraciones subinhibitorias, hay tanto bacterias dañadas como íntegras.

Por otro lado, en la Figura 18C, se observa que el tratamiento con una concentración de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del compuesto tiene un efecto más pronunciado en *S. aureus*, ya que este valor está por encima del de la MIC. Se puede apreciar una deformación de la membrana de la bacteria.

En el caso de *S. epidermidis*, cuya MIC es de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , los tratamientos, tanto 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 18E), como 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 18F), corresponden a concentraciones suprainhedoras en las que se inhibe el crecimiento de la bacteria. Esto se evidencia en la Figura 18E (tratada con 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y en la Figura 18F (tratada con 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), donde se observa una notable afectación de la membrana plasmática.



**Figura 18:** Imágenes de HRFSEM de (A) *S. aureus* en ausencia de tratamiento (control); (B) *S. aureus* tratado con 400 µg/mL de MCM-FOH-EPL; (C) *S. aureus* tratado con 1000 µg/mL de MCM-FOH-EPL; (D) *S. epidermidis* en ausencia de tratamiento (control); (E) *S. epidermidis* tratado con 400 µg/mL de MCM-FOH-EPL; (F) *S. epidermidis* tratado con 1000 µg/mL de MCM-FOH-EPL.

Por lo tanto, de lo expuesto anteriormente se puede concluir que el sistema MCM-FOH-EPL afecta a la integridad de las membranas de las bacterias gram positivas y gram negativas, mostrándose un efecto diferencial en el caso de la bacteria *S. aureus*, en función de si el tratamiento se realizó a concentraciones subinhibitorias o suprainhibitorias. Cabe destacar que no se muestran imágenes de *E. coli*, ya que los resultados no fueron concluyentes.

#### 4.4.4 ENSAYO DE MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD RESPIRATORIA MEDIANTE LA TASA DE REDUCCIÓN DE RESAZURINA

En este ensayo, se permite comprobar las diferencias en la actividad respiratoria de las células en función de la concentración de farnesol, gracias a la reducción de resazurina a resofurina. La reducción mencionada se lleva a cabo durante la respiración aerobia de las células vivas, donde se produce un intercambio de electrones entre el NADH (agente reductor) y la resazurina (agente oxidante). Es decir, será reducido por las células metabólicamente activas.

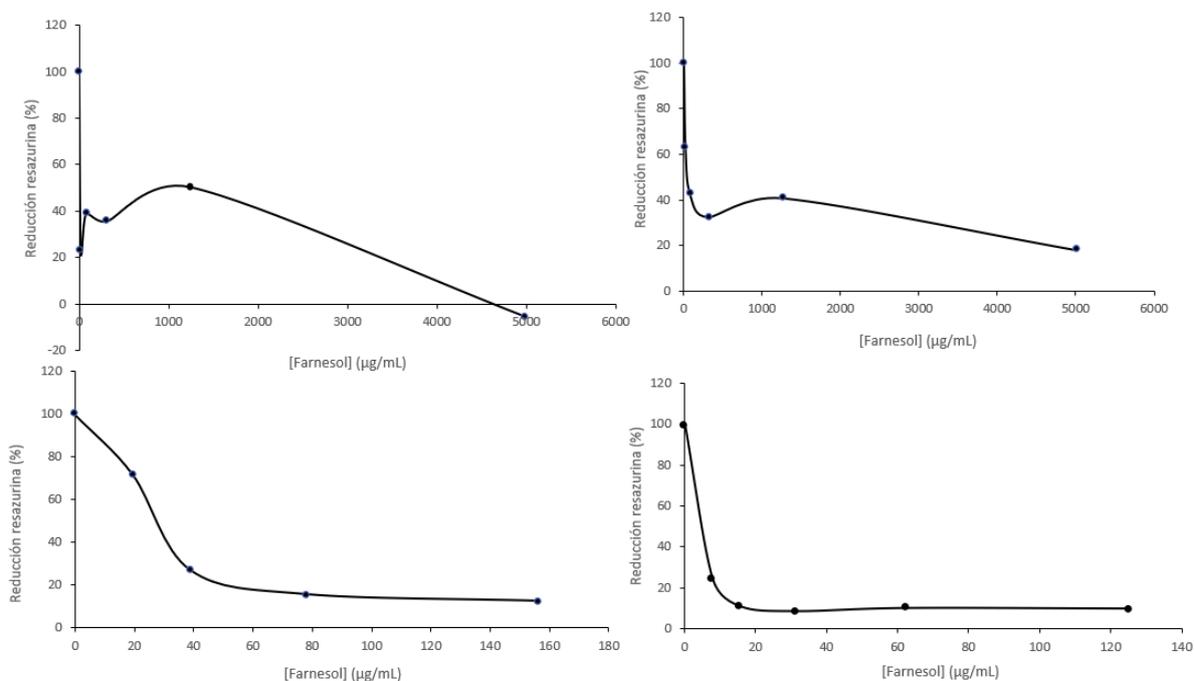
A continuación, con el objetivo de determinar si existen diferencias en la modulación de la actividad respiratoria entre bacterias gram positivas y gram negativas tras el tratamiento con farnesol libre, se medirá la tasa de reducción de resazurina.

Para *P. aeruginosa*, no se observa una tendencia clara en la reducción de la actividad metabólica en concentraciones subinhibitorias (Figura 19A). Esto, se debe a la escasez de bacterias presentes en la muestra.

Para *E. coli*, todo el ensayo se realizó a concentraciones subinhibitorias. Primeramente, se muestra una brusca disminución de la actividad metabólica (hasta un 32,58%) a bajas concentraciones de farnesol (0-312,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A continuación, conforme aumentan las concentraciones de farnesol (312,5-5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) estabiliza el porcentaje de reducción de resazurina (Figura 19B), a pesar de repuntar una subida en 1250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

En el caso de *S. epidermidis*, a concentraciones subinhibitorias (0 -78,125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) se observa una reducción en la actividad respiratoria progresiva que llega hasta el 15,57%. Por el contrario, a concentraciones suprainhibitorias (a partir de aproximadamente 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) se estabiliza la tasa de reducción de la resazurina en un 20% (Figura 19C). En estas concentraciones, la bacteria experimenta la muerte y pierde su actividad respiratoria, lo que resulta en la falta de reducción de la resazurina. Esto, lo podemos corroborar con el ensayo de microscopía confocal, donde la Figura 15C y 15D muestran una disminución notable del número de células en el rango de concentraciones mencionadas con anterioridad.

Por último, en el caso de *S. aureus*, se produce una disminución de la actividad respiratoria (hasta 8,71%) a concentraciones subinhibitorias (hasta aproximadamente 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para posteriormente estabilizarse en porcentajes de alrededor de 15%. (Figura 19D). Por lo tanto, se estaría produciendo una muerte celular, como se puede comprobar en la Figura 16D.



**Figura 19:** Representación del porcentaje de reducción de resazurina en: (A) *P. aeruginosa*; (B) *E. coli*; (C) *S. epidermidis*; (D) *S. aureus*.

De los resultados obtenidos anteriormente se puede concluir que el tratamiento con farnesol reduce la actividad respiratoria de las bacterias gram positivas y gram negativas. Además, se requieren concentraciones mucho mayores para que se produzca una estabilización en la tasa de reducción de resazurina en el caso de la bacteria gram negativa *E. coli* (1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en comparación con las concentraciones necesarias en *S. epidermidis* (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o *S. aureus* (15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), lo que concuerda con que esta sea más resistente al tratamiento con farnesol. Por otra parte, comparando los resultados obtenidos en bacterias gram positivas, se puede visualizar como para *S. epidermidis*, se requiere mayor concentración de farnesol para alcanzar el mismo porcentaje de reducción de resazurina que en *S. aureus*. Por ejemplo, para alcanzar un 20% de la tasa de reducción de resazurina en *S. aureus*, se requieren 7,81  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de farnesol, mientras que para alcanzar ese

mismo porcentaje en *S. epidermidis*, se requieren aproximadamente 40 µg/mL de tratamiento. Por lo que se puede concluir que habrá menos bacterias metabólicamente activas en el caso de *S. aureus* y que el tratamiento será más eficaz en esta bacteria, como se demuestra al comparar las MICs (Figura 11).

Por último, cabe destacar que en la Figura 19A, se muestra el porcentaje de reducción de resazurina para *P. aeruginosa*. Estos resultados no son concluyentes ya que no se estaría produciendo una correcta reducción de la resazurina debido a la poca concentración bacteriana de la muestra.

## 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Como consecuencia de la problemática actual de resistencia a los antibióticos convencionales, surge la necesidad de obtener nuevos enfoques terapéuticos que sean empleados en monoterapia o como adyuvantes para mejorar la eficacia de los antibióticos actuales. En este trabajo se ha propuesto la nanomedicina como propuesta alternativa a los tratamientos antimicrobianos actuales. En concreto, se ha diseñado un dispositivo de liberación controlada de fármacos antimicrobianos (MCM-FOH-EPL), basado en la apertura de la puerta molecular EPL en presencia de las proteasas secretadas por bacterias. Para comprobar la integridad del material, se ha llevado a cabo una caracterización a través de XDR, potencial Z, IR y TEM. Las medidas obtenidas en todos los experimentos para cada uno de los pasos de síntesis correspondían con los datos se debían obtener y por lo tanto se concluyó que el material se encontraba bien sintetizado.

Una vez preparado el material, se ha estudiado la actividad antimicrobiana del sistema MCM-FOH-EPL mediante la obtención de su concentración mínima inhibitoria en bacterias gram negativas (*E. coli*, y *P. aeruginosa*) y en bacterias gram positivas (*S. aureus* y *S. epidermidis*). Además, estos mismos análisis se realizaron con el EOC libre, el farnesol, con el objetivo de determinar si existe mejora entre el tratamiento con el compuesto libre o encapsulado.

De este modo, se han confirmado las diferencias en el tratamiento con farnesol libre y farnesol encapsulado en función del tipo de bacteria. En el caso de las bacterias gram negativas, no fue posible determinar la concentración mínima inhibitoria que se asume que se debe a la presencia de una membrana externa que confiere resistencia adicional a este tipo de bacterias. Esto se corrobora con los datos bibliográficos que determinan que las bacterias gram negativas son más resistentes a los productos naturales debido a la presencia de la membrana que las protege de los compuestos antibacterianos [34], [55]

En cambio, se observó una respuesta positiva a los tratamientos en bacterias gram positivas debido a la ausencia de membrana externa, lo que facilitó la penetración de los compuestos. En el caso de *S. epidermidis*, se demostró que el compuesto encapsulado era más eficaz que el compuesto libre, mientras que en *S. aureus*, se observó que el compuesto libre funcionaba mejor que el compuesto encapsulado. Esto podría deberse a un aumento en la cantidad de proteasas liberadas en el caso de *S. epidermidis* que permitieran la apertura de la puerta molecular EPL, liberando de manera controlada el farnesol encapsulado en su interior.

Por otra parte, se intentó caracterizar el mecanismo de acción del farnesol para poder explicar que las diferencias de actividad antimicrobiana se debían a la distinta naturaleza de las bacterias. Para ello, se realizaron ensayos de absorción de cristal violeta, microscopía confocal, HRFSEM y ensayos de modulación de la actividad respiratoria mediante la tasa de reducción de resazurina.

En el ensayo de absorción de cristal violeta, se evidenciaron nuevamente las diferencias entre el tratamiento en bacterias gram positivas y gram negativas. En *P. aeruginosa* y *E. coli*, se observó un aumento en la absorción de cristal violeta, lo que indica que, aunque no se encontró una concentración que inhibiera el crecimiento, el farnesol afecta la permeabilidad de la membrana, lo que hace que las bacterias sean más susceptibles a su captación, aunque no resulte en su muerte. En cambio, en bacterias gram positivas se pudo realizar un análisis diferenciado según si la bacteria crecía a concentraciones subinhibitorias o suprainhibitorias. En el caso de *S. epidermidis*, se observó que cuando la bacteria era capaz de crecer, aumentaba la permeabilidad de la

membrana debido a la incorporación de farnesol. Sin embargo, a concentraciones suprainhedoras se producía una disminución en el porcentaje de cristal violeta captado. Se observó un patrón similar para *S. aureus* a concentraciones suprainhedoras, mientras que a concentraciones subinhedoras también se observó una disminución en la absorción de cristal violeta. Estos resultados, coinciden con los resultados bibliográficos para las bacterias gram positivas, que indican que estas son más susceptibles al tratamiento con sustancias naturales.

Con el objetivo de comprobar las hipótesis expuestas, se realizó microscopía confocal tras el tratamiento con farnesol libre. Los resultados mostraron que en bacterias gram negativas, tanto en *E. coli* como en *P. aeruginosa*, a medida que iba aumentando la concentración de tratamiento, iban aumentando el número de bacterias con las membranas dañadas, pero al tratarse de concentraciones subinhedoras en ambos casos, seguían apareciendo un gran número de bacterias con las membranas intactas. En el caso de las bacterias gram positivas, a medida que aumenta la concentración de farnesol, se produce una disminución del número de bacterias vivas, especialmente notable a concentraciones suprainhedoras, lo que coincide con los resultados obtenidos en el ensayo de absorción de cristal violeta.

También, para confirmar la acción del dispositivo MCM-FOH-EPL sobre las bacterias, se realizaron visualizaciones de estas bacterias mediante HRFEM de muestras sin tratamiento y con tratamiento (400 µg/mL y 1000 µg/mL) de farnesol. En las muestras tratadas de bacterias gram negativas, en *P. aeruginosa* se pudo observar daño en la membrana, mientras que en las muestras de control se observó una membrana intacta. Por el contrario, no se pudieron obtener imágenes concluyentes de *E. coli*. En bacterias gram positivas, concretamente en *S. aureus*, a concentraciones subinhedoras (400 µg/mL) se pueden observar bacterias cuya membrana está intacta y otras en las que se encuentra dañada. A concentraciones suprainhedoras, se observará daño en todas las membranas. En *S. epidermidis*, ambas concentraciones de tratamiento ocasionan importantes alteraciones de membrana al tratarse de concentraciones suprainhedoras.

Por último, con el objetivo de visualizar diferencias en la actividad respiratoria tras el tratamiento con farnesol libre, se realizó un ensayo de tasa de reducción de resazurina. Se demostró que para bacterias gram negativas se requiere mayor concentración de tratamiento para producir una disminución en el porcentaje de resazurina, y, por lo tanto, de la actividad respiratoria. Además, se concluyó que *S. aureus* es más sensible a concentraciones bajas de farnesol en comparación con *S. epidermidis*, al producirse una disminución más rápida en la tasa de resazurina reducida.

Tomando en consideración lo expuesto con anterioridad, los objetivos de este trabajo se han cumplido con éxito:

1. Se ha desarrollado y caracterizado un sistema de liberación controlada basado en nanopartículas mesoporosas de sílice encapsuladas con un antimicrobiano natural, farnesol, y funcionalizadas con la proteína EPL para controlar la liberación del farnesol.
2. Se ha analizado la actividad antimicrobiana de las farnesol libre y encapsulado.
3. Se ha comenzado un estudio de la caracterización del mecanismo de acción del farnesol libre siguiendo cuatro ensayos diferentes.

Como perspectiva de futuro, cabría repetir los ensayos de determinación del mecanismo de acción para poder obtener resultados más clarificadores, así como realizar otros que permitieran determinar cómo actúa el farnesol libre y el compuesto en MCM-FOH-EPL en cada bacteria, algunos de los propuestos podrían ser la cuantificación de daño de la membrana externa con n-fenil-naftilamina (NPN) o cuantificación del daño de la membrana interna con yoduro de propidio.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] R. I. Aminov, "The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature," *Environmental Microbiology*, vol. 11, no. 12. pp. 2970–2988, Dec. 2009. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01972.x.
- [2] A. S. Balderrama-González, H. A. Piñón-Castillo, C. A. Ramírez-Valdespino, L. L. Landeros-Martínez, E. Orrantia-Borunda, and H. E. Esparza-Ponce, "Antimicrobial resistance and inorganic nanoparticles," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 23. MDPI, Dec. 01, 2021. doi: 10.3390/ijms222312890.
- [3] M. Ferri, E. Ranucci, P. Romagnoli, and V. Giaccone, "Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems," *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 57, no. 13, pp. 2857–2876, Sep. 2017, doi: 10.1080/10408398.2015.1077192.
- [4] OMS, "Resistencia a los antimicrobianos 2022."
- [5] S. Sengupta, M. K. Chattopadhyay, and H. P. Grossart, "The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature," *Frontiers in Microbiology*, vol. 4, no. MAR. Frontiers Research Foundation, 2013. doi: 10.3389/fmicb.2013.00047.
- [6] C. Lee Ventola, "The Antibiotic Resistance Crisis Part 1: Causes and Threats," 2015.
- [7] F. L. Gordillo Altamirano and J. J. Barr, "Phage Therapy in the Postantibiotic Era," 2019. [Online]. Available: <https://journals.asm.org/journal/cmr>
- [8] OMS, "10 amenazas para la salud pública ."
- [9] M. E. A. de Kraker, A. J. Stewardson, and S. Harbarth, "Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050?," *PLoS Med*, vol. 13, no. 11, Nov. 2016, doi: 10.1371/journal.pmed.1002184.
- [10] E. Christaki, M. Marcou, and A. Tofarides, "Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence," *Journal of Molecular Evolution*, vol. 88, no. 1. Springer, pp. 26–40, Jan. 01, 2020. doi: 10.1007/s00239-019-09914-3.
- [11] G. D. Wright and H. Poinar, "Antibiotic resistance is ancient: Implications for drug discovery," *Trends in Microbiology*, vol. 20, no. 4. pp. 157–159, Apr. 2012. doi: 10.1016/j.tim.2012.01.002.
- [12] D. G. J. Larsson and C. F. Flach, "Antibiotic resistance in the environment," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 20, no. 5. Nature Research, pp. 257–269, May 01, 2022. doi: 10.1038/s41579-021-00649-x.
- [13] J. A. Ayukekbong, M. Ntemgwa, and A. N. Atabe, "The threat of antimicrobial resistance in developing countries: Causes and control strategies," *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, vol. 6, no. 1. BioMed Central Ltd., May 15, 2017. doi: 10.1186/s13756-017-0208-x.
- [14] R. L. Finley *et al.*, "The scourge of antibiotic resistance: The important role of the environment," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 57, no. 5. pp. 704–710, Sep. 01, 2013. doi: 10.1093/cid/cit355.
- [15] A. P. Magiorakos *et al.*, "Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 18, no. 3, pp. 268–281, 2012, doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- [16] J. M. A. Blair, M. A. Webber, A. J. Baylay, D. O. Ogbolu, and L. J. V. Piddock, "Molecular mechanisms of antibiotic resistance," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 13, no. 1. Nature Publishing Group, pp. 42–51, Jan. 11, 2015. doi: 10.1038/nrmicro3380.
- [17] L. K. Ruddaraju, S. V. N. Pammi, G. sankar Guntuku, V. S. Padavala, and V. R. M. Kolapalli, "A review on anti-bacterials to combat resistance: From ancient era of plants and metals to present and future perspectives of green nano technological combinations," *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 15, no. 1. Shenyang Pharmaceutical University, pp. 42–59, Jan. 01, 2020. doi: 10.1016/j.ajps.2019.03.002.
- [18] J. M. Munita and C. A. Arias, "Mechanisms of Antibiotic Resistance," *Microbiol Spectr*, vol. 4, no. 2, Mar. 2016, doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.

- [19] N. Chakraborty *et al.*, “Nanobiotics against antimicrobial resistance: harnessing the power of nanoscale materials and technologies,” *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 20, no. 1. BioMed Central Ltd, Dec. 01, 2022. doi: 10.1186/s12951-022-01573-9.
- [20] A. H. Holmes *et al.*, “Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance,” *The Lancet*, vol. 387, no. 10014. Lancet Publishing Group, pp. 176–187, Jan. 09, 2016. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00473-0.
- [21] R. A. Fisher, B. Gollan, and S. Helaine, “Persistent bacterial infections and persister cells,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 15, no. 8. Nature Publishing Group, pp. 453–464, Aug. 01, 2017. doi: 10.1038/nrmicro.2017.42.
- [22] L. Czaplewski *et al.*, “Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review,” *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 16, no. 2. Lancet Publishing Group, pp. 239–251, Feb. 01, 2016. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00466-1.
- [23] W. Chen, “Will the mRNA vaccine platform be the panacea for the development of vaccines against antimicrobial resistant (AMR) pathogens?,” *Expert Rev Vaccines*, vol. 21, no. 2, pp. 155–157, 2022, doi: 10.1080/14760584.2022.2011226.
- [24] R. Rosini, S. Nicchi, M. Pizza, and R. Rappuoli, “Vaccines Against Antimicrobial Resistance,” *Frontiers in Immunology*, vol. 11. Frontiers Media S.A., Jun. 03, 2020. doi: 10.3389/fimmu.2020.01048.
- [25] K. Kotzampassi and E. J. Giamarellos-Bourboulis, “Probiotics for infectious diseases: More drugs, less dietary supplementation,” *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 40, no. 4. Elsevier B.V., pp. 288–296, 2012. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.06.006.
- [26] G. D. Wright, “Antibiotic Adjuvants: Rescuing Antibiotics from Resistance,” *Trends in Microbiology*, vol. 24, no. 11. Elsevier Ltd, pp. 862–871, Nov. 01, 2016. doi: 10.1016/j.tim.2016.06.009.
- [27] S. S. Y. Leung and H. K. Chan, “Emerging antibiotic alternatives: From antimicrobial peptides to bacteriophage therapies,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 191. Elsevier B.V., Dec. 01, 2022. doi: 10.1016/j.addr.2022.114594.
- [28] S. Yamaguchi, E. Yamamoto, T. Mannen, and T. Nagamune, “Protein refolding using chemical refolding additives,” *Biotechnology Journal*, vol. 8, no. 1. pp. 17–31, Jan. 2013. doi: 10.1002/biot.201200025.
- [29] P. Guglielmi, V. Pontecorvi, and G. Rotondi, “Natural compounds and extracts as novel antimicrobial agents,” *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, vol. 30, no. 12. Taylor and Francis Ltd., pp. 949–962, 2020. doi: 10.1080/13543776.2020.1853101.
- [30] I. Frost *et al.*, “The role of bacterial vaccines in the fight against antimicrobial resistance: an analysis of the preclinical and clinical development pipeline,” *The Lancet Microbe*, vol. 4, no. 2. Elsevier Ltd, pp. e113–e125, Feb. 01, 2023. doi: 10.1016/S2666-5247(22)00303-2.
- [31] K. J. Hetrick, M. A. Aguilar Ramos, and R. T. Raines, “Endogenous Enzymes Enable Antimicrobial Activity,” *ACS Chem Biol*, vol. 16, no. 5, pp. 800–805, May 2021, doi: 10.1021/acscchembio.0c00894.
- [32] F. Donsì and G. Ferrari, “Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food,” *Journal of Biotechnology*, vol. 233. Elsevier B.V., pp. 106–120, Sep. 10, 2016. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.07.005.
- [33] K. Wińska, W. Mączka, J. Łyczko, M. Grabarczyk, A. Czubaszek, and A. Szumny, “Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative?,” *Molecules*, vol. 24, no. 11. MDPI AG, Jun. 05, 2019. doi: 10.3390/molecules24112130.
- [34] G. de Araújo Delmondes *et al.*, “Toxicological and pharmacologic effects of farnesol (C 15 H 26 O): A descriptive systematic review,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 129, pp. 169–200, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.fct.2019.04.037.
- [35] H. N. H. Veras, F. F. G. Rodrigues, M. A. Botelho, I. R. A. Menezes, H. D. M. Coutinho, and J. G. M. Costa, “Enhancement of aminoglycosides and  $\beta$ -lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Thymol,” *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 10, pp. S2790–S2795, May 2017, doi: 10.1016/j.arabjc.2013.10.030.
- [36] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, and M. Idaomar, “Biological effects of essential oils - A review,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 46, no. 2. pp. 446–475, Feb. 2008. doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106.

- [37] N. Basavegowda, J. K. Patra, and K. H. Baek, "Essential oils and mono/Bi/tri-metallic nanocomposites as alternative sources of antimicrobial agents to combat multidrug-resistant pathogenic microorganisms: An overview," *Molecules*, vol. 25, no. 5. MDPI AG, Feb. 27, 2020. doi: 10.3390/molecules25051058.
- [38] A. F. Costa, L. D. C. Silva, and A. C. Amaral, "Farnesol: An approach on biofilms and nanotechnology," *Medical Mycology*, vol. 59, no. 10. Oxford University Press, pp. 958–969, Oct. 01, 2021. doi: 10.1093/mmy/myab020.
- [39] M. Polke, I. Leonhardt, O. Kurzai, and I. D. Jacobsen, "Farnesol signalling in *Candida albicans*—more than just communication," *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 44, no. 2. Taylor and Francis Ltd, pp. 230–243, Mar. 04, 2018. doi: 10.1080/1040841X.2017.1337711.
- [40] V. Dupuis *et al.*, "Nanodelivery of essential oils as efficient tools against antimicrobial resistance: a review of the type and physical-chemical properties of the delivery systems and applications," *Drug Delivery*, vol. 29, no. 1. Taylor and Francis Ltd., pp. 1007–1024, 2022. doi: 10.1080/10717544.2022.2056663.
- [41] B. Y. , R. J. T. , & C. W. C. Kim, "Nanomedicine," *N Engl J Med*, vol. 363, no. 25, pp. 2434–43, Dec. 2010.
- [42] S. Contera, J. B. De La Serna, and T. D. Tetley, "Biotechnology, nanotechnology and medicine," *Emerging Topics in Life Sciences*, vol. 4, no. 6. Portland Press Ltd, pp. 551–554, Dec. 01, 2021. doi: 10.1042/ETLS20200350.
- [43] S. Kulshrestha and A. U. Khan, "Nanomedicine for anticancer and antimicrobial treatment: An overview," *IET Nanobiotechnol*, vol. 12, no. 8, pp. 1009–1017, Dec. 2018, doi: 10.1049/iet-nbt.2018.5112.
- [44] W. Najahi-Missaoui, R. D. Arnold, and B. S. Cummings, "Safe nanoparticles: Are we there yet?," *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 1, pp. 1–22, Jan. 2021, doi: 10.3390/ijms22010385.
- [45] O. C. Farokhzad and R. Langer, "Impact of nanotechnology on drug delivery," *ACS Nano*, vol. 3, no. 1, pp. 16–20, Jan. 2009, doi: 10.1021/nn900002m.
- [46] V. J. Mohanraj and Y. Chen, "Nanoparticles-A Review," 2006. [Online]. Available: <http://www.tjpr.freehosting.net>
- [47] F. Tang, L. Li, and D. Chen, "Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, biocompatibility and drug delivery," *Advanced Materials*, vol. 24, no. 12, pp. 1504–1534, Mar. 2012, doi: 10.1002/adma.201104763.
- [48] I. Garrido-Cano *et al.*, "Biocompatibility and internalization assessment of bare and functionalised mesoporous silica nanoparticles," *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 310, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.micromeso.2020.110593.
- [49] C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, and J. S. Becht, "LETTERS TO NATURE Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism," 1992.
- [50] F. Tang, L. Li, and D. Chen, "Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, biocompatibility and drug delivery," *Advanced Materials*, vol. 24, no. 12, pp. 1504–1534, Mar. 2012, doi: 10.1002/adma.201104763.
- [51] F. Tang, L. Li, and D. Chen, "Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, biocompatibility and drug delivery," *Advanced Materials*, vol. 24, no. 12, pp. 1504–1534, Mar. 2012, doi: 10.1002/adma.201104763.
- [52] M. Gisbert-Garzarán, D. Lozano, and M. Vallet-Regí, "Mesoporous silica nanoparticles for targeting subcellular organelles," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 24. MDPI AG, pp. 1–18, Dec. 02, 2020. doi: 10.3390/ijms21249696.
- [53] E. Aznar, M. Oroval, L. Pascual, J. R. Murguía, R. Martínez-Mánez, and F. Sancenón, "Gated Materials for On-Command Release of Guest Molecules," *Chemical Reviews*, vol. 116, no. 2. American Chemical Society, pp. 561–718, Jan. 27, 2016. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00456.
- [54] S. Srisikandan and J. Cohen, "BACTERIAL SEPSIS AND SEPTIC SHOCK GRAM-POSITIVE SEPSIS Mechanisms and Differences from Gram-Negative Sepsis."

- [55] H. N. H. Veras, F. F. G. Rodrigues, M. A. Botelho, I. R. A. Menezes, H. D. M. Coutinho, and J. G. M. Costa, "Enhancement of aminoglycosides and  $\beta$ -lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Thymol," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 10, pp. S2790–S2795, May 2017, doi: 10.1016/j.arabjc.2013.10.030.

## 7. ANEXO I.

### Anexo al Trabajo de Fin de Grado: Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No Procede
ODS 1. Fin de la pobreza.			X	
ODS 2. Hambre cero.			X	
ODS 3. Salud y bienestar.	X			
ODS 4. Educación de calidad.			X	
ODS 5. Igualdad de género.			X	
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.			X	
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.			X	
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.			X	
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.			X	
ODS 10. Reducción de las desigualdades.			X	
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.			X	
ODS 12. Producción y consumo responsables.			X	
ODS 13. Acción por el clima.			X	
ODS 14. Vida submarina.			X	
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.			X	
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.			X	
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.			X	

El objetivo principal de este trabajo está vinculado al Objetivo de Desarrollo Sostenible número 3 de la Agenda 2030, el cual busca asegurar una vida saludable y promover el bienestar. En este contexto, se aborda el tema de la nanomedicina, específicamente el uso de nanopartículas con propiedades antimicrobianas. Así, el propósito principal de este proyecto es combatir y reducir la resistencia a los antibióticos, una de las preocupaciones más importantes en el ámbito de la salud pública en la actualidad mediante el uso de la nanotecnología. Por lo tanto, el desarrollo de este TFG se encuentra en línea con el Objetivo de Desarrollo Sostenible número 3 de la Agenda 2030.