

Nanopartículas de plata: Aplicaciones biomédicas

Teresa Gómez-Quintero^{a*}, Miguel A. Arroyo-Ornelas,^a Genoveva Hernández-Padrón,^b y Laura S. Acosta-Torres^c

^aLicenciatura en Tecnología, UNAM Campus Juriquilla, Querétaro, México.

^bDepartamento de Nanotecnología, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, UNAM Campus Juriquilla, Querétaro, México

^cEscuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, UNAM, León Guanajuato, México.

*E-mail: tgomez.quintero@gmail.com

Recibido 20-septiembre-2013, Aceptado 25 septiembre 2013

Resumen

El impacto de la nanotecnología en diversos ámbitos de la biomedicina se incrementa día a día, la implementación de diversos tipos y combinaciones de nanomateriales ha permitido obtener mejores herramientas para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. El uso de nanopartículas metálicas, específicamente nanopartículas de plata, se ha generalizado; algunos de los retos en su implementación es la búsqueda del método de síntesis, tamaño, morfología y dosis ideales para tratar problemas relacionados a infecciones sistémicas mediadas por microorganismos patógenos; en el desarrollo de nuevos dispositivos de diagnóstico, biosensores; y en tratamientos contra el cáncer, evidenciado el potencial que estas nanopartículas ofrecen para tratamientos médicos y preventivos.

Palabras clave: Nanopartículas de plata, efecto antimicrobiano, efecto anticancerígeno, biosensores.

1. Introducción

La inclusión de la nanotecnología en el campo de la medicina y las aplicaciones biomédicas, ha generado un amplio campo de investigación hoy en día. Las nuevas aplicaciones son motivo de interés general en el campo de la ciencia e ingeniería de materiales al igual que en procesos biológicos y como herramienta de diagnóstico para posibles enfermedades. Los nanomateriales son estructuras cuya morfología se restringe a tamaños que van entre 1 y 100 nm al menos en una dimensión del material, pero existen otras definiciones que acortan el rango o dejan entrar en la categoría de nanomaterial dimensiones mayores. Lo que vuelve atractivos a estos materiales es el hecho de que muchos de ellos mejoran sus características físico-químicas con respecto a las que presentan en bulto e incluso exhiben propiedades nuevas no observadas a escala macrométrica, por lo que muchos materiales que en bulto no pueden utilizarse para cierta aplicación sintetizados como un nanomaterial puede resultar aplicables. Existe una infinidad de nanomateriales, estudios sobre su funcionalidad y los posibles efectos secundarios de utilizar algo tan pequeño que interactúe con organismos vivos, las aplicaciones biomédicas se han incrementado con los nuevos procesos de síntesis y cualidades morfológicas de estos nanomateriales, son las nanopartículas la categoría más difundida debido a su practicidad para penetrar organismos vivos fácilmente y su capacidad de utilizarse como vehículos de liberación de fármacos, etiquetas de marcaje celular, etc. Dependiendo del tipo de nanopartículas, las aplicaciones pueden variar significativamente, casi un campo ilimitado donde todos los días se sintetizan nuevos materiales tratando de adecuar sus efectos a nuestras necesidades. Existe una

sencilla clasificación para nanopartículas que las divide en dos grandes grupos: orgánicas e inorgánicas, nos interesa hablar sobre nanopartículas metálicas, que se encuentran en el segundo grupo. Las nanopartículas metálicas se han distinguido por su versatilidad, ya que son aplicables en optoelectrónica, catálisis, procesos de remediación ambiental, biomedicina, etc.; las más utilizadas son las nanopartículas de oro, plata y cobre porque son las que muestran una dispersión más estable en suspensión. Las características observadas en las nanopartículas dependen del método de síntesis, que a su vez define el tamaño, forma, y demás propiedades físicas [1].

Las nanopartículas de plata (AgNPs) sobresalen por su potencial como herramienta en aplicaciones biomédicas, debido a sus propiedades ópticas, eléctricas, mecánicas y estructurales; su fotoactividad las promueve como agente antimicrobiano (bactericida-fungicida) y han resultado ideales para marcaje celular. Actualmente su uso más extendido es como agente antimicrobiano en una infinidad de productos, pero también se enfocan en utilizarlas como parte de biosensores y en estudios sobre su actividad antitumoral y antiviral [2].

2. Características fisicoquímicas

El tamaño, forma, tipo de superficie y estado de agregación de las nanopartículas cambiará dependiendo de su futura aplicación, por lo que las características de estas deben ser seriamente consideradas dentro del medio donde serán inmersas para mejorar rendimientos. Las nanopartículas de plata son muy eficientes para absorber y dispersar luz, su color depende del tamaño y forma en que se sintetizan; la interacción de estas nanopartículas con la luz se produce debido a que los electrones de



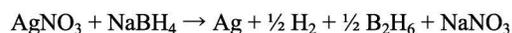
conducción de la superficie se someten a oscilación colectiva a longitudes de onda específica una vez que son excitados por una fuente de luz. Este fenómeno es conocido como resonancia de plasmón (las nanopartículas metálicas se consideran un cristal tridimensional de iones positivos inmersos en un gas de electrones deslocalizados que están en movimiento continuo generando un potencial periódico); la fuerte dispersión que exhiben estas AgNPs permite que sean fácilmente visualizadas con un microscopio convencional. Las coloraciones características para estos plasmones son azul, para resonancias de plasmón absorción UV en 450 nm y amarillo-verde, para nanopartículas esféricas con absorción UV entre 400 y 530 nm. Entre mayor sea el pico de absorción del plasmón cerca o dentro de la región infrarroja del espectro se sabe que la morfología representante de estos rangos corresponde a nanoalambres o nanodiscos de plata [3].

Las técnicas de caracterización más utilizadas para determinar tamaño y forma de estas nanopartículas son microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía de fuerza atómica (AFM). Si lo que se desea medir es el estado de agregación se requiere usar dispersión de luz dinámica (DLS) para analizarlas en solución. La espectroscopia UV-Vis es muy útil para analizar tamaños y formas del plasmón, pues a medida que aumenta el diámetro de nanopartículas el pico de resonancia se desplaza hacia longitudes de onda más largas y se amplía. Para diámetros mayores a 80 nm, el espectro UV-Vis exhibirá dos picos, el principal de la resonancia de plasmón y uno secundario que se origina por la resonancia cuadrupolar que tiene un patrón de oscilación de electrones en comparación con el patrón dipolar del pico principal; entonces, la longitud de onda máxima, la anchura del pico y el efecto de resonancias secundarias producen un espectro característico para cada plasmón con tamaño y forma de nanopartícula específica [4].

3. Métodos de síntesis

La plata coloidal es de particular interés por sus propiedades conductivas, estabilidad química, actividad catalítica y efecto antibacterial. La síntesis por reducción química es el método de síntesis más utilizado, permite obtener las AgNPs en solución acuosa o solventes orgánicos; entre los agentes reductores más comunes se encuentran borohidruros, ascorbato, citratos e hidrogeno elemental. Durante la reducción de los iones de plata los diámetros de AgNPs resultantes son variable, pues depende de la cantidad de iones de plata (Ag^+) que formen átomos de plata (Ag^0) y después del número de átomos de plata que se aglomeren en clústeres que conformarán las nanopartículas de plata coloidal. La síntesis por reducción química utiliza por lo general dos reductores para mediar la cinética de reacción y obtener

AgNPs de tamaño pequeño (alrededor de 12 nm). Un método de síntesis muy común a través de reducción química parte de sales de nitrato de plata (AgNO_3) y la utilización de borohidruro de sodio (NaBH_4) como agente reductor, para obtener dispersiones coloidales de nanopartículas de plata amarillas y con una estabilidad considerable. Un exceso de NaBH_4 promueve la formación de iones de Ag^+ y estabiliza las nanopartículas formadas; la reacción se muestra a continuación:



Las AgNPs obtenidas mediante esta ruta de síntesis son esféricas con un diámetro promedio de 12 nm y absorbancia del plasmón superficial en 400 nm, esta síntesis se realiza por nucleación de iones de plata; la absorción del NaBH_4 estabiliza el crecimiento de las nanopartículas mediante una carga superficial, la cantidad de este reductor debe ser suficiente para estabilizar las AgNPs al momento en que ocurre la reacción pero no demasiado grande como para aumentar la fuerza iónica total en la disolución y promover la agregación [5].

Otro tipo de método para sintetizarlas es a partir de agentes reductores "verdes" que suelen ser más amigables con el medio ambiente y no requiere de estabilizantes para las AgNPs en solución.

Las síntesis verdes se han clasificado en varias categorías, los métodos más populares se muestran a continuación:

- Método de polisacáridos, que consiste en la utilización de agua como solvente de suspensión y polisacáridos como estabilizante para las nanopartículas después de la nucleación (cuando los clústeres se vuelven nanopartículas); un agente estabilizante y reductor utilizado en este tipo de síntesis es la heparina cargada negativamente, pero el más común es el almidón.
- Método Tollens, que produce capas de AgNPs de diversas formas y tamaños entre 50 y 200 nm mediante la reducción del reactivo de Tollens usando un aldehído o cetona. El reactivo de Tollens es una solución de iones de plata obtenida de AgNO_3 en una forma hidratada. La formación de las AgNPs se genera en medios con baja concentración de amoníaco y glucosa, el tamaño promedio de estas estructuras es de 57 nm.
- Método por irradiación, generalmente consiste en soluciones acuosas con sales de plata y surfactantes que se irradian con una fuente de luz para formar las AgNPs con tamaño y formas definidos. Las fuentes de radiación van desde láseres, lámparas de mercurio, microondas, etc., y uno de los beneficios es que no se utilizan agentes reductores durante el proceso. Los tamaños de AgNPs varían considerablemente según los tiempos de exposición y fuente de irradiación. La siguiente imagen muestra una micrografía de

nanoprismas de plata obtenidos por un método de irradiación, figura 1.

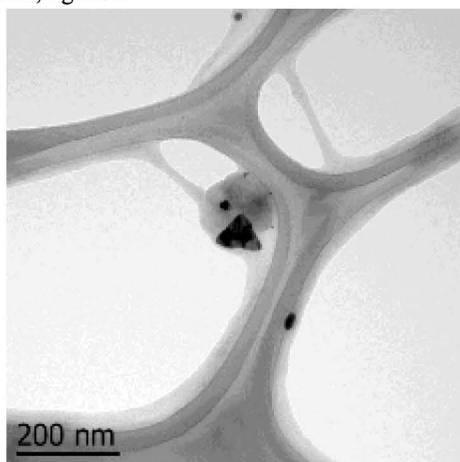


Figura 1. Microscopía TEM de nanoprismas formados a partir de AgNPs esféricas sintetizadas con borohidruro de sodio como agente reductor.

- Métodos biológicos, donde se utilizan extractos de organismos vivos y se utilizan estos como agentes reductores y estabilizadores, la reducción de los iones de plata es mediada por biomoléculas como proteínas o enzimas, aminoácidos, polisacáridos y vitaminas. Comúnmente se utilizan extractos de plantas o algas, hongos, entre otros. Incluso se utilizan microorganismos vivos (bacterias) que sintetizan las AgNPs extracelular e intracelularmente.

- Método por polioxometalatos, abreviados POMs, que son fragmentos discretos de óxidos metálicos de forma y tamaño bien definidos, solubles en agua y capaces de someterse a reacciones redox sin modificar su estructura. Los POMs actúan como reductores, fotocatalizadores, y estabilizador. Las AgNPs se sintetizan a partir de soluciones acuosas de sales de plata con POMs y varían según el tipo de polioxometalato utilizado, en general, se obtienen AgNPs esféricas con diámetro de 38 nm [6].

4. Biocompatibilidad de AgNPs

Las AgNPs tienen diferentes efectos sobre la salud humana dependiendo de la dosis que se haya incorporado y el método de síntesis de las mismas. El problema de la bioacumulación es un tema interesante que ha motivado a los investigadores a realizar estudios sobre qué tipos y tamaños de AgNPs pueden perjudicar considerablemente organismos vivos, se sabe que algunas de estas nanopartículas muestran una tendencia a acumularse en riñones y cerebro dependiendo de su habilidad para traspasar la piel. El problema que tienen las AgNPs al entrar en organismos vivos (superficies biológicas y sus fluidos o células y sus compartimentos internos) generan especies reactivas de oxígeno que produce estrés oxidativo y daño celular. Por lo anterior es que

comúnmente las AgNPs se utilizan inmersas en distintos materiales para aumentar su viabilidad, materiales biocompatibles o con tasas altas de compatibilidad con tejidos u organismos vivos, ya sean matrices poliméricas u cualquier otro material, además de analizar la dosis de nanopartículas.

Al entrar en tejidos vivos, las AgNPs tienden a aglomerarse y oxidarse, liberando iones de Ag^+ que pueden unirse a ligandos (por ejemplo, cisteína) formando complejos con Ag^+ , formando especies reactivas de oxígeno y aumentando la toxicidad las nanopartículas; hay otras reacciones por las que debe tomarse cuidado, por ejemplo los iones de calcio (Ca^{2+}) en concentraciones milimolares causan la aglomeración de las AgNPs en ensayos realizados sobre cultivos celulares (pruebas *in vitro* con medio de cultivo Liebovitz's L-15). Un medio de cultivo celular contiene esencialmente sales inorgánicas, carbohidratos, aminoácidos y suplementos (factores de crecimiento), por lo que las especies ligandos con las que los iones de plata pueden asociarse son ilimitados, con lo que podemos hacer una aproximación a los efectos de la oxidación de AgNPs en cualquier sistema vivo, y tomar serias consideraciones sobre su viabilidad, que dependerá en gran medida del pH (niveles entre 6.0 y 9.0 favorecen la oxidación de estas nanopartículas), solutos disueltos, temperatura (mayores riesgos de oxidación entre 22 y 90 °C), proteínas, lípidos, etc. Por ejemplo, con tan solo entrar en contacto con la sangre, las AgNPs pueden interactuar con alrededor de 7000 proteínas e isomorfos [7].

Los estudios sobre citotoxicidad y genotoxicidad son básicos en la determinación de niveles de daño por toxinas, pues evalúan los efectos de exposición a fármacos, materiales, etc., en función del tiempo y diferentes dosis. Una toxina puede afectar sistemas estructurales, daño genético y/o fallas funcionales. Las genotoxinas inducen daño en el ADN de sistemas vivos, algunas nanopartículas muestran efectos adversos durante la síntesis de nuevo ADN, estudios de viabilidad de AgNPs en *E. Coli* muestran que no existe daño genotóxico en concentraciones menores entre 0-32.26 mg/L en comparación con el grupo control durante ensayo SOS Chromotest [8]. Por otro parte, diversos estudios en animales, la mayoría mamíferos pequeños, han tratado de evaluar qué tamaños, morfologías y topología de AgNPs; un estudio sobre la administración intravenosa de AgNPs de tamaños bien definidos, 20 y 100 nm, durante 28 días en ratas mostró que con una dosis máxima de 6 mg/kg de peso corporal fue bien tolerada por los animales, pero a lo largo del tratamiento se observó para ambos tamaños de AgNPs retraso en el crecimiento general, aumento en el tamaño y peso del bazo; los linfocitos T y B también mostraron un incremento, además de presentar pigmentaciones color

café y negras en tejido de bazo, hígado y nódulos linfáticos por acumulación de las nanopartículas. Las AgNPs también se encontraron en algunos otros órganos. Análisis clínicos mostraron daño hepático, pero no se confirmó por pruebas de histopatología; además los niveles de células sanguíneas también se redujeron al término del experimento de 28 días. Las células inmunitarias NK se redujeron casi por completo en altas dosis de AgNPs. Por lo que se encontró que las AgNPs inducen toxicidad generalizada en ratas por exposición interna [9]. Dos de los ensayos ampliamente utilizados para determinar si materiales como las AgNPs producen citotoxicidad o genotoxicidad sobre cultivos celulares *in vitro* son los ensayos MTT y BrdU, debido a la practicidad de los ensayos y el tiempo que lleva realizarlos. Se pueden evaluar diferentes tipos de muestras de AgNPs, ya sean las soluciones coloidales o las AgNPs inmersas en otro material. El ensayo MTT se basa en la conversión de sales de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 bromuro de difenil tetrazol) en cristales de formazán dentro de las células vivas, para determinar su actividad mitocondrial, el objetivo de este ensayo es medir la viabilidad celular con un alto rendimiento sin tener que contar las células; debido a que la actividad mitocondrial está siempre activa, un aumento o descenso en esta representará linealmente la conversión de sales de formazán; luego, a partir de la concentración de sales que se mide por densidad óptica (D. O.), se puede tener una comparación entre grupos celulares que fueron expuestas o no al material (AgNPs u otros). Cualquier daño en las estructuras celulares afectará la actividad mitocondrial y se verá reflejado en la D. O. medida al final del experimento, en comparación con el grupo control [10]. El BrdU es un ensayo celular *in vitro* que mide el daño del material genético al ser expuesto a ciertas sustancias y concentraciones, la capacidad de síntesis del ADN se mide utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra bromodeoxiuridina (BrdU) que es un análogo de timidina que se incorpora en las células durante la nueva síntesis en fase S del ciclo celular (durante la replicación) justo como si esta fuera un nucleósido. Después de la posible incorporación en la célula, este análogo de timidina puede detectarse utilizando el anticuerpo monoclonal. El complejo puede ser detectado agregando un segundo sustrato que reaccione con el anticuerpo y genere color, después se mide su D. O. para tener los resultados [11].

Ambos ensayos son considerados como primera instancia para saber si un material, como pueden ser las AgNPs, sintetizadas por métodos específicos y a diferentes concentraciones resultarán dañinas para las células en ensayos de viabilidad celular.

5. Aplicaciones biomédicas

Las nanopartículas de plata tienen un amplio número de aplicaciones, como se mencionó con anterioridad, juegan un papel importante en medicina, productos de consumo, remediación ambiental, etc. Dentro del campo de la biomedicina sus aplicaciones primordiales se centran en su actividad antimicrobiana, su uso en biosensores y como agente anticancerígeno, entre otros.

5.1 Actividad antimicrobiana de AgNPs

La efectividad del efecto antimicrobiano de algunas nanopartículas se basa en la alta relación superficie-volumen y la reactividad en pequeña escala de las nanopartículas frente a agentes patógenos. Muchos nanomateriales y nanocompositos se investigan por su potencial uso como inhibidores de crecimiento antimicrobiano, agentes antimicrobianos como tal, portadores antimicrobianos o películas de embalaje con la misma característica. La incorporación de AgNPs en diversos materiales les brinda a estos una fuerte actividad mitocondrial contra un amplio espectro de bacterias, virus y hongos. Actualmente hay una infinidad de nuevos materiales que se sintetizan incluyendo AgNPs en matrices de polietileno, poliestireno, quitosán, almidón, etc., todos buscando preservar superficies sin agentes patógenos. Por ejemplo, dentro de la recolección de muestras clínicas y alimenticias, la elaboración de agaros con AgNPs promueve la esterilidad contra *Escherichia Coli* o *Listeria monocytogenes* inhibiendo su invasión y/o proliferación en otras muestras [7].

Otros microorganismos combatidos con AgNPs son *Enterococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Staphylococci*, previniendo la formación del biofilm característico en pruebas *in vitro*, además de que se han elaborado catéteres con superficies plásticas funcionalizadas con estas nanopartículas para combatir infecciones [8].

En odontología, las AgNPs han sido utilizadas para inhibir el crecimiento de *Candida albicans* y algunos otros microorganismos pertenecientes al microambiente de la cavidad oral. Las prótesis dentales base resina acrílica han sido sintetizadas con estas nanopartículas, sin embargo, no a toda concentración y método de síntesis las AgNPs reducen la adherencia y proliferación del biofilm bacteriano; el método de incorporación dentro de matrices poliméricas también influye de manera importante en la dispersión de las nanopartículas. Algunos experimentos a concentraciones de AgNPs que van de 1000 a 0.49 $\mu\text{g/ml}$ no han mostrado efecto adverso sobre el crecimiento de *C. albicans* [9].

Las bacterias como estructuras más simples y requerimientos mínimos para su proliferación han sido objeto de estudio para analizar la incorporación de AgNPs en su interior y los efectos adversos sobre diferentes especies de bacterias. Estudios sobre *E. Coli*

expuestas a AgNPs esféricas con diámetros que van de 10 a 50 nm, mostraron que después de un tiempo de exposición de dos horas a una concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$ no mostró incorporación de AgNPs al interior de las bacterias a pesar del parecido en tamaño con los organelos celulares de *E. Coli* pero sí mostraron mutaciones en la membrana externa de las nuevas colonias, existen varios estudios sobre los efectos mutágenos de AgNPs sobre especies bacterianas, afectando la funcionalidad de las membranas y produciendo la muerte de las bacterias [4]. El mecanismo de acción del efecto bactericida de las AgNPs propuesto y mayormente aceptado se basa en el cambio de la permeabilidad de la membrana celular del patógeno y la alteración de las funciones respiratorias, la inhibición de ciertas enzimas asociadas al proceso de respiración celular es el detonante para el inicio de formación de ROS que dañan a la misma célula. Si las AgNPs son lo suficientemente pequeñas (1 nm), estas pueden atravesar la membrana celular bacteriana, ensayos sobre *E. Coli*, *Vibria cholera*, *P. aeruginosa* y *Pyphillis typhus* muestran que el crecimiento de estas bacterias se inhibe a concentraciones de 75 $\mu\text{g/ml}$, además de exhibir daño en sus membranas celulares, disrupción, que puede ser causado por la interacción de las AgNPs con componentes del ADN que poseen fósforo y sulfuros evitando la replicación del material genético. También hay evidencia de que los iones de Ag^+ interactúa fuertemente con los grupos tioles de enzimas inactivándolas; los peptidoglicanos, componentes conformacional de algunas membranas microbiales (hongos y bacterias) se ven afectados directamente debido a su carga negativa, pues atraen libremente los iones de plata que desnaturalizan la membrana o pared celular. Bacterias Gram positivas se ven menos afectadas debido a que restringen el acceso de AgNPs al interior de su citoplasma con mayor eficiencia que las Gram negativas [10]. En la siguiente figura se observan los diferentes mecanismos de acción de las AgNPs sobre bacterias, en el mismo esquema se muestran todas las posibles afecciones registradas para microorganismos por la inclusión de estas nanopartículas, figura 2.



Figura 2. Mecanismos de acción de AgNPs sobre bacterias. El diagrama muestra la formación de poros, el bloqueo de transporte de electrones, la interrupción de funciones celulares básicas y la generación de especies ROS en el interior de la célula bacteriana.

5.2 Biosensores

Los biosensores y sensores químicos, son dispositivos que permiten detectar sustancias con una mayor precisión, rapidez y a un costo más asequible en comparación con los métodos analíticos convencionales. Las nanopartículas de plata se han usado principalmente en sensores electroquímicos y ópticos, aunque también se han usado directamente para censar por colorimetría. Estas se han utilizados principalmente como marcadores para ciertos compuestos, como potenciador de las señales y como transportador de electrones durante reacciones químicas o enzimáticas.

En los biosensores electroquímicos que funcionan detectando los cambios de corriente dentro de una reacción, usualmente se tienen problemas para captar los electrones sobre la superficie del electrodo, ya que estos tienden a difundirse en la solución. Para mejorar la captura se utilizan transportadores de electrones, las AgNPs han demostrado ser una excelente opción para colocar en la superficie de los electrodos [11], para realizar el proceso de inmovilización, se pueden sintetizar electroquímicamente sobre la superficie del electrodo [12]; un ejemplo es su uso para un biosensor con un sistema de avidina y biotina sobre un electrodo de oro [13], para este se conjugaron las AgNPs a la biotina y se colocaron como una segunda capa en el electrodo, la incorporación de las partículas permitió mejorar el paso de electrones a través de la capa orgánica para aumentar la cantidad de corriente en el electrodo de oro. De forma similar se han usado para un biosensor que usa un electrodo de grafeno - poliamidoamina (PAMAM) para detección de glucosa [14], en este sensor se colocó una capa de AgNPs sobre la cual se inmovilizó glucosa oxidada, al incubar muestras de sanguíneas se pudo detectar la glucosa mejorando los límites de detección y eliminando la interferencia provocada por ácido ascórbico y úrico que se presenta en los biosensores convencionales de glucosa, gracias al mejoramiento del transporte de electrones. También se ha creado otro sensor que utiliza el mismo método pero para la detección de xantina en carne adulterada usando la enzima xantina oxidasa [15].

En otros casos las AgNPs han sido usadas directamente como marcador en biosensores electroquímicos; por ejemplo se ha creado un sensor para la detección de secuencias específicas de ADN [16], este utiliza una sonda de ADN funcionalizada con un grupo tiol unida covalentemente a las AgNPs, el sensor detecta el analito por el cambio de conductividad que se produce por estas partículas. También se ha creado un sensor similar pero usando hematina para catalizar la formación de nanopartículas a partir de los iones de plata conjugados a las sondas de ADN [17], este sensor es extremadamente sensible ya que permite detectar concentraciones de hasta 1 fM. Un ejemplo más, es un sensor para la detección de glutatión [18], en este las AgNPs son unidas a la enzima

glutación oxidada, la cual se inmovilizó sobre un electrodo de polianilina y nanotubos de carbono, al incubarse el glutatión, se genera una corriente y hay un cambio de conductividad en el electrodo. A continuación se muestra el mecanismo de funcionamiento de un sensor electroquímico, Figura 3.

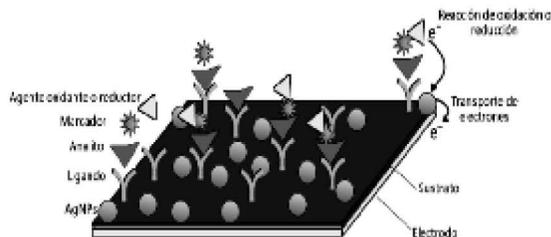


Figura 3. Esquema de funcionamiento de un biosensor electroquímico. El analito de interés es capturado por un ligando, el cual se inmoviliza sobre un sustrato que recubre el electrodo. Se usa un marcador con afinidad por el analito el cual puede ser oxidado o reducido por un agente generando un flujo de electrones. Las AgNPs transportan estos electrones hacia el electrodo permitiendo registrar la corriente eléctrica.

Las AgNPs también se han usado como marcador para sensores colorimétricos. En estos, se pueden medir simplemente el cambio de color a simple vista, por medio de espectroscopia de UV-VIS o a través de fluorescencia usando con la ayuda de otros compuestos [19]. Un ejemplo de este tipo de aplicaciones, es el desarrollo de un sensor colorimétrico para la detección de iones de mercurio y peróxido de hidrógeno [20], este funciona manteniendo las partículas en solución, al agregar una muestra del analito de interés, se genera un cambio en el color de la solución debido a la reducción de los iones de Hg y el cambio de color de las AgNPs por agregación. Otro es la creación de un biosensor para detectar melanina [21], esta sustancia se usa para adulterar productos lácteos aumentando el contenido proteico pero haciendo tóxico el alimento; el biosensor detecta esta sustancia por el cambio de color de las AgNPs en solución, este ocurre debido a que la melanina induce la agregación de las partículas, la detección se llevó a cabo por UV-VIS logrando un límite de detección de 2.23 μM .

En los sensores ópticos, la técnica más usada es la resonancia de plasmones superficiales (SPR), esta se basa en el cambio de las propiedades ópticas al ser excitadas las partículas a cierta longitud de onda [22]. Por ejemplo, se ha creado un biosensor basado en esta técnica para la detección de peróxido de hidrógeno [23], en este se utilizan AgNPs estabilizadas con almidón, la degradación de las partículas por el H_2O_2 genera un cambio en las propiedades ópticas. La cantidad de peróxido de hidrogeno se mide registrando el cambio de absorbancia a través del tiempo. Se ha desarrollado un sensor similar para la detección de glucosa [24], en este caso las nanopartículas se sintetizan directamente sobre

una matriz de sol-gel, sobre la cual se inmoviliza glucosa oxidasa para producir peróxido de hidrógeno, este al igual que el ejemplo anterior genera una degradación cambiando las propiedades ópticas del sustrato, este sensor tiene un límite de detección de 23 mg/L.

5.3 Agente anti-cancerígeno

Tal vez una de las aplicaciones de las AgNPs que más expectativa ha producido es su uso como agente anti-cancerígeno. Se ha demostrado que estas nanopartículas presentan cierta toxicidad hacia diferentes líneas celulares, esta depende en gran medida del tamaño de las nanopartículas y de la concentración, pero en general se reporta que las células tumorales son más sensibles a los efectos citotóxicos de estas [25].

Por ejemplo, se han sintetizado AgNPs recubiertas de látex, esto permite que las nanopartículas tengan una mejor solubilidad en agua y aumenta su biocompatibilidad, por lo que puede ser un medio para liberarlas a células cancerígenas, en este caso se mostró su función con células de carcinoma de pulmón A549, y se demostró que las AgNPs generan un daño oxidativo *in vitro* contra estas células, el cual depende de la concentración [26]. Un estudio similar con partículas sin recubrir, reporta que se obtuvo una mortalidad de 50% contra la misma línea celular con una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ [27], esto se explica debido a que las nanopartículas inducen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), creando un mayor estrés oxidativo en la célula, lo que conduce a la muerte celular. También se han probado este mecanismo contra células de leucemia mieloide aguda [28], para este análisis usaron alcohol de polivinilo como agente reductor, el ensayo se llevó a cabo con células aisladas de 11 pacientes diferentes afectados por leucemia, al igual que en los ejemplos anteriores se demostró la efectividad al eliminar estas células a través del mecanismo de generación de ROS.

Pruebas similares se han realizado para evaluar la efectividad de las AgNPs contra células cancerígenas de cáncer de colon (HCT15) [29], las AgNPs en este caso se sintetizaron a partir de un extracto de las hojas de la planta *Vitex negundo*, los resultados mostraron que con una dosis de 20 $\mu\text{g/ml}$ se inhibe en 50% el crecimiento de las células después de 48 horas de incubación, estimulando el proceso de apoptosis. También se ha analizado la eficiencia de las nanopartículas contra células de cáncer de mama (MCF-7) [30], en este caso se usó como agente reductor un extracto de la planta *Sesbania grandiflora* al igual que en los casos anteriores, se reporta una disminución en la proliferación de las células cancerígenas *in vitro* por los efectos estrés oxidativo y daño en la membrana celular. Algunos ejemplos más que han demostrado el potencial de las AgNPs para inducir la apoptosis y han usado extractos de

plantas como agente reductor para la síntesis de las nanopartículas son en células cancerígenas son en células de cáncer de laringe (Hep-2) [31], en el cual se utilizó el extracto de *Phyllanthus emblica*; se ha usado el extracto *Podophyllum hexandrum* para sintetizar AgNPs y se ha probado su efectividad ante células de cáncer cervical [32].

Además del uso directo de las AgNPs como agente anticancerígeno, también se han usado como transductores foto-térmicos para terapia contra célula cancerígenas *in vitro* [33], para este estudio se usaron nanopartículas piramidales recubiertas de quitosano como estabilizador y para mejorar su biocompatibilidad; otra ventaja que presenta el uso de quitosano es que puede permitir la conjugación de anticuerpos o proteínas, estas tienen el potencial de ser excitadas de con láseres de forma transdermal, lo que en un futuro permitiría la terapia en pacientes con ciertos tipos de cáncer. Por el momento se demostró una buena biocompatibilidad para células humanas de riñón (HEK) y la capacidad de destruir por excitación térmica células de cáncer de pulmón (NCI-H460).

5.4 Otras aplicaciones biomédicas

Recientemente se ha revelado la potencial actividad citoprotectiva de las AgNPs frente a células infectadas con VIH-1, pruebas sobre la línea Hut/CCR5 mostraron que tras 3 días de tratamiento con soluciones a 5 μ M AgNPs y 50 μ M AgNPs se obtuvieron porcentajes de células apoptóticas de 49% y 35 %, respectivamente, comparadas con el grupo control que exhibió solo un 19%. Se considera entonces que las AgNPs tal vez inhiban la proliferación de células Hut/CCR5 que causan la apoptosis celular asociada con el VIH [34].

Un nuevo uso para las AgNPs como antiinflamatorio está siendo estudiado, el proceso de cicatrización de heridas en presencia de estas nanopartículas se ve acelerado debido a la reducción de la actividad de la matriz local de metaloproteína [MMP] (endopeptidasas dependientes de zinc) y el aumento de apoptosis de neutrófilos dentro de la herida; la MMP induce inflamación y no permite la cicatrización de la herida. Se ha demostrado, además, en modelos de ratón con heridas por quemadura la reducción de citosinas proinflamatorias al aplicarles tratamiento con AgNPs, con lo que se evidencia el efecto antiinflamatorio de estas nanopartículas [35].

6. Observaciones finales y consideraciones a futuro

Las aplicaciones y mejoras a los procesos de síntesis de AgNPs se centran en preservar su estabilidad durante un tiempo mayor, evitando así la formación prematura de ROS y haciéndolas más biocompatibles al incorporarlas en nuevos y mejores materiales para su interacción con

organismos vivos. Muchas de las actuales investigaciones muestran avances sorprendentes en cuestión del aprovechamiento de su actividad antimicrobiana y anticancerígena; la efectividad de las AgNPs para inducir la apoptosis sobre una gran variedad de células cancerígenas o producir la muerte de diversos patógenos he sido demostrada; sin embargo, aún existe el reto de generar mecanismos que permitan dirigir las nanopartículas contra estructuras tumorales, células cancerígenas o cualquier microorganismo sin generar daños al huésped. Los ensayos *in vitro* e *in vivo* continuarán con estas pruebas, con el propósito de aplicar las AgNPs en más tratamientos y con menor riesgos a la salud.

6. Referencias

1. Maribel G. Guzmán; Jean Dille, Stephan Godet. International Journal of Chemical and Biological Engineering. **2009**, 2:3, 104-111
2. Christiane Beer; Rasmus Foldbjerg; Yuya Hayashi; Duncan S. Sutherland; Herman Autrup. Toxicology Letters. **2012**, 208, 286-292.
3. J. J. Mock; M. Barbic; D. R. Smith; D. A. Schultz; S. Schultz. J. Chem. Phys. **2002**, 116 (15), 6755-6759.
4. Jingy Liu; David A. Sonshine; Robert H. Hurt. ACS Nano. **2010**, 4(11), 6903-6913.
5. S. D. Solomon; M. Bahadory; A. V. Jeyarajasingam; S. A. Rutkowsky; C. Borito; L. Mulfinger. J. Chem. **2007**, 84(2), 322-325.
6. Virender K. Sharma; Ria A. Yngard; Yekaterina Lin. Advances in colloid and interface Science. **2009**, 145, 83-96.
7. Renata Behra; Laura Sigg; Martin J. D. Clift; Fabian Herzog; Matteo Minghetti; Blair Johnston; Alke Petri-Fink; Barbara Rothen-Ruthishauser. J. R. Soc. Interface. **2013**, 10: 20130396, 15.
8. Sun-Hwa Nam; Shin Woong Kim; Youn-Joo An. J. Appl. Toxicol. **2013**, 33, 1061-1069.
9. Wim H. De Jong; Leo T. M. Van Der Ven, Annemarie Sleijffers; Margriet V. D. Z. Park; Eugene H. J. M. Jansen, Henk Van Loveren; Rob J. Vandebriel. Biomaterials. **2013**, 34, 8333-8343.
10. R. Elvira Núñez-Anita; Genoveva Hernández-Padrón; Laura Susana Acosta-Torres; Luz M. López-Marín; Víctor M. Castaño. J. Nanomaterials. **2011**, 109, 1-8.
11. Rothausler K.; Baumgarth N. Curr Protoc Cytom. **2007**, 7 (31), 1-17.
12. J. W. Rhim; L. F. Wang; S. I. Hong. Food Hydrocolloids. **2013**, 33, 327-335.
13. Roe D.; Karandikar B.; Bonn-Savage N.; Gibbins B.; Roulet J. B.; J Antimicrob Chemother. **2008**, 61(4), 869-76.
14. A.F. Wady; A. L. Machado; V. Zucolotto; C. A. Zamperini; E. Berni; C. E. Vergani. Journal of Applied Microbiology. **2012**, 112, 1163-1172.
15. N. Savithramma; M. Linga Rao; K. Rukmini; P. Suvamalatha devi. International Journal of ChemTech Research. **2011**, 3(3), 1394-1402.

16. S. Prakash, Tina Chakrabarty, Ajay K. Singh, Vinod K. Shahi. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013, 41, 43-53.
17. Shuo Wu, Hongtao Zhao, Huangxian Ju, Chuanguo Shi, Jianwei Zhao. *Electrochemistry Communications*. **2006**, 8, 1197-1203.
18. P. Kar, F. Tatar, G. Lamblin, P. Banet, P.H. Aubert, C. Plesse, C. Chevrot. Hochberg, J. *Electro. Chem.* **2013**, 692, 17-25.
19. Zhimin Luo, Lihui Yuwen, Yujie Han, Jing Tian, Xingrong Zhu, Lixing Weng, Lianhui Wang. *Biosensors and Bioelectronics*. **2012**, 36, 179-185.
20. Rooma Devi, Bhawna Batra, Suman Lata, Sandeep Yadav, C.S. Pundir. *Process Biochemistry*. **2013**, 48, 242-249.
21. Yuzhong Zhang *, Keying Zhang, Haiyan Ma. *Anal. Biochem.* **2009**, 387, 13-19.
22. J.M. Kong, H. Zhang, X.T. Chen, N. Balasubramanian, D.L. Kwong. *Biosensors and Bioelectronics*. **2008**, 24, 787-791.
23. Jagriti Narang, Nidhi Chauhan, Preeti Jain, C.S. Pundir. *J. of Biol. Macromolecules*. **2012**, 50, 672-678.
24. Juan Carlos Ramos, Antonio Ledezma, Eduardo Arias, Ivana Moggio, Carlos Alberto Martínez, Felipe Castillon. *Vacuum*. **2010**, 84, 1244-1249.
25. Guang-Li, Xiao-Ying Zhu, Huan-Jun Jiao, Yu-Ming Dong, Zai-Jun Li. *Biosensors and Bioelectronics*. **2012**, 31, 337-342.
26. Hong Ping, Minwei Zhang, Hongkun Li, Shugui Li, Quansi Chen, Chunyan Sun, Tiehua Zhang. *Food Control*, **2012**, 23, 191-197.
27. F.-C. Chien, S.-J. Chen. *Biosensors and Bioelectronics*. **2004**, 20, 633-642.
28. P. Vasileva, B. Donkova, I. Karadjova, C. Dushkin. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. **2011**, 382, 203-210.
29. J. Tashkhourian, M.R. Hormozi-Nezhad, J. Khodaveisi, R. Dashti. *Sensors and Actuators B*. **2011**, 158, 185-189.
30. Alicia Ávalos, Ana Isabel Haza, Paloma Morales. *Toxicology Letters*. **2012**, 211, S202-S203.
31. Mayur Valodkar, Ravirajsinh N. Jadeja, Menaka C. Thounaojam, Ranjitsinh V. Devkar, Sonal Thakore. *Materials Science and Engineering C*. **2011**, 31, 1723-1728.
32. Renu Sankar, Arunachalam Karthik, Annamalai Prabu, Selvaraju Karthik, Kanchi Subramanian Shivashangari, Vilwanathan Ravikumar. *Materials Science and Engineering C. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **2013**, 108, 80-84.
33. Dawei Guo, Lingying Zhu, Zhihai Huang, Haixia Zhou, Yue Ge, Wenjuan Ma, Jie Wu, Xiuyan Zhang, Xuefeng Zhou, Yu Zhang, Yun Zhao, Ning Gu. *Biomaterials*. **2013**, 34, 7884-7894.
34. D. Prabhu, C. Arulvasu, G. Babu, R. Manikandan, P. Srinivasan. *Process Biochemistry*. **2013**, 48, 317-324.
35. [M. Jeyaraj, G. Sathishkumar, G. Sivanandhan, D. MubarakAli, M. Rajesh, R. Arun, G. Kapildev, M. Manickavasagam, N. Thajuddin, K. Premkumar, A. Ganapathi. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **2013**, 106, 86-92.
36. Fathima Stanley Rosarin, Vadivel Arulmozhi, Samuthira Nagarajan, Sankaran Mirunalini. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. **2012**, 1, 1-10.
37. Gnanasekar Sathishkumar, Ganeshan Sivanandhan, Gnanajothi Kapil Dev, Markandan Manickavasagam, Kumpati Premkumar, Nooruddin Thajuddin, Andy Ganapathi. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **2013**, 102, 708-717.
38. Sanda C. Boca, Monica Potara, Ana-Maria Gabudean, Aurelie Juhem, Patrice L. Baldeck, Simion Astilean. *Cancer Letters*. **2011**, 311, 131-140.
39. Sun R. W.; Chen R.; Chung N. P.; Ho C. M.; Lin C. L.; Che C. M. *Chem Commun*. **2005**, 40, 5059-61.
40. [Sukumaran Prabhu; Eldho K. Poullose. *International Nano Letters*. **2012**, 2:32.