



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
TÍTULO: SÍNTESIS VERDE DE NANOPARTÍCULAS
DE PLATA Y SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

Autor: Carlos De Leonardo Simón

Fecha: 22/06/20

Tutor: Inmaculada Aranaz Corral

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	2
2	NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	3
3	OBJETIVOS	6
4	MATERIAL Y MÉTODOS.....	6
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	6
5.1	Métodos biológicos.....	6
5.1.1	Extractos de plantas.....	6
5.1.2	Microorganismos	8
5.2	Métodos no biológicos.....	9
5.2.1	Polisacáridos.....	9
5.2.2	Reacción de Tollens.....	11
5.2.3	Irradiación	12
6	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y APLICACIONES DE LAS AGNPS	12
7	TOXICIDAD Y RESISTENCIA.....	16
8	CONCLUSIÓN	17
9	BIBLIOGRAFÍA	17

RESUMEN

Esta revisión examina la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) mediante síntesis verde, mostrando sus beneficios frente a otros métodos convencionales que presentan toxicidad ambiental. La síntesis verde incluye métodos biológicos y no biológicos, tales como polisacáridos, irradiación, Tollens. Los métodos biológicos revisados son el uso de extractos de plantas como agentes reductores y estabilizadores, y la síntesis mediante bacterias. Las AgNPs obtenidas tienen una distribución de tamaño entre 1 y 200 nm, aunque en algunos métodos se obtienen tamaños superiores, de hasta 500 nm. Los métodos de caracterización y determinación de nanopartículas de plata más usados son: espectroscopia UV/Vis, difracción de rayos X, espectroscopia electrónica de barrido y de transmisión y espectroscopia infrarroja de Fourier. Análogamente, se valoró la capacidad antimicrobiana de las AgNPs frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, exponiendo los posibles mecanismos de acción responsables de su citotoxicidad bacteriana. En la misma línea, se evaluaron los posibles riesgos asociados y la seguridad de la inclusión de AgNPs en terapias médicas o productos para el consumidor.

1 INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es la ciencia que estudia la obtención de materiales y dispositivos con una escala de entre 1 y 100 nm. La nanomedicina consiste en el empleo de estos dispositivos para la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades. Entre los distintos nanomateriales que se estudian, las nanopartículas son herramientas muy eficaces en medicina que permiten resolver problemas de biocompatibilidad. Recientemente, las nanopartículas han adquirido una gran relevancia en el campo de la investigación médica, ya que poseen una gran actividad antimicrobiana y antifúngica frente a distintos microorganismos, con baja toxicidad y una buena actividad térmica. Además, se les atribuyen propiedades antiinflamatorias (1) y antivirales (2). En especial, la actividad antimicrobiana y antifúngica de las nanopartículas de plata (AgNPs) es más eficaz a largo plazo frente a otras nanopartículas, debido a su potente acción citotóxica frente a microorganismos patógenos (3). También han demostrado una elevada efectividad como terapia anticancerígena, ya que tienen acción citotóxica selectiva contra las células cancerígenas. Las aplicaciones de las nanopartículas de metales se extienden también al tratamiento de aguas, la conversión energética, los sensores químicos, la agricultura y la industria alimentaria (4).

En las últimas décadas, la síntesis de nanopartículas se ha incrementado y, con ello, han aumentado los riesgos ambientales y biológicos como consecuencia del uso de agentes reductores nocivos, como el borohidruro sódico (NaBH_4) (5), la hidracina (6), la N,N-dimetilformamida y otros solventes orgánicos. En contraposición a esta situación, se están estudiando nuevos métodos de síntesis de nanopartículas centrados en la "química verde", dirigidos a la protección del medio ambiente (7). Entre las estrategias de síntesis verde, destaca la selección de medios solventes (generalmente acuosos), agentes reductores y agentes estabilizadores no tóxicos. Como resultado de la síntesis verde, las AgNPs presentan una toxicidad muy baja, permitiendo su uso en la nanomedicina; por ejemplo, en la encapsulación de fármacos o proteínas. Además, estos métodos verdes se están popularizando debido a que son accesibles, reproducibles y minimizan costes energéticos y económicos (8).

2 NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Actualmente, se investiga sobre la producción de nanopartículas de metales nobles, como el oro y la plata. La plata tiene buena conductividad y buena estabilidad química y catalítica. Desde la antigüedad, la plata se ha utilizado como tratamiento de quemaduras y heridas crónicas ya que, como resultado de su capacidad donadora de electrones, se le atribuye una potente actividad antimicrobiana (9). La presencia de AgNPs en células y tejidos es menos lesiva; además, sus estructuras son fuertes, ligeras y menos corrosivas que sus materiales en bruto. Una característica imprescindible para su empleo en terapia médica es la biocompatibilidad, de forma que ejerzan su acción terapéutica sin provocar toxicidad al organismo en el que se administran. La modificación de su superficie les confiere alta especificidad, permitiendo llevar a cabo acciones terapéuticas dirigidas en el organismo (10).

Las nanopartículas tienen propiedades físicas, químicas y biológicas muy diferentes en comparación a las sustancias en bruto. Estas propiedades son susceptibles a las modificaciones de las nanopartículas en cuanto a su tamaño, forma, distribución (polidispersión) o interacciones con el sustrato estabilizador (11). Las características anteriores también se ven modificadas por varios parámetros cinéticos, como la concentración del agente precursor, el poder reductor de los reactivos, la naturaleza del disolvente y el crecimiento superficial controlado mediante estabilizadores. Estudios previos muestran que el uso de reductores fuertes da lugar a partículas de pequeño tamaño, pero en las cuales es difícil controlar el crecimiento de la superficie. En cambio, cuando se adicionan reductores débiles, se consigue una distribución estrecha con un tamaño de partícula adecuado para su actividad terapéutica frente a microorganismos patógenos. Por tanto, las condiciones experimentales son un factor clave en el diseño de la síntesis de AgNPs.

La caracterización de las AgNPs se puede realizar por diversas técnicas en función de las características que nos interese conocer del material obtenido. Una de las técnicas más habituales es el análisis espectroscópico UV-Vis entre 200-800 nm, que aporta información sobre la presencia de las nanopartículas, así como de su tamaño y distribución de tamaño. La espectroscopia visible capta la resonancia de plasmones superficial producida por la presencia de electrones libres en la superficie de la partícula. Así, se obtendrá una variación en la intensidad en función de la longitud de onda a la que absorben los materiales. Valores entre 400-450 nm indican la presencia de AgNPs de tamaño entre 1-100 nm. La interpretación del análisis espectroscópico permite realizar un seguimiento de las partículas según su tamaño y su forma (12). Los desplazamientos de los picos de absorción hacia el rojo o superiores a 500 nm indican la presencia de agregados o un elevado tamaño de partícula; mientras que un ensanchamiento del pico en el espectro indica una distribución de tamaño no homogénea de las AgNPs sintetizadas (13). En cuanto a la morfología, las nanopartículas esféricas tienden a absorber en la región azul del espectro, mientras que las nanopartículas dodecaédricas o con secciones triangulares absorben en la región verde y roja del espectro, respectivamente (14).

La difracción de rayos X (XDR) permite identificar la presencia de AgNPs, ya que estas cristalizan en el sistema cúbico centrado en el cuerpo (FCC) con reflexiones típicas en los ángulos 38.22°, 44.62°, 64.54° y 77.42°; y los planos de Miller en 111, 200, 220 y 311 nm comparados con el Comité Conjunto de Estándares de Difracción en Polvo. La microscopía electrónica de barrido (SEM) y la microscopía electrónica de transmisión (TEM) permiten determinar la forma de las nanopartículas, su tamaño y su polidispersidad (13). De la misma manera, la microscopía atómica (AFM) permite analizar el tamaño y la estructura superficial

de las partículas en alta resolución (15). La estructura química de las AgNPs y de los grupos químicos implicados en la reducción de los iones de plata puede determinarse mediante espectroscopia infrarroja de Fourier (FTIR), con el interés de establecer la interacción que presentan durante el proceso de síntesis.

La estabilidad de las dispersiones coloidales está determinada por el sumatorio de las fuerzas de atracción o de Van der Waals y las fuerzas de repulsión o electroestáticas que las partículas experimentan cuando están próximas. Una dispersión será estable cuando predominen las fuerzas repulsivas. La estabilidad se puede medir mediante el potencial zeta, de forma que, cuanto mayor sea su valor, más estable será la dispersión. Se consideran dispersiones estables a partir de un valor de potencial zeta de ± 30 mV, lo que indica que la dispersión es resistente a la agregación de partículas (3,8).

En cuanto al diseño y la planificación de AgNPs, existen dos estrategias: Top-Down o Bottom-Up. Las estrategias Top-Down se basan en la aplicación de métodos físicos, como la abrasión o la molienda del material de partida en bruto. No son métodos muy atractivos debido a que producen AgNPs con superficie imperfecta y la superficie de la partícula es un factor crítico que condiciona sus propiedades fisicoquímicas. Por su parte, las estrategias Bottom-up consisten en someter productos moleculares a reacciones químicas para la obtención de nanopartículas. Generalmente son métodos en los que se forman primero las entidades estructurales de las nanopartículas mediante unión de átomos y, después, se procede al ensamblaje. Esta última estrategia es la más usada debido a que permite la obtención controlada en cuanto a tamaño y forma (16).

La síntesis de nanopartículas mediante la estrategia Bottom-up puede realizarse mediante métodos físicos, químicos o biológicos. El método más extendido consiste en la reducción química de sales inorgánicas de plata, lo que permite obtener nanopartículas sin agregación, con alto rendimiento y bajo coste de producción. El proceso de síntesis puede realizarse en uno o en dos pasos. Los métodos basados en dos pasos utilizan agentes reductores potentes, como el NaBH_4 , para la obtención de pequeñas partículas de plata. A continuación, se emplean reductores débiles que permiten el aumento de tamaño de estas partículas. Los métodos de un único paso han sido descritos en los últimos años, como el método de Tollens o el “cristal de plata”.

Recientemente, han cobrado relevancia los métodos biológicos para la obtención de AgNPs mediante el uso de plantas, microorganismos, levaduras y algas. La reacción que transcurre durante el proceso de síntesis es la reducción de iones Ag^+ a átomos Ag^0 , cuyos núcleos tienden a unirse formando nanopartículas (Figura 1). Las nanopartículas sufren procesos de agregación que da lugar a agregados grisáceos de gran tamaño; para evitarlo, se adicionan estabilizadores, que permiten controlar el crecimiento superficial de los coloides. Los estabilizadores pueden ser moléculas orgánicas, biológicas o poliméricas que generan impedimento estérico (anclando cadenas poliméricas a su superficie) o electroestático (cargando la superficie molecular).

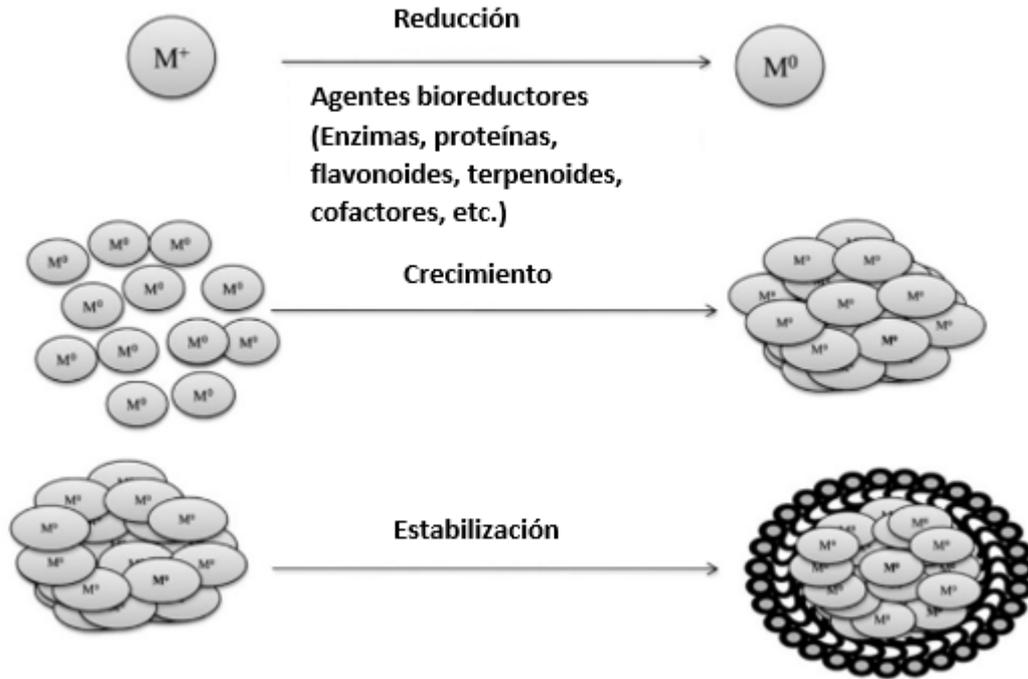


Figura 1: Mecanismo de síntesis de nanopartículas (M^+ -ion metálico) (16)

La espectroscopia UV-VIS permite hacer un seguimiento de todo el proceso. La solución transparente indica que no hay presencia de nanopartículas o que su tamaño es muy pequeño para dispersar la luz. En cambio, cuando se forman las nanopartículas, la solución vira a una coloración (amarillo, rojizo o pardo) que puede detectarse mediante UV/VIS, de forma que se observa un pico de absorción correspondiente a las AgNPs sobre los 380-400 nm (Figura 2).

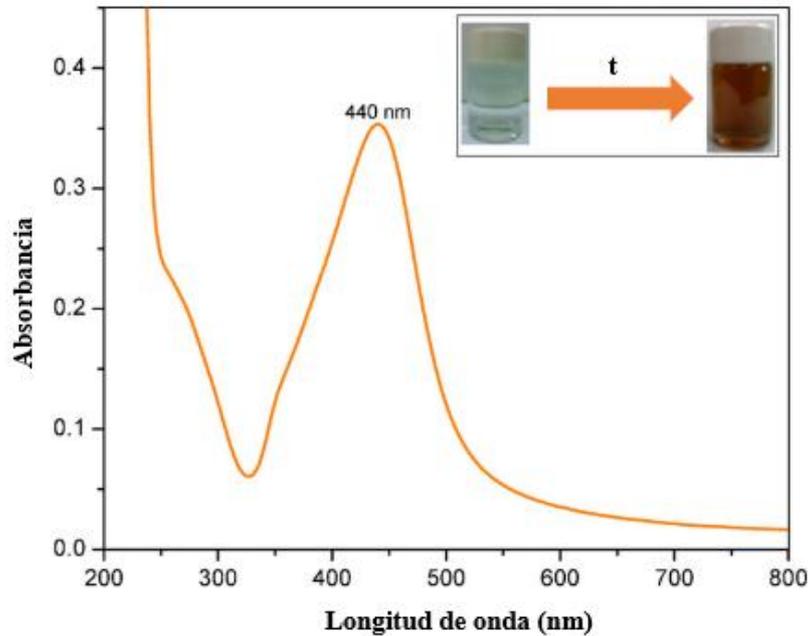


Figura 2: Observación visual y absorción Uv-visible en la síntesis de AgNPs (17)

3 OBJETIVOS

Los objetivos de la presente revisión son:

- Describir los diferentes métodos verdes de obtención de nanopartículas de plata (AgNPs).
- Describir el mecanismo de acción de las AgNPs como agentes antibacterianos.
- Valorar el uso de las AgNPs en diferentes aplicaciones.
- Analizar la posible toxicidad de las AgNPs en el ser humano y resistencias de las bacterias a la acción de las AgNPs.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado mediante una revisión bibliográfica de artículos científicos recogidos en bases de datos como PubMed, Google Scholar, Scopus, Elsevier y WOS (Web Of Science). Los artículos se seleccionaron atendiendo a su año de publicación (centrándose en estudios publicados desde el año 2010 hasta la actualidad), su idioma (inglés o español) y su índice de impacto.

Las palabras clave utilizadas en la búsqueda fueron: “nanopartículas”, “plata”, “síntesis verde”, “antimicrobiana”, “quitosano”.

Con la revisión bibliográfica, se recopilaron los procesos verdes de obtención de nanopartículas de plata y los datos de su uso como antimicrobianos en diferentes aplicaciones biomédicas. Finalmente, se detalló la posible toxicidad de las nanopartículas en humanos y la posible existencia de resistencias.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La síntesis de AgNPs puede llevarse a cabo por distintos métodos físicos, químicos y biológicos. Las síntesis verdes han demostrado que, además de ser sostenibles y económicas, son capaces de producir grandes cantidades de AgNPs con buenos resultados en homogeneidad, forma y tamaño de partícula.

5.1 Métodos biológicos

5.1.1 Extractos de plantas

En los últimos años, la biosíntesis de AgNPs basada en el uso de plantas ha sido objeto de numerosas investigaciones debido a que se trata de un proceso de síntesis verde simple, con bajo impacto ambiental y más barato que otros métodos biológicos, como la obtención mediada por bacterias. Consiste en el uso de plantas enteras, tejidos, frutos o extractos como responsables de la biorreducción, en especial el uso de extractos por ser un proceso más simple. Los componentes presentes en los vegetales –fenoles, terpenoides, polisacáridos y flavonas– son los responsables de los procesos de la reducción de metales y la estabilización de las nanopartículas obtenidas. La concentración y la combinación de los agentes reductores son factores que condicionan las características fisicoquímicas de las AgNPs. El proceso de biosíntesis generalizado se basa en la mezcla de la solución acuosa de una sal metálica junto con el extracto acuoso, en condiciones de temperatura ambiente y tiempos relativamente cortos. En la *Tabla 1*, se muestra un resumen del uso de extractos de planta en la preparación de AgNPs.

NOMBRE CIENTIFICO	PARTE DE LA PLANTA	TAMAÑO AgNPs (nm)	FORMA	CARACTERIZACION	REFERENCIA
<i>Acatlipa hispida</i>	Hoja	10-30	NE	UV/VIS, TEM	(18)
<i>Aegle marmelos</i>	Hoja	60	Esférica	UV/ VIS, XDR, FTIR	(19)
<i>Amorphophallus paeniifolius</i>	Hoja	20-26	NE	UV/VIS, TEM, SEM	(20)
<i>Fritillaria</i>	Flor	10	Esférica	TEM, SEM, FTIR, XRD	(21)
<i>Hibiscus cannabinus</i>	Tallo	5-20	Esférica	UV/VIS, TEM	(22)
<i>Holoptelea integrifolia</i>	Hoja	32-38	Esférica	UV/VIS, XDR, SEM	(23)
<i>Iresine herbstii</i>	Hoja	44-64	NE	UV/VIS, XDR, FT-IR, SEM	(24)
<i>Ixora coccinea</i>	Hoja	13-57	Esférica	UV/VIS, SEM, FTIR, XDR	(25)
<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	Hoja	25	NE	UV/VIS, FT-IR, SEM	(26)
<i>Moringo deiflora</i>	Flor	22	Esférica	UV/VIS, TEM, FT-IR	(27)
<i>Parkia speciosa</i>	Hoja	35	Esférica	UV/VIS, TEM, SEM	(28)
<i>Rosa rugosa</i>	Hojas	12	Esférica	UV/VIS, TEM, XRD, FTIR	(29)
<i>Salvia hispanica</i>	Semilla	1-27	Esférica	UV/VIS, TEM, SEM	(30)
<i>Talinum portulacifolium</i>	Hoja	4-40	Esférica	UV/VIS, TEM, SEM, XDR	(31)
<i>Terminalia chebula</i>	Fruto	25	NE	UV/VIS, FT-IR, XRD, TEM	(32)
<i>Urtica dioica</i>	Hoja	10-30	Esférica	UV/VIS, TEM, SEM, XDR, FT-IR	(33)
<i>Dalbergia spinosa</i>	Hoja	18	Esférica	UV/VIS, TEM, FT-IR	(34)

Tabla 1. Resumen del uso de las plantas en la formación de AgNPs.

5.1.2 Microorganismos

Entre los distintos métodos de síntesis verde destaca, por su reproducibilidad y sencillez, el uso de microorganismos. Tanto los microorganismos unicelulares como los pluricelulares producen nanomateriales inorgánicos a nivel intracelular y extracelular, aunque todavía se desconocen los mecanismos concretos. La síntesis intracelular de nanopartículas permite un mejor control de su forma y tamaño, pero se trata de un proceso muy complejo a la hora de recolectar y aislar las nanopartículas; por lo que la síntesis extracelular es la de elección.

Las levaduras y los hongos son microorganismos ampliamente usados para la obtención de AgNPs. Basavaraja et al. llevaron a cabo una síntesis verde extracelular usando la especie *Fusarium semitectum* (14). En primer lugar, se obtuvo la biomasa del hongo mediante su cultivo anaerobio para, posteriormente, hacerlo reaccionar con una disolución de nitrato de plata (AgNO_3). Tras las primeras 24 horas, se confirmó la presencia de AgNPs mediante espectroscopia UV/VIS y, mediante las imágenes aportadas por TEM, se determinó su tamaño, en torno a 35 nm. La reducción de los iones de plata hasta la formación de AgNPs es catalizada por la reductasa dependiente de NADH en presencia de proteínas y aminoácidos secretados por la levadura, como triptófano y tirosina. Siguiendo el mismo procedimiento, otros investigadores obtuvieron AgNPs, con un tamaño entre 550-650 nm, usando la especie *Aspergillus clavatus* (35). La determinación de las AgNPs se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina y espectroscopia UV/VIS.

El uso de bacterias para la producción de AgNPs también es un mecanismo ecológico, pero presenta limitaciones, como dificultad para la producción en masa y para la recreación de ambientes estériles y, en algunos casos, baja productividad. Con el propósito de atajar dichas limitaciones, Juibari utilizó una cepa de una bacteria termófila, *Ureibacillus thermosphaericus*, como biocatalizador (36). Esta síntesis puede llevarse a cabo en ambientes no estériles, debido a que las condiciones extremas del medio limitan el crecimiento de otras bacterias. Además, es un medio económico y fácil de reproducir. Mediante este método de síntesis, se pueden producir en masa AgNPs con un tamaño comprendido entre 10-100 nm, en condiciones de temperatura y concentración de Ag^+ altas. En la misma línea, Shivaji et al. utilizaron el sobrenadante de cinco microorganismos psicrófilos –*Pseudomonas antarctica*, *Pseudomonas proteolytica*, *Pseudomonas meridiana*, *Arthrobacter kerguelensis*, *Arthrobacter angotriensi*– para la síntesis de AgNPs esféricas con un tamaño 6-12 nm. La solución permaneció estable durante 8 meses en condiciones de oscuridad (37).

Priyadarshini et al. diseñaron una síntesis de AgNPs utilizando *Bacillus flexus* como agente reductor y estabilizador de la reacción. Se realizó un cribado de bacterias obtenidas en minas de plata con el fin de determinar las cepas más adecuadas en la biogénesis de AgNPs, la cepa S-27 fue seleccionada para llevar a cabo el ensayo. La síntesis se logró con la adición del sobrenadante del cultivo con una solución acuosa de AgNO_3 , inmediatamente la solución se convirtió en marrón oscuro con un pico de absorción en los 420 nm. Las AgNPs obtenidas tenían un tamaño entre 12-65 nm y forma esférica mayoritariamente, caracterizadas mediante SEM, XDR y FTIR. La dispersión mostró estabilidad durante cinco meses a temperatura ambiente en oscuridad (38).

5.2 Métodos no biológicos

5.2.1 Polisacáridos

El uso de diversos polisacáridos –almidón, heparina, sulfato de condroitina, hialuronato y quitosano– en la síntesis de AgNPs ha sido ampliamente estudiado.

Además de como agentes estabilizadores, los polímeros pueden actuar también como agentes reductores, evitando así el uso de productos químicos tóxicos, como el NaBH_4 . Una ventaja del uso de polímeros es que muchos de ellos son solubles en medios acuosos y, por tanto, la producción de las nanopartículas se lleva a cabo evitando el uso de solventes tóxicos.

El almidón es uno de los polímeros cuyo uso está más extendido para la síntesis de AgNPs. El almidón, a su vez, está constituido por la unión de dos polisacáridos: amilosa y amilopectina. La amilosa está formada por cadenas lineales de moléculas de α -D-glucosa, unidas mediante enlaces α -(1-4). La amilopectina tiene la misma estructura que la amilosa, pero también presenta ramificaciones α -(1-6).

El almidón se ha empleado como agente reductor y estabilizador de las AgNPs. Raveendran et al. llevaron a cabo la síntesis de AgNPs sobre moldes de almidón nanoscópicos, capaces de interaccionar con las nanopartículas mediante enlaces de hidrogeno y, así, evitar su agregación (39). En otro estudio, se obtuvieron AgNPs de tamaño 10-34 nm mediante la mezcla de AgNO_3 con almidón, como agente reductor y estabilizador, en un autoclave a 15 psi durante 5 minutos (40). Adicionalmente, en la universidad de Nuevo León se realizó un experimento para comparar la síntesis de AgNPs mediante el uso de almidón tanto a $55^\circ\text{C} / 2\text{ h}$ (reacción A) como a $85^\circ\text{C} / 24\text{ h}$ (reacción B). Las condiciones de experimentación de la reacción B dieron lugar a AgNPs en torno a 80 nm con una distribución monomodal, mostrando mejores resultados que la reacción A (41). Por tanto, el uso de almidón como agente protector tiene muy buenos resultados y puede ser integrado en la industria farmacéutica.

Otros estudios muestran el uso del almidón como agente estabilizador, evitando así el uso de sustancias dañinas para el medio ambiente, junto con el monosacárido β -D-glucosa, por su poder reductor. Como resultado de la reacción de ambos con las sales inorgánicas de plata en un medio caliente, se obtiene el complejo almidón-AgNPs que, debido a su débil interacción, puede ser hidrolizado para dar lugar AgNPs aisladas.

La síntesis de AgNPs también se puede realizar mediante la reducción de AgNO_3 con heparina, molécula con carga negativa que tiene carácter reductor y estabilizador, en un medio a $70^\circ\text{C} / 8\text{ h}$, dando lugar a partículas estables durante 2 meses. La heparina contiene gran cantidad de grupos sulfonato capaces de enriquecer el medio con iones Ag^+ , lo que favorece la formación de AgNPs. La presencia de nanopartículas se confirma mediante espectroscopía UV/VIS, mostrando una banda de resonancia intensa a 401 nm cuando la solución vira a amarillo. Se ha observado que concentraciones crecientes de ambos reactivos (AgNO_3 y heparina) aumentan el tamaño de las partículas. Por tanto, la heparina tiene un papel fundamental en el crecimiento y la estabilización (42).

El sulfato de condroitina es un mucopolisacárido perteneciente a la familia de los glucosaminoglicanos, formado estructuralmente por una cadena de disacáridos de N-acetilgalactosamina y N-ácido glucurónico alternados. Es de origen natural y se encuentra en la matriz extracelular del cartílago en mamíferos. Es una molécula biocompatible y biodegradable por la microflora del colon, lo que le confiere propiedades muy seguras.

Diversos estudios han demostrado el papel del sulfato de condroitina como agente reductor y estabilizador en la síntesis verde de AgNPs (8,9). El solvente usado para llevar a cabo la disolución del AgNO_3 es el agua, solvente benigno para el medio ambiente, con adición de NaOH, que confiere basicidad al medio. Las nanopartículas obtenidas tienen un tamaño inferior a 20 nm y se observa un mayor rendimiento en la velocidad de reacción a medida que se incrementa la temperatura de reacción (9). Por otra parte, Cheng et al. mostraron que la adición de glucosa, como agente reductor, favorecía el proceso, obteniéndose AgNPs de tamaño inferior a 10 nm. En la misma línea, también se comprobó que el aumento de la basicidad del medio mostraba bandas de resonancia de mayor intensidad en espectroscopia UV/VIS, consecuencia del aumento en el número de nanopartículas sintetizadas (8). En ambos ensayos, las dispersiones de AgNPs se mantenían estables durante largos periodos, de 2 a 4 meses.

Otro polisacárido que ha sido empleado en la síntesis verde de AgNPs es el hialuronato. Se trata de una molécula de origen natural presente en la matriz extracelular del tejido conectivo, neural y epitelial. El hialuronato es un polímero formado por disacáridos constituidos por la unión de D-glucurónico y D-N-acetilglucosamina repetidos, con uniones β -(1-4) y β -(1-3) alternadas.

Los factores experimentales condicionantes de la síntesis de AgNPs usando hialuronato como agente reductor y estabilizador fueron evaluados, obteniendo los siguientes resultados. Valores elevados de temperatura y aumentos en la concentración de hialuronato dan lugar a una mayor reducción de iones Ag^+ y a un mayor tamaño de partícula. Durante las 4 primeras horas de reacción, se observa una tasa de producción alta; a partir de ese periodo, comienzan a producirse fenómenos de agregación no deseados. La caracterización mediante espectroscopia UV/Vis muestra bandas intensas y desplazadas hacia el rojo. Las imágenes obtenidas mediante TEM muestran que las AgNPs resultantes presentan un tamaño de 7, 15, 30, 40 nm, obtenidas a tiempos 1, 4, 8, 24 horas, respectivamente (7).

Diferentes estudios basados en la obtención de AgNPs mediante polímeros destacan el uso de quitosano como material de partida por ser una molécula no tóxica, biodegradable, biocompatible, poco inmunogénica y con una fuerte actividad antibacteriana. El quitosano es un polímero lineal derivado de la quitina formado por uniones β -(1-4) de los monómeros D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina. Estructuralmente, el quitosano presenta gran cantidad de grupos amino e hidroxilo, grupos químicos a los que algunos autores atribuyen la actividad reductora frente a iones Ag^+ (43). Los grupos aminos presentes en el quitosano protegen a las partículas de la agregación, ya que el nitrógeno posee un par de electrones libres capaces de adsorber AgNPs en su superficie mediante mecanismos de quelación (15).

Kannappan et al. obtuvieron quitosano a partir del exoesqueleto de crustáceos. A partir de la reducción de una solución acuosa de AgNO_3 por acción del quitosano en medio acético, sintetizaron AgNPs de 17-50 nm. La presencia de AgNPs se confirmó mediante espectroscopia UV/Vis cuando la solución viró de un marrón claro a oscuro, con un pico de absorción en torno a los 400 nm (12).

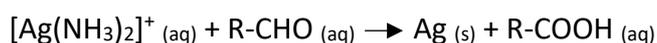
Durante la síntesis, hay que controlar los factores críticos que van a afectar a la velocidad de reacción, como la basicidad del medio, el peso molecular del quitosano y los productos de degradación del quitosano (PDQ). Twu et al. observaron que un aumento en la basicidad del medio produce un incremento de la degradación del quitosano y del ratio de PDQ. Al aumentar la cantidad de PDQ, aumenta también la disponibilidad de electrones susceptibles

de ser captados por los iones Ag^+ , por lo que se reducen a átomos Ag^0 y aumenta la velocidad de reacción (44). También se comparó el uso de reactivos de distinto peso molecular. Las moléculas evaluadas fueron el quitosano, PDQ de alto peso molecular y PDQ de bajo peso molecular, obtenidos mediante la actividad catalítica de *Bacillus licheniformis*. La determinación por espectroscopia UV/Vis confirmó que, a menor peso molecular de los polímeros, mayor es la velocidad de reacción y su polidispersión (45).

Nuevas investigaciones han arrojado datos sobre los beneficios de la obtención de AgNPs híbridas ligadas a moléculas de quitosano. La gran cantidad de grupos aminos e hidroxilos confieren a la matriz polimérica una gran capacidad de adsorción de metales. Liang et al. desarrollaron un método de reticulación en dos pasos para la obtención del complejo quitosano-AgNPs. En un primer paso, se lleva a cabo la formación de AgNPs con glucosa, como agente reductor, y PVP, como agente estabilizador (70 °C / 10 min). Posteriormente, se procede al ensamblaje tras la adición de una disolución acética de quitosano, en condiciones de altas temperaturas. Las microesferas formadas se aíslan por un proceso de liofilización (46). La preformación de las AgNPs puede realizarse mediante una gran variedad de métodos; Senthilkumar et al. llevó a cabo una síntesis biológica usando el extracto de las hojas de *T. portulacifolium* como agente reductor (31).

5.2.2 Reacción de Tollens

La reacción de Tollens es un método de síntesis verde que permite obtener AgNPs de tamaño controlado en un único paso. El reactivo de Tollens es una solución de amoníaco (NH_3) con AgNO_3 , como agentes reductores se emplean glúcidos, que presentan grupos aldehído, y se usa agua como solvente ambientalmente benigno. El control de las condiciones experimentales es crucial, ya que el tamaño de partícula, su distribución y su estabilidad están condicionadas por la concentración de NH_3 , el pH y la temperatura durante el proceso de reducción (10). El esquema de la reacción general es:



La fuente de plata es el complejo iónico $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$, producto de la interacción de los iones Ag^+ con NH_3 en medio acuoso. En el seno de la reacción, los iones Ag^+ se reducen a Ag^0 sólida hidrosoluble, a la vez que los grupos aldehído (R-CHO) se oxidan a grupos carboxílicos (R-COOH). De esta forma, se obtienen AgNPs de tamaño 20-50 nm. EL control de las condiciones experimentales es crucial, ya que, se ha observado una relación directa entre la concentración de amoníaco del medio y el aumento de tamaño de las partículas obtenidas, usando glucosa como agente reductor. Su seguimiento se realiza mediante espectrofotometría, donde las AgNPs muestran una banda de absorción intensa en torno a los 420 nm (11).

Le et al. llevaron a cabo un experimento con estimulación UV empleando glucosa como agente reductor. El resultado fue la obtención de AgNPs con un tamaño 9-10 nm, una distribución de tamaño muy estrecha y una gran estabilidad, favorecida por el uso de ácido oleico como surfactante (10).

Con el objetivo de optimizar el proceso de síntesis de AgNPs, se realizaron varios experimentos que valoran: la actividad de los monosacáridos (glucosa / galactosa), la actividad de los disacáridos (maltosa / lactosa), la concentración de NH_3 (5 mM / 0,2 M) y el pH del medio

(11,5 / 13). En la discusión de los resultados, se muestra que el uso de disacáridos a un pH 11,5 produce AgNPs de menor tamaño frente al experimento a pH 13. Por tanto, cuanto mayor es la basicidad del medio, mayor es el tamaño de partícula y la polidispersión de estas. Por otro lado, al compararse el uso de los distintos glúcidos, se obtuvieron los mejores resultados con la maltosa. Además, como se había demostrado anteriormente, el empleo de concentraciones altas de NH_3 en la solución repercute en la obtención de tamaños de partícula mayores. La estabilización de las partículas se llevó a cabo mediante una mezcla de surfactantes –dodecil sulfato sódico-SDS y polioxitilensorbitato, monoleato Tween 80– (47), o un polímero –polivinilpirrolidona-PVP360– (48).

5.2.3 Irradiación

La síntesis de AgNPs mediante irradiación difiere de otros métodos tradicionales en que no requiere catálisis adicionales ni temperaturas elevadas, y no utiliza agentes reductores ni moldes. Se considera un método verde porque los solventes usados son benignos para el medio ambiente y, además, no produce ningún desecho químico tóxico.

Shao et al. estudiaron la obtención de AgNPs mediante periodos cortos de irradiación con luz UV (≈ 5 min / 500 W). Como solvente de la disolución de AgNO_3 utilizaron, por un lado, agua y, por otro, etanol. Así, obtuvieron de forma sencilla AgNPs con un tamaño de 2 nm y 20 nm, respectivamente. Los factores experimentales –la concentración de AgNO_3 , la potencia de irradiación, el tiempo de irradiación y la distancia entre la lámpara y la disolución– condicionan el tamaño y la forma de las AgNPs. Se observó un mayor rendimiento y agregados de menor tamaño con el uso de etanol en comparación con la reacción en medio acuoso, debido a que el etanol es un agente reductor potente. De este ensayo se concluye que la obtención de AgNPs resulta de la descomposición directa de AgNO_3 por irradiación de luz UV (49).

Otros métodos de síntesis mediada por irradiación fueron estudiados por Tsuji et al. El experimento fue llevado a cabo por ablación láser con una potencia de 36 J/cm^2 sobre una disolución acuosa de plata durante 30 minutos. El tamaño de partícula y la distribución del tamaño de los coloides de plata se vieron afectados por la cantidad de pulsos láser irradiados y por la longitud de onda del láser. Se consiguieron menores tamaños de partícula y una distribución más estrecha a mayor número de pulsos y a menor longitud de onda. Para comprobar que el cambio de longitud de onda permite controlar el tamaño, se irradió el láser a 1064, 522, 352 nm, obteniéndose AgNPs desde los 30 nm hasta los 12 nm, respectivamente. El uso de la irradiación adicional a 532 nm sobre los coloides permitió un mayor rendimiento y control del tamaño de partícula (50).

6 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y APLICACIONES DE LAS AGNPS

Actualmente, la actividad antimicrobiana de las AgNPs es objeto de numerosas investigaciones debido a que el reto de la medicina moderna es la identificación de nuevos medicamentos frente a bacterias resistentes a antibióticos comunes. Las AgNPs poseen una actividad antimicrobiana más potente a menores dosis que la plata metálica en bruto. Además, las AgNPs poseen una gran superficie específica activa y una alta densidad de carga superficial, propiedades necesarias para combatir los mecanismos bacterianos (46).

Entre los mecanismos de acción citotóxica de las AgNPs frente a las bacterias más aceptados destacan la producción de especies reactivas de oxígeno (EOR), la liberación de iones Ag^+ y la modificación de la membrana por contacto. En esta sección se pretenden describir los principales mecanismos y mostrar algunos ejemplos de sus aplicaciones en diversos campos.

Wu et al. valoraron la actividad antimicrobiana de AgNPs con distinto tamaño (2, 12 y 32 nm) frente a cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* por los métodos de dilución en caldo, difusión en disco y medición de la densidad óptica. Las AgNPs de menor radio mostraron la actividad antimicrobiana más potente. Los resultados del experimento revelaron eficacia frente a ambas cepas bacterianas, manifestando un carácter inhibitorio superior en bacterias Gram-negativas (*E. coli*) que en Gram-positivas (*S. aureus*). Como mecanismo de acción, se propuso que el contacto de las AgNPs con la pared del microbio provocaba una disrupción en la membrana, lo que fue confirmado mediante SEM, y en consecuencia inducía la muerte celular. Además, se observó un incremento paulatino en la concentración de iones Ag^+ capaces de formar fuertes interacciones con componentes del citoplasma microbiano, actuando sinérgicamente como mecanismo en la muerte bacteriana (51).

Las infecciones nosocomiales causadas por *E. coli* y *S. aureus* tras el implante de prótesis constituyen una de las complicaciones más graves y frecuentes en la cirugía. Con el objetivo de minimizar estas dificultades, se evaluó el recubrimiento de implantes de titanio con AgNPs (4, 10, 40 nm). Los resultados mostraron una fuerte actividad biocida, más potente frente a *E. coli* (99%) que frente a *S. aureus* (90%), siendo el tamaño de partícula más eficaz el de 10 nm. Se determinó el mecanismo de muerte celular mediante la medición del número de EOR por fluorescencia, que mostró una gran cantidad de radicales libres formados entre las primeras 3-6 horas, responsables del daño celular. Además, se estudió la influencia de la conductividad del material del implante sobre las AgNPs. Los materiales evaluados fueron titanio (Ti, conductor), silicio (Si, semiconductor) y óxido de silicio (SiO_2 , aislante). A mayor conductividad del material ($Ti > Si > SiO_2$), mayor es la transferencia de electrones, por lo que se generan niveles de estrés oxidativo más altos en la bacteria y, por tanto, la actividad microbiana es más potente (52).

Salem et al. investigaron el uso de AgNPs frente a cepas de *Vibrio cholerae*, patógeno causante de la colera, y *E. coli enterotoxigénica* (ETEC), ambos microorganismos causantes de cuadros diarreicos graves que pueden ocasionar la muerte del paciente, sobre todo en el caso de *Vibrio*. El estudio fue llevado a cabo con AgNPs de un tamaño en torno a los 90-100 nm, se determinó la concentración mínima inhibitoria y se estudió la inhibición de la actividad metabólica. Los resultados obtenidos para ambas pruebas *in vitro* mostraron una actividad antimicrobiana reproducible tras 2 horas, más potente contra *V. cholerae*. Además, se estudió su actividad *in vivo* por vía oral en ratones infectados, obteniéndose tasas de colonización entre 75 y 100 veces menores a las de la muestra control. Debido a su obtención sencilla y económica, las AgNPs se han convertido en una potencial terapia antimicrobiana en países en desarrollo, en los cuales las infecciones por ambas bacterias suponen la segunda causa de muerte más frecuente, con elevada letalidad en niños (53).

Como ya se ha comentado, han surgido nuevas cepas bacterianas resistentes a antibióticos de uso común, como *Pseudomonas aeruginosa*, patógeno oportunista Gram-negativo al cual se le atribuye una gran morbilidad y mortalidad. *P. aeruginosa* posee una gran capacidad de colonización, formando biopelículas que se adhieren a tejidos y órganos, por lo que causa graves enfermedades, como endocarditis, otitis media, prostatitis crónica, fibrosis quística e infecciones nosocomiales. Palanisamy et al. estudiaron la actividad antimicrobiana de las AgNPs frente a cepas de *P. aeruginosa* resistente a múltiples fármacos –carbapenemas, cefalosporinas, fluoroquinolonas y aminoglucósidos–. Los resultados mostraron que las AgNPs de tamaño 20-30 nm pueden llegar a inhibir hasta en un 67 % el crecimiento bacteriano en un

periodo de 24 horas. Por tanto, las AgNPs constituyen una terapia alternativa para reducir la gravedad de las infecciones causadas por cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes (54).

En la misma línea, Saravanan y Nanda comprobaron la eficacia de las AgNPs frente a cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) y *Staphylococcus epidermidis* resistente a meticilina (SERM) con los métodos de difusión en agar y difusión en disco. Un primer experimento con AgNPs obtenidas a partir de *S. aureus* (55) con un tamaño de 160-180 nm y posteriormente con AgNPs obtenidas a través a partir de *Aspergillus clavatus* (35) con un tamaño de 550-650 nm. Ambas muestras mostraron actividad microbiana, con halos de inhibición más grandes en SARM que en SERM. Además, las AgNPs de menor tamaño también demostraron inhibición del crecimiento de *Streptococcus pyogenes*. El mecanismo de acción biocida propuesto fue la inhibición de la síntesis de la pared celular, con posterior plasmólisis bacteriana.

Asimismo cabe destacar el uso de AgNPs frente a cepas multirresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* (56), agente etiológico de la tuberculosis y microorganismo patógeno con mayor letalidad a nivel mundial. Seth et al. modelaron AgNPs tapizadas con albúmina de suero bovino (AgNPs-ASB) con el objetivo de medir su actividad frente al patógeno, ya que los tratamientos convencionales provocan muchos efectos adversos y requieren monitorización constante. Las AgNPs-ASB, de tamaño aproximado de 6 nm, presentaron una fuerte actividad biocida sobre distintas cepas de *M. tuberculosis*. Los mecanismos de acción propuestos fueron la disrupción de la pared celular y la internalización de las AgNPs-ASB en el interior celular, impidiendo los procesos fisiológicos de las bacterias. Los mecanismos propuestos se apoyaron en la observación por TEM de agregados citoplasmáticos correspondientes a AgNPs-ASB.

Las infecciones por *Helicobacter Pylori*, factor de riesgo primario en la aparición de úlcera gástrica y cáncer gástrico, es un microorganismo resistente a antibióticos comunes –penicilina y metronidazol–. Gopinath et al. obtuvieron una potente actividad biocida de AgNPs, con un tamaño 6-16 nm, frente a las cepas NCTC11637 y UM066 de *H. pylori* mediante la difusión en disco de agar sangre. La interacción de los iones Ag^+ con la membrana bacteriana y con los grupos tioles de enzimas vitales provocan la inhibición de la replicación de ADN y ,finalmente, la muerte celular. En el mismo ensayo también se demostró la capacidad biocida frente a *Estafilococo aureus*, *Escherichia coli* ,*Bacillus cereus* y *Pseudomonas aeruginosa* (57).

Anteriormente, se ha explicado el proceso de síntesis verde de AgNPs híbridas utilizando el quitosano como agente reductor y estabilizador. Además, el quitosano confiere una mayor estabilidad y una mayor capacidad de adhesión en el lugar de acción, por lo que aumenta la eficacia de las AgNPs frente a microorganismos patógenos. Además, es una molécula poco lesiva y citotóxica en el organismo humano, buen candidato como prevención de resistencias.

En cuanto al complejo quitosano-AgNPs, es necesario controlar su tamaño y su polidispersión ya que, a menor tamaño de partícula, permite establecer una interacción con la diana terapéutica bacteriana más cercana y, por tanto, mejorará la acción bactericida. El método de síntesis consta de dos pasos, primero se sintetizan las AgNPs y, posteriormente, se hibridan con el quitosano (Figura 3). Con el fin de optimizar el proceso, se deben definir los parámetros experimentales que condicionan las características de las AgNPs. Las quitosano-AgNPs de menor tamaño se obtienen cuando aumenta la reticulación del quitosano durante la hibridación. Los factores que favorecen la reticulación son el aumento de la temperatura y la concentración del agente reticulante (glucosa). Por otro lado, se logró obtener un diámetro de partícula más pequeño cuanto menor fue el número de AgNPs previo a la hibridación, debido a que se evitan fenómenos de aglomeración (46).

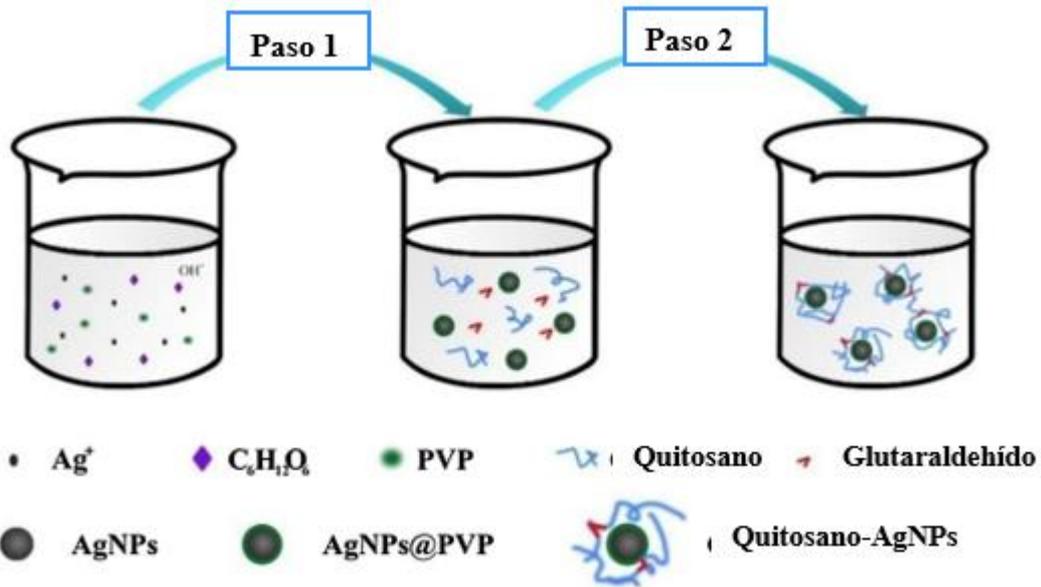


Figura 3: Procedimiento de síntesis del complejo quitosano-AgNPs (46)

El mecanismo de acción del complejo quitosano-AgNPs propuesto por Liang et al. fue una acción sinérgica entre las propiedades catiónicas del quitosano y la liberación de radicales libres por las AgNPs (Figura 4). Los radicales libres generados en la superficie de las AgNPs alteran los lípidos de la membrana bacteriana, además de penetrar en el interior celular e interrumpir las funciones vitales, induciendo la muerte celular. El quitosano es una molécula catiónica sin capacidad de penetración en la bacteria, pero capaz de interactuar con la membrana superficial negativa de algunas bacterias, como resultado interrumpe las funciones de la membrana y provoca la lisis celular. Su eficacia se probó para evitar la putrefacción y descomposición de fruta, en este caso con cerezas, provocadas por los siguientes microorganismos: *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Penicillium citrinum*. En el estudio se valoró la apariencia, la velocidad de descomposición y la pérdida de peso a lo largo del tiempo. Se obtuvieron resultados satisfactorios respecto a la actividad biocida de las quitosano-AgNPs, superior a la de AgNPs y muy superior a la del quitosano, verificando además la acción sinérgica de las moléculas híbridas (46).

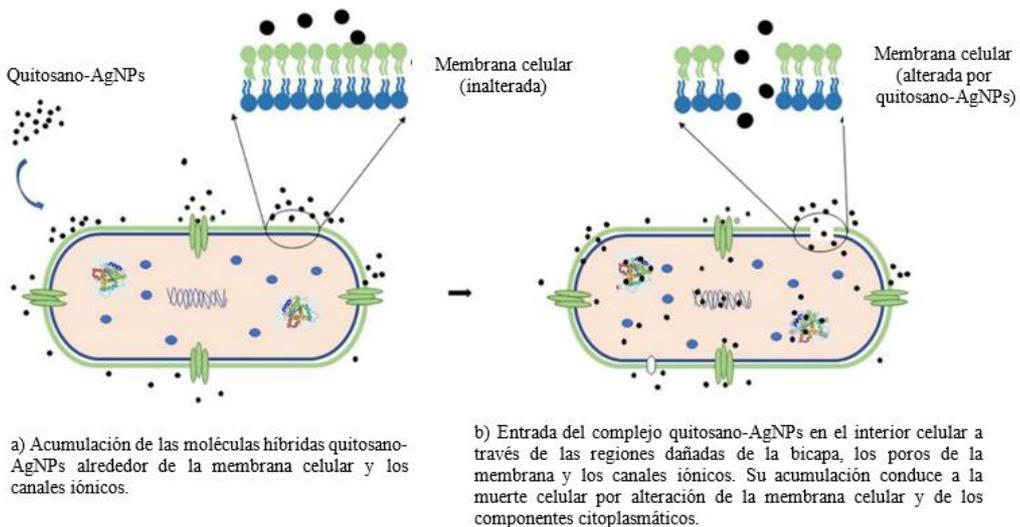


Figura 4: Esquema del mecanismo de acción de las AgNPs tapizadas con quitosano (31)

Además, otros autores estudiaron la actividad antimicrobiana de las quitosano-AgNPs frente a *E. coli* y *Serratia marcescens* por el método clásico de difusión en agar, mostrando capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias. Las microesferas suponen una posible herramienta para la industria biomédica y agroalimentaria (31).

7 TOXICIDAD Y RESISTENCIA

El conocimiento actual del impacto de los nanomateriales en la salud es escaso debido al reciente uso de estos materiales y al bajo número de estudios llevados a cabo. Por ello, el conocimiento del comportamiento de las AgNPs en contacto con sistemas biológicos es limitado. En esta sección se pretende recoger los estudios más relevantes sobre la toxicidad de las AgNPs en organismos vivos.

Estudios sobre la distribución orgánica de las AgNPs en ratones han revelado que se localizan, principalmente, en hígado, bazo y pulmón, lo que no es de extrañar ya que son órganos con un papel fundamental en la eliminación de tóxicos y con mayor número de células fagocíticas (58). Distintos estudios sugieren que los efectos citotóxicos de las AgNPs son causados por estrés oxidativo (59,60). Cuando el estrés oxidativo supera la capacidad antioxidante de la célula, los radicales libres dañan proteínas, lípidos y ADN y, cuando el daño es severo, se activan cascadas de señalización que dan lugar a moléculas proinflamatorias que inducen la muerte celular.

Partiendo de un estudio *in vitro*, Parque et al. (61) ensayaron el efecto de AgNPs con tamaños diferentes 20, 80, 110 nm sobre macrófagos y fibroblastos cultivados y proporcionados por "American Type Culture Collection". Entre los distintos procesos fisiológicos que se evaluaron, se encuentra la actividad metabólica celular, la integridad de membrana, la generación de EOR celular y acelular, los marcadores inflamatorios, la genotoxicidad y la diferenciación celular. En todos los ensayos realizados, las AgNPs de 20 nm mostraron una respuesta tóxica más potente que las de mayor tamaño, generando un mayor daño celular en los fibroblastos. Se ha de tener en cuenta que la cinética y el patrón de distribución varían en función del tamaño, la superficie específica y número de partículas. En el mismo estudio se comparó el daño celular asociado a los iones Ag^+ . Los resultados indicaron que las nanopartículas muy pequeñas, inferiores a los 5 nm, eran más lesivas pero que a tamaños de partículas de entre 20-50 nm el daño celular se equiparaba. Tanto para AgNPs como para iones Ag^+ , las concentraciones que generan la citotoxicidad fueron muy superiores a las concentraciones en las que se detecta actividad antimicrobiana por lo que es posible poder establecer en un futuro intervalos de seguridad con acción terapéutica.

La acción citotóxica de las AgNPs sobre las mitocondrias supone una preocupación debido a que es el orgánulo encargado de la necesidad bioenergética de la célula y su equilibrio homeostático. Se desconoce si las nanopartículas llegan a la mitocondria directamente o como consecuencia del daño oxidativo, pero su presencia genera déficits de ATP y apoptosis celular. Entre los daños producidos sobre la mitocondria, Hussain et al. (62) observaron una pudieron discernir la disminución del potencial de la membrana mitocondrial, el aumento de EOR y la disminución de los niveles de glutatión reducido (GSH) en células hepáticas de ratas. Un ensayo sobre la influencia de AgNPs, con un tamaño de 40 y 80 nm, sobre mitocondrias expuso deterioros en las funciones bioenergéticas debido a una disminución en el potencial de membrana, respiración celular y permeabilidad de la membrana. Con todo ello, se produce la inhibición de la fosforilación oxidativa con el consiguiente déficit energético y finalmente se

produce la muerte celular. Estos efectos se producen a concentraciones superiores de las dosis terapéuticas propuestas (63)

Como consecuencia de la introducción de AgNPs en diferentes sistemas médicos o farmacológicos, ha sido necesario valorar su actividad tóxica sobre la reproducción y la fertilidad. Las nanopartículas son capaces de interactuar y alterar el ADN dando lugar a células tumorogénicas o mutagénicas. Si estas alteraciones se producen en células participes en la línea germinal puede ocasionar alteraciones en la tasa de reproductibilidad y en la salud de los descendientes que se transmitan mediante mecanismos genéticos o epigenéticos. Asare (64) llevo a cabo un ensayo en el cual exponía nanopartículas (20 nm) y subpartículas (200 nm) a células testiculares obtenidas de ratones, permitiendo crear un modelo de estudio sobre la capacidad reproductiva masculina. Tras 24 horas de exposición se observó que hubo una potente disminución de células testiculares viables para ambos tamaño de partícula, incrementándose hasta las 48 horas. El mecanismo de toxicidad propuesto es la disrupción de la respiración celular por parte de la mitocondria, apoyando el trabajo realizado por Hussain anteriormente. La toxicidad en la fertilidad y la reproducción se observa a concentraciones superiores al efecto terapéutico.

8 CONCLUSIÓN

Múltiples métodos de síntesis verde de AgNPs utilizando componentes ambientalmente benignos han demostrado ser rápidos y eficaces en el control de la producción de nanopartículas, permitiendo una producción sostenible libre de residuos tóxicos. Aunque no se conocen todavía los mecanismos de interacción con las bacterias, se ha mostrado una actividad antimicrobiana potente frente a distintos grupos de bacterias, otorgándoles propiedades adecuadas como potencial herramienta terapéutica frente a infecciones y a la resistencia a antibióticos. La evaluación de la toxicidad en el organismo humano debe de ser estudiada *in vivo* en profundidad, con el fin de estimar su seguridad y las consecuencias de su uso en medicina y la industria agroalimentaria, en especial la distinción entre la exposición a las AgNPs y a iones Ag^+ .

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Bhol KC, Alroy J, Schechter PJ. Anti-inflammatory effect of topical nanocrystalline silver cream on allergic contact dermatitis in a guinea pig model. *Clin Exp Dermatol.* 2004;29(3):282–7.
2. Gaikwad S, Ingle A, Gade A, Rai M, Falanga A, Incoronato N, et al. Antiviral activity of mycosynthesized silver nanoparticles against herpes simplex virus and human parainfluenza virus type 3. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:4303–14.
3. Jebril S, Khanfir Ben Jenana R, Dridi C. Green synthesis of silver nanoparticles using *Melia azedarach* leaf extract and their antifungal activities: In vitro and in vivo. *Mater Chem Phys.* 2020;248(March).
4. Ahmad S, Munir S, Zeb N, Ullah A, Khan B, Ali J, et al. Green nanotechnology: A review on green synthesis of silver nanoparticles — An ecofriendly approach. *Int J Nanomedicine.* 2019;14:5087–107.
5. Van Hying DL, Klemperer WG, Zukoski CF. Characterization of colloidal stability during precipitation reactions. *Langmuir.* 2001;17(11):3120–7.
6. Sakai H, Kanda T, Shibata H, Ohkubo T, Abe M. Preparation of highly dispersed core/shell-type titania nanocapsules containing a single Ag nanoparticle. *J Am Chem Soc.* 2006;128(15):4944–

- 5.
7. Xia N, Cai Y, Jiang T, Yao J. Green synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction with hyaluronan. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2011;86(2):956–61.
8. Cheng KM, Hung YW, Chen CC, Liu CC, Young JJ. Green synthesis of chondroitin sulfate-capped silver nanoparticles: Characterization and surface modification. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2014;110:195–202.
9. Young J jong, Cheng K ming, Young Y an, Chen X an, Chen Y hao, Chang T yao, et al. Chondroitin sulfate-stabilized silver nanoparticles: Improved synthesis and their catalytic, antimicrobial, and biocompatible activities. *Carbohydr Res* [Internet]. 2018;457:14–24.
10. Le AT, Huy PT, Tam PD, Huy TQ, Cam PD, Kudrinskiy AA, et al. Green synthesis of finely-dispersed highly bactericidal silver nanoparticles via modified Tollens technique. *Curr Appl Phys* [Internet]. 2010;10(3):910–6.
11. Soukupová J, Kvítek L, Panáček A, Nevěčná T, Zbořil R. Comprehensive study on surfactant role on silver nanoparticles (NPs) prepared via modified Tollens process. *Mater Chem Phys*. 2008;111(1):77–81.
12. Priya K, Vijayakumar M, Janani B. Chitosan-mediated synthesis of biogenic silver nanoparticles (AgNPs), nanoparticle characterisation and in vitro assessment of anticancer activity in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Int J Biol Macromol*. 2020 Apr 15;149:844–52.
13. Aranaz I, Castro C, Heras A, Acosta N. On the ability of low molecular weight chitosan enzymatically depolymerized to produce and stabilize silver nanoparticles. *Biomimetics*. 2018;3(3):7–11.
14. Basavaraja S, Balaji SD, Lagashetty A, Rajasab AH, Venkataraman A. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*. *Mater Res Bull*. 2008;43(5):1164–70.
15. Kalaivani R, Maruthupandy M, Muneeswaran T, Hameedha Beevi A, Anand M, Ramakritinan CM, et al. Synthesis of chitosan mediated silver nanoparticles (Ag NPs) for potential antimicrobial applications. *Front Lab Med* [Internet]. 2018;2(1):30–5.
16. Mittal AK, Chisti Y, Banerjee UC. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2013;31(2):346–56.
17. Edison TJI, Sethuraman MG, Karupiah M, Rajmohan R, Dipankar C, Murugan S, et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Ixora coccinea* leaves extract. *Mater Res Bull* [Internet]. 2013;47(2):112–9.
18. Selvakumar P, Sithara R, Viveka K, Sivashanmugam P. Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Acalypha hispida* and its application in blood compatibility. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2018;182(December 2017):52–61.
19. Jagajjanani Rao K, Paria S. Green synthesis of silver nanoparticles from aqueous *Aegle marmelos* leaf extract. *Mater Res Bull* [Internet]. 2013;48(2):628–34.
20. Gomathi M, Prakasam A, Rajkumar P V. Green Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Using *Amorphophallus paeoniifolius* Leaf Extract. *J Clust Sci* [Internet]. 2019;30(4):995–1001.
21. Jyoti K, Baunthiyal M, Singh A, Fatimah I, Ravichandran V, Vasanthi S, et al. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Fritillaria* flower extract and their antibacterial activity against some human pathogens. *Gene Reports* [Internet]. 2019;205(3):217–27.
22. Bindhu MR, Vijaya Rekha P, Umamaheswari T, Umadevi M. Antibacterial activities of *Hibiscus*

- cannabinus stem-assisted silver and gold nanoparticles. *Mater Lett* [Internet]. 2014;131:194–7.
23. Kumar V, Singh S, Srivastava B, Bhadouria R, Singh R. Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Holoptelea integrifolia* and preliminary investigation of its antioxidant, anti-inflammatory, antidiabetic and antibacterial activities. *J Environ Chem Eng* [Internet]. 2019;7(3):103094.
 24. Dipankar C, Murugan S. The green synthesis, characterization and evaluation of the biological activities of silver nanoparticles synthesized from *Iresine herbstii* leaf aqueous extracts. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2012;98:112–9.
 25. Karuppiah M, Rajmohan R. Green synthesis of silver nanoparticles using *Ixora coccinea* leaves extract. *Mater Lett* [Internet]. 2013;97:141–3.
 26. Molina GA, Esparza R, López-Miranda JL, Hernández-Martínez AR, España-Sánchez BL, Elizalde-Peña EA, et al. Green synthesis of Ag nanoflowers using *Kalanchoe Daigremontiana* extract for enhanced photocatalytic and antibacterial activities. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2019;180(May):141–9.
 27. Bindhu MR, Umadevi M, Esmail GA, Al-Dhabi NA, Arasu MV. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles from *Moringa oleifera* flower and assessment of antimicrobial and sensing properties. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2020;205(February):111836.
 28. Ravichandran V, Vasanthi S, Shalini S, Shah SAA, Tripathy M, Paliwal N. Green synthesis, characterization, antibacterial, antioxidant and photocatalytic activity of *Parkia speciosa* leaves extract mediated silver nanoparticles. *Results Phys* [Internet]. 2019;15(December 2018):102565.
 29. Dubey SP, Lahtinen M, Sillanpää M. Green synthesis and characterizations of silver and gold nanoparticles using leaf extract of *Rosa rugosa*. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* [Internet]. 2010;364(1–3):34–41.
 30. Hernández-Morales L, Espinoza-Gómez H, Flores-López LZ, Sotelo-Barrera EL, Núñez-Rivera A, Cadena-Nava RD, et al. Study of the green synthesis of silver nanoparticles using a natural extract of dark or white *Salvia hispanica* L. seeds and their antibacterial application. *Appl Surf Sci* [Internet]. 2019;489(April):952–61.
 31. Senthilkumar P, Yaswant G, Kavitha S, Chandramohan E, Kowsalya G, Vijay R, et al. Preparation and characterization of hybrid chitosan-silver nanoparticles (Chi-Ag NPs); A potential antibacterial agent. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2019;141:290–7.
 32. Edison TJI, Sethuraman MG. Instant green synthesis of silver nanoparticles using *Terminalia chebula* fruit extract and evaluation of their catalytic activity on reduction of methylene blue. *Process Biochem* [Internet]. 2012;47(9):1351–7.
 33. Jyoti K, Baunthiyal M, Singh A. Characterization of silver nanoparticles synthesized using *Urtica dioica* Linn. leaves and their synergistic effects with antibiotics. *J Radiat Res Appl Sci* [Internet]. 2016;9(3):217–27.
 34. Muniyappan N, Nagarajan NS. Green synthesis of silver nanoparticles with *Dalbergia spinosa* leaves and their applications in biological and catalytic activities. *Process Biochem* [Internet]. 2014;49(6):1054–61.
 35. Saravanan M, Nanda A. Extracellular synthesis of silver bionanoparticles from *Aspergillus clavatus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2010;77(2):214–8.

36. Juibari MM, Abbasalizadeh S, Jouzani GS, Noruzi M. Intensified biosynthesis of silver nanoparticles using a native extremophilic *Ureibacillus thermosphaericus* strain. *Mater Lett* [Internet]. 2011;65(6):1014–7.
37. Shivaji S, Madhu S, Singh S. Extracellular synthesis of antibacterial silver nanoparticles using psychrophilic bacteria. *Process Biochem* [Internet]. 2011;46(9):1800–7.
38. Priyadarshini S, Gopinath V, Meera Priyadharsshini N, MubarakAli D, Velusamy P. Synthesis of anisotropic silver nanoparticles using novel strain, *Bacillus flexus* and its biomedical application. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2013;102:232–7.
39. Raveendran P, Fu J, Wallen SL. Completely “Green” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2003;125(46):13940–1.
40. Vigneshwaran N, Nachane RP, Balasubramanya RH, Varadarajan P V. A novel one-pot “green” synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch. *Carbohydr Res.* 2006;341(12):2012–8.
41. Torres-Castro, Alejandro & González, Virgilio & Garza M& G-G. Síntesis de nanocompuestos de plata con almidón. *Ingenierías.* 2011;
42. Huang H, Yang X. Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: A green method. *Carbohydr Res.* 2004;339(15):2627–31.
43. Aranaz I, Mengibar M, Harris R, Panos I, Miralles B, Acosta N, et al. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Curr Chem Biol.* 2012;3(2):203–30.
44. Twu YK, Chen YW, Shih CM. Preparation of silver nanoparticles using chitosan suspensions. *Powder Technol.* 2008;185(3):251–7.
45. Affes S, Maalej H, Aranaz I, Kchaou H, Acosta N, Heras Á, et al. Controlled size green synthesis of bioactive silver nanoparticles assisted by chitosan and its derivatives and their application in biofilm preparation. *Carbohydr Polym.* 2020;236(December 2019).
46. Liang J, Wang J, Li S, Xu L, Wang R, Chen R, et al. The size-controllable preparation of chitosan/silver nanoparticle composite microsphere and its antimicrobial performance. *Carbohydr Polym.* 2019;220(May):22–9.
47. Kvítek L, Pucek R, Panáček A, Novotný R, Hrbáč J, Zbořil R. The influence of complexing agent concentration on particle size in the process of SERS active silver colloid synthesis. *J Mater Chem* [Internet]. 2005;15(10):1099–105.
48. Panáček A, Kvítek L, Pucek R, Kolář M, Večeřová R, Pizúrová N, et al. Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J Phys Chem B.* 2006;110(33):16248–53.
49. Shao K, Yao J nian. Preparation of silver nanoparticles via a non-template method. *Mater Lett.* 2006;60(29–30):3826–9.
50. Tsuji T. Preparation of silver nanoparticles by laser ablation in solution.pdf. *Appl Surf Sci.* 2002;202:80.
51. Wu Y, Yang Y, Zhang Z, Wang Z, Zhao Y, Sun L. A facile method to prepare size-tunable silver nanoparticles and its antibacterial mechanism. *Adv Powder Technol* [Internet]. 2018;29(2):407–15.
52. Wang G, Jin W, Qasim AM, Gao A, Peng X, Li W, et al. Antibacterial effects of titanium embedded with silver nanoparticles based on electron-transfer-induced reactive oxygen species. *Biomaterials* [Internet]. 2017;124:25–34.
53. Salem W, Leitner DR, Zingl FG, Schratte G, Prassl R, Goessler W, et al. Antibacterial activity of

- silver and zinc nanoparticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* [Internet]. 2015;305(1):85–95.
54. Palanisamy NK, Ferina N, Amirulhusni AN, Mohd-Zain Z, Hussaini J, Ping LJ, et al. Antibiofilm properties of chemically synthesized silver nanoparticles found against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Nanobiotechnology*. 2014;12(1):1–7.
 55. Nanda A, Saravanan M. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. 2009;5(4):452–6.
 56. Seth D, Choudhury SR, Pradhan S, Gupta S, Palit D, Das S, et al. Nature-inspired novel drug design paradigm using nanosilver: Efficacy on multi-drug-resistant clinical isolates of tuberculosis. *Curr Microbiol*. 2011;62(3):715–26.
 57. Gopinath V, Priyadarshini S, Loke MF, Arunkumar J, Marsili E, MubarakAli D, et al. Biogenic synthesis, characterization of antibacterial silver nanoparticles and its cell cytotoxicity. *Arab J Chem* [Internet]. 2017;10(8):1107–17.
 58. Lankveld DPK, Oomen AG, Krystek P, Neigh A, Troost - de Jong A, Noorlander CW, et al. The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. *Biomaterials* [Internet]. 2010;31(32):8350–61.
 59. Park EJ, Yi J, Kim Y, Choi K, Park K. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicol Vitro* [Internet]. 2010;24(3):872–8.
 60. Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, Dang DA, Hoffmann HJ, Autrup H. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicol Lett*. 2009;190(2):156–62.
 61. Park MVDZ, Neigh AM, Vermeulen JP, de la Fonteyne LJJ, Verharen HW, Briedé JJ, et al. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials* [Internet]. 2011;32(36):9810–7.
 62. Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol Vitro*. 2005;19(7):975–83.
 63. Teodoro JS, Simões AM, Duarte F V., Rolo AP, Murdoch RC, Hussain SM, et al. Assessment of the toxicity of silver nanoparticles in vitro: A mitochondrial perspective. *Toxicol Vitro* [Internet]. 2011 Apr;25(3):664–70.
 64. Asare N, Instanes C, Sandberg WJ, Refsnes M, Schwarze P, Kruszewski M, et al. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology* [Internet]. 2012;291(1–3):65–72.