

ESTRATEGIAS ANALÍTICAS PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE IONES PLATA Y NANOPARTÍCULAS Y SUS EFECTOS SINÉRGICOS CON ANTIBIÓTICOS

Isabel Abad-Álvaro¹, Ana C. Giménez-Ingalaturre¹, Mariam Bakir¹, Pilar Goñi², Francisco Laborda¹

¹Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores (GEAS), Instituto Universitario de Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA), Zaragoza, España.

²Grupo de Agua y Salud Ambiental, Instituto Universitario de Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA), Zaragoza, España.
iabad@unizar.es, www.geas.unizar.es

Abstract

La resistencia a antimicrobianos es uno de los mayores retos de salud pública que afecta a la eficacia de los antibióticos. Los compuestos de plata son conocidos por su efecto bactericida, siendo su forma nanoparticulada una estrategia alternativa para reducir el consumo de antibióticos y luchar contra la resistencia antimicrobiana. Este trabajo se centra en el estudio del efecto bactericida de nanomateriales de plata, así como los efectos sinérgicos que pueden surgir tras su combinación con antibióticos convencionales. El objetivo analítico se basa en el desarrollo y aplicación de métodos directos basados en la detección de células y partículas individuales mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (SC-ICP-MS, SP-ICP-MS) y cromatografía hidrodinámica ICP-MS (HDC-ICP-MS), en combinación con digestiones alcalinas y enzimáticas, para identificar y cuantificar el contenido y la biodistribución de las distintas especies de plata presentes en bacterias *Escherichia coli* expuestas a nanomateriales de plata y antibióticos.

1. Introducción

A pesar de la actual era de tecnologías avanzadas, las enfermedades infecciosas se encuentran todavía entre las primeras causas de muerte. El principal inconveniente de los agentes antimicrobianos convencionales es el incremento en el número y tipos de resistencias múltiples a los fármacos [1], lo cual supone una amenaza a la hora de mantener la eficacia de los antibióticos usados hoy en día. Esta resistencia surge cuando los microorganismos, como bacterias, virus, hongos y parásitos, evolucionan a lo largo del tiempo y dejan de responder a los medicamentos. De hecho, esta resistencia a antimicrobianos es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las diez principales amenazas sanitarias [2, 3]. Una solución ideal al problema de la resistencia a antimicrobianos sería el desarrollo de nuevas clases de antibióticos. Sin embargo, el desarrollo de nuevos antibióticos suele llevar décadas, lo que hace imposible detener a corto plazo el problema de las resistencias. En 2019, la OMS identificó 32 antibióticos en fase de desarrollo clínico contra patógenos prioritarios, de los que solo seis se clasificaron como innovadores [4]. Por tanto,

es necesario desarrollar antimicrobianos alternativos que sean económicos y eficaces.

Algunos metales como plata, cobre, zinc y magnesio han sido tradicionalmente utilizados para tratar enfermedades, mucho antes de la revolución farmacéutica de los antibióticos [5]. Específicamente, los compuestos de plata son bien conocidos por sus propiedades bactericidas. En la actualidad, la plata es usada en sistemas de tratamiento de aguas, así como en otras aplicaciones médicas como odontología, catéteres o tratamiento de quemaduras [6-8]. Asimismo, los iones plata se han propuesto como un eficaz antimicrobiano alternativo a los antibióticos debido a su baja citotoxicidad [9,10]. Recientemente, una serie de iniciativas destinadas a combatir las bacterias multirresistentes han optado por estrategias que combinan plata con antibióticos para potenciar la eficacia de fármacos [11]. En este sentido, la combinación de plata con antibióticos convencionales es una alternativa interesante para luchar contra la resistencia a antimicrobianos, permitiendo potenciar la eficacia de los fármacos mediante la aparición de efectos sinérgicos. Sin embargo, a pesar de su amplio uso, los mecanismos de la actividad bactericida de la plata todavía no se conocen completamente. De la misma forma, la disponibilidad de resultados sobre los mecanismos bactericidas sinérgicos asociados a la combinación de antibióticos con plata es todavía escasa. Por todo ello, es necesario desarrollar metodologías analíticas que permitan obtener información sobre la plata en cultivos microbiológicos, para posteriormente relacionar esta información con los mecanismos de acción individual de la plata y en combinación con antibióticos convencionales. El modo de detección de partículas individuales mediante ICP-MS puede aplicarse al análisis de biopartículas (como células, bacterias, microalgas o levaduras), dando lugar a la técnica de detección de células individuales. Conceptualmente, SC y SP están basados en el mismo fundamento. Cuando se introduce en el plasma una suspensión de células a una concentración suficientemente baja, cada una de las células será vaporizada, atomizada e ionizada y se generará un paquete de iones a partir de los metales presentes en las células que podrá ser detectado como un evento discreto. Cada evento detectado corresponderá a una célula individual. Mientras que los métodos tradicionales utilizados para la determinación del contenido de metales de las células proporcionan

concentraciones de masa promedio asumiendo una distribución homogénea de los metales en las células [12], SC-ICP-MS permite el análisis célula a célula, proporcionando información sobre la masa de metales por célula, la distribución de masa de metales en la población de células y el número de células que contienen metales o nanopartículas metálicas [13]. Por su parte, SP-ICP-MS y la cromatografía hidrodinámica acoplada con ICP-MS permiten la discriminación simultánea entre especies disueltas y nanopartículas, para la posterior cuantificación de ambas fracciones por separado y la determinación del tamaño de las nanopartículas [14, 15]. En este trabajo se lleva a cabo el desarrollo y aplicación de una plataforma analítica que permita la detección y cuantificación directa de plata en cultivos de bacterias *E. coli* previamente expuestos a plata (I) y nanopartículas de plata, con el objetivo de proporcionar la información química requerida para elucidar la acción bactericida de distintas nanopartículas de plata. Esta plataforma está basada en la combinación de SC-ICP-MS, SP-ICP-MS y HDC-ICP-MS, y distintos tratamientos de muestra (digestión alcalina y/o enzimática con lisozima) para permitir: i) la determinación de la plata total (adsorbida o internalizada) en bacterias y su distribución por bacteria, ii) la determinación de las especies de plata presentes en bacterias, iii) la evaluación de la relación entre las especies de plata detectadas en el medio de cultivo y en las bacterias y su potencial papel en la actividad bactericida, iv) el estudio de la biodistribución de la plata a través de la cuantificación de plata intracelular tras la eliminación enzimática de la pared celular con lisozima, v) el estudio de la interacción y la aparición de efectos bactericidas sinérgicos tras la combinación de plata y antibióticos.

2. Efecto bactericida de las especies de plata

2.1. Estudio de las especies de plata durante el proceso de incubación

La actividad bactericida de las nanopartículas de plata está fuertemente influenciada por sus propiedades fisicoquímicas como tamaño, forma, superficie química, recubrimiento, así como por el pH y la fuerza iónica del medio [16, 17]. Las nanopartículas en contacto con el medio de cultivo pueden sufrir transformaciones como disolución/oxidación o agregación [18, 19]. Por lo tanto, antes de estudiar el efecto bactericida de las especies de plata con bacterias, es necesario determinar si se producen estas transformaciones durante el proceso de incubación, así como las especies de plata presentes durante el mismo. Para ello, se llevó a cabo un ensayo en el que la plata (I) y diferentes nanopartículas de plata (10 y 60 nm estabilizadas con citrato) se sometieron a un proceso de incubación durante 24 horas en el medio de cultivo previamente optimizado (sin bacterias) [20]. Tras el proceso de incubación, estas muestras, junto con una muestra control de las mismas nanopartículas en agua ultrapura, se midieron mediante SP-ICP-MS y HDC-ICP-MS. En la figura 1 se muestran las distribuciones de tamaño obtenidas mediante SP-ICP-MS para unas AgNPs de 60 nm

control e incubadas en el medio de cultivo. En ambos casos se obtuvieron distribuciones similares con tamaños medios próximos entre sí. El tamaño nominal de las nanopartículas incubadas fue $58,3 \pm 0,1$ nm, mientras que el de las nanopartículas de plata control diluidas en agua fue $59,7 \pm 0,4$ nm. Estos valores concordaban entre sí y con el tamaño nominal proporcionado por el proveedor (60 ± 7 nm). Esto indicaba que las nanopartículas mantenían el tamaño original tras la incubación y no sufrían procesos de agregación. Adicionalmente, mediante SP-ICP-MS se determinó que las AgNPs de 60 nm contenían una pequeña fracción de plata (I) en la suspensión original ($3,9 \pm 0,3$ %), mientras que, tras su incubación en el medio de cultivo, esta fracción de plata (I) aumentó hasta un $9,2 \pm 0,1$ %, indicando procesos de disolución de las nanopartículas durante la incubación. En el caso de los cultivos con AgNPs de 10 nm no se pudo obtener información cuantitativa mediante SP-ICP-MS debido a que el valor crítico en tamaño era 10,7 nm.

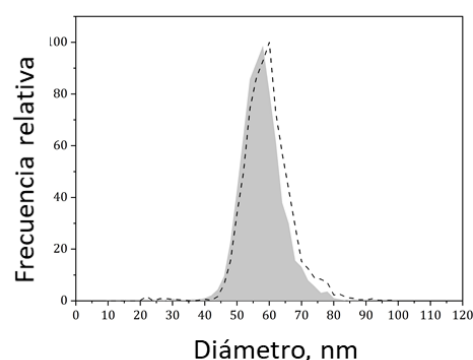


Fig. 1. Distribuciones de tamaño obtenidas por SP-ICP-MS para AgNPs de 60 nm diluidas en agua ultrapura (control) (línea discontinua) y tras la incubación en el medio de cultivo (área sombreada).

Para obtener información adicional sobre las AgNPs de 10 nm y sobre la posible presencia de una fracción disuelta, las muestras se midieron mediante HDC-ICP-MS. En esta técnica de separación las especies de mayor tamaño eluyen en primer lugar. En las figuras 2a, b se recogen los cromatogramas obtenidos tras la incubación con plata (I) y AgNPs de 10 nm en el medio de cultivo. En ambos casos sólo se obtuvo un pico correspondiente a la plata disuelta (Fig. 2a) y a las AgNPs de 10 nm (Fig. 2b), respectivamente. Esto indicaba que en ambos casos se mantenía el estado original de las especies de plata incubadas, y que en el caso de las AgNPs de 10 nm éstas no se oxidaban a plata (I). Sin embargo, en el caso del cromatograma obtenido para las AgNPs de 60 nm (Fig. 2c) se observaron dos picos. El primer pico, con un tiempo de retención de 8,15 min, corresponde a las AgNPs de 60 nm, mientras que el segundo a 8,50 min indica la presencia de plata disuelta. Eso corroboraba los resultados anteriormente obtenidos por SP-ICP-MS, confirmando la oxidación parcial de las AgNPs de 60 nm a plata (I) durante el proceso de incubación.

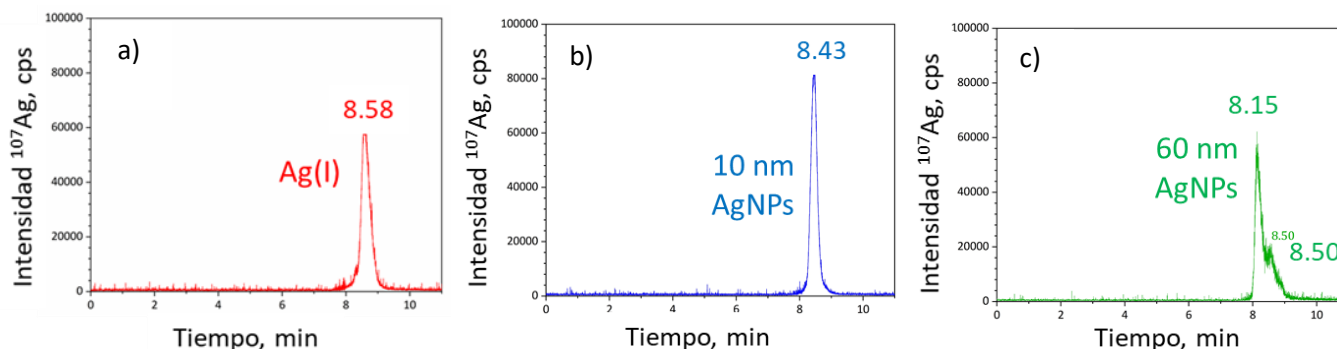


Fig. 2. Cromatogramas obtenidos por HDC-ICP-MS para las muestras sometidas a un proceso de incubación: a) Ag (I); b) AgNPs 10 nm; c) AgNPs 60 nm.

2.2. Detección de plata en bacterias: especies involucradas en la actividad bactericida y biodistribución

Una vez conocidas las especies de plata presentes durante el proceso de incubación, las muestras de bacterias *E. coli* incubadas con plata se analizaron mediante SC-ICP-MS para detectar la presencia o ausencia de plata en dichas bacterias. En la figura 3 se muestran los barridos de tiempo obtenidos para dos cepas distintas de *E. coli*. En todas las muestras se confirmó la presencia de biopartículas que contenían plata, indicando que las bacterias habían interactuado y captado plata durante su incubación. Sin embargo, una de las limitaciones de SC-ICP-MS es que no permite diferenciar entre formas disueltas y particuladas de un elemento, limitándose a determinar el contenido total de los elementos específicos en las células individuales. Con el fin de conocer la forma química en la que se encuentra la plata captada por las bacterias, las muestras de *E. coli* expuestas a plata se sometieron a una digestión alcalina con TMAH y CaCl₂. Este medio permite la degradación de la matriz biológica, preservando a su vez la integridad de las nanopartículas. Tras la digestión, las muestras se analizaron mediante SP-ICP-MS y HDC-ICP-MS. En la figura 4 se muestra la distribución de tamaño resultante de la muestra de bacterias incubadas con AgNPs de 60 nm, sometidas a la digestión alcalina y analizadas por SP-ICP-MS. Al compararla con unas AgNPs control de 60 nm diluidas en ese mismo medio alcalino (TMAH 0,2% y

CaCl₂ 0,05 mM) se confirmó la ausencia de AgNPs en la muestra de bacterias, lo que indicaba que las nanopartículas no habían sido internalizadas ni adsorbidas por las bacterias. Asimismo, se observó una línea base mayor que las nanopartículas control, lo que indicaba a su vez que la forma física presente en las bacterias era plata iónica, como consecuencia de la oxidación parcial de las nanopartículas o de la plata (I) presente en la suspensión original.

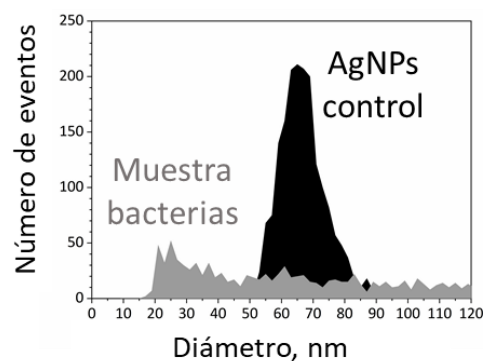


Fig. 4. Distribución de tamaño obtenida por SP-ICP-MS para bacterias *E. coli* J62 expuestas a AgNPs de 60 nm (gris) y AgNPs de 60 nm control (negro) tras digestión alcalina.

Al igual que en el caso de los medios de incubación, para los cultivos de bacterias expuestas a AgNPs de 10 nm no

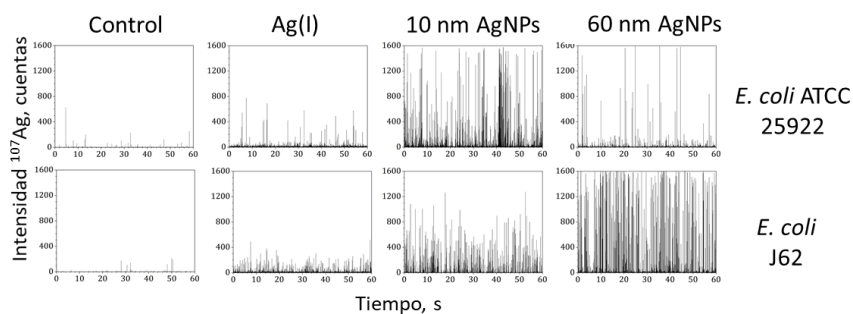


Fig. 3. Barridos de tiempo obtenidos por SC-ICP-MS para las muestras de bacteria *E. coli* ATCC 25922 y J62 expuestas a Ag (I), AgNPs 10 nm y AgNPs 60 nm.

podieron obtenerse resultados cuantitativos por SP-ICP-MS, ya que el valor crítico de la técnica está muy próximo al tamaño de las nanopartículas. Para complementar esta información, las muestras de bacterias incubadas con AgNPs de 10 nm se midieron mediante HDC-ICP-MS. En la figura 5 se muestran los cromatogramas hidrodinámicos obtenidos para las dos cepas de *E. coli* incubadas con AgNPs 10 nm y sometidas al proceso de digestión alcalina. En ambos casos se observaron dos picos: el primero a tiempos de retención de 8,50 y 8,60 min, correspondiente a la presencia de nanopartículas de 10 nm; y un segundo pico a 9,58 y 9,50 min relacionado con la presencia de plata disuelta. Por lo tanto, estos resultados mostraban que, contrariamente a lo que sucedía en ausencia de bacterias, cuando las AgNPs de 10 nm entran en contacto con las bacterias se produce su oxidación y la liberación de iones plata, los cuales son captados (internalizados y/o adsorbidos) por las bacterias.

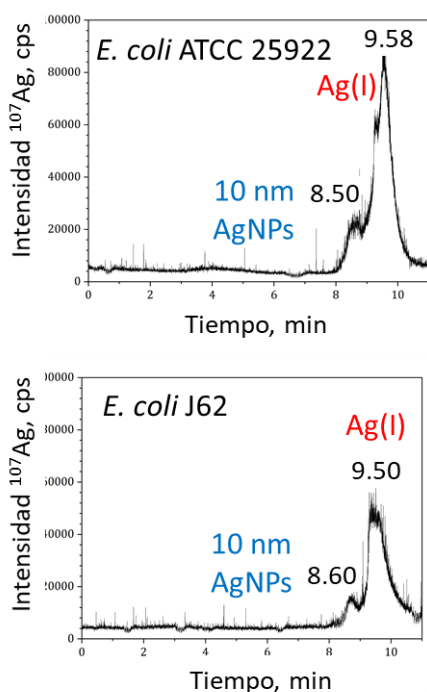


Fig. 5. Cromatogramas obtenidos por HDC-ICP-MS para bacterias *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* J62 expuestas a AgNPs de 10 nm y digeridas con TMAH y CaCl_2 .

Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos en los medios de cultivo y en presencia de las propias bacterias, se pudo concluir que la actividad bactericida de las AgNPs de 60 nm estaría relacionada a la acción única de los iones. El análisis de las nanopartículas en el medio de cultivo confirmó la presencia de plata (I) y nanopartículas. Asimismo, tras el análisis mediante SP-ICP-MS de las bacterias *E. coli* expuestas a nanopartículas y digeridas con TMAH, se demostró la ausencia de AgNPs de 60 nm, indicando que estas nanopartículas no se habían acumulado en las bacterias. Esto podría deberse al gran tamaño de las nanopartículas y su carga superficial negativa, lo cual estaría de acuerdo con la bibliografía [21,22]. Por otro lado, la presencia de bacterias que

contenían plata se detectó mediante SC-ICP-MS, indicando que las bacterias habían captado plata. Esta plata se encontraría como plata iónica, tal y como se demostró por SP-ICP-MS, y procedería de la oxidación parcial de las nanopartículas en el medio de cultivo, justificando de esta forma la actividad bactericida asociada únicamente a los iones. En el caso de las AgNPs de 10 nm, la actividad bactericida estaría asociada a una acción combinada ion-partícula. Esto estaría justificado por el análisis en el medio de cultivo, donde se demostró que las nanopartículas se mantenían en su estado original, sin detectarse la presencia de iones plata. El pequeño tamaño de las AgNPs de 10 nm favorecería su interacción con las bacterias, produciendo la alteración de la membrana y facilitando su captación por parte de las mismas. Esto se confirmó a partir de los resultados obtenidos tras la digestión alcalina de las bacterias y su posterior análisis por SP-ICP-MS y HDC-ICP-MS, donde se demostró la presencia de AgNPs de 10 nm. Además, se detectó plata (I) proveniente de la oxidación parcial de las nanopartículas en las bacterias sometidas a digestión alcalina y analizadas mediante HDC-ICP-MS. Cuando las nanopartículas entran en contacto con la membrana de la bacteria, tendría lugar un proceso de oxidación que llevaría a la liberación de iones plata desde su superficie. Estos iones podrían ser adsorbidos en la pared de la bacteria o internalizados a través de las porinas de la membrana o de la membrana alterada. Alternativamente, las nanopartículas podrían internalizarse en las bacterias tras su contacto con la pared celular y, una vez dentro, podrían oxidarse a plata (I). Estos resultados están de acuerdo con la bibliografía [21-23], donde los autores proporcionan una serie de evidencias analíticas que corroboran la interacción de las nanopartículas con la superficie de las bacterias mediante microscopía electrónica o la presencia de plata (I) en las bacterias mediante técnicas de ICP-MS.

Una vez establecidas las especies de plata presentes en los medios de cultivo y en las propias bacterias, así como de haber sugerido los posibles mecanismos de acción de las distintas nanopartículas, se llevó a cabo un estudio de la biodistribución de la plata en las bacterias. Una vez más, la limitación de la técnica de SC-ICP-MS no permite distinguir si el elemento acumulado (en este caso plata) ha sido internalizado por el microorganismo o adsorbido en la pared de las bacterias. Sin embargo, si esta técnica se complementa con una digestión enzimática de la pared celular con lisozima, las bacterias pierden la pared celular, quedando en forma de esferoplasto y haciendo posible la cuantificación de la plata intracelular presente. De esta forma, los cultivos de bacterias con plata se sometieron a la digestión enzimática con lisozima con el fin de cuantificar la plata intracelular mediante SC-ICP-MS. Asimismo, se llevó a cabo una digestión ácida de estos esferoplastos y su posterior medida mediante ICP-MS para validar los resultados obtenidos mediante análisis directo por SC-ICP-MS. Adicionalmente, los sobrenadantes que contenían los restos de la membrana y los componentes del espacio periplásmico se atacaron con una digestión ácida y se midieron para cuantificar la plata adsorbida en la pared o que se encontraba en el espacio periplásmico

[24]. En el caso de la incubación de las bacterias con plata (I) se observó que éstas internalizaron aproximadamente el 100% de la plata captada, mientras que en el caso de la incubación con AgNPs de 10 nm, este porcentaje se limitó al 46% (figura 6). Esto podría deberse a la dificultad de las partículas para atravesar la membrana interna de la bacteria.

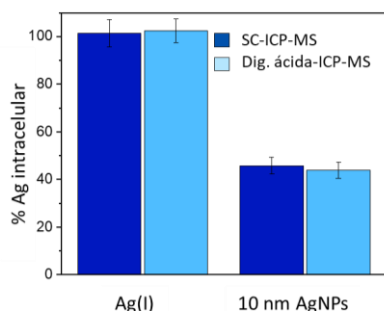


Fig. 6. Biodistribución de plata presente en bacterias expuestas a Ag (I) y AgNPs de 10 nm. Plata intracelular determinada a partir del análisis de esferoplastos resultantes de la digestión de bacterias con lisozima mediante SC-ICP-MS e ICP-MS (tras digestión ácida).

3. Efecto bactericida de las especies de plata en combinación con antibióticos convencionales

Como se ha discutido anteriormente, la actividad bactericida de las nanopartículas está fuertemente influenciada por propiedades fisicoquímicas como el tamaño, pero también por la estructura y composición de la pared celular de las bacterias. Una de las ventajas de las nanopartículas es que, al igual que los metales, no se unen a receptores específicos de las bacterias, complicando el desarrollo de resistencia por parte de las mismas. En este sentido, la combinación de plata con antibióticos convencionales es una alternativa interesante para luchar contra la resistencia a antimicrobianos, permitiendo potenciar la eficacia de los fármacos mediante la aparición de efectos sinérgicos. Por este motivo, una vez estudiadas las especies de plata involucradas en el efecto bactericida, así como la biodistribución de las mismas en bacterias, esta metodología analítica se aplicó en el estudio bactericida de las especies de plata en combinación con antibióticos. En este caso las bacterias se incubaron previamente con plata (I) o AgNPs de 10 nm, individualmente, o en combinación con dos concentraciones diferentes de un antibiótico convencional. El antibiótico elegido fue la apramicina (aminoglucósido), cuyo espectro de acción es frente a bacterias Gram-negativas y es comúnmente utilizado en veterinaria. A la vista de los resultados discutidos anteriormente no se estudiaron las AgNPs de 60 nm debido a que las partículas no eran captadas por las bacterias.

Antes de llevar a cabo la determinación de plata captada, se estudiaron los efectos bactericidas de las combinaciones de apramicina-plata y la posible aparición de efectos sinérgicos. Los efectos bactericidas sinérgicos son aquellos en los que la actividad de los dos antimicrobianos

combinados es mayor que la adición de las actividades de los mismos por separado. En primer lugar, se determinó la actividad bactericida individual de cada antimicrobiano mediante el método de dilución [25]. La concentración bactericida mínima (CBM) se define como la concentración mínima del agente bactericida necesario para reducir el 99,9% de la población microbiana inicial. A continuación, se determinó la actividad bactericida combinada para cada una de las combinaciones de antimicrobianos mediante el método del tablero [26]. Los valores obtenidos mostraron que la combinación de AgNPs de 10 nm y apramicina producía la aparición de efectos sinérgicos, permitiendo disminuir hasta 4 y 8 veces la concentración de apramicina y de las nanopartículas, respectivamente. De la misma manera, la combinación apramicina-Ag (I) permitió disminuir hasta 8 y 16 veces su concentración. Tras demostrar la presencia de efectos sinérgicos, todas las combinaciones de plata con apramicina se analizaron mediante SC-ICP-MS para detectar y cuantificar la plata captada por las bacterias. El análisis directo por SC-ICP-MS se validó a través de la cuantificación tras digestión ácida (figura 7). Se observó que la presencia de antibiótico aumentaba la captación de plata en las bacterias, demostrando además una influencia de la concentración de apramicina en la captación de plata.

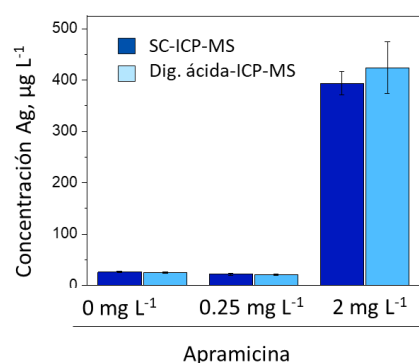


Fig. 7. Concentración de plata tras el análisis directo mediante SC-ICP-MS y tras digestión ácida ICP-MS para muestras de bacterias *E. coli* ATCC 29522 expuestas a 2 mg L⁻¹ AgNPs 10 nm y apramicina.

Finalmente, estas muestras de bacterias se observaron mediante TEM y SEM, donde se observaron importantes alteraciones estructurales y morfológicas en las bacterias. Mientras que las bacterias control mantenían su forma ovalada y su estructura lisa, así como su doble membrana intacta, en presencia de apramicina y AgNPs se observaron daños en la pared de las bacterias y contracción (incluso desaparición) del citoplasma. Estos daños eran todavía mayores cuando ambos antimicrobianos se combinaban. Todo ello, parece indicar que la combinación de ambos antimicrobianos pueden ser una alternativa interesante al uso indiscriminado de grandes cantidades de antibióticos.

4. Conclusiones

El uso de una plataforma analítica basada en SC-ICP-MS, SP-ICP-MS y HDC-ICP-MS, en combinación con distintas

estrategias de digestión (como la digestión alcalina o enzimática mediante lisozima), ha permitido llevar a cabo la detección directa y la identificación de las especies de plata presentes en medios de cultivo y en bacterias *E. coli* expuestas a plata (I) y a nanopartículas de plata. Asimismo, se ha podido detectar y cuantificar de manera directa la biodistribución de esa plata captada por las bacterias. De esta forma, a partir de los resultados obtenidos, se ha sugerido una actividad bactericida asociada a la acción ion-partícula para las AgNPs de 10 nm, mientras que las AgNPs de 60 nm actuarían sólo a través de iones. Por otra parte, el análisis a través de SC-ICP-MS de los esferoplastos resultantes de la digestión enzimática de la pared bacteriana con lisozima ha permitido cuantificar la plata intracelular y estudiar la biodistribución de la plata en bacterias individuales. En el caso de bacterias expuestas a plata (I), la plata captada por las bacterias se encontró mayoritariamente internalizada, mientras que en el caso de las bacterias expuestas a AgNPs de 10 nm, tan solo el 45% de la plata captada estaba internalizada. Finalmente, se ha observado que la combinación de plata con apramicina produce la aparición de efectos sinérgicos contra las bacterias, reduciendo las concentraciones de antimicrobianos y manteniendo su efecto bactericida individual.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, el Fondo Europeo de Desarrollo Regional [proyecto PID2021-123203OB-I00 (AEI/FEDER)] y el Departamento de Ciencia, Universidad y Sociedad del Conocimiento del Gobierno de Aragón (E29_23R). ACG agradece al Gobierno de Aragón por su contrato predoctoral. IA agradece al Ministerio de Universidades/NextGenerationEU por su contrato María Zambrano.

Referencias

- [1] A.J. Huh, Y.J. Kwon, "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era, *J. Control. Release* 156 (2011) 128–145. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.002>.
- [2] L.J.V. Piddock, The crisis of no new antibiotics-what is the way forward? *Lancet Infect Dis.* 12 (2012) 249–253. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70316-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70316-4).
- [3] J. Davies, D. Davies, Origins and evolution of antibiotic resistance., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74 (2010) 417–433. <https://doi.org/10.1128/mubr.00016-10>.
- [4] World Health Organization, Resistencia a los antimicrobianos, (2020). <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobialresistance>.
- [5] J.A. Lemire, J.J. Harrison, R.J. Turner, Antimicrobial activity of metals: Mechanisms, molecular targets and applications, *Nat. Rev. Microbiol.* 11 (2013) 371–384. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3028>.
- [6] F. Barras, L. Aussel, B. Ezraty, Silver and antibiotic, new facts to an old story, *Antibiotics.* 7 (2018). <https://doi.org/10.3390/antibiotics7030079>.
- [7] M. Catauro, M.G. Raucchi, F. De Gaetano, A. Marotta, Antibacterial and bioactive silver-containing Na₂O·CaO·2SiO₂ glass prepared by sol-gel method, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 15 (2004) 831–837. <https://doi.org/10.1023/B:JMSM.0000032825.51052.00>.
- [8] J.H. Crabtree, R.J. Burchette, R.A. Siddiqi, I.T. Huen, L.L. Hadnott, A. Fishman, The efficacy of silver-ion implanted catheters in reducing peritoneal dialysis related infections, *Perit. Dial. Int.* 23 (2003) 368–374. <https://doi.org/10.1177/089686080302300410>.
- [9] J.R. Morones-Ramirez, J.A. Winkler, C.S. Spina, J.J. Collins, Silver Enhances Antibiotic Activity Against Gram-Negative Bacteria, *Sci. Transl. Med.* 5 (2013). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006276>.
- [10] M. Herisse, Y. Duverger, I. Martin-Verstraete, F. Barras, B. Ezraty, Silver potentiates aminoglycoside toxicity by enhancing their uptake, *Mol. Microbiol.* 105 (2017) 115–126. <https://doi.org/10.1111/mmi.13687>.
- [11] A.R. Brochado, A. Telzerow, J. Bobonis, M. Banzhaf, A. Mateus, J. Selkrig, E. Huth, S. Bassler, J. Zamarreño Beas, M. Zietek, N. Ng, S. Foerster, B. Ezraty, B. Py, F. Barras, M.M. Savitski, P. Bork, S. Göttig, A. Typas, Species-specific activity of antibacterial drug combinations, *Nature* 559 (2018) 259–263. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0278-9>.
- [12] M. Resano, M. Aramendía, E. García-Ruiz, A. Bazo, E. Bolea-Fernandez, F. Vanhaecke, Living in a transient world: ICP-MS reinvented via time-resolved analysis for monitoring single events, *Chem. Sci.* (2022). <https://doi.org/10.1039/d1sc05452j>.
- [13] L. Amable, C. Stephan, S. Smith, R. Merrifield, An Introduction to Single Cell ICP-MS Analysis, White Paper. Perkin Elmer, 2017, pp. 1–5.
- [14] F. Laborda, E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Nanoanalysis, *Anal. Chem.* 86 (2014) 2270–2278. <https://doi.org/10.1021/ac402980q>.
- [15] M.S. Jiménez, M. Bakir, D. Isabal, M.T. Gómez, J. Pérez-Arategui, J.R. Castillo, F. Laborda, Evaluation of hydrodynamic chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry for speciation of dissolved and nanoparticulate gold and silver, *Anal. Bioanal. Chem.* 413 (2021) 1689–1699. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03132-3>.
- [16] M.K. Rai, S.D. Deshmukh, A.P. Ingle, A.K. Gade, Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria, *J. Appl. Microbiol.* 112 (2012) 841–852. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05253.x>
- [17] T. Bruna, F. Maldonado-Bravo, P. Jara, N. Caro, Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 7202. <https://doi.org/10.3390/ijms22137202>.
- [18] A.C. Gimenez-Ingalaturre, E. Rubio, P. Chueca, F. Laborda, P. Goñi, Contribution to optimization and standardization of antibacterial assays with silver nanoparticles: the culture medium and their aggregation, *J.*

- Microbiol. Methods 203 (2022) 106618.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106618>.
- [19] L. V. Stebounova, E. Guio, V.H. Grassian, Silver nanoparticles in simulated biological media: A study of aggregation, sedimentation, and dissolution, J. Nanoparticle Res. 13 (2011) 233–244.
<https://doi.org/10.1007/s11051-010-0022-3>.
- [20] A.C. Gimenez-Ingalaturre, I. Abad-Álvaro, M. Bakir, P. Chueca, P. Goñi, F. Laborda, Bactericidal activity of silver nanoparticles: An analytical approach based on single cell and single particle inductively coupled plasma mass spectrometry analysis to determine silver species involved, Microchem. J. 205 (2024) 111296.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.111296>
- [21] L.M. Stabryla, K.A. Johnston, J.E. Millstone, L.M. Gilbertson, Emerging investigator series: It's not all about the ion: Support for particle-specific contributions to silver nanoparticle antimicrobial activity, Environ. Sci. Nano 5 (2018) 2047–2068.
<https://doi.org/10.1039/c8en00429c>.
- [22] A. Ivask, A. ElBadawy, C. Kaweeteerawat, D. Boren, H. Fischer, Z. Ji, C.H. Chang, R. Liu, T. Tolaymat, D. Telesca, J.I. Zink, Y. Cohen, P.A. Holden, H.A. Godwin, Toxicity Mechanisms in Escherichia coli Vary for Silver Nanoparticles and Differ from Ionic Silver, ACS Nano 8 (2014) 374–386. <https://doi.org/10.1021/nn4044047>.
- [23] J.R. Morones, J.L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J.B. Kouri, J.T. Ramírez, M.J. Yacaman, The bactericidal effect of silver nanoparticles, Nanotechnology. 16 (2005) 2346–2353. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>.
- [24] A.C. Gimenez-Ingalaturre, I. Abad-Álvaro, P. Goñi, K. Billimoria, H. Goenaga-Infante, F. Laborda, Performance of single-cell ICP-MS for quantitative biodistribution studies of silver interactions with bacteria, J. Anal. At. Spectrom. 39 (2024) 743–753. <https://doi.org/10.1039/D3JA00378G>.
- [25] R. Cantón, J.E. García Sánchez, M.L. Gómez-Lus, C. Martínez Martínez, Luis Rodríguez-Avial, J. Vila, J.A. García Rodríguez, Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los microorganismos., in: Procedimientos En Microbiología Clínica. Recomendaciones de La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2000: pp. 1–54.
- [26] A.L. Leber, Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington, DC, USA: 2016.
<https://doi.org/10.1128/9781555818814>.