



CIENCIAS TÉCNICAS

Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba, 2020

Empleo de nanopartículas de arcillas y cerámicas para el diagnóstico microbiológico rápido

Tamara Lobaina Rodríguez ^{1*} <https://orcid.org/0000-0001-8182-7947>

Claudio Rodríguez Martínez ^{1*} <https://orcid.org/0000-0003-4235-2103>

Ivonne Alfonso Valdés ¹ <https://orcid.org/0000-0003-3915-1909>

Raisa Zhurbenko ¹ <https://orcid.org/0000-0002-4160-7429>

Yordania Zayas Ruiz ¹ <https://orcid.org/0000-0002-3295-1199>

Ana Iris Brito González ¹ <https://orcid.org/0000-0001-5698-0085>

¹ Centro Nacional de Biopreparados. La Habana, Cuba

*Autores para la correspondencia: lobaina@biocen.cu, claudio@biocen.cu

RESUMEN

Palabras clave

diagnóstico microbiológico; nanopartículas; arcillas; cerámicas; zeolitas

Introducción. El objetivo de la investigación consistió en emplear nanopartículas de arcillas, sales de fosfatos de calcio y cerámicas, combinados con sustratos fluorogénicos y cromogénicos, para acortar significativamente el período de diagnóstico microbiológico. **Métodos.** Se seleccionaron combinaciones de bases nutritivas, co-enzimas, co-factores que aceleran el desarrollo y metabolismo microbiano, se acoplaron estos componentes a nanopartículas y sustratos fluorogénicos y cromogénicos para obtener diferentes nanocompuestos. Las nanopartículas y los nanocompuestos se caracterizaron en su composición, estructura y funcionalidad con cepas aisladas de microorganismos y en muestras clínicas, aguas, entre otras. **Resultados.** Las nanopartículas y los agregados de halositas, bentonita, tierra silíceas, hidroxiapatitas, de fosfatos cálcicos y zeolitas, mostraron elevadas relación superficie/volumen, porosidad y rugosidad de la superficie, con tamaños de partículas y de poros del orden nanométrico. Se combinaron extractos e hidrolizados de proteínas con un conjunto de sales y co-enzimas que posibilitaron la rápida multiplicación celular y la síntesis de enzimas microbianas detectadas en sólo minutos por la degradación de una combinación de sustratos fluorogénicos y cromogénicos. Se acoplaron las nanopartículas y agregados a los demás componentes obteniendo diferentes estructuras que permitieron reducir el tiempo de incubación para la detección, identificación, aislamiento y recuento a mínimos de 10 min a 60 min en muestras directas. Como conclusión se logró una plataforma de diagnóstico rápido de microorganismos empleando nanopartículas y agregados de arcillas y cerámicas acoplados a sustratos que revelan la actividad enzimática en solo minutos.



Nanoparticles of clays and ceramics for a fast microbiological diagnosis

ABSTRACT

Keywords

microbiological diagnosis; nanoparticles; clays, ceramics; zeolites

Introduction. The aim of the research was to use nanoparticles of clays, calcium phosphate salts and ceramics, combined with fluorogenic and chromogenic substrates to significantly shorten the period of microbiological diagnosis. **Methods.** Combinations of nutritional bases, co-enzymes, co-factors that accelerate microbial development and metabolism were selected. These components were coupled with nanoparticles and fluorogenic and chromogenic substrates to obtain different nanocomposites. Nanoparticles and nanocomposites were characterized according to their composition, structure and functionality both with isolated strains of microorganisms, and in clinical samples, water, among others. **Results.** Nanoparticles and aggregates of halosites, bentonites, siliceous earth, hydroxyapatites, calcium phosphates and zeolites showed high surface / volume ratio, porosity and surface roughness, with particle and pore sizes in the nanometric order. Protein extracts and hydrolysates were combined with a set of salts and co-enzymes that enabled rapid cell multiplication and the synthesis of microbial enzymes detected in just minutes by the degradation of a combination of fluorogenic and chromogenic substrates. The nanoparticles and aggregates were coupled with the other components obtaining different structures that allowed for reducing the incubation time for detection, identification, isolation and counting to a minimum of 10 to 60 min in direct samples. As a conclusion, a rapid diagnosis platform for microorganisms was achieved using nanoparticles and aggregates of clays and ceramics coupled with substrates that reveal enzymatic activity in only minutes.

INTRODUCCIÓN

Los métodos para diagnóstico microbiológico actualmente no satisfacen las necesidades en la clínica por no posibilitar una temprana terapia antimicrobiana. Tampoco satisfacen la velocidad en que se necesita disponer los datos de la contaminación o del límite microbiano de productos farmacéuticos, alimentos y otros. Es por eso que surge la necesidad del desarrollo de nuevos métodos. ⁽¹⁾

Varios métodos rápidos se han desarrollado para solucionar la respuesta demorada en el diagnóstico, ⁽¹⁾ incluyendo los basados en la nanotecnología mediante la construcción de nanosensores ^(2,3) o acoplando nanopartículas a anticuerpos monoclonales, ⁽⁴⁾ sondas de ADN o ARN. ⁽⁵⁾

El objetivo de la investigación consistió en el desarrollo de una plataforma tecnológica flexible para el diagnóstico rápido de microorganismos empleando nanopartículas de arcillas, fosfatos de calcio, cerámicas y zeolitas.

MÉTODOS

Se diseñaron mezclas originales de bases nutritivas, todas patentadas por los autores, a partir de materias primas nacio-

nales tales como extractos de *Saccharomyces cerevisiae* ⁽⁶⁾ e *Ipomoea batatas*; ⁽⁷⁾ hidrolizados enzimáticos de corazón de res ⁽⁸⁾ y sangre bovina; ⁽⁹⁾ hidrolizados enzimáticos o ácido de caseína; ^(10,11) mezcla de peptona ⁽¹²⁾ y se seleccionaron las que acortaron significativamente la fase *lag* de crecimiento microbiano hasta sólo 60 min a 120 min, midiendo el valor de la densidad óptica (DO) en el tiempo. ⁽¹³⁾ Se diseñó, una mezcla de sales y otras sustancias como las vitaminas que participan en la síntesis de enzimas microbianas, ^(14,15) todas grado p.a. (Applichem, Alemania); entre ellas $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{Mn}(\text{SO}_4)_2$, ZnSO_4 , MgSO_4 , NaCl , CaCl_2 , Na_2HPO_4 , NaSO_3 , tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantoténico, piridoxina, biotina, ácido fólico, cianocobalamina, L-histidina monoclóhidrato; L-triptófano y L-metionina. ⁽¹⁶⁾ Se diseñaron composiciones para la detección de las fluorescencias y cromogénesis, adicionando sustratos empleados por los autores en medios de cultivo y se ensayaron en diversos métodos cualitativos y cuantitativos, para cepas de colección de la American Type Culture Collection (ATCC), cepas aisladas y muestras de aguas y orina para microorganismos, como *Escherichia coli*, coliformes, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Candida*. ^(17,18,19,20,21,22)

Entre los sustratos estudiados se encuentran los derivados del fenol, de la para-nitro-anilina; del indolil, la metilcumarina y metilumbeliferil (MU) para actividades galactosidasa, glucuronidasa, decarboxilasa, glucosidasa y fosfatasa; se seleccionaron los que mostraron la aparición de reacciones de degradación enzimática de hasta un máximo de 6 h para combinarlos con las nanopartículas. ⁽¹⁶⁾

Se obtuvieron y caracterizaron nanopartículas de arcillas y cerámicas naturales o artificiales escogidos entre un amplio rango, seleccionando entre ellos la sal de fosfato de calcio de origen natural hidroxiapatita Coralina® (CNIC, Cuba) (denominada indistintamente como HAP-S, CHA y CFN); Osteosynt®, cerámica sintética de fosfato tricálcico, Einco Biomaterials, Brasil (HAP-56, BCP y OSDG); nanopartículas de hidroxiapatita sintética código 677418, Sigma-Aldrich (HAP nano); cerámica de tierra silíceas purificada y calcinada, código 1.07910.0250, Merck (TS); bentonita hidrofílica nanoclay código 682659, Sigma-Aldrich (BT); nanopartículas de bentonita, CAS 1302-78-9, Sigma-Aldrich (BT nano); nanopartículas de halosita código 685445, Sigma-Aldrich (Hal); zeolita natural purificada tipo clinoptilolita ZNPmed® (IMRE, Cuba) (Z). Las nanopartículas se obtuvieron por métodos de síntesis (OSDG) o a partir de fuentes naturales (OFN) y procesándolas por secado por aspersión (*spray-drying*) en la fase final a escala piloto. ⁽²³⁾

La composición y características de las nanopartículas y nanocompuestos se evaluaron por los siguientes métodos: pH por potenciometría, pérdida por desecación y capacidad de absorción de agua por gravimetría, potencial ζ y tamaño de partículas por dispersión dinámica de la luz, las características superficiales por microscopía de barrido (SEM). ^(24,25,26) La composición química se determinó por espectrometría de absorción atómica (EAA), el espectro infrarrojo y el espectro de absorción se determinó por Espectroscopía Infrarroja por transformación de Fourier (FTIR), el perfil de degradación térmica (TGA) se efectuó por análisis termogravimétrico. ^(24,25) El efecto de la actividad inhibitoria de las nanoestructuras y nanocompuestos se ejecutó por el método de Kirby-Bauer en Agar de Mueller-Hinton (BioCen, Cuba) ⁽²⁵⁾ y mediante microscopía electrónica de barrido y de transmisión. ^(24,25,27)

La obtención de los nanocompuestos y las estructuras tridimensionales a partir de los materiales originales (arcillas, sales de fosfato de calcio, cerámicas, zeolitas) se ejecutaron fundamentalmente por métodos de absorción, dispersión, precipitación, centrifugación y *spray-drying*. ⁽²⁰⁾ Para el desarrollo de métodos específicos de detección, aislamiento, identificación, diferenciación y recuento de bacterias y hongos se estudiaron cepas de ATCC, aisladas y muestras biológicas y de aguas, diferentes relaciones de volumen o masa de nano-

compuestos/muestra, de volumen de inóculo/muestra; tiempo de detección, temperatura de incubación. ^(20,25) Se emplearon como indicadores la DO medida en espectrofotómetro, ⁽¹²⁾ intensidad de la fluorescencia en el equipo SUMA (CIE, Cuba) o mediante observación visual bajo luz ultravioleta a longitud de onda de 366 nm.

Para la evaluación funcional como diagnosticadores de las composiciones nutritivas y los nanocompuestos que conforman la plataforma tecnológica se evaluaron múltiples parámetros, tales como sensibilidad, especificidad y exactitud relativas, índice Kappa, diferencias por Chi cuadrado, discrepancias, regresión lineal. ^(28,29,30) Todos los análisis estadísticos como Anova, prueba *post hoc* de Tukey y estadística descriptiva (media, Std. Dev.) se realizaron con Statistica 8 (Statsoft Inc., EE. UU.).

RESULTADOS

Se diseñaron nuevas mezclas de bases nutritivas, todas garantizaron una reducción del tiempo de duración de la fase lag de crecimiento de máximo 120 min, gracias a los originales procesos de hidrólisis y extracción, resultando seleccionadas para conformar las composiciones nutritivas los extractos de *S. cerevisiae* e *I. batatas*; hidrolizados enzimáticos de corazón de res, sangre bovina, hidrolizados enzimático o ácido de caseína.

En la figura 1 se muestran, a manera de ejemplo, 3 combinaciones de bases nutritivas (g/L): V1: peptona de sangre 6,37; peptona de soya 3,24; triptona 9,97; extracto de levadura 3,24; extracto de carne 2,43; NaCl 0,5 y Na₂HPO₄ 0,1; V2: peptona de sangre 6,0; peptona de soya 5,0, triptona 5,0; extracto de levadura 5,0; extracto de carne 3,0; NaCl 0,5 y Na₂HPO₄ 0,1 y V3: peptona de sangre 6,0; peptona de soya 6,0; triptona 3,0; extracto de levadura 6,0; extracto de carne 4,0; NaCl 0,5 y Na₂HPO₄ 0,1. Se logra para los 3 microorganismos ensayados reducir la fase lag de crecimiento a un máximo de 2 h y el inicio de la fase de crecimiento exponencial.

Con la original mezcla de sales y otras sustancias se obtuvieron composiciones para detectar fluorescencia y cromogénesis, como ejemplo las denominadas CCL y ADC, introducidas en la producción en BioCen y registradas en el Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED) (CromoCen CCL y Agar Dextrosa de Sabouraud de composición original).

De los sustratos ensayados se seleccionó 1 serie de composiciones diferentes, como ejemplo los derivados del MU para detectar actividades galactosidasa, glucuronidasa, decarboxilasa, la glucosidasa y fosfatasa, que incluyen a: 2-nitrofenil-p-D-galactopiranosido, 4-metilumbeliferil-p-D-glucurónido, 4-metilumbeliferil-fosfato, L-prolina-metilcumarina

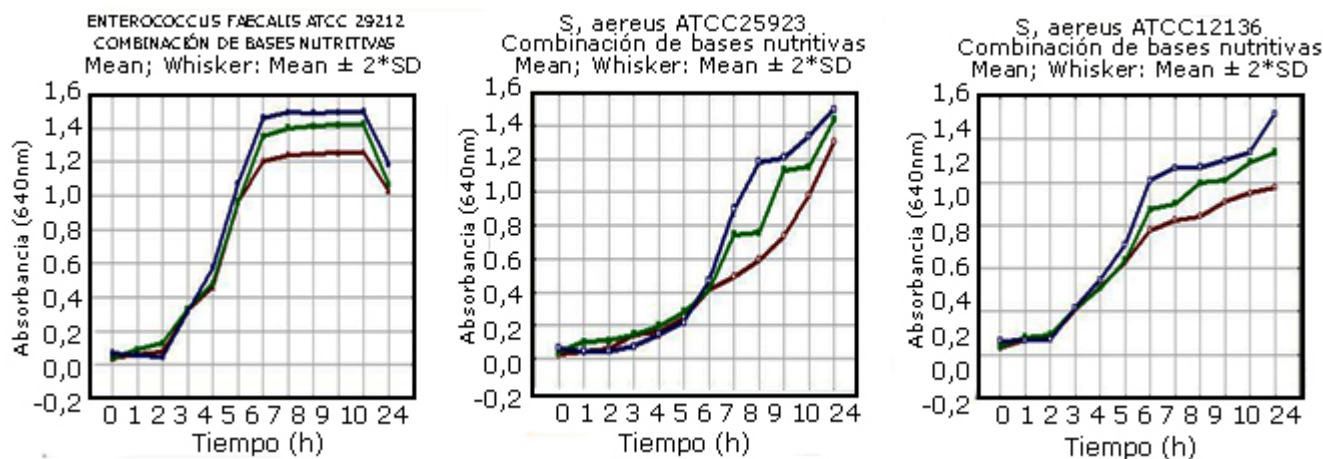


Fig. 1. Crecimiento expresado en densidad óptica (DO) de cepas de ATCC *Enterococcus faecalis* 29212, *Staphylococcus aureus* 25923 y *Streptococcus agalactiae* 12136 con diferentes combinaciones de peptona de sangre, peptona de soya, triptona, extracto de levadura y extracto de carne.

y 4-metilumbeliferil-13-D-glucósido, los cuales, combinados con las composiciones nutritivas, posibilitaron la detección e identificación por fluorescencia en menor tiempo para bacterias y hongos, todos con un máximo de detección de 6 h.

En el ejemplo de la composición CCL empleada para detectar, identificar y enumerar *E. coli* y coliformes en 97 muestras de agua potable se obtuvo, para el análisis cualitativo de coliformes totales, una exactitud relativa de $94,85\% \pm 0,90\%$, sensibilidad relativa de $94,74\% \pm 0,90\%$, especificidad relativa de $95,24\% \pm 0,80\%$, índice Kappa de 0,86. El análisis de equivalencia de los métodos cuantitativos mostró una diferencia relativa media de los recuentos de 9,29. El análisis de regresión reveló la linealidad de los recuentos transformados a *Log*, resultando la ecuación de regresión $y = 0,04x + 1,09$. El análisis de varianza arrojó un valor de F de 2,99; menor del crítico (3,05). Para *E. coli* como método cualitativo la exactitud relativa resultó $96,00\% \pm 0,94\%$, la sensibilidad relativa $92,18\% \pm 0,88\%$ y la especificidad relativa de $100,00\%$ a $1,00\%$. Para el análisis como método cuantitativo la diferencia relativa media de los recuentos transformados a *Log* fue de 0,31; y una linealidad adecuada (ecuación de regresión $y = 0,02x + 0,99$).

Se obtuvieron o caracterizaron nanopartículas de arcillas naturales o artificiales, zeolitas y cerámicas, seleccionando entre ellos la halosita, tierra de diatomea, bentonitas, hidroxapatitas, la ZNPmed® y fosfatos de calcio. Las nanopartículas empleadas se obtuvieron por OSDG o a partir de OFN y procesándolas por métodos no químicos, entre ellos molienda en molinos de bolas, dispersión en fase líquida, centrifugación, procesamiento por *spray-drying* en la fase final a escala piloto y mezcla para conformar los nanocompuestos.

De la caracterización de los nanomateriales diseñados, se seleccionaron para los próximos ensayos la hidroxapatita BCP

(con 65 % de hidroxapatita y 35 % de fosfato tricálcico masa/masa), la ZNPmed® y la bentonita nano (Sigma-Aldrich). Se demostró que las nanopartículas poseían tamaños desde 20 nm a 200 nm y más en algunos agregados diseñados combinándolas con otras sustancias, con superficies altamente rugosas, con diámetros y cavidades de un mínimo de holgura de 1 nm a 5 nm y hasta el rango milimétrico en las estructuras tridimensionales obtenidas a partir de agregados de los nanocompuestos (figura 2). La difracción de rayos X mostró los picos característicos de los materiales, en casos evidenciando la cristalinidad de las estructuras de la hidroxapatita y de las nanopartículas de fosfatos tricálcicos sintéticos.

El análisis termogravimétrico manifestó pérdidas de masa de 6 % a 12 % entre 25 °C y 750 °C y el análisis térmico diferencial no evidenció cambios energéticos con sólo una zona de transformación de 500 °C a 1250 °C, asociados a la pérdida de masa de componentes volátiles, demostrando su elevada estabilidad. Los materiales mostraron una muy baja pérdida por desecación (< 5 %) y adecuada capacidad de absorción de agua entre 20 % y 40 % de su masa. El potencial ζ resultó negativo con valores de -10 mV a -20 mV y el pH cercano al neutro (6,8-7,2).

Ninguno de los nanocompuestos de las variantes incluidas en la plataforma diagnóstica mostraron propiedades inhibitorias contra los principales patógenos, tales como *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. faecalis* y *S. aureus* (figura 3).

Se estableció, por microscopías electrónica de barrido y de transmisión, que los nanocompuestos no dañan la pared celular y por el contrario se adhieren a ellas garantizando la degradación de los sustratos por las enzimas microbianas en el ejemplo de *E. coli* (figura 4).

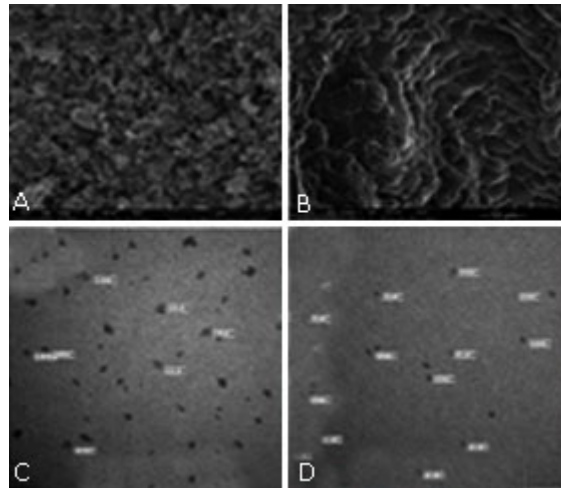


Fig. 2. Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido de diferentes nanocompuestos. A: superficie de nanocompuesto de hidroxiapatita Coralina® con mezcla nutritiva CCL, B: superficie de nanocompuesto de cerámica de fosfato de calcio bifásico sintético y mezcla nutritiva CCL, C: tamaño de partícula de nanocompuesto de ZNPmed® con mezcla nutritiva CNM, D: tamaño de partícula de nanocompuesto de bentonita nano con mezcla nutritiva CNM

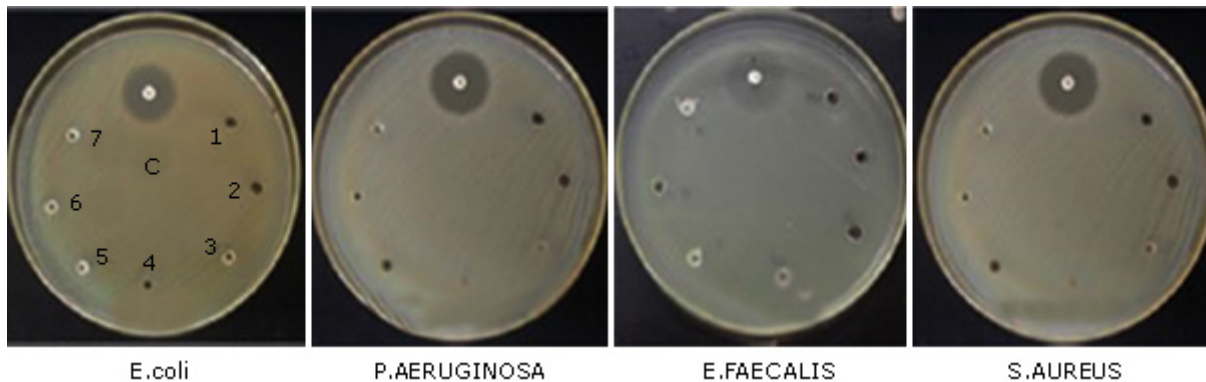


Fig. 3. Efecto antimicrobiano de las partículas de tamaño nanométrico (HAP-S) a diferentes concentraciones 0,05 (1); 0,5 (2); 1,0 (3); 5,0 (4); 10 (5); 15 (6); 20 (7) % m/v contra *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *E. faecalis* (ATCC 29212) y *S. aureus* (ATCC 25923) en Agar de Mueller-Hinton. Los pocillos centrales superiores (c) muestran los halos de inhibición contra gentamicina, amikacina, sulfametoxazol-trimetoprim y cloranfenicol respectivamente

En modelos de detección de *E. coli* por método fluorescente, ensayando nanopartículas de hidroxiapatitas con un sustrato para la actividad glucuronidasa, se demostró la dependencia del tiempo mínimo de detección de la presencia de nanopartículas, la concentración de la bacteria en la muestra, el volumen de inóculo, el proceso de hidratación del nanocompuesto, logrando, en las primeras experiencias, reducir el tiempo de detección de 18 h a 24 h a 150 min y a 60 min con co-enzimas y co-factores. Similares resultados se obtuvieron para el modelo de un microorganismo Gram-positivo *E. faecalis*.

Posteriormente se logró detectar *E. coli* en muestras directas de orina en períodos de 10 min [sepsis urinaria de 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL a 10^8 UFC/mL] a 60 min (infección urinaria aproximadamente de 10^4 UFC/mL a

10^6 UFC/mL) en comparación con el período de incubación al no emplear las nanoestructuras (de 3 h a 5 h). Otros microorganismos fueron detectados e identificados en diferentes muestras, incluyendo orina y aguas, entre ellos *Enterococcus* spp., *P. aeruginosa*, *S. aureus*, coliformes, *Candida* spp.

Desde el punto de vista tecnológico, se diseñó la plataforma para el diagnóstico a partir de las nanopartículas de manera muy flexible. Se ensayaron microorganismos aerobios y anaerobios con múltiples variantes de presentación: pequeñas esferas, combinadas con soportes para conformar membranas filtrantes, con otros soportes para obtener filtros multicapas, para muestras líquidas, sólidas y para detectar las señales en las muestras o en el líquido que las contiene (figura 5).

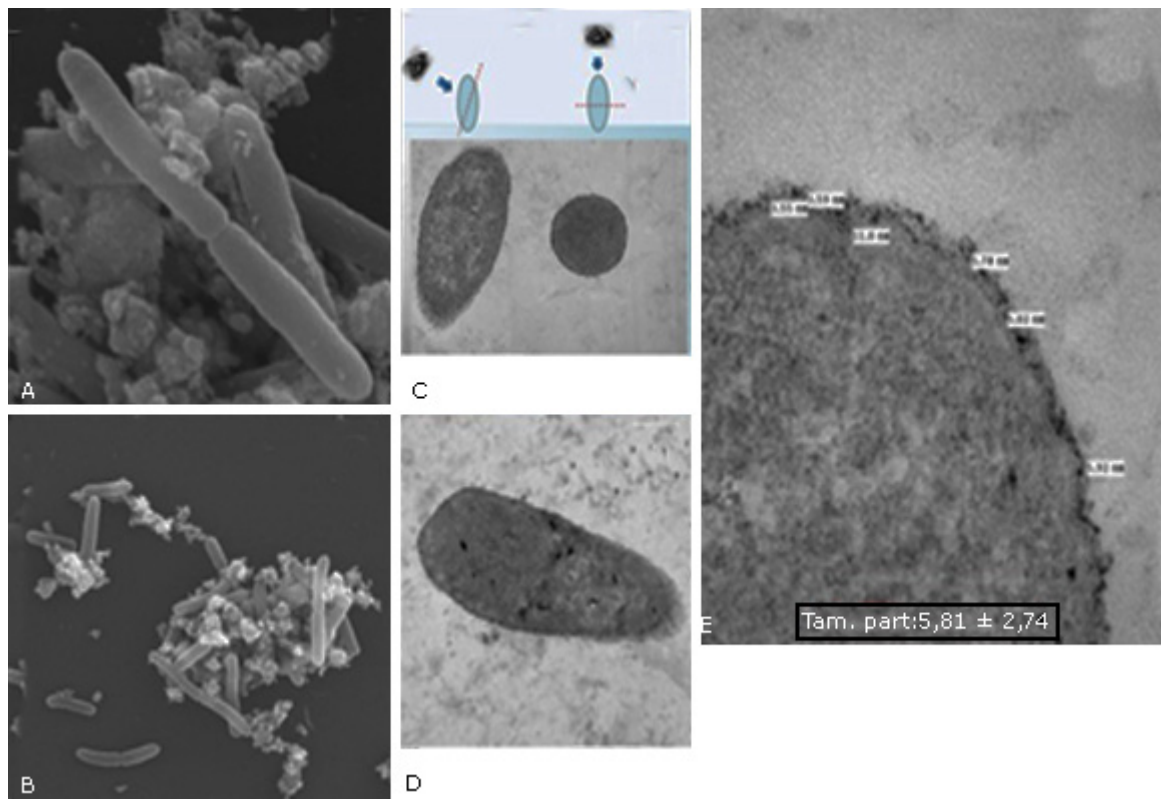


Fig. 4. Imágenes de la microscopía de barrido y de transmisión que demuestran la integridad de las células de *E. coli* en contacto con nanocompuestos para detectar actividad glucuronidasa. A y B: microscopía electrónica de barrido de células completas de *E. coli* en contacto con estructuras tridimensionales del nanocompuesto de hidroxiapatita sintética y composición fluorogénica CCL. C, D y E: microscopía de transmisión de cortes longitudinales y transversales de células de *E. coli* en contacto con nanocompuesto de bentonita con la composición fluorogénica CNM

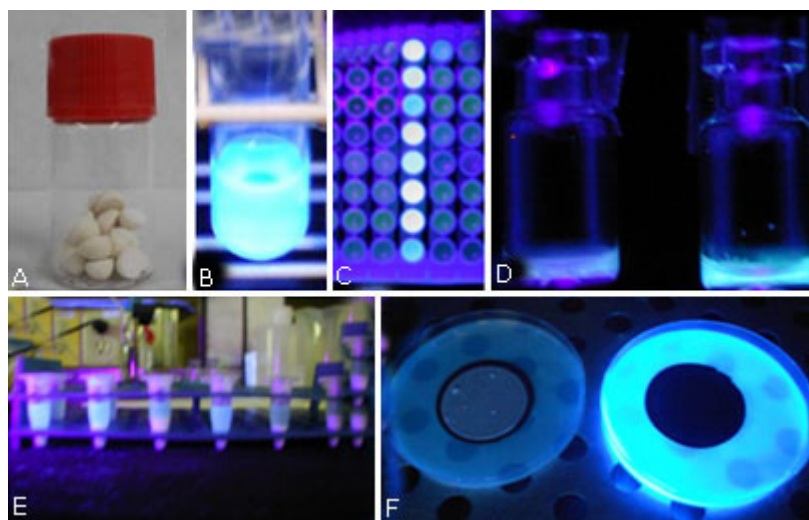


Fig. 5. Formas de presentación de los nanocompuestos que integran la plataforma tecnológica para el diagnóstico rápido de microorganismos. A: comprimidos para adicionar directamente a muestras líquidas; B: en polvo para adicionar a muestras líquidas para técnica de Número Más Probable o diagnóstico directo en tubos u otros contenedores; C: microdosis dispensadas o liofilizadas en placas o microplacas para detección visual o automatizada en lectores de fluorescencia, densidad óptica u otras señales; D: adicionados directamente a bulbos con fármacos o productos biológicos; E: en viales a los que se le adiciona la muestra para lectura visual; F: incorporados a membranas filtrantes para la técnica de filtración por membrana con posibilidad de identificación y recuento de micro colonias sobre la membrana o identificación alrededor de la membrana en medio líquido, sólido o semisólido.

Se logró detectar un mínimo de 1 UFC/mL hasta 10⁹ UFC/mL de manera visual y automatizada empleando un equipo SUMA del Centro de Inmunoensayo.

Los resultados mostraron que las más apropiadas por la rapidez en la identificación y la factibilidad de su obtención fueron la hidroxiapatita Coralina[®], la cerámica de hidroxiapatita sintética (Einco Biomaterials), bentonita nanométrica (Sigma-Aldrich) y la zeolita ZNPmed[®].

DISCUSIÓN

Los hidrolizados y extractos desarrollados proporcionaron una duración de la fase *lag* mucho menor que otros hidrolizados⁽³¹⁾ que requieren para ello 5 h debido a que los métodos propios de hidrólisis y purificación posibilitan que los microorganismos se adapten rápidamente al nuevo ambiente altamente rico en nutrientes, con presiones osmóticas y pH más adecuados.

El diseño de las mezclas originales de bases nutritivas está acorde a la tendencia de los últimos años para acelerar el inicio de la multiplicación celular y el aumento de la biomasa.^(32,33)

El empleo de mezclas de co-factores y co-enzimas para acelerar la síntesis de enzimas microbianas es una práctica actual, la inclusión de las sales minerales garantiza los elementos constitutivos de las enzimas; y las vitaminas actúan, entre otras funciones, como co-enzimas o sus precursores e intervienen en la síntesis del ADN.^(13,34)

Las composiciones para la detección fluorescencia y cromogénesis logradas, como en el caso más relevante de la denominada CCL, demostraron resultados comparables con otras formulaciones convencionales, pero acortando el tiempo de respuesta y posibilitando el registro sanitario en el CECMED.⁽¹⁷⁾ Investigaciones anteriores ejecutadas en BioCen para el registro de medios de cultivo cromogénicos y fluorogénicos, así como de otros autores extranjeros demostraron la utilidad de los sustratos para la detección, identificación y enumeración de bacterias y levaduras.^(17,18,19,35) Sin embargo, no existían referencias previas, ni en BioCen, ni a escala mundial, de su combinación con arcillas, cerámicas y zeolitas para detectar la actividad enzimática de bacterias y hongos, las cuales brindaron los resultados de detección e identificación por fluorescencia en menor tiempo, todos con un máximo de detección de 6 h.^(24,25,26,36)

Durante la validación de los métodos alternativos en muestras de agua con las nuevas composiciones (bases nutritivas, promotores de crecimiento y sustratos fluorogénicos y cromogénicos), aún sin su combinación con las nanopartículas, se evidenció que los parámetros de desempeño cualitativos y cuantitativos mostraron valores superiores o equiva-

lentes a los métodos convencionales, con la ventaja de una reducción en 3 veces de la respuesta.^(37,38) Los parámetros de diagnóstico relativos resultaron siempre superiores al 94 % y se logró la equivalencia de los recuentos y linealidad de la regresión de los recuentos, todos en correspondencia a los requisitos internacionales.^(28,29,30)

Los novedosos métodos desarrollados de obtención de las nanopartículas y de los nanocompuestos difieren significativamente de los comúnmente empleados a escala mundial para transformar las arcillas, cerámicas y zeolitas, que incluyen la modificación química, el empleo de surfactantes, ultrasonido e intercambio iónico, entre otros.^(39,40,41)

En la presente investigación, se emplearon operaciones más sencillas, de menor costo y que pueden ser ejecutadas en las instalaciones industriales de BioCen, entre ellas, el molinado con bolas, sedimentación, centrifugación y el procesamiento por spray-drying que ofrece ventajas muy significativas. Esta última operación posibilitó obtener nanopartículas y nanocompuestos con elevada relación superficie/volumen, porosidad y rugosidad de la superficie, que garantiza absorber mayor volumen de las mezclas nutritivas y sustratos y disponibilizarlos para su posterior contacto con los microorganismos en las muestras, además de garantizar una amplia superficie de contacto para la ocurrencia anticipada de las reacciones enzimáticas de degradación de los sustratos.⁽¹⁶⁾

Las nanopartículas mantuvieron las características propias de los nanomateriales de origen natural o sintéticos, reportados por otros autores, entre ellas, composición elemental, tamaño de partículas y potencial ζ.^(42,43)

Relevante y novedosa, a escala mundial, resultó la total inhibición del efecto tóxico de los nanomateriales de arcillas sobre los microorganismos reportado anteriormente,^(44,45,46) gracias a la adición de las composiciones nutritivas en lugar de la modificación o sustitución química de grupos tóxicos en la estructura de las nanopartículas.

Los nanocompuestos se integran a la membrana externa de las bacterias posibilitando el intercambio de las composiciones y por tanto la ocurrencia de las reacciones enzimáticas y su alta porosidad y rugosidad de la superficie no resultan dañinas para la integridad de las células.^(25,27)

La novedosa plataforma tecnológica posibilitó dar respuesta al hito diagnóstico de reducir el período de incubación para la detección e identificación de bacterias en diferentes muestras a un mínimo de 10 min a 60 min en el ejemplo del diagnóstico de *E. coli* en muestras directas de orina, lo que posibilita la aplicación de una terapia oportuna para el tratamiento de infecciones y al aplicar los nanocompuestos al análisis de productos alimenticios y farmacéuticos liberarlos en menor tiempo y satisfacer más eficientemente las necesidades de la industria.

La original plataforma tecnológica desarrollada posibilita flexibilidad no sólo con respecto a los formatos de presentación anteriores, ⁽⁴⁷⁾ aplicación a diferentes técnicas de diagnóstico, sino que posibilita, como ninguna otra solución técnica anterior, ^(48,49) detectar, identificar o diferenciar, aislar y enumerar diferentes especies y géneros de bacterias y hongos en un rango tan amplio de concentración en las muestras de 1 a 10⁹ UFC/unidad de manera visual o con el novedoso empleo del lector de fluorescencia del SUMA.

Se logra, además, una reducción del consumo de reactivo, de sus costos, del gasto de energía (el tiempo de incubación se reduce de 24 h -48 h -72 h a 10 min -60 min).

Se puede concluir que se seleccionaron hidrolizados y extractos de proteínas y se diseñaron originales combinaciones entre ellas y con co-factores y co-enzimas que posibilitaron reducir la fase *lag* de crecimiento microbiano y acelerar el inicio de la fase de crecimiento exponencial a 2 h de cultivo. Fueron obtenidas nuevas composiciones nutritivas con sustratos fluorogénicos y cromogénicos con elevada exactitud diagnóstica relativa superior al 94 % para el diagnóstico de *E. coli*, coliformes y otros géneros y especies de microorganismos.

Por otro lado, se lograron seleccionar arcillas, cerámicas y zeolita modificadas para obtener nanopartículas de 20 nm a 200 nm y sus estructuras tridimensionales con elevadas relación superficie/volumen, porosidad y rugosidad de la superficie, entre ellas la hidroxiapatita sintética, la bentonita-nano y la zeolita natural purificada ZNPmed[®] que resultaron ser termoestables, con adecuada capacidad de absorción, lo que posibilitó por primera vez a escala mundial, desarrollar y patentar en Cuba y en el extranjero una novedosa y flexible plataforma tecnológica para obtener nanocompuestos empleando la tecnología de *spray-drying*, combinando los nanomateriales con las composiciones nutritivas que, sobre la base de la detección de reacciones enzimáticas, posibilitó la detección, identificación y enumeración simultánea de microorganismos en períodos reducidos de tiempo, llegando hasta un mínimo de 10 min a 60 min que posibilita el desarrollo ulterior de nuevos diagnosticadores específicos.

Los nanocompuestos obtenidos no dañan las células por lo que a partir de ellos se pueden aislar y estudiar los microorganismos detectados, posibilitan el diagnóstico rápido de diferentes géneros, especies y cepas de bacterias y hongos en diversos tipos de muestras con disímiles formatos de los dispositivos y por distintos métodos diagnóstico tales como filtración por membrana, en caldo líquido, en placas, en alícuotas o en soportes sólidos.

Por otra parte, se han escalado, hasta el nivel industrial, y comercializado hidrolizados proteicos, extractos, sus mezclas, las composiciones nutritivas; las nanopartículas, nanoa-

gregados y nanocompuestos se han escalado hasta nivel piloto y existen todas las condiciones para su escalado a nivel industrial si fuese necesaria una demanda mayor.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a las siguientes instituciones y colaboradores: Adelaida Ortega Suris, José Miguel García Marichal, Diana Rosa Viera Oramas, Claudia Filgueira Rego del Centro Nacional de Biopreparados (BioCen) por su apoyo en la ejecución de experimentos a diferentes escalas. Jesús Eduardo González Ruiz, Javier Aragón Fernández, Mónica López Hernández del Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC) de Cuba por el aporte de hidroxiapatita Coralina, su composición y cálculo de superficies. Gerardo Rodríguez Fuentes del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Materiales de la Universidad de La Habana (IMRE) por el aporte de las zeolitas, su composición y recomendaciones para la redacción del documento. Graciela Castro Escarpulli, Edgar López Villegas, María del Rosario Espinosa Mellado, María Guadalupe Aguilera Arreola del Instituto Politécnico Nacional de México, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas por la ejecución de experimentos de ensayos con cepas y muestras de microorganismos y microscopías. María Esperanza Cortés Segura, Rubén Darío Sinisterra, Allinne D.M. Gomes, Savio Lacerda Morato Gontijo, Diego Peñaranda Suárez, Alfonso Gala García, Luis F. Morgan, Célia R.M. Lanza de la Universidad Federal de Minas Gerais, Brasil por el aporte de una cerámica de hidroxiapatita sintética y la contribución a la ejecución de experimentos de caracterización de materiales durante un proyecto de colaboración bilateral.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fred C. Tenover. Rapid Detection and Identification of Bacterial Pathogens Using Novel Molecular Technologies: Infection Control and Beyond. Clin Infect Dis. 2007;44:418-23.
2. Samaneh Ghasemia, Mahmoud Rezazadeh Baria, Sajad Pirsaa, Saber Amirib. Use of bacterial cellulose film modified by polypyrrole/TiO₂-Ag nanocomposite for detecting and measuring the growth of pathogenic bacteria. Carbohydr Polymers. 2020;232:115801.
3. Wan Y, Sun Y, Qi P, Wang P, Zhang, D. (2014). Quaternized magnetic nanoparticles-fluorescent polymer system for detection and identification of bacteria. Biosensors & Bioelectronics. 2014;55: 289-93.
4. B. B. Stephen Inbaraj, B.H. Chen. Nanomaterial-based sensors for detection of foodborne bacterial pathogens and toxins as well as pork adulteration in meat products. J Food Drug Anal. 2016;24:15-28.
5. Augustine R, Abraham AR, Kalarikkal N, Sabu T. 9-Monitoring and separation of food-borne pathogens using magnetic nanoparticles. Novel Approaches of Nanotechnology in Food Nanotechno-

- logy in the Agri-Food Industry In: Nanotechnology in the Agri-Food Industry. Volumen 1. Editorial: Academic Press 2016:271-312p. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-01014-0>
6. Zhurbenko R, Rodríguez Martínez C, Barroetabeña Márquez FR, Varela Llanes AE, inventores. Método de obtención de extracto de levadura para el cultivo de microorganismos. Centro Nacional de Biopreparados. Certificado de Autor de Invención de Cuba No. 22221. 1993 dic 30.
 7. Rodríguez Martínez C, Lobaina Rodríguez T, Zhurbenko R, García Marichal JM, inventores. Base nutritiva a partir de raíz reservante de *Ipomoea batatas*. Centro Nacional de Biopreparados. Certificado de Autor de Invención de Cuba No. 23507. 2010 feb 26.
 8. Zhurbenko R, Rodríguez Martínez C, Barroetabeña Márquez FR, Varela Llanes AE, García Marichal JM, inventores. Procedimiento de obtención de un hidrolizado proteico a partir de músculos de corazón y producto obtenido. Centro Nacional de Biopreparados. Certificado de Autor de Invención de Cuba No. 22442. 1996 may 29.
 9. Zhurbenko R, Barroetabeña Márquez FR, García Marichal JM, Rodríguez Martínez C, Varela Llanes AE, Hernández González F, inventores. Método de obtención de biopreparado para el cultivo de microorganismos y producto obtenido. Centro Nacional de Biopreparados. Certificado de Autor de Invención de Cuba No. 22208. 1993 dic 30.
 10. Rodríguez Martínez C, Varela Llanes AE, Barroetabeña Márquez FR, Garcés Rodríguez L, Zhurbenko R., García Marichal JM, inventores. Método de obtención de un biopreparado para el cultivo de microorganismos. Centro Nacional de Biopreparados. Certificado de Autor de Invención de Cuba No. 22166. 1993 jul 3.
 11. Rodríguez Martínez C, Barroetabeña Márquez FR, García Marichal JM, Montero Veitía HJ, Varela Llanes AE, Zhurbenko R, inventores. Método de obtención de hidrolizado proteico. Centro Nacional de Biopreparados. Certificado de Autor de Invención de Cuba No. 22089. 1992 sept 5.
 12. Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R, Pérez Pérez Y, Hernández Enríquez R, inventores. Combinación de bases nutritivas para el cultivo de microorganismos. Centro Nacional de Biopreparados. Certificado de Autor de Invención de Cuba No. 22441. 1996 may 29.
 13. Zhurbenko R, Rodríguez Martínez C, Lobaina Rodríguez T, López Hernández OD, Viera Oramas DR. Peptona papaínica de corazón de res como fuente de nutrientes para los microorganismos. Sociedad Iberoamericana de Información Científica. 2012 Feb. Disponible en: URL: <http://www.siiicsalud.com>
 14. Matthew A. Oberhardt, Raphy Zarecki, Sabine Gronow, Elke Lang, Hans-Peter Klenk, Uri Gophna, Eytan Ruppín. Harnessing the landscape of microbial culture media to predict new organism-media pairings. Nat Commun. 2015:1-14. <https://doi.org/10.1038/ncomms9493>
 15. Bonnet M, Lagier JC, Raoult D, Khelaifia S. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. New Microbes New Infect. 2020;34(C):1-11.
 16. Rodríguez Martínez C, González Ruiz JE, Lobaina Rodríguez T, Zhurbenko R, Brito González AI, López Hernández M, Aragón Fernández J, Ortega Suris A, Alfonso Valdés I, inventores. Método para la detección, recuperación, identificación y enumeración simultánea de microorganismos y dispositivos para su ejecución. Centro Nacional de Biopreparados. Certificado de Autor de Invención de Cuba No. 24137. 2015 nov 20.
 17. Zhurbenko R, Viera-Oramas DR, Lobaina-Rodríguez T, Castro-Escarpullí G, Aguilera-Arreola MG, Rodríguez-Martínez C. Evaluation of A New Detection and Quantification Method of Total Coliforms and *Escherichia coli* in Water. Enliven: Microb Microbial Tech. 2017;2(2):001. Disponible en: <http://www.enlivenarchive.org/articles/evaluation-of-a-new-detection-and-quantification-method-of-total-coliforms-and-escherichia-coli-in-water.html>
 18. Someillan Iglesias D, Zhurbenko R, Rodríguez Martínez C. Efectos de una combinación nutritiva y selectiva con sustratos cromogénicos para diagnóstico de cocos grampositivos. Rev Cubana Inv Bioméd. 2015;34(4).
 19. Viera Oramas DR, Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R. Recuperación y diferenciación de *Aeromonas* con CromoCen AE y CromoCen AGN. Rev Cubana Inv Bioméd. 2016;35(1):36-47.
 20. Rodríguez Martínez C, González Ruiz JE, Lobaina Rodríguez T, Zhurbenko R, Brito González AI, López Hernández M, Aragón Fernández J, Alfonso Valdés I, Ortega Suris A, inventores. Method for simultaneous detection, recovery, identification and counting of bacteria and fungi and three-dimensional structure arrangement for the implementation of said method. Centro Nacional de Biopreparados assignee. European Patent EP 2837690. 2017 sept 13.
 21. Tsoraeva A, Rodríguez Martínez C, inventores. Mezcla nutritiva para la identificación y recuento temprano de organismos Gram-negativos y procedimiento para su empleo. Centro Nacional de Biopreparados. Certificado de Autor de Invención de Cuba No. 22789. 2002 mar 19.
 22. Lobaina Rodríguez T, Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R, García Marichal JM, Zayas Ruiz Y, inventores. Medio nutritivo para el cultivo de levaduras. Centro Nacional de Biopreparados. Certificado de Autor de Invención de Cuba No. 23499. 2010 feb 4.
 23. Rodríguez Martínez C, González Ruiz JE, Lobaina Rodríguez T, Zhurbenko R, Brito González AI, López Hernández M, Aragón Fernández J, Alfonso Valdés I, Ortega Suris A, inventores. Sposob poluchenia trikhmernikh structur, ispolzuemikh dlia detectsii, vidielienia ili podschiota microorganismos. Centro Nacional de Biopreparados assignee. Russian Federation Patent RU2644683. 2018 feb 13.
 24. Lobaina T, Zhurbenko R, Alfonso I, Rodríguez C, Gala-García A, Lacerda-Gontijo S, Cortés ME, Gomes A, Sinisterra RD. Efficacy of coral-hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate for early bacterial detection. Biointerphases. 2014;9(2). <http://scitation.aip.org/content/avs/journal/bip/9/2?email=author>
 25. Claudio R. Martínez, Tamara L. Rodríguez, Raisa Zhurbenko, Ivonne A. Valdés, Sávio M. L. Gontijo, Alinne D. M. Gomes, Diego F. Suarez, Rubén D. Sinisterra, Maria E. Cortés. Development of a calcium phosphate nanocomposite for fast fluorogenic detection of bacteria. Molecules. 2014;19:13948-64.
 26. Gala-García A, Rodríguez T, Zhurbenko R, Alfonso I, Fernandez D, Gomes ADM, ET AL. Nanoparticulated calcium phosphate ceramic for diagnostic: physico-chemical characterization and microbiological properties. Eur Cells Mater. 2013;26:83.
 27. Rodríguez Martínez C. Applications of nanoclays in diagnostic microbiology. Oral presentation. - Ponente. 3rd International Con-

- ference on Past and Present Research Systems of Green Chemistry. Las Vegas, USA. September 19-21, 2016.
28. Anonymous ISO 17994. (2004) Water quality-Requirements for the comparison of the relative recovery of microorganisms by two quantitative methods.
 29. Anonymous Nord Val (2009) Protocol for the validation of alternative microbiological methods. NordVal/NMKL.
 30. Anonymous ISO 16140 (2003) Animal Microbiology of food and feeding stuffs-Protocol for the validation of alternative methods. International Standards Organization, Geneva, Switzerland.
 31. Katherine Pere, Betty Mbatia, Edward Muge, Vitalis W. Wekesa Dagaa (Rastrinoebola argentea) protein hydrolysate as a nitrogen source in microbial culture media. *J Appl Biol Biotechnol.* 2017;5(03):008-12.
 32. Tsoraeva A, Zhurbenko R. Development and Characterization of a Mixed Nutrient Base for the Culture of a Wide Range of Microorganisms. *Rev Latinoam Microbiol.* 2000; 42:155-61.
 33. Oghenerobor B. Akpor, Damilola E. Odesola, Remilekun E. Thomas, Olarewaju M. Oluba. Chicken feather hydrolysate as alternative peptone source for microbial cultivation [version 3; peer review: 2 approved, 1 not approved] *F1000Research* 2019;7:1918. Last updated: 16 aug 2019.
 34. Raoult D, Khelafia S. Bacterial cultura through selective and non-selective condition: the evolution of cultura media in clinical microbiology. *New Microbes New Infect.* 2020;34:100622. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100622>
 35. Genter F, Marks SJ, Clair-Caliot G, Mugume DS, Johnston RB, Baine RES et al. Evaluation of the novel substrate RUG™ for the detection of *Escherichia coli* in water from temperate (Zurich, Switzerland) and tropical (Bushenyi, Uganda) field sites. *Environ Sci: Water Res. Technol.* 2019;5:1082.
 36. Rodríguez Martínez C, González Ruiz JE, Lobaina Rodríguez T, Zhurbenko R, Brito González AI, López Hernández M, Aragón Fernández J, Ortega Suris A, Alfonso Valdés I, inventors. Method for simultaneous detection, recovery, identification and counting of microorganisms and devices for the implementation of said method. Centro Nacional de Biopreparados assignee. Canadian Patent CA2,883,197. 2020 jan 23.
 37. Abdelkader Boubetra, Francois Le Nestour, Corrie Allaert, Max Feinberg. Validation of Alternative Methods for the Analysis of Drinking Water and Their Application to *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2011:3360-7.
 38. Ibrahim Cakir, Hilal B. Dogan, A. Kadir Halkman, Randy W. Worbob. An alternative approach for enumeration of *Escherichia coli* in foods. *Int J Food Microbiol.* 2001; 68 Ž2001:217-23.
 39. Ajlan Abbas, Abdelazeem Sh. Sallam, Adel R.A. Usmana, Mohammad I. Al-Wabel, Organoclay-based nanoparticles from montmorillonite and natural clay deposits: Synthesis, characteristics, and application for MTBE removal. *Appl Clay Sci.* 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2016.11.028>
 40. Sohrabnezhad Sh, Esfandiyari Takas M. Synthesis and characterization of porous clay heterostructure intercalated with CuO nanoparticles as a visible light-driven photocatalyst. *J Iran Chem Soc.* <https://doi.org/10.1007/s13738-018-1479-8>
 41. Makmur Sirait, Nurdin Bukit, and Nurdin Siregar Preparation and characterization of natural bentonite in to nanoparticles by coprecipitation method AIP Conference Proceedings 1801, 020006 (2017); <https://doi.org/10.1063/1.4973084>
 42. Shahid Nazir M, Haafiz Mohamad Kassim M, Mohapatra L, Amjad Gilani M, Rafi Raza M, Majeed K. Characteristic Properties of Nanoclays and Characterization of Nanoparticulates and Nanocomposites Springer Science+Business Media Singapore 2016. M. Jawaid *et al.* (eds.), Nanoclay Reinforced Polymer Composites, Engineering Materials. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1953-1_2
 43. Mojtaba Mousavi S, Alireza Hashemi S, Salahi S, Hosseini M, Amani AM, Babapoor A. Development of Clay Nanoparticles Toward Bio and Medical Applications. <https://doi.org/10.5772/intechopen.77341>
 44. Williams LB. Geomimicry: harnessing the antibacterial action of clays Lecture, 2016, delivered at the Mid-European Clay Conference, held in Košice, Slovakia. *Clay Miner.* 2017;52:1-24. <https://doi.org/10.1180/claymin.2017.052.1.01>
 45. Adusumilli S, Haydel SE. In vitro antibacterial activity and in vivo efficacy of hydrated clays on *Mycobacterium ulcerans* growth Adusumilli and Haydel *BMC. J Altern Complement Med.* 2016;16:40. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1020-5>
 46. Merino D, Mansilla AY, Casalougué CA, Alvarez VA. Preparation, characterization and in vitro testing of nano-clay antimicrobial activities and elicitor capacity. *J Agric Food Chem, Just Accepted Manuscript.* Publication Date (Web): 06 Mar 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00049>
 47. Patel A, Patra F, Shah N, Khedkar Ch. Application of Nanotechnology in the Food Industry: Present Status and Future Prospects Impact of Nanoscience in the Food Industry Academic Press Handbook of Food Bioengineering 2018, Pages 1-27. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811441-4.00001-7>
 48. Huda A, Norshafadzila MN, Noor A, Noor A, Aidil AH. PANI-Ag-Cu Nanocomposite Thin Films Based Impedimetric Microbial Sensor for Detection of *E. coli* Bacteria. *J Nanomater.* Volume 2014, Article ID 951640, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/951640>
 49. Qiusen H, Xinhuan W, Xueliang L, Wei X, Shuangfei C, Chen W *et al.* Controllable fabrication of magnetic core-shell nanocomposites with high peroxide mimetic properties for bacterial detection and antibacterial applications. *J Mater Chem B.* Published on 29 January 2019. Downloaded by Iowa State University on 2/5/2019 12:51:49 PM. <https://doi.org/10.1039/c8tb02834f>

Recibido: 24/05/2021

Aprobado: 27/08/2021

Conflicto de intereses

Los autores declaran la ausencia de conflictos de intereses con respecto a toda la investigación.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Tamara Lobaina Rodríguez, Claudio Rodríguez Martínez

Curación de datos: Tamara Lobaina Rodríguez, Claudio Rodríguez Martínez, Ivonne Alfonso Valdés, Raisa Zhurbenko

Análisis formal: Ivonne Alfonso Valdés

Adquisición de fondos: Tamara Lobaina Rodríguez

Investigación: Tamara Lobaina Rodríguez, Claudio

Rodríguez Martínez, Ivonne Alfonso Valdés, Raisa Zhurbenko, Yordania Zayas Ruiz, Ana Iris Brito González

Metodología: Tamara Lobaina Rodríguez, Claudio Rodríguez Martínez, Ivonne Alfonso Valdés

Administración del proyecto: Tamara Lobaina Rodríguez, Claudio Rodríguez Martínez

Recursos: Tamara Lobaina Rodríguez, Claudio Rodríguez Martínez, Ivonne Alfonso Valdés, Yordania Zayas Ruiz

Software: Tamara Lobaina Rodríguez, Ivonne Alfonso Valdés

Supervisión: Tamara Lobaina Rodríguez, Claudio Rodríguez Martínez

Validación: Tamara Lobaina Rodríguez, Ivonne Alfonso Valdés

Visualización: Tamara Lobaina Rodríguez, Claudio Rodríguez Martínez, Ivonne Alfonso Valdés

Redacción-borrador original: Claudio Rodríguez Martínez, Raisa Zhurbenko, Tamara Lobaina Rodríguez

Redacción-revisión y edición: Tamara Lobaina Rodríguez, Claudio Rodríguez Martínez, Raisa Zhurbenko

Financiación

La investigación se financió con recursos monetarios propios del proyecto BioCen "Desarrollo de nanocompuestos para el diagnóstico microbiológico", del proyecto No 75/2017 del Fondo Estatal para la Ciencia (FONCI) del Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente de Cuba.

Cómo citar este artículo

Lobaina Rodríguez T, Rodríguez Martínez C, Alfonso Valdés I, Zhurbenko R, *et al.* Empleo de nanopartículas de arcillas y cerámicas para el diagnóstico microbiológico rápido. Anales de la Academia de Ciencias de Cuba [internet] 2022[citado en día, mes y año];12(1): e1032. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1032>

