



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO
**Estudio de los factores que afectan a la actividad
bactericida de las AgNPs**

Autor: Beatriz Sánchez Ruiz

Fecha: Julio 2020

Tutor: Ana García Fontecha

1	RESUMEN.....	4
2	ABSTRACT.....	4
3	INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	5
3.1	PLATA.....	5
3.2	NANOPARTÍCULAS.....	5
3.3	SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA	6
3.3.1	MÉTODOS FÍSICOS (TOP-DOWN)	6
3.3.2	MÉTODOS QUÍMICOS (BOTTOM-UP)	6
3.3.3	MÉTODOS BIOLÓGICOS.....	7
3.4	MECANISMO DE ACCIÓN ANTIBACTERIANO DE LAS AgNPs.....	7
4	OBJETIVOS.....	9
5	METODOLOGÍA.....	9
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
6.1	FACTORES INTRÍNSECOS	10
TAMAÑO		10
FORMA		11
RECUBRIMIENTO.....		12
CARGA SUPERFICIAL		12
POTENCIAL ZETA		12
PROPIEDADES ÓPTICAS		12
CONCENTRACIÓN		13
6.2	FACTORES EXTRÍNSECOS.....	14
TEMPERATURA		14
pH.....		14
AGLOMERACIÓN		15
OTROS COMPONENTES PRESENTES EN EL MEDIO.....		15
7	CONCLUSIONES.....	16
8	BIBLIOGRAFÍA.....	17

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

AgNPs: Nanopartículas de plata

NPs: Nanopartículas

DLS: Dispersión dinámica de la luz

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

ROS: Reactive oxygen species

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido; forma reducida

ATP: Adenosín trifosfato

ADN: Ácido desoxirribonucleico

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CMB: Concentración mínima bactericida

PVP: Polivinilpirrolidona

PEG: Polietilenglicol

SPR: Surface plasmon resonance

1 RESUMEN

La resistencia a antibióticos y el auge de la nanotecnología son algunos de los diversos factores que han favorecido el estudio y empleo de las nanopartículas de plata, AgNPs, en el tratamiento de procesos infecciosos. En este sentido, se han publicado múltiples estudios que permiten conocer en detalle los factores que afectan a su actividad bactericida y a la consolidación de su empleo en la terapéutica. Con el objetivo de que las AgNPs tengan un alto poder bactericida, la toma de decisiones, principalmente en la síntesis, desempeña un papel crucial, puesto que, en función de los métodos y reactivos empleados, obtendremos AgNPs con unas características fisicoquímicas concretas. Estas características fisicoquímicas son intrínsecas como, por ejemplo, concentración, tamaño, forma, recubrimiento, carga superficial, potencial zeta y características ópticas. Asimismo, existen otros factores de tipo externo, es decir, aquellos presentes en el medio en el que las AgNPs permanecen hasta su utilización, así como aquellos presentes en la diana terapéutica. Dentro de estos factores externos, encontramos el pH, la temperatura, estado de aglomeración y la presencia de componentes específicos que condicionen la estabilidad de las NPs. Una vez realizado el estudio bibliográfico, se seleccionan las características que deben presentar las AgNPs para tener mayor actividad bactericida: el tamaño idóneo es el comprendido en el intervalo de 1-10 nm, con el fin de aumentar la superficie específica y aumentar la reactividad de las AgNPs; la forma debe ser esférica, cúbica o triangular; y, por último, la carga superficial y el potencial Z han de ser positivos para así favorecer la interacción con la superficie bacteriana. Es importante destacar que la velocidad de transformación de las AgNPs en iones Ag^+ , es la etapa clave en el inicio del mecanismo de acción bactericida y depende en gran medida de factores externos como temperatura y pH.

2 ABSTRACT

Antibiotic resistance and the rise of nanotechnology are some of main factors that have contributed to an increase in the research and use of silver nanoparticles, AgNPs, in treating infectious processes. In this regard, many studies have been published allowing us to better understand the factors that determine their antibacterial activity and their use in therapeutics. In order to obtain high-bactericide activity AgNPs, a precise decision-making process, mainly during the synthesis, is required, as the methods and reagents used, will determine specific AgNPs physicochemical characteristics. These physicochemical properties may be intrinsic properties such as, concentration, size, shape, coating, superficial charge, zeta potential and optical characteristics. Nonetheless, other factors, such as external factors need to be considered as well. External factors are those elements which are present in the AgNPs biological environment until their use, as well as those found in the therapeutic target. pH value, temperature, agglomeration, and presence of specific compounds that may interfere in the AgNPs stability are among these external factors. Once the bibliographical review has been completed, the characteristics that AgNPs must show to have more antibacterial activity are established: the perfect size is between 1-10 nm, so that reactivity and specific surface may be increased; the shape must be spherical, cubic or triangular; and, lastly, positive superficial charge and zeta potential are required so that interaction with the bacterial surface is favoured. It is important to emphasize speed of transformation of AgNPs into Ag^+ ions, is a key element at the beginning of the bactericidal action mechanism, and depends largely on external factors, such as temperature and pH value.

3 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

3.1 PLATA

La plata es un metal de transición de origen natural perteneciente al grupo once de la tabla periódica, con muy buenas propiedades térmicas y eléctricas. Al igual que otros metales, la plata es empleada en el tratamiento de infecciones, en la purificación de aguas residuales y en la fabricación de instrumental médico-quirúrgico. Estas propiedades terapéuticas de la plata son conocidas desde hace más de diez siglos, aunque no se utilizaron empíricamente hasta que el Dr. Credé empleó la sal nitrato de plata (AgNO_3) para la prevención de la oftalmia neonatorum, un tipo de afección ocular de origen bacteriano (1895).

A día de hoy, la plata está incluida en fórmulas tópicas que son ampliamente utilizadas; desde apósitos empleados en unidades de quemados, hasta en casa, formando parte de fórmulas tópicas que comúnmente encontramos en nuestros botiquines para la regeneración cutánea producida por irritaciones. (1)

La plata, pese a su amplio uso, no está exenta de efectos adversos. Una sobreexposición a la plata ocasiona la precipitación de proteínas, dando lugar a lo que se conoce como argiria, una pigmentación azul grisácea de la piel y de las membranas de las mucosas. (2)

3.2 NANOPARTÍCULAS

Las nanopartículas (NPs) son todas aquellas partículas nanométricas cuyo tamaño se encuentra en el intervalo de 1 a 100 nm. La característica principal de estas partículas es que, al disminuir el tamaño y volumen, aumenta la superficie específica, lo que las hace ser especialmente reactivas.

Estamos expuestos a las nanopartículas de manera natural por medio de la alimentación, del aire o por contacto directo a través de la piel. En estas últimas décadas, gracias al nacimiento de la nanotecnología, hemos aprendido a sintetizarlas y utilizarlas para nuestro propio beneficio, como, por ejemplo; en la electrónica o incluyéndolas en tratamientos de diversas patologías. (3)

Es esencial la caracterización de las nanopartículas ya que su actividad reside fundamentalmente en el tamaño y forma que presenten. Con este fin, se realizan diversas técnicas que nos detallan la distribución del tamaño hidrodinámico (tamaño de la NP, núcleo + corona + capa de disolvente), la estructura y la capa superficial. Ejemplos de técnicas habituales son la dispersión dinámica de la luz (DLS), para obtener información sobre el tamaño hidrodinámico, y la microscopía electrónica de transmisión (TEM), empleada para determinar la estructura y la capa superficial; y con la que podemos observar el tamaño del núcleo. (4)

Centrándonos en las AgNPs, la principal ventaja que presentan frente a plata es que se pueden alcanzar concentraciones mayores empleando menores dosis y sin que ello conlleve un aumento de la toxicidad. La toxicidad de las nanopartículas reside fundamentalmente en las propiedades fisicoquímicas, en las que también reside la actividad terapéutica, y que veremos en detalle más adelante. (5) La primera vez que se describen los coloides de plata fue en 1889 por Carey, aunque no es hasta finales del siglo XX, principios del XXI, cuando adquieren una gran relevancia en la terapéutica ante el aumento de resistencias a antibióticos. (6) En el presente se publican estudios detallados de las AgNPs en los que se determinan y estudian todos aquellos factores que puedan afectar a su actividad terapéutica con el objetivo de que se las considere como un activo específico y de máxima eficacia en la terapéutica.

3.3 SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Existen diferentes rutas de síntesis de estos compuestos, pudiéndose clasificar en tres grupos: síntesis física, síntesis química o, la que últimamente tiene más importancia, la síntesis biológica. Es muy importante la selección de la ruta sintética, porque determina las características fisicoquímicas del producto obtenido y, por tanto, la efectividad del mismo.

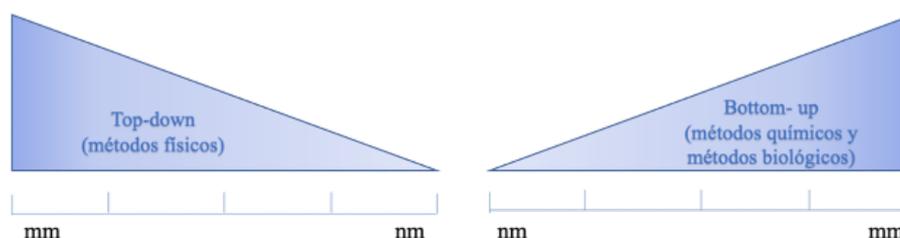


Figura 1. Principales estrategias de síntesis; top-down y bottom-up.

3.3.1 MÉTODOS FÍSICOS (TOP-DOWN)

Se ejercen acciones mecánicas sobre los reactivos a granel con las que se consigue reducir las partículas a un tamaño nanométrico. A pesar de que se requiera una elevada cantidad de energía, se generen muchos residuos y sean métodos caros, conseguimos nanopartículas con una pureza y uniformidad muy notable, con propiedades fisicoquímicas perfectamente válidas y sin necesidad de adición de disolventes químicos. (7,8) Se han desarrollado múltiples métodos válidos entre los que destaca la ablación con láser. El proceso consiste en la ablación de un sólido inicial y reducir su tamaño hasta alcanzar un nivel atómico. El factor más limitante de este método es la longitud de onda que se haga incidir sobre el producto inicial, ya que, cuanto mayor sea la longitud de onda empleada, mayor será el tamaño de los coloides obtenidos, disminuyendo su actividad bactericida. (9)

3.3.2 MÉTODOS QUÍMICOS (BOTTOM-UP)

La síntesis de las nanopartículas se realiza a partir del ensamblaje de átomos o moléculas. Los métodos químicos son los más utilizados por la posibilidad de incluirlos en producciones a escala industrial y, además, se obtiene un tamaño homogéneo de partícula. A pesar de existir numerosos métodos químicos, todos tienen en común el empleo de un precursor metálico, agentes reductores y factores estabilizadores de la reacción. El proceso se compone de dos etapas: nucleación y crecimiento. Entre todos los métodos químicos destaca por ser el más utilizado el de la reducción química. En esta síntesis se parte de una solución acuosa u orgánica de plata en presencia de agentes reductores (ascórbico, citrato... etc) y estabilizadores (ligandos, surfactantes cargados) en unas condiciones de presión y temperatura específicas.

Es importante controlar los factores críticos como el pH, la temperatura y las cantidades de agentes reductores y estabilizadores empleados, estos últimos porque, además de condicionar la forma y tamaño de las nanopartículas, están relacionados con su posible toxicidad. (10)

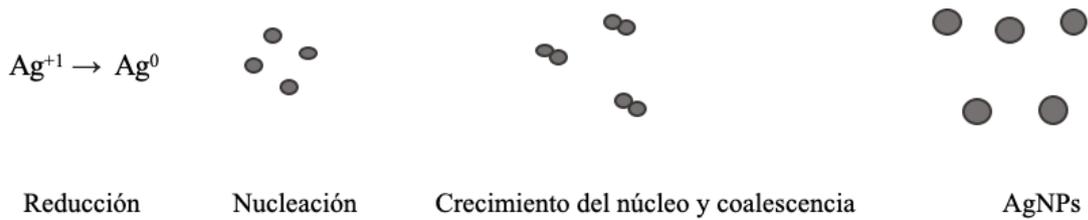


Figura 2. Esquema de rutas sintéticas químicas.

3.3.3 MÉTODOS BIOLÓGICOS

La comunidad científica actualmente revela un interés en este tipo de procesos. Los recursos empleados son mucho menores en comparación con los métodos anteriormente citados y, en consecuencia, supone que el coste económico sea menor. Son denominados internacionalmente como *green synthesis*, que al castellano sería traducido como aquellos métodos respetuosos con el medio ambiente. Se emplean hongos, bacterias, algas o plantas; aprovechando la maquinaria reductora que disponen en su propio metabolismo, se obtienen nanopartículas libres de agentes tóxicos.

La síntesis de las AgNPs puede ser extra o intracelular, en función de donde se concentre la maquinaria reductora de la célula. Siempre es preferible la síntesis extracelular, pues las nanopartículas pueden utilizarse directamente, por el contrario, las AgNPs obtenidas por mecanismos intracelulares necesitan ser tratadas previo uso. (8,11)

Método biológico	Fuente de iones plata	Agente reductor
Plantas	AgNO ₃	Flavonoides, terpenos, alcaloides, polifenoles, alcohol, ácidos fenólicos, antioxidantes, vitaminas
Hongos		Proteínas, enzimas, NADH, NADPH, péptidos, biomacromoléculas nitrogenadas, naftoquinonas, antraquinonas
Bacterias		Maquinaria reductora de especies bacterianas resistentes a Ag

Tabla 1. Agentes reductores empleados en la síntesis biológica de AgNPs. (12)

3.4 MECANISMO DE ACCIÓN ANTIBACTERIANO DE LAS AgNPs

Las nanopartículas de plata son en sí un reservorio de iones de plata que en una disolución aerobia son capaces de oxidarse ($Ag \rightarrow Ag(I)$) para dar lugar al catión Ag^+ , agente propiamente activo. El ión Ag^+ se une a las moléculas cargadas negativamente con grupos funcionales donadores importantes en el metabolismo y supervivencia celular como los grupos tioles, fosfatos, hidroxilos, imidazoles e indoles. Quizás, los más importantes por su participación en múltiples procesos celulares son los tioles, que participan en mecanismos antioxidantes, en la síntesis de proteínas, en las reacciones redox, en el metabolismo xenobiótico y en la regulación del sistema inmune.

Las AgNPs tienen un amplio espectro, actúan frente a las bacterias Gram positivas, Gram negativas y también frente a las bacterias multirresistentes, aunque no todas las especies bacterianas son sensibles a su acción. (13) El crecimiento bacteriano se ve condicionado por la presencia los iones Ag^+ , que dañan a la célula, a través de la unión a diversos grupos funcionales afectando múltiples estructuras. Los iones pueden adherirse a la superficie celular y condicionar la permeabilidad de la célula, desnaturalizar los ribosomas e interferir en el proceso de síntesis de proteínas; aumentar la formación de radicales libres de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) al unirse al grupo tiol de las NADH deshidrogenasas (14), interfiriendo en la síntesis ATP e impidiendo el correcto funcionamiento de la cadena de electrones, y, por último, puede afectar al ADN y acabar conduciendo a la célula a un proceso de apoptosis. (15)

Además, se ha de señalar que la efectividad se asocia con otro concepto, la toxicidad, que en este caso destaca por tratarse de un metal como la plata. Es relevante que la toxicidad originada por las nanopartículas no se presenta exclusivamente en las bacterias sino que también afecta las células eucariotas, sobre todo para estructuras como la membrana celular, las mitocondrias y que también puede ser genotóxico, (3) aunque la plata no afecta con la misma intensidad a las bacterias que a las células humanas, estas últimas presentan un núcleo que protege al ADN del efecto de la plata y enzimas capaces de neutralizar los ROS.

El uso reducido de la plata para tratar infecciones hace que no se haya desarrollado tanta resistencia hacia ella como hacia otros antibióticos, aunque no todas las especies bacterianas son sensibles a la plata. El uso de las AgNPs debe de ser complementario al uso de otros antibióticos. Se ha demostrado que las AgNPs son más activos contra las bacterias Gram negativas, esto se debe a diferencias estructurales entre las Gram negativas y las positivas. Por un lado, las bacterias Gram negativas tienen una capa de lipopolisacárido en la superficie externa seguida de una capa delgada de peptidoglucano, mientras que las Gram positivas la pared celular se compone principalmente de una capa gruesa de peptidoglucano.

Especie bacteriana	Mecanismo de acción.
<i>E. coli</i>	Alteración de la permeabilidad de la membrana y la respiración.
<i>Klebsiellapneumoniae</i>	Alteración de la membrana
<i>P. aeruginosa</i>	Daño irreversible de las células bacteriana
<i>S. aureus</i>	Alteración de la permeabilidad de la membrana y la respiración. Daño irreversible de las células.
<i>S. epidermidis</i> y <i>S. typhi</i>	Inhibición de la replicación del ADN, daño en la membrana citoplasmática bacteriana, modifica los niveles de ATP intracelular.
<i>V. cholera</i>	Alteración de la permeabilidad de la membrana y la respiración.

Tabla 2. Mecanismo de acción de las nanopartículas de plata frente a diferentes especies bacterianas. (16)

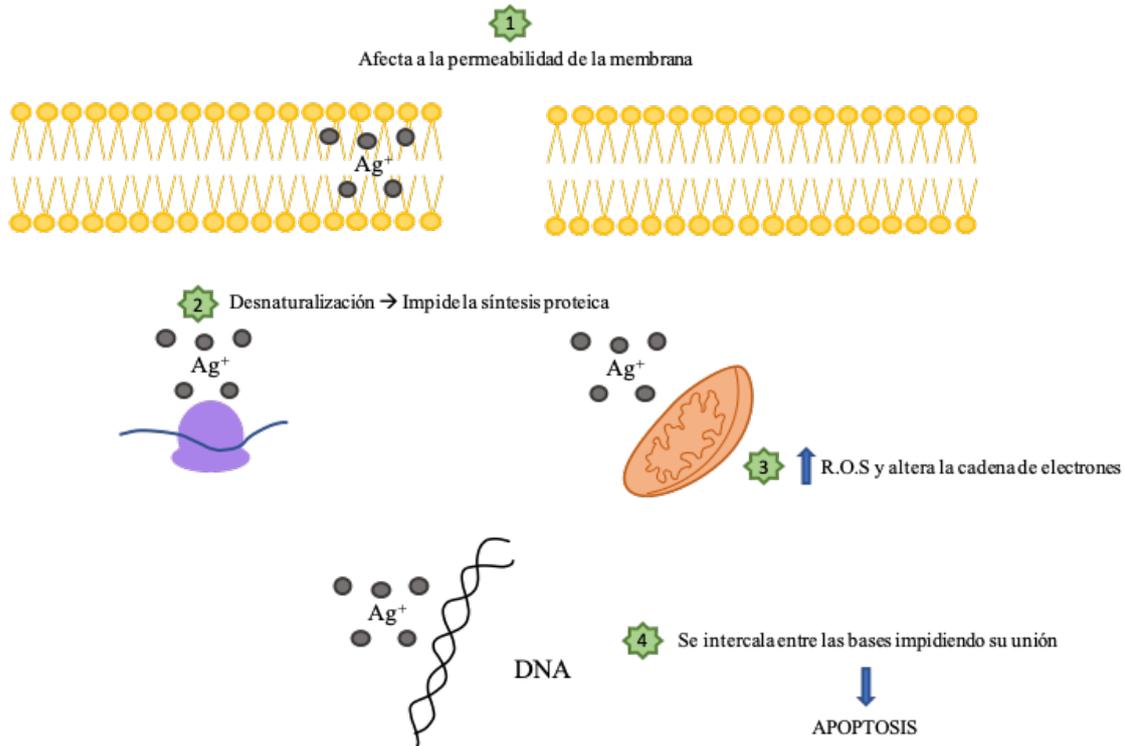


Figura 3. Dianas sobre las que ejerce su acción las AgNPs en la bacteria.

4 OBJETIVOS

El aumento de las resistencias a antibióticos es un problema que va adquiriendo mayor relevancia en esta última década y hace que en la comunidad científica se estudien diferentes posibles alternativas terapéuticas. La evolución de la nanomedicina en el campo de la utilización de las nanopartículas permite que el empleo de AgNPs sea una posible solución, principalmente por las propiedades antibacterianas de la plata que ya se conocían previamente. Este trabajo se centra en el estudio del mecanismo de acción de las AgNPs como agentes antibacterianos y se describen y analizan en detalle los diferentes factores que afectan a la actividad bactericida de las AgNPs que se conocen hasta la actualidad justificando así su empleo en el tratamiento de infecciones.

5 METODOLOGÍA

La información para redactar este Trabajo Fin de Grado ha sido seleccionada de diferentes artículos y estudios científicos en castellano e inglés encontrados en bases de datos de portales como PubMed, ScienceDirect y libros relacionados con el tema facilitados por la Universidad Complutense de Madrid. Con el fin de que fuese una revisión actual en los criterios de búsqueda de los portales se han excluido aquellos que no hayan sido publicados en los últimos 11 años.

Para ello, las palabras clave utilizadas han sido: *nanoparticles; AgNPs; silver; bactericide; physicochemical properties*

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se mencionaba en la introducción a este trabajo, las AgNPs presentan actividad bactericida de amplio espectro, frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas. Recientes trabajos de investigación mencionan que determinados factores pueden condicionar esta actividad bactericida de las AgNPs. Es el resultado de la combinación de todos los factores que afectan lo que determina finalmente la efectividad de las AgNPs; en los que a grandes rasgos podemos dividir en dos grupos: las propiedades fisicoquímicas de las AgNPs (tamaño, forma... etc.) y las condiciones de almacenamiento o fisiológicas de la zona a tratar, es decir, factores intrínsecos y extrínsecos respectivamente.

6.1 FACTORES INTRÍNSECOS

Se consideran como intrínsecos a todos aquellos que son consecuencia de las propiedades fisicoquímicas que presentan las AgNPs, como son el tamaño, la forma, la adición de una capa de recubrimiento, las cargas y potencial Z y propiedades ópticas y también se detalla la afectación de la actividad de las AgNPs en función de la concentración empleada. En todos ellos encontramos un denominador común, la velocidad de disolución imprescindible para que se de la liberación de iones Ag^+ . Son determinantes pero eludibles en la mayor parte de los casos, variando condiciones y reactivos en la síntesis como veremos a continuación.

TAMAÑO

Existe una relación inversa entre el tamaño de la nanopartícula y actividad antimicrobiana. Cuanto menor sea la nanopartícula mayor es la superficie específica, y, por tanto, aumenta la interacción con la superficie de la bacteria. El tamaño óptimo para su efectividad bactericida es el comprendido en el intervalo de 1 y 10 nm. Conseguir ese tamaño requiere de condiciones muy complejas ya que las nanopartículas de ese intervalo no suelen ser estables ni monodispersables. Para la obtención por métodos químicos de nanopartículas de ese tamaño es necesario emplear grandes cantidades de un agente reductor fuerte, para que rápidamente se genere el núcleo y posteriormente, los coloides sean monodispersos y uniformes. (20)

Además, el tamaño también afecta la velocidad de liberación de iones plata, aquellas AgNPs de menor tamaño y con mayor superficie disponible son las que mayores valores de velocidad de liberación presentan. (14)

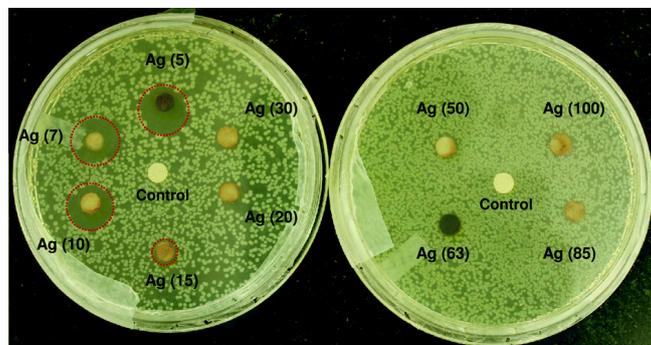


Figura 5. Pruebas de difusión en disco para AgNPs de diferentes tamaños contra la cepa *E. coli* MTCC 443. La zona de inhibición se resalta con un círculo punteado que indica un efecto antibacteriano notable. (20)

FORMA

Teniendo en cuenta que la efectividad está relacionada con el área superficial disponible, se parte de la premisa de que a mayor superficie disponible mayor efectividad. Las nanopartículas con forma esférica, cúbica y triangular son las más destacadas en los estudios por su elevada área superficial. (21,22) La efectividad también se ve influida por la especie bacteriana sobre la que actúa, ya que, los mecanismos de entrada pueden variar en función de la especie. Dentro de la síntesis química, que es la más utilizada, es interesante observar en algunos ejemplos qué etapas o componentes varían entre las diferentes formas geométricas que se obtienen. (23)

- Formas cúbicas: reducción de nitrato de plata con etilenglicol en presencia de PVP concentración mayor de 0,1 M, si es menor se obtienen formas de varillas a 160°C-180°C.
- Formas esféricas: 100 mL de una solución acuosa hirviendo 10^{-3} AgNO_3 reducida con 2 mL 1% citrato de sodio hasta que la solución torna a gris amarillo.
- Formas triangulares/piramidales: reducción de una solución de AgNO_3 con (NaBH_4) empleando PVP como agente para el recubrimiento.
- Hexagonales: 600 μL de PEG 2000 y 500 μL al 1% de NaOH añadido a 90 mL de agua desionizada calentada hasta punto de ebullición. Después añadir rápidamente 10 mL de una solución acuosa de AgNO_3 10^{-2} M.

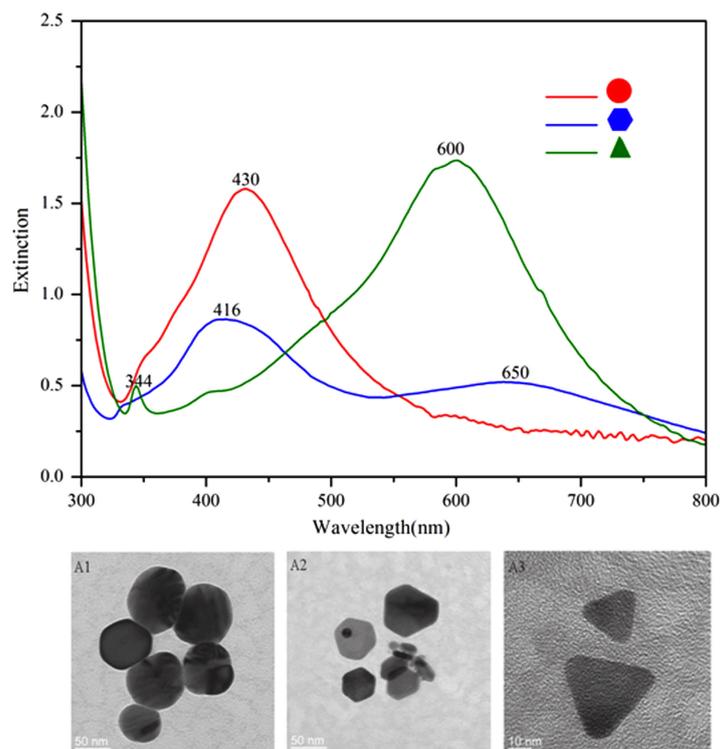


Figura 6. Espectros UV-visibles de AgNP con diferentes formas. Diferentes micrografías de AgNP de citrato, (A1) AgNP de PEG y (A2) AgNP de borohidruro (A3). (23)

RECUBRIMIENTO

En el transcurso de una infección, el organismo libera sustancias inflamatorias como interleucinas o citosinas. Esta cascada inflamatoria se aminora cuando las AgNPs están encapsuladas. (24) Una de las funciones más importantes del recubrimiento es prevenir el efecto citotóxico de los AgNP contra las células vivas. Las sustancias empleadas pueden ser orgánicas (polisacáridos, proteínas, polímeros, etc.) o inorgánicas (cloruro, sulfuros, etc.). Además, que estén recubiertas presentan otros beneficios en la farmacodinamia de las AgNPs; hace que sean más estables electrostáticamente, disminuye la aglomeración y simplifica la disolución y liberación de iones. (25) La elección del material empleado para el recubrimiento es condicionante para la efectividad de las AgNPs, puesto que, van a disolverse mejor aquellas con recubrimientos neutros (PVP) que aquellas con recubrimientos cargados negativa o positivamente, porque pueden ralentizar el proceso de liberación de iones (citrato). (26)

CARGA SUPERFICIAL

La membrana celular bacteriana está cargada negativamente debido a la presencia de carboxil fosfato y grupos amino. Las AgNPs cargadas positivamente son las que muestran la mayor actividad bactericida, las nanopartículas neutras tienen actividad intermedia y las cargadas negativamente son las que menos actividad bactericida presentan. Las AgNPs cargadas negativamente crean una barrera electrostática limitando la interacción entre las NPs y la bacteria. Las cargadas positivamente interactúan con la superficie celular, cargada negativamente, con el azufre y fósforo de las proteínas de la bacteria, lo que explicaría su mayor efectividad frente a las negativas o neutras. (27)

POTENCIAL ZETA

Las AgNPs comúnmente se encuentran en soluciones coloidales. En este tipo de soluciones es recurrente la determinación del potencial zeta, para conocer las fuerzas de repulsión que existen entre las AgNPs y, en definitiva, el posible grado de aglomeración que pudiese producirse entre ellas. Los cambios en el potencial zeta pueden atribuirse a los cambios en la cantidad de iones cargados en las superficies de las nanopartículas. En el caso de las AgNPs, es importante que presente un potencial Z positivo para que cuando se produzca la interacción con la superficie, cargada negativamente, se generen las fuerzas electrostáticas que hagan que se aproximen más la una a la otra. (28) Además, el potencial zeta nos indica la estabilidad del coloide, aquellas con valores superiores a +30 mV son consideradas como estables. (29)

PROPIEDADES ÓPTICAS

Las AgNPs interactúan intensamente con la luz que incide sobre ellas por medio de los electrones situados en la capa más superficial. Estos electrones son excitados por luz emitida a longitudes de onda específicas y experimentan una oscilación colectiva. A esta oscilación se la conoce como resonancia de plasmón superficial (SPR), y hace que las intensidades de absorción y dispersión sean mucho más altas. De hecho, las AgNPs pueden tener secciones transversales de extinción efectiva (dispersión + absorción) hasta diez veces más grandes que su sección transversal física. Una fuerte sección transversal de dispersión permite visualizar fácilmente nanopartículas de menos de 100 nm con un microscopio convencional.

Las propiedades de dispersión y absorción de nanopartículas de plata se pueden ajustar controlando el tamaño, forma e índice de refracción local cerca de la superficie de la partícula. El SPR en función del tamaño de la nanopartícula puede oscilar entre 400 nm, luz violeta, a

530 nm, luz verde y pueden alcanzarse longitudes superiores en la región infrarroja si la forma de las AgNPs es de barra o placa. (30,31)

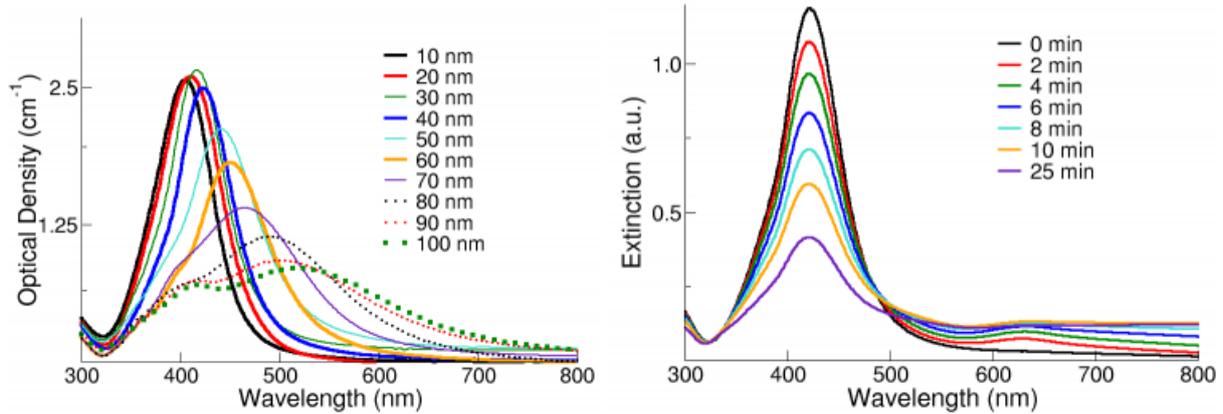


Figura 7. Izquierda. Efecto del tamaño en las propiedades ópticas de las AgNPs. Derecha. Efecto de la agregación en las propiedades ópticas de las AgNPs. (32)

CONCENTRACIÓN

En la síntesis, el aumento de la concentración de AgNO_3 resulta en la formación de nanopartículas de menor tamaño. Bajas concentraciones de nanopartículas favorecen la solubilidad de las AgNPs. Según muestran los estudios encontrados, la concentración idónea para la actividad bactericida de las AgNPs no es elevada, y, esos mismos estudios también muestran una relación directamente proporcional entre el tiempo que están expuestas a un medio aerobio y la concentración que alcanzan. Los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) son útiles para determinar la efectividad de cualquier sustancia con propiedades bactericidas, como en este caso las AgNPs. El valor de la CMI muestra la capacidad del antimicrobiano para inhibir el crecimiento de las bacterias y el valor de la CMB muestra la concentración de antimicrobiano capaz de matar un 99.9% de la población bacteriana inicial. Los estudios revelan que para las AgNPs ambos parámetros son bajos con lo que demuestra la elevada eficacia de las AgNPs. (17–19)

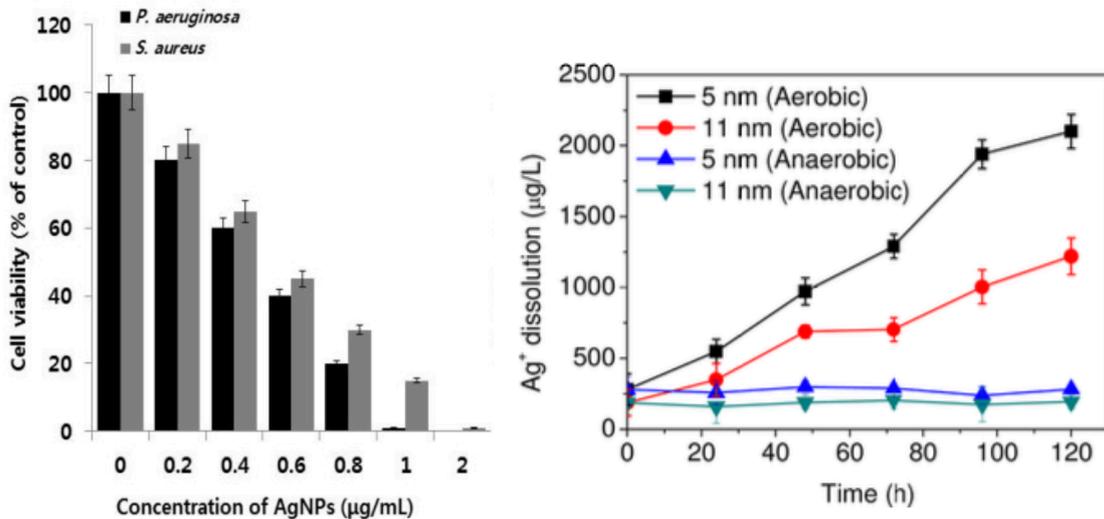


Figura 4. Izquierda. Efecto de la concentración de AgNP en la viabilidad de las células bacterianas. *P. aeruginosa* y *S. aureus* (18) Derecha. La concentración del catión Ag⁺ disuelto aumenta con el tiempo en condiciones aeróbicas. (19)

6.2 FACTORES EXTRÍNSECOS

Son todos aquellos que no dependen de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas directamente, sino que, son las circunstancias que rodean a las AgNPs y que afectan a todos los niveles, en la síntesis, conservación y administración como son el pH, la temperatura, el estado de agregación y la presencia en el medio de diferentes elementos. A diferencia de los factores intrínsecos, al estar presentes en tantos procesos, estos factores son más difíciles de controlar en la conservación y administración, sobre todo en esta última, porque responden en su mayoría a las condiciones del tejido a tratar.

TEMPERATURA

Durante la síntesis de AgNPs si aumentamos la temperatura aumenta también la velocidad de síntesis de AgNPs, y facilita la formación de los núcleos, sin alcanzar niveles muy altos de temperatura, trabajando por debajo de 60°C conseguimos que no se produzca la aglomeración y se obtienen nanopartículas de tamaños inferiores a 30 nm. (34) Además, si aumentamos ligeramente la temperatura, aumentamos la energía cinética, esencial para una mayor disolución y liberación de los iones plata.

pH

Durante la síntesis de las AgNPs, aumentar el pH hasta alcanzar valores alcalinos es necesario para disminuir el tiempo empleado en la reducción de los iones Ag⁺. En todo el proceso de síntesis el pH tiene que estar monitorizado porque, valores de pH superiores a 10, favorecen el crecimiento del núcleo de las AgNPs, resultando en la formación de AgNPs de mayor tamaño (33) con menor absorbancia. (34)

En cambio, en un medio biológico, como una infección tisular, un pH elevado disminuye la estabilidad y la disolución de iones de las NPs. (26) El tejido infectado muestra valores de pH básicos, por lo que la disolución y liberación de iones puede verse comprometida. (35)

AGLOMERACIÓN

Las AgNPs presentan tendencia aglomerarse, es decir, se asocian, formando partículas de mayor tamaño y, por consiguiente, disminuye la concentración de nanopartículas libres en la disolución. Este fenómeno sucede sobre todo en medios acuosos catiónicos. (36) La aglomeración es la consecuencia directa de las fuerzas débiles que tienden entre sí las AgNPs, Van der Waals o electroestáticas. A pesar de que la aglomeración sea fácilmente reversible con fuerzas mecánicas, condiciona la efectividad de las AgNPs porque un aumento del tamaño se relaciona con una disminución del área superficial disponible y la entrada a la bacteria finalmente no se produce. (18) La concentración del precursor de plata empleado en la síntesis de las NPs es un factor limitante, porque, a pesar de ser una fuente de iones de plata y se pueda pensar que existe una relación directamente proporcional entre los iones Ag^+ y la formación de nanopartículas, lo que finalmente sucede no es la síntesis de más nanopartículas, sino la aglomeración de estas. (37)

OTROS COMPONENTES PRESENTES EN EL MEDIO

La presencia en el medio de diferentes compuestos puede tener diferentes consecuencias sobre las nanopartículas, concretamente pueden afectar a la disolución y liberación de los iones de plata.

- Disminuyen la disolución de las AgNPs:
 - Los electrolitos, producen una disminución en la repulsión electrostática entre las AgNPs y, la agregación de partículas podría ocurrir simultáneamente a la liberación de Ag^+ . Estos dos procesos fisicoquímicos pueden afectarse entre sí. (38)
 - El calcio, magnesio y cloruro de sodio porque favorecen la agregación de las AgNPs. (39)
 - Los grupos tioles libres tienen una gran afinidad por los iones Ag^+ , estos grupos se unen a la superficie de las AgNPs y previenen la oxidación de $\text{Ag} \rightarrow \text{Ag}(\text{I})$ al inhibir la exclusión del oxígeno. (14)
 - Ácido ascórbico, a bajas concentraciones aumenta la disolución de las AgNPs, es decir, el paso de Ag^0 a cationes Ag^+ , sin superar 1 mM. Se cree que concentraciones superiores a 1 mM pueden estar relacionadas con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan a la célula. (14)
 - Iones fosfato y cloruro. Forman sales con los iones de plata; por ejemplo, AgCl_3^{2-} o AgCl^{2-} . Estas sales son muy poco solubles, precipitan, y disminuyen la cantidad de plata disuelta. (40)
 - La glucosa, como agente reductor, ralentiza el proceso de liberación de iones Ag^+ . (40)
- Aumentan la disolución de las AgNPs:
 - El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), acelera la disolución por la formación de intermediarios. (40)

- El cloruro es el más efectivo puesto que aumenta la liberación de iones incluso a muy bajas concentraciones. (41)

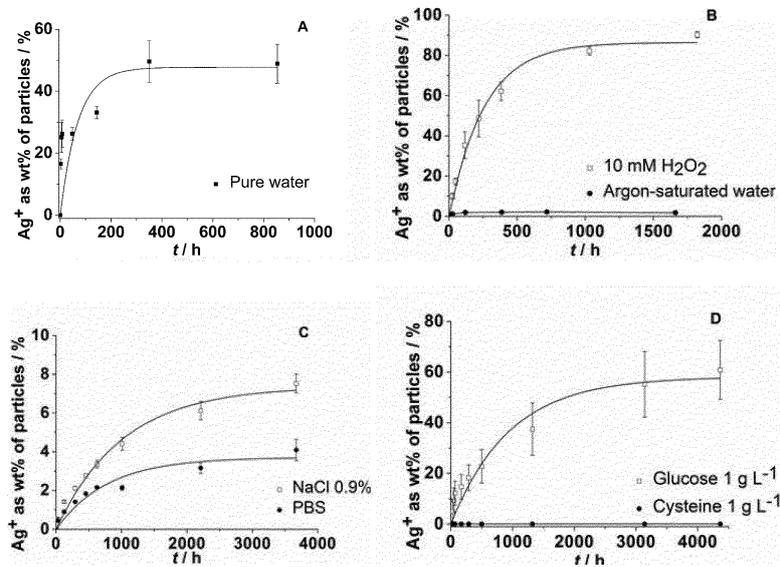


Figura 8. Curvas de liberación de iones plata en diferentes condiciones: Disolución de AgNPs en agua pura (A); agua desgasificada, saturada de argón bajo una atmósfera de argón, y en agua con H₂O₂ 10 mM (B); en NaCl acuoso (0.9%) o en PBS (C); en presencia de cisteína (aq.:1 g/L) o glucosa (aq. :1g/L) (D). (40)

7 CONCLUSIONES

Una vez visualizados en conjunto los factores que afectan a la actividad bactericida podemos determinar que, para conseguir una mayor efectividad y que las AgNPs se empleen más en el tratamiento de procesos infecciosos es necesario que tengan unas características específicas. Algunas de estas pueden ser intrínsecas de las AgNPs, resultado del tipo de síntesis y de reactivos empleados en su síntesis; o extrínsecas, correspondientes a las características que presenta el medio en el que se almacenan o donde ejercen su acción. La acción bactericida de las AgNPs comienza cuando se liberan los iones Ag⁺, por lo que los factores que condicionen la velocidad de disolución, que generalmente suelen ser los presentes en el medio, o el recubrimiento de las AgNPs o la aglomeración, pueden disminuir o incrementarla.

La primera interacción de las AgNPs con la célula es a través de las capas más superficiales de la pared bacteriana; por este motivo, todos aquellos parámetros que puedan interferir en la interacción deben de ser controlados. Formas como la triangular, esférica o hexagonal tienen una elevada superficie específica y, favorece la interacción de las AgNPs con la superficie celular. También favorecen la interacción con la bacteria las cargas positivas presentes en las AgNPs; como la carga superficial y el potencial zeta, ya que la membrana de las células bacterianas está cargada negativamente. La mayor parte de estos parámetros pueden ser determinados gracias a las propiedades ópticas de las AgNPs, herramienta bastante empleada para la caracterización de las mismas.

Conociendo en detalle las AgNPs y los factores que afectan a su actividad bactericida se justifica su uso en la farmacoterapia de determinados procesos infecciosos, pudiendo ser una de las soluciones frente al auge de la resistencia a antibióticos.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Alan B. G. Lansdown. Silver in Healthcare: Its Antimicrobial Efficacy and Safety in Use (Issues in Toxicology). The Royal Society of Chemistry; 2010. 274 p.
2. Kubba A, Kubba R, Batrani M, Pal T. Argyria an unrecognized cause of cutaneous pigmentation in Indian patients: A case series and review of the literature. Vol. 79, Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology. Indian J Dermatol Venereol Leprol; 2013. p. 805–11.
3. del Rocío E, Ávila L, Arroyo O. Las Nanopartículas De Plata: Mecanismos De Entrada, Toxicidad Y Estrés Oxidativo*. Rev Educ Bioquímica. 2017;36(2):39–54.
4. Anghel I, Grumezescu A, Holban A, Ficai A, Anghel A, Chifiriuc M. Biohybrid Nanostructured Iron Oxide Nanoparticles and *Satureja hortensis* to Prevent Fungal Biofilm Development. Int J Mol Sci [Internet]. 2013 Sep 4 [cited 2020 Apr 1];14(9):18110–23. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/14/9/18110>
5. Xiu ZM, Ma J, Alvarez PJJ. Differential effect of common ligands and molecular oxygen on antimicrobial activity of silver nanoparticles versus silver ions. Environ Sci Technol. 2011 Oct 15;45(20):9003–8.
6. Maccuspie RI, Allen AJ, Hackley VA. Dispersion stabilization of silver nanoparticles in synthetic lung fluid studied under in situ conditions. Nanotoxicology. 2011;5(2):140–56.
7. Beyene HD, Werkneh AA, Bezabh HK, Ambaye TG. Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles (AgNPs), a review. Sustain Mater Technol [Internet]. 2017;13(January):18–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.susmat.2017.08.001>
8. Saeed S, Iqbal A, Ashraf MA. Bacterial-mediated synthesis of silver nanoparticles and their significant effect against pathogens. Environ Sci Pollut Res [Internet]. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07610-0>
9. Kim M, Osone S, Kim T, Higashi H, Seto T. Synthesis of nanoparticles by laser ablation: A review. KONA Powder Part J. 2017;2017(34):80–90.
10. Belusso LCS, Lenz GF, Fiorini EE, Pereira AJ, Sequinel R, Bini RA, et al. Synthesis of silver nanoparticles from bottom up approach on borophosphate glass and their applications as SERS, antibacterial and glass-based catalyst. Appl Surf Sci [Internet]. 2019;473(November 2018):303–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.12.155>
11. Shanmuganathan R, Karuppusamy I, Saravanan M, Muthukumar H, Ponnuchamy K, Ramkumar VS, et al. Synthesis of Silver Nanoparticles and their Biomedical Applications - A Comprehensive Review. Curr Pharm Des. 2019;25(24):2650–60.
12. Tarannum N, Divya, Gautam YK. Facile green synthesis and applications of silver nanoparticles: A state-of-the-art review. RSC Adv. 2019 Oct 28;9(60):34926–48.
13. Das B, Dash SK, Mandal D, Ghosh T, Chattopadhyay S, Tripathy S, et al. Green synthesized silver nanoparticles destroy multidrug resistant bacteria via reactive oxygen species mediated membrane damage. Arab J Chem [Internet]. 2017;10(6):862–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.08.008>
14. Liu J, Sonshine DA, Shervani S, Hurt RH. Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces. ACS Nano. 2010 Nov 23;4(11):6903–13.

15. Bonilla-Gameros L, Chevallier P, Sarkissian A, Mantovani D. Silver-based antibacterial strategies for healthcare-associated infections: Processes, challenges, and regulations. An integrated review. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. 2020;24:102142. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102142>
16. Dos Santos CA, Seckler MM, Ingle AP, Gupta I, Galdiero S, Galdiero M, et al. Silver nanoparticles: Therapeutical uses, toxicity, and safety issues. *J Pharm Sci*. 2014;103(7):1931–44.
17. Gurunathan S, Choi YJ, Kim JH. Antibacterial efficacy of silver nanoparticles on endometritis caused by *Prevotella melaninogenica* and *Arcanobacterium pyogenes* in dairy cattle. *Int J Mol Sci*. 2018 Apr 16;19(4).
18. Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *Int J Mol Sci*. 2016;17(9).
19. Xiu ZM, Zhang QB, Puppala HL, Colvin VL, Alvarez PJJ. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano Lett*. 2012;12(8):4271–5.
20. Agnihotri S, Mukherji S, Mukherji S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Adv*. 2014;4(8):3974–83.
21. Franci G, Falanga A, Galdiero S, Palomba L, Rai M, Morelli G, et al. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*. 2015;20(5):8856–74.
22. Ashkarran AA, Estakhri S, Nezhad MRH, Eshghi S. Controlling the geometry of silver nanostructures for biological applications. *Phys Procedia* [Internet]. 2013;40:76–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phpro.2012.12.011>
23. El-Zahry MR, Mahmoud A, Refaat IH, Mohamed HA, Bohlmann H, Lendl B. Antibacterial effect of various shapes of silver nanoparticles monitored by SERS. *Talanta*. 2015 Jun 1;138:183–9.
24. Yusuf A, Casey A. Surface modification of silver nanoparticle (AgNP) by liposomal encapsulation mitigates AgNP-induced inflammation. *Toxicol Vitro*. 2019 Dec 1;61:104641.
25. Fahmy HM, Mosleh AM, Elghany AA, Shams-Eldin E, Abu Serea ES, Ali SA, et al. Coated silver nanoparticles: Synthesis, cytotoxicity, and optical properties. Vol. 9, *RSC Advances*. Royal Society of Chemistry; 2019. p. 20118–36.
26. Pareek V, Gupta R, Panwar J. Do physico-chemical properties of silver nanoparticles decide their interaction with biological media and bactericidal action? A review. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2018;90(May):739–49. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.093>
27. Abbaszadegan A, Ghahramani Y, Gholami A, Hemmateenejad B, Dorostkar S, Nabavizadeh M, et al. The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: A preliminary study [Internet]. Vol. 2015, *Journal of Nanomaterials*. 2015 [cited 2020 Mar 20]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/272353636_The_Effect_of_Charge_at_the_Surface_of_Silver_Nanoparticles_on_Antimicrobial_Activity_against_Gram-Positive_and_Gram-Negative_Bacteria_A_Preliminary_Study
28. Borowik A, Butowska K, Konkul K, Banasiuk R, Derewonko N, Wyrzykowski D, et al. The impact of surface functionalization on the biophysical properties of silver

- nanoparticles. *Nanomaterials*. 2019;9(7).
29. Meléndrez MF, Cárdenas G, Arbiol J. Synthesis and characterization of gallium colloidal nanoparticles. *J Colloid Interface Sci*. 2010 Jun 15;346(2):279–87.
 30. Mahmudin L, Suharyadi E, Utomo ABS, Abraha K. Optical Properties of Silver Nanoparticles for Surface Plasmon Resonance (SPR)-Based Biosensor Applications. *J Mod Phys* [Internet]. 2015 [cited 2020 Apr 13];06(08):1071–6. Available from: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/jmp.2015.68111>
 31. Stampelcoskie KG, Scaiano JC. Light emitting diode irradiation can control the morphology and optical properties of silver nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 2010;132(6):1825–7.
 32. Silver Nanoparticles: Optical Properties – nanoComposix [Internet]. [cited 2020 May 20]. Available from: <https://nanocomposix.com/pages/silver-nanoparticles-optical-properties>
 33. Aziz WJ, Jassim HA. A novel study of pH influence on Ag nanoparticles size with antibacterial and antifungal activity using green synthesis. [cited 2020 Apr 13]; Available from: www.worldscientificnews.com
 34. Gurunathan S, Kalishwaralal K, Vaidyanathan R, Venkataraman D, Pandian SRK, Muniyandi J, et al. Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2009 Nov 1;74(1):328–35.
 35. Gamerith C, Luschig D, Ortner A, Pietrzik N, Guse JH, Burnet M, et al. pH-responsive materials for optical monitoring of wound status. *Sensors Actuators, B Chem*. 2019 Dec 12;301:126966.
 36. Chen SF, Zhang H. Aggregation kinetics of nanosilver in different water conditions. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol*. 2012;3(3).
 37. Zahran MK, Ahmed HB, El-Rafie MH. Alginate mediate for synthesis controllable sized AgNPs. *Carbohydr Polym*. 2014 Oct 13;111:10–7.
 38. Zhang W, Yao Y, Sullivan N, Chen Y. Modeling the primary size effects of citrate-coated silver nanoparticles on their ion release kinetics. *Environ Sci Technol*. 2011;45(10):4422–8.
 39. Jin X, Xue X. Computational fluid dynamics analysis of solid oxide electrolysis cells with delaminations. *Int J Hydrogen Energy*. 2010 Jul 1;35(14):7321–8.
 40. Loza K, Diendorf J, Sengstock C, Ruiz-Gonzalez L, Gonzalez-Calbet JM, Vallet-Regi M, et al. The dissolution and biological effects of silver nanoparticles in biological media. *J Mater Chem B*. 2014 Mar 28;2(12):1634–43.
 41. Garg S, Rong H, Miller CJ, Waite TD. Oxidative Dissolution of Silver Nanoparticles by Chlorine: Implications to Silver Nanoparticle Fate and Toxicity. *Environ Sci Technol*. 2016 Apr 5;50(7):3890–6.