

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



TRABAJO FIN DE GRADO

Nanopartículas metálicas aplicadas a medicina y farmacia

Autor/a: Ana Isabel Toresano Bajo

Tutor/a: Alberto Escudero Belmonte

Facultad de FARMACIA

TRABAJO FIN DE GRADO
(Revisión bibliográfica)

Nanopartículas metálicas aplicadas a medicina y farmacia

Grado en FARMACIA
Departamento de QUÍMICA INORGÁNICA
Curso 2021/2022

ÍNDICE GENERAL

1. <u>Introducción</u>	5
2. <u>Objetivos</u>	7
3. <u>Metodología</u>	8
4. <u>Resultados y discusión</u>	9
4.1. Nanopartículas de oro	9
4.1.1. Propiedades	9
4.1.2. Síntesis	11
4.1.3. Funcionalización	16
4.1.4. Aplicaciones	18
4.2. Nanopartículas de plata	22
4.2.1. Propiedades	22
4.2.2. Síntesis	24
4.2.3. Funcionalización	27
4.2.4. Aplicaciones	28
4.3. Discusión	31
5. <u>Conclusiones</u>	33
6. <u>Bibliografía</u>	34

RESUMEN

Las nanopartículas, aquellas que tienen al menos una dimensión de un tamaño inferior a 100 nanómetros, tienen unas propiedades excepcionales debido a su pequeño tamaño. De entre todas las aplicaciones que presentan, se ha encontrado que las nanopartículas metálicas presentan diversas aplicaciones en el ámbito de la medicina y farmacia, por ejemplo, a la hora de diagnosticar, monitorizar e incluso proporcionar una terapia o administrar un fármaco frente a una enfermedad determinada. En este trabajo se presentan las principales propiedades y aplicaciones de algunas de las nanopartículas más empleadas en este ámbito, las nanopartículas de oro y de plata, así como algunos conceptos asociados a ellas como sus rutas de síntesis o la funcionalización de su superficie. Para ello, se han analizado diversos artículos científicos de relevancia publicados sobre el tema, realizando una comparación y un análisis crítico de ellos. Se ha observado como existen diferentes rutas para sintetizar nanopartículas metálicas, destacando especialmente la ruta de síntesis química por reducción, así como el proceso biológico, que constituye la principal línea de investigación de cara al futuro. Por otra parte, se ha reflejado la gran versatilidad que tienen las nanopartículas metálicas en el campo de la medicina, especialmente las nanopartículas de oro y de plata. Las de oro destacan especialmente por sus propiedades ópticas, por lo que adecuadamente modificadas son muy útiles para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades como el cáncer, mientras que las de plata destacan por sus propiedades bactericidas, lo que las hace idóneas para lograr una administración más efectiva de antibióticos. Por último, destacar también la existencia de otras líneas de investigación futuras en este ámbito, como es el campo de la nanoseguridad, es decir, conocer en profundidad los riesgos asociados a la ingesta de este tipo de nanopartículas.

Palabras clave

Nanopartículas metálicas, medicina, aplicaciones biomédicas, funcionalización

1. INTRODUCCIÓN

A pesar de que existen diferentes definiciones de nanomaterial, en general se define nanomaterial como aquella estructura que tiene un tamaño en la escala nanométrica, generalmente menos de 100 nanómetros en al menos una de las tres dimensiones (1,2).

La enorme proporción superficie/volumen de una nanopartícula (NP), junto con su pequeño tamaño, le otorga unas propiedades especiales que los hace únicos. Por esta razón, en las últimas décadas, la nanotecnología ha mostrado tener un gran potencial en diversas áreas, como la ingeniería, la biología, la química, la biotecnología o la medicina (1,3,4).

Como se observa a continuación (figura 1), una NP puede presentar un tamaño equiparable al de un anticuerpo, y generalmente es menor que la de un virus. Por otro lado, el diámetro de una célula eucariota suele tener un tamaño de entre 10^4 - 10^5 nm, por lo que una NP presenta un tamaño mucho menor que las células de nuestro cuerpo (3). De este modo, el pequeño tamaño con el que se presentan las NPs se corresponde con aquel en el que se dan muchas de las interacciones biológicas, por lo que estas partículas presentan diversas aplicaciones en los campos de la medicina y la farmacia (5).

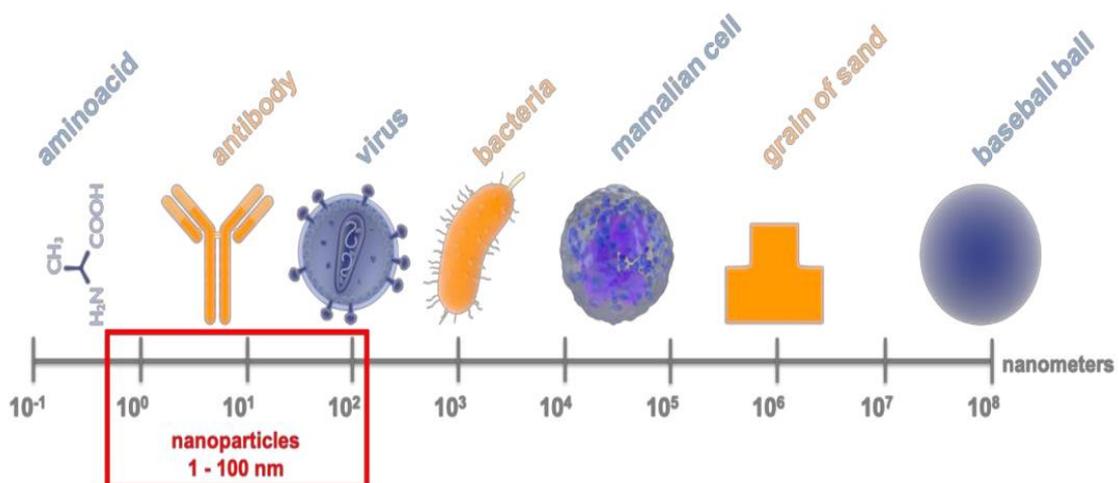


Figura 1. Comparativa del tamaño de una NP en escala logarítmica (3)

Existen diferentes artículos (2,5) que demuestran las diversas aplicaciones que tienen las NPs en este ámbito, pudiendo destacar especialmente el diagnóstico y/o el tratamiento “*in vivo*” de varias enfermedades, así como la elaboración de implantes médicos. Estas aplicaciones se comentarán con más detalle a lo largo de este trabajo.

Dentro de las NPs empleadas en medicina, existen NPs de carácter no metálico, como nanoestructuras basadas en carbono, que se pueden utilizar para la elaboración de implantes gracias a su excelente biocompatibilidad y propiedades mecánicas (6). Estos nanomateriales son de carácter no metálico y no constituyen el objeto de estudio de este trabajo. En este trabajo nos centraremos en las nanopartículas de carácter metálico.

En cuanto a la justificación para realizar este trabajo, generalmente, el público asocia el concepto de la nanomedicina únicamente al desarrollo y posterior inyección de fármacos que incorporan en su formulación partículas o estructuras de tamaño nanométrico y que permiten el tratamiento de diversas enfermedades. Sin embargo, el uso de los nanomateriales en el ámbito de la medicina es mucho más amplio e incluye también el uso de NPs metálicas para otras aplicaciones (5), como las que se desarrollarán en este trabajo. Por otra parte, la nanotecnología es un campo de investigación que se encuentra en pleno auge, y el número de aplicaciones que presentan las NPs en el campo de la medicina es cada vez mayor. Por esta razón, se hace necesaria la realización de una revisión bibliográfica que aúne y sintetice todo este conocimiento. De este modo, en este trabajo se pretende describir las principales NPs metálicas empleadas en el ámbito de la medicina y farmacia hasta ahora, describir su síntesis, así como identificar los principales usos que se les ha dado a estas NPs en este ámbito, analizando y comparando desde un punto de vista crítico cada una de ellas.

2. OBJETIVOS

Como se ha comentado anteriormente, el principal objetivo de este trabajo es

realizar una revisión bibliográfica de las principales nanopartículas metálicas empleadas en el ámbito de la medicina y la farmacia, describiendo sus principales propiedades, así como sus aplicaciones dentro de estos campos.

Dentro de los objetivos específicos, podemos destacar que en este trabajo se pretende:

- Identificar las principales NPs metálicas empleadas en el campo de la medicina y farmacia.
- Explicar las principales rutas de síntesis que existen para producir estas NPs a escala de laboratorio.
- Conocer las principales características y propiedades de estas NPs que las hacen útiles en el campo de la medicina y farmacia.
- Analizar las principales técnicas de modificación superficial de estas NPs y cómo afecta este proceso a sus propiedades.
- Describir las principales aplicaciones de estas NPs en este ámbito.
- Explicar algunos procesos relacionados con el uso de NPs en medicina, como el *“targeting”* o direccionamiento activo.
- Resumir y comparar los resultados anteriores, analizando la ruta a seguir en el futuro para continuar con esta línea de investigación.

3. METODOLOGÍA

Para la realización de este trabajo, se han analizado diversos artículos científicos obtenidos a partir de diferentes bases de datos. Las bases de datos empleadas han sido:

Tabla I. Bases de datos utilizadas para realizar el trabajo

Base de datos	url
Google Académico	https://scholar.google.es/
PubMed	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/
ScienceDirect	https://www.sciencedirect.com/
SpringerLink	https://link.springer.com/
MDPI	https://www.mdpi.com/

En cuanto a la obtención de artículos de interés, se ha realizado una búsqueda utilizando diversas palabras clave en función de la información que se quería obtener en cada momento. Por ejemplo, para obtener información general sobre las aplicaciones de las NPs en el ámbito de la medicina, se ha realizado la búsqueda "*nanoparticles*" AND "*medical application**". Si deseamos realizar una búsqueda más específica, sustituimos el primer término de la búsqueda por el metal concreto que sea de interés, como por ejemplo "*gold nanoparticles*", o añadimos un nuevo término de búsqueda relacionado, como por ejemplo "*targeting*".

En cuanto a la forma de dar los resultados, en el siguiente capítulo se presentan, en diferentes secciones, las principales NPs metálicas empleadas en este ámbito, explicando, para cada una de ellas, su síntesis, funcionalización, propiedades y principales aplicaciones en el campo de la medicina. En cuanto a los criterios de selección y evaluación de estos artículos, se ha intentado que estos sean lo más recientes posibles, para asegurar que la revisión bibliográfica permita reflejar el estado del arte de la manera más actualizada posible, y que estos artículos sean lo más relevantes posibles, es decir, que su número de citas y referencias en la literatura científica sea lo más alto posible.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a varios artículos de revisión (2,4,7), las NPs metálicas más comunes empleadas en el ámbito de la medicina son las NPs de oro y de plata, aunque también se pueden utilizar otros metales como platino, paladio, cobre, titanio o zinc, aunque estos tres últimos se presentan generalmente en forma de óxido.

A continuación, en este capítulo se describen con más detalle las principales características de cada uno de ellos, centrándonos especialmente en las NPs de oro y de plata, al ser las más empleadas en la actualidad, y enfocándonos especialmente en sus métodos de síntesis y de funcionalización superficial, así como sus principales características y aplicaciones en el ámbito de la medicina y farmacia.

4.1. Nanopartículas de oro

4.1.1. Propiedades

Las principales propiedades de las nanopartículas de oro (AuNPs) que las hace útiles en el ámbito de la medicina vienen determinadas por la gran cantidad de rutas químicas que permiten modificar su tamaño, forma y características superficiales, así como sus propiedades ópticas, elevada estabilidad frente a la oxidación y a la degradación “*in vivo*”, baja citotoxicidad, alta biocompatibilidad e inercia química (8,9). Otros autores (10) destacan también las propiedades antibacterianas, antioxidantes y antifúngicas de las AuNPs.

Destacar también que, cuando se produce su modificación superficial, gracias a la posibilidad para conjugarse con otras biomoléculas, las AuNPs pueden actuar como “*carriers*” de moléculas tanto de carácter hidrofílico como hidrófobo, presentando además una gran estabilidad y una gran facilidad para ser administradas en el cuerpo humano (8). De entre las principales moléculas que se pueden conjugar con las AuNPs, podemos destacar proteínas, medicamentos, anticuerpos, enzimas o ácidos nucleicos (ADN o ARN) (9).

La característica más destacable sin duda de las AuNPs en el ámbito de la nanomedicina son sus propiedades ópticas, gracias a la presencia de una banda de resonancia de plasmón de superficie localizado (LSPR, por sus siglas en inglés), que se asocia con la excitación colectiva de una serie de electrones de conducción (8). Esta banda de resonancia se puede localizar en una región muy amplia del espectro, desde el espectro visible hasta el infrarrojo, en función del tamaño, forma, estructura y entorno químico en el que se encuentren las AuNPs (8,11). A la hora de sintetizar las AuNPs, interesa que estas sean anisotrópicas y que su LSPR caiga dentro de la región de 700-1100 nm, ya que corresponde a aquella región del infrarrojo cercano (NIR) donde la luz penetra a una mayor profundidad en los tejidos biológicos. Es posible modificar la posición del LSPR cambiando, por ejemplo, la forma de las AuNPs (tubular, prisma, etc.) o su estructura (hueca u homogénea) (8). Por otra parte, para provocar un crecimiento anisotrópico de las AuNPs, es necesario o bien producir un crecimiento controlado de las AuNPs en una dirección determinada, o bien evitar que estas crezcan hacia un determinado sentido, lo cual se logra regulando los aspectos cinéticos de la reacción de síntesis (12).

En este aspecto, las AuNPs presentan propiedades plasmónicas, es decir, son capaces de interactuar con la luz y la materia a través de su LSPR y las hace útiles para el diagnóstico por imagen, actuar como biosensores, producir reacciones químicas para la liberación de medicamentos o terapia térmica, entre otras aplicaciones (13). Dicho de otro modo, la irradiación de la luz en la superficie de las AuNPs provoca una dispersión y absorción de la luz por parte de los plasmones, que produce campos electromagnéticos en la superficie de las AuNPs y ciertos fenómenos ópticos. De este modo, las AuNPs con una LSPR en la región adecuada presentarán una banda de resonancia (banda de absorción, concretamente) en la región visible que se podrá identificar con diferentes técnicas espectroscópicas y realizar así análisis de tipo cualitativo y cuantitativo en el ámbito médico (9). Técnicas como el diagnóstico por imagen basadas en este fenómeno se pueden clasificar en dos métodos: (1) respuesta lineal por ejemplo del microscopio óptico, y (2) respuesta no lineal en otros métodos como SERS (espectroscopía Raman de superficie mejorada), entre otros. El SERS, por ejemplo, es una técnica ultrasensible y no invasiva que permite el rastreo de biomoléculas en una célula o el diagnóstico "*in vivo*" por imagen, etc. (13). Se trata de

una técnica muy empleada en el diagnóstico de enfermedades, cuando se combina con unas NPs con propiedades plasmónicas, como las AuNPs, obteniendo análisis a nivel cuantitativo y con una gran sensibilidad de la presencia de determinadas moléculas pequeñas en fluidos humanos, entre otras aplicaciones (14).

4.1.2. Síntesis

En la actualidad, existe una amplia variedad de rutas para sintetizar AuNPs, tanto en medio acuoso como orgánico, existiendo varios disolventes y aditivos diferentes que se pueden emplear en el proceso, y permitiendo también controlar de manera exhaustiva el tamaño (desde menos de 5 nm hasta mas de 100 nm) y forma (nanobarras, nanorecubrimientos, prisma, estrella,...) de las AuNPs (8).

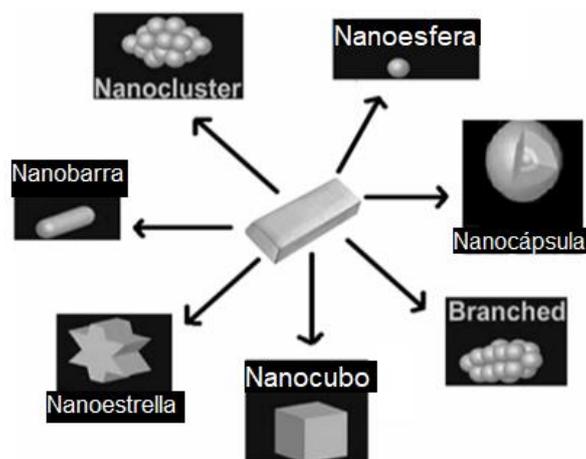


Figura 2. Diferentes formas en las que se pueden presentar las nanopartículas de oro (1)

4.1.2.1. En medio orgánico

A pesar de que la mayoría de los métodos de síntesis química de AuNPs emplean un medio acuoso, también es posible sintetizar AuNPs en un medio orgánico para dotarlas así de carácter hidrófobo en sus extremos. Uno de estos métodos, ampliamente utilizado, es el de Brust-Schiffin, que se caracteriza por emplear un líquido orgánico como disolvente, normalmente bromuro de tetraoctilamonio (TOAB), y la sal de oro empleada como precursor metálico es el ácido cloraúrico (HAuCl_4). Este precursor se disuelve a una temperatura de 100 °C en una solución con el TOAB. Como aditivos se añaden tolueno, que actúa como coagulante, y borohidruro de sodio, que actúa como

agente reductor (15). En la actualidad, es muy común utilizar este método para sintetizar AuNPs de carácter hidrófobo, introduciendo algunas modificaciones al método Brust-Schiffin original. Por ejemplo, Lin et al. (16) han descrito un procedimiento experimental para sintetizar AuNPs en medio orgánico a escala laboratorio, que se describe en el artículo de revisión de Hühn et al. (17), y que a grandes rasgos consiste en:

- Disolver hidrógeno tetracloroaurato(III) (HAuCl_4) en agua (H_2O) para obtener la fase acuosa con los iones precursores del oro (AuCl_4^-) disueltos.
- Disolver bromuro de tetraoctilamonio (TOAB, $\text{N}(\text{C}_8\text{H}_{17})_4\text{Br}$) en tolueno (C_7H_8) para obtener la fase orgánica.
- Mezclar ambas fases en un embudo de decantación y agitar vigorosamente para que los iones AuCl_4^- de la fase acuosa pasen a la fase orgánica, según la ecuación:
$$\text{HAuCl}_4^- (\text{aq}) + \text{N}(\text{C}_8\text{H}_{17})_4^+\text{Br}^- (\text{tol}) \rightarrow \text{N}(\text{C}_8\text{H}_{17})_4^+\text{AuCl}_4^- (\text{tol}) + \text{HBr} (\text{aq})$$
- Se desecha la fase acuosa del fondo y la fase orgánica se transfiere a un recipiente esférico.
- Por otra parte, se prepara la solución reductora disolviendo borohidruro de sodio (NaBH_4) en agua, y posteriormente se añade gota a gota a la solución orgánica con el precursor del oro anterior mientras se mantiene una agitación continua. De este modo, el Au(III) se reduce a Au(0), formando así las AuNPs.
- Se transfiere la mezcla a un embudo de decantación, se desecha la fase acuosa del fondo y se obtiene la orgánica, que se lava con HCl, NaOH y agua.
- La solución orgánica final, una vez lavada, se mantiene en agitación durante toda la noche para así obtener las AuNPs termodinámicamente estables y con una distribución de tamaño de partícula estrecho, de unos 4 nm de diámetro.

Una de las principales ventajas de la síntesis de AuNPs en medio orgánico es que la concentración de precursor que se puede alcanzar es alta, por lo que la cantidad de AuNPs que se puede obtener durante la síntesis es mayor. Además, se pueden utilizar una amplia gama de aditivos para controlar la forma y tamaño de las AuNPs, que tengan carácter hidrófobo y se disuelven bien en este medio. Por otra parte, la principal desventaja de este método es que, al tener las AuNPs carácter hidrófobo y el medio

biológico es acuoso, estas AuNPs necesitarían un proceso de modificación para hacerlas hidrófilas antes de utilizarlas para aplicaciones biomédicas (17).

4.1.2.2. En medio acuoso

En cuanto a la síntesis en medio acuoso, la mayoría de las rutas de síntesis de AuNPs hidrosolubles y con forma esférica se basan en el método Turkevich (18), conocido desde hace ya más de 60 años y que consiste a grandes rasgos en la reducción del HAuCl_4 en medio acuoso utilizando el citrato sódico como agente reductor. Este método se ha ido modificando a lo largo de los años para obtener una distribución del tamaño de partículas más estrecha y una mayor homogeneidad en las AuNPs obtenidas (8), como por ejemplo el método descrito por Piella et al. (19), con el que se obtiene un mayor rendimiento y control de la forma y el tamaño de las AuNPs. A grandes rasgos, este procedimiento consiste en:

- Mezclar citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) con trazas de ácido tánico ($\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$), que favorece el crecimiento homogéneo de las AuNPs, y carbonato de potasio (K_2CO_3) en un recipiente cerrado y calentarlo hasta $70\text{ }^\circ\text{C}$ con reflujo para evitar la evaporación.
- Añadir hidrógeno tetracloroaurato(III) (HAuCl_4) al frasco y mantenerlo en agitación continua y a $70\text{ }^\circ\text{C}$ durante el tiempo suficiente para que tenga lugar la reducción completa del Au(III) a Au(0) por la acción del citrato de sodio.

En este proceso, las condiciones de reacción (temperatura, pH, velocidad de agitación, etc.) y su estequiometría (proporción sal de oro : citrato de sodio utilizada) influyen en el tamaño de las partículas de AuNPs obtenidas, pudiendo variar su diámetro de las partículas desde 5 hasta 100 nm, aunque el método Turkevich no está recomendado para diámetros superiores a 50 nm (17).

En cuanto a la forma con la que se obtienen las AuNPs, la esfera es la forma más estable energéticamente, de modo que será la forma de las AuNPs obtenida en condiciones termodinámicamente controladas. Si se desean obtener AuNPs con otra forma, el proceso se debe realizar con unas condiciones determinadas que provoquen la síntesis de las AuNPs de esa forma, utilizando, por ejemplo, surfactantes que bloqueen el crecimiento en una dirección determinada (como por ejemplo el bromuro de

hexadeciltrimetilamonio, CTAB), haluros (Br^- , I^-) u otras especies reductoras ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) (8).

A continuación, se describen los procesos de síntesis de AuNPs con otras formas (figura 2).

4.1.2.3. Nanobarras

En la actualidad, la forma anisotrópica de las AuNPs más empleada son las nanobarras o nanocilindros (*“nanorods”*). Estas se sintetizan a través de un proceso de crecimiento a partir de AuNPs esféricas de pequeño tamaño, denominadas semillas, que se añaden a una solución rica en bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) que induce el crecimiento de las AuNPs en forma de barra (8). Este método usa ácido ascórbico como agente reductor. Debido a la elevada citotoxicidad que presenta el CTAB (20), interesa utilizar este compuesto en una concentración lo más baja posible. De acuerdo con el estudio realizado por Ye et al. (21), la concentración mínima de CTAB que se puede emplear para sintetizar AuNPs en forma de nanobarras es de 0,037 M, en presencia de otro aditivo como el oleato de sodio (figura 3).

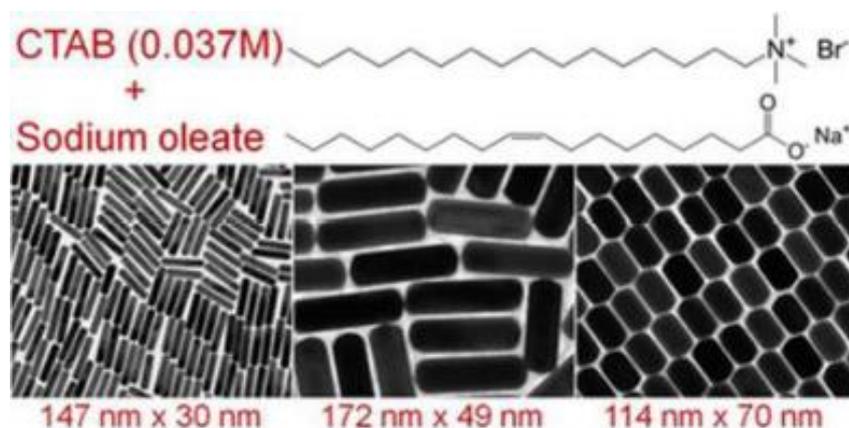


Figura 3. Crecimiento de semillas de AuNPs en forma de barras por la acción del CTAB y oleato de sodio (21)

4.1.2.4. Nanorecubrimientos

Otra forma anisotrópica en la que suelen presentarse las AuNPs es en forma de nanocubierta (*“nanoshell”*). Esta forma anisotrópica fue investigada originalmente por Halas et al. (22). Estas nanoestructuras están constituidas por un núcleo de sílice alrededor del cual crece el metal, empleando generalmente ácido cloroáurico (HAuCl_4)

como precursor metálico y borohidruro de sodio (NaBH_4) como agente reductor (22) (figura 4).

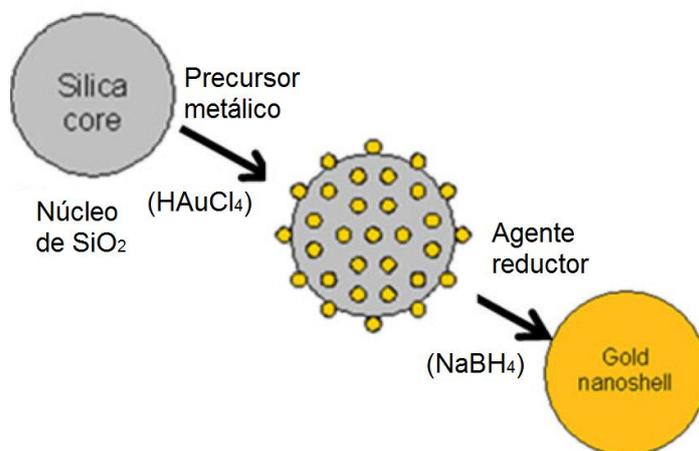


Figura 4. Síntesis de una nanocubierta de oro utilizando ácido cloroáurico como precursor metálico y borohidruro sódico como agente reductor (22)

El LSPR, en este caso, se controla modificando la relación entre el tamaño del núcleo y el espesor de la cápsula del metal. Estas estructuras se pueden volver más complejas añadiendo a la nanoestructura más capas de sílice o de metal.

4.1.2.5. Estrella

Por otra parte, Senthil Kumar et al. (23) también han desarrollado una ruta de síntesis de AuNPs en forma de estrella, que presenta su LSPR en el rango de interés biológico y por tanto presenta aplicaciones en el campo de la medicina. La síntesis se basa en un proceso de crecimiento similar al empleado para obtener las AuNPs en forma de nanobarras, en este caso reduciendo la sal de oro a oro metálico sobre “semillas” de AuNPs estabilizadas previamente con polivinilpirrolidona (PVP, $(\text{C}_6\text{H}_9\text{NO})_n$), utilizando como agente reductor una mezcla de dimetilformamida ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$) y polivinilpirrolidona (PVP).

Por último, destacar que las técnicas de síntesis anteriores se corresponden a rutas de síntesis química por reducción, existiendo también otro tipo de técnicas como las *top-down*, que consisten en romper estructuras de mayor tamaño hasta obtener tamaños nanométricos por procesos físicos. Sin embargo, las rutas de síntesis química descritas anteriormente son las que se utilizaron en primer lugar para sintetizar AuNPs, y por tanto las más estudiadas en la actualidad por la comunidad científica (9).

Se pueden consultar el resto de métodos de síntesis de AuNPs en diversos artículos de revisión, como el realizado por Hu et al. (9) o Ramalingam (10).

4.1.2.6. Posible evolución de las rutas de síntesis

En cuanto a las tendencias futuras en la síntesis de AuNPs, el objetivo es lograr una síntesis “verde” más respetuosa con el medio ambiente que utilice una menor cantidad de disolventes o reactivos de carácter tóxicos. En esta línea, destacar el estudio realizado por Luangpipat et al. (24), donde se analiza la síntesis de AuNPs a partir de extractos naturales de microalgas y plantas. En estos casos, son las propias biomoléculas presentes en estos organismos, tales como grupos carboxilo, aminas, polisacáridos o enzimas, los que actúan como agentes reductores y estabilizantes del HAuCl_4 (10). En el estudio llevado a cabo por Ramalingam (10) se enumeran diversos microorganismos capaces de sintetizar AuNPs tras un proceso biológico de reducción.

Sin embargo, el rendimiento y la calidad de las AuNPs obtenidas con estos métodos no es tan alto como el que se obtiene utilizando los métodos convencionales, por lo que aún queda un largo camino en este aspecto.

Por otra parte, destacar también que los procesos de síntesis mostrados en este capítulo se han realizado a escala laboratorio. Desafortunadamente, existen muy pocos artículos que hablen sobre la síntesis y el control del tamaño de las nanopartículas sintetizadas a una mayor escala, siendo este un tema fundamental para realizar el escalado del proceso y fabricar nanopartículas en grandes cantidades, algo necesario para poder aplicarlas en diversos sectores como el farmacéutico. Se trata, por tanto, de otra línea de investigación interesante para el futuro.

4.1.3. Funcionalización

Antes de utilizar las AuNPs en el campo de la medicina, estas deben como norma general ser recubiertas superficialmente con una sustancia química con el objetivo de aportar estabilidad a la suspensión coloidal (8). El recubrimiento suele ser de carácter orgánico y se realiza para asegurar que las propiedades de las AuNPs se mantienen intactas una vez inmersas en el medio biológico (25), aunque también se han descrito recubrimientos

inorgánicos, siendo las más comunes las AuNPs recubiertas de dióxido de silicio (SiO₂) (26). La funcionalización de la superficie también es útil para eliminar cualquier resto de sustancia potencialmente citotóxica o impurezas producidas durante su síntesis (por ejemplo, CTAB en la síntesis de nanobarras de oro) (8). Una de las características del oro es su elevada reactividad con los grupos tiol (-SH). Esto permite lograr la estabilización de las AuNPs con ligandos que contengan este grupo funcional, por un proceso por el que se intercambian los ligandos presentes en la superficie de las AuNPs por unos nuevos ligandos con el grupo tiol (8), que suelen presentar una gran afinidad por el oro.

Tabla II. Sustancias empleadas para la funcionalización de la superficie de las nanopartículas de oro (8)

Estabilizante		Fuente	
Polietilenglicol	PEG	C _{2n+2} H _{4n+6} O _{n+2}	Dreaden et al. (27)
Ácido dihidrolipoico		C ₈ H ₁₆ O ₂ S ₂	Roux et al. (28)
Albúmina de suero bovino			Brewer et al. (29)
Polielectrolitos			Mayya et al. (30)
Polivinilpirrolidona	PVP	(C ₆ H ₉ NO) _n	Mahl et al. (31)
Polímeros anfifílicos			Lin et al. (16)

Hasta la fecha, se han utilizado un gran número de sustancias químicas para estabilizar la superficie de las AuNPs. En la tabla II se muestra un resumen de algunas de estas sustancias. Destacar especialmente el PEG, que es el más utilizado en la actualidad, ya que la estabilización con cadenas bifuncionales de PEG permite una posterior modificación química de la superficie de las AuNPs que permite la unión de diferentes biomoléculas como carbohidratos, anticuerpos, péptidos, etc. a las AuNPs, así como su carga eléctrica (8). En este aspecto, el PEG adecuadamente modificado se considera una cadena bifuncional porque puede presentar por un extremo un grupo tiol (-SH), por el cual se une a la AuNP, y por el otro extremo, el extremo libre, puede presentar un grupo reactivo como por ejemplo un grupo amino (-NH₂), a través del cual se produce la reacción química.

A continuación, una vez que las AuNPs forman una suspensión coloidal estable en el medio biológico gracias a su química superficial, se pueden llevar a cabo diferentes modificaciones químicas en su superficie, siendo este campo muy amplio y versátil,

permitiendo obtener sistemas adaptados a cada aplicación particular y que se deben analizar por separado (8).

4.1.4. Aplicaciones

Por su pequeño tamaño, y como muchas otras nanopartículas, las AuNPs tienen una gran habilidad para penetrar en el interior de tumores vasculares y retenerlos. Por ello, son útiles en diversos aspectos relacionados con el cáncer como su detección y diagnóstico *“in vivo”* por imagen (*“imaging”*), así como para la liberación dirigida de medicamentos y genes específicos, terapias fotoinducidas y radioterapia, entre otras aplicaciones (8). Dado este elevado número de aplicaciones distintas, las AuNPs son útiles también para realizar combinaciones simultáneas de diagnóstico y tratamiento (*“theranostics”*), es decir, utilizar las AuNPs para diagnosticar, proporcionar una terapia *“in vivo”* localizada y monitorizar la respuesta a esa terapia de manera sucesiva, demostrando además en este caso un efecto sinérgico y por tanto un mayor potencial para luchar contra la enfermedad (8).

4.1.4.1. Liberación de medicamentos

Las AuNPs se pueden emplear para la liberación de medicamentos, genes y proteínas. En este aspecto, las AuNPs han sido profundamente estudiadas para su aplicación como agentes liberadores de una amplia gama de medicamentos, tal y como recopilan Hu et al. (9). De forma más específica, las AuNPs han demostrado tener una gran eficacia para la liberación de medicamentos contra el cáncer (32).

Un ejemplo lo tenemos en el artículo publicado por Wókcik et al. (33), donde, utilizando el ensayo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), se comprobó cómo las AuNPs estabilizadas con glutatión (GSH-AuNPs), cuando se conjugan con la doxorubicina (DOX), un fármaco empleado en quimioterapia, presentan una mayor eficacia contra las células de un fibrosarcoma felino, respecto de la eficacia del fármaco sin las AuNPs, así como con las AuNPs sin modificar, lo que demuestra también la eficacia de la modificación superficial.

Otro ejemplo de liberación de la DOX con AuNPs lo realizaron Venkatesan et al. (34), en este caso utilizando un polímero para funcionalizar las AuNPs previamente, resultando en una mejor biocompatibilidad, estabilidad y liberación controlada del medicamento (9). La nanoestructura está formada por moléculas de DOX previamente funcionalizadas con poli(estireno sulfonato) (PSS) y ácido clorhídrico (HCl) para hacerlas moléculas hidrófilas, unidas a nanobarras de Au (AuNRs) (DOX@PSS-AuNRs). La unión se produce por atracción electrostática entre el grupo amino de la DOX y la carga negativa de las PSS-AuNRs. Los autores de este artículo observaron una liberación del medicamento y un efecto terapéutico más eficiente respecto de la administración de la DOX (9).

La mejor eficacia en cuanto a la liberación de medicamentos gracias a su unión superficial a las AuNPs también ha sido demostrada por Podsiadlo et al. (35): en su investigación, se unieron los medicamentos 6-Mercaptopurina (6-MP) y su ribósido (6-MPR) a la superficie de las AuNPs a través de enlaces Au-S, que son muy fuertes, y se observó una disminución de la proliferación de las células K-562 que provocan leucemia, respecto del efecto antiproliferación que causa el medicamento cuando se administra sin las AuNPs.

Por otra parte, se ha demostrado también que las AuNPs son capaces de transportar proteínas. Por ejemplo, Joshi et al. (36) han demostrado que la insulina se puede unir directamente a AuNPs mediante enlaces covalentes, creando así nanopartículas de Au-insulina que se pueden emplear para el tratamiento de la diabetes. Este tipo de unión tiene la característica de que, para liberar la molécula, será necesario romper previamente el enlace covalente. En este caso, la eficiencia de la liberación de la insulina se puede mejorar recubriendo las AuNPs con un biopolímero no tóxico, que pueda adsorber la insulina en su superficie.

4.1.4.1.1. “Targeting” o direccionamiento activo

En tratamientos contra el cáncer, en ocasiones, al administrar el medicamento para realizar la quimioterapia de forma intravenosa, este se disemina a lo largo de todo el cuerpo de forma homogénea, llegando solo una pequeña fracción del medicamento a la zona con el tumor (37). En este aspecto, sería útil que estos medicamentos se administraran de forma controlada a una determinada zona del cuerpo, ya sean células,

órganos o tejidos del cuerpo humano (9). De este modo, el medicamento llegaría en una mayor cantidad a la zona con el tumor y su eficacia sería mayor. Este fenómeno se conoce como “*targeting*” o direccionamiento activo y constituye un tema de amplio estudio en la actualidad.

En este aspecto, las AuNPs se pueden funcionalizar con diferentes moléculas para que se dirijan preferentemente a un tipo de células o de órganos y hacer los tratamientos mucho más selectivos. Por ejemplo, Rizk et al. (38) demostraron como el ácido fólico actúa como agente de direccionamiento activo cuando se unen a las AuNPs y se emplean para el tratamiento del cáncer de mama.

4.1.4.2. Terapia

Dentro de la terapia con AuNPs, se han estudiado tres principales ramas: la terapia fototérmica (PTT), la terapia fotodinámica (PDT) y la terapia por radiación (RT).

En primer lugar, la terapia fototérmica consiste en inyectar materiales en el cuerpo para que se acumulen alrededor de los tejidos del tumor de manera que, cuando sean irradiados por una fuente de luz externa, transformen la energía lumínica en calor y se destruyan las células cancerosas de alrededor (39). Las AuNPs, que en estos casos generalmente se administran en forma de nanobarras o nanocubiertas (9), son una buena opción para realizar este tratamiento, debido a que presentan su absorción máxima en el espectro visible-NIR y por su elevada eficiencia de conversión fototérmica debido a su efecto SPR (9).

Por otra parte, la terapia fotodinámica consiste en inyectar un fotosensibilizador en el cuerpo, que se acumula selectivamente en la zona del tumor. Al excitar esta sustancia con una luz láser a una longitud de onda determinada, se excita y desencadena una reacción fotoquímica. La energía producida en esta reacción se transfiere al oxígeno presente en el tejido para producir especies reactivas de oxígeno (ROS), que reaccionan las macromoléculas biológicas de alrededor, dañándolas e incluso provocando su muerte y apoptosis (40), y destruyen el tumor. Las AuNPs, unidas a un fotosensibilizador, son una buena opción como tal porque han demostrado tener una elevada capacidad para acumularse en el área del tumor y absorber la luz NIR para incrementar la

temperatura y generar una concentración de ROS lo suficientemente alta para provocar la muerte de las células cancerosas (41).

Por último, la terapia por radiación consiste en liberar radiaciones ionizantes de alta intensidad (por ejemplo, rayos gamma o rayos X) en los tejidos del tumor, que hidrolizan componentes celulares como el agua, produciendo especies cargadas y radicales libres que pueden dañar la membrana celular de las células cancerosas y destruirlas (42). Las AuNPs se pueden emplear como radiosensibilizadores por el alto número atómico del oro (43).

4.1.4.3. Diagnóstico

Las AuNPs se pueden emplear para el diagnóstico molecular de enfermedades de manera más precisa y con una mayor sensibilidad que las técnicas de diagnóstico convencionales (44). Cuando la luz incide sobre la superficie de las AuNPs, si la frecuencia de los fotones incidentes coincide con la frecuencia de vibración promedio de los electrones transmitidos por las AuNPs, estas AuNPs absorberán la energía del fotón y provocarán el fenómeno de LSPR descrito anteriormente (45). El pico LSPR de las AuNPs se ve generalmente en la región visible o NIR, sobre 500 nm o 800-1200 nm (46). Gracias a esta propiedad, las AuNPs, generalmente con forma esférica, se pueden emplear en técnicas espectroscópicas como el SERS para el diagnóstico molecular con una gran sensibilidad (47). Por ejemplo, El-Husseini et al. (48) sintetizaron AuNPs recubiertas con citrato y se emplearon para la detección del herpesvirus equino tipo 1 (EHV-1) con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). En el artículo se muestra que la técnica PCR realizada con las AuNPs es más sensible que la técnica PCR convencional y, por lo tanto, se podrían emplear las AuNPs para realizar un diagnóstico molecular del EHV-1 más eficiente.

4.1.4.4. “Imaging” u obtención de imágenes

Existen diferentes técnicas para la obtención de imágenes de tejidos u órganos del cuerpo humano. Por ejemplo, la técnica de tomografía por ordenador con rayos X (CT) es una técnica empleada para la reconstrucción visual en 3D de tejidos que se componen de imágenes de rayos X tomadas de diferentes ángulos alrededor de un objeto (49). Se basa en que los tejidos o células sanos y enfermos tienen diferente densidad, por lo que

empleando agentes de contraste se puede generar un contraste entre ambos (50). El agente de contraste puede atenuar los rayos X para mejorar la calidad de la imagen, resaltando un área específica, como la estructura de vasos sanguíneos o un órgano (49). Generalmente, se utilizan moléculas yodadas como agentes de contraste por su coeficiente de absorción de rayos X (51). Por otra parte, las AuNPs son también útiles como agentes de contraste por su gran capacidad de absorber rayos X, y convertir luz en energía por el efecto SPR (52). Presenta otras ventajas como una buena sensibilidad y especificidad, baja toxicidad y permeabilidad vascular, así como una elevada densidad electrónica y coeficiente de absorción(53), en general mayor que los agentes de contraste empleados habitualmente. En este aspecto, Liu et al. (54) desarrollaron el primer estudio en la estimación de la actividad “in vivo” de la proteasa utilizando la técnica de “*imaging*” y una sonda activable constituida por AuNPs en forma de cubos.

4.2. Nanopartículas de plata

Junto con las AuNPs, las nanopartículas de plata (AgNPs) son las nanopartículas metálicas más utilizadas en el ámbito de la medicina y farmacia, aunque sus propiedades, y con ello sus aplicaciones, presentan algunas diferencias.

4.2.1. Propiedades

Las AgNPs, al igual que las AuNPs, se pueden utilizar para combatir el cáncer. Estas son capaces de causar la apoptosis o la necrosis destruyendo la estructura celular de las células cancerosas, provocando la producción de especies reactivas de oxígeno, que son muy inestables y acaban dañando el ADN celular. Esta acción tiene lugar gracias a las propiedades intrínsecas de las propias AgNPs, sin necesidad de unirse a otra molécula, influyendo especialmente su tamaño, forma y carga superficial. De hecho, se ha demostrado que, cuanto menor sea el tamaño de la AgNP, mayor será su actividad biológica (55). Además de las propiedades contra el cáncer que presentan las AgNPs (56), la principal propiedad que caracteriza a estas NPs es sin duda su capacidad para actuar como agente antibacteriano, siendo capaz de combatir bacterias que causan infecciones, tanto Gram-positivas como Gram-negativas, actuando además con un

efecto sinérgico cuando las AgNPs se administran en combinación con un antibiótico de carácter orgánico (57).

Destacar que el modo de actuación por el que las AgNPs desactivan a los microorganismos aún no se conoce con exactitud, existiendo en la actualidad tres grandes hipótesis:

- Las AgNPs son capaces de atravesar la membrana externa del microorganismo y acumularse en su membrana interna, de modo que cuando las AgNPs se adhieren a esta, se produce su desestabilización y se ven dañadas, aumentando su permeabilidad y provocando la salida del contenido celular, provocando su muerte (58).
- Las AgNPs pueden atravesar directamente la pared o membrana celular del microorganismo, gracias a su pequeño tamaño y a sus propiedades fisicoquímicas, y son capaces de afectar directamente a determinados componentes intracelulares del microorganismo, como aquellos que presentan moléculas con grupos sulfuro o con fósforo, como por ejemplo algunas moléculas intracelulares como ADN o proteínas, modificando su estructura y función y provocando su destrucción.
- Las AgNPs son capaces de producir la liberación de iones plata (Ag^+) en el interior del medio celular. Estos iones interactúan con los componentes celulares y, debido a su tamaño y carga, son capaces de alterar sus rutas metabólicas, membranas y material genético, provocando su destrucción (59).

En cuanto a los principales factores fisicoquímicos que afectan a la actividad antibacteriana de las AgNPs, podemos destacar:

- El tamaño: Lu et al. (60) demostraron como las AgNPs de un tamaño de 5 nm presentan una actividad antimicrobiana mayor que las de 15 y 55 nm. Esto se cree que se debe a que cuando las AgNPs presentan un tamaño pequeño, estas producen una mayor generación de especies reactivas de oxígeno y por tanto su actividad antibacteriana es mayor.
- La carga eléctrica: tal y como describen Abbaszadegan et al. (61), las AgNPs cargadas positivamente muestran una mayor actividad antimicrobiana que las

que no están cargadas, creyendo que se debe a la atracción electrostática producida entre las AgNPs cargadas positivamente y las bacterias cargadas negativamente, que favorecen su destrucción. Generalmente, la carga positiva en una AgNPs se puede conseguir recubriéndola con una molécula orgánica o un polímero con un grupo funcional cargado positivamente, generalmente grupos amino (-NH₂) (61).

En cuanto a otras propiedades que presentan las AgNPs, podemos destacar su relativamente baja toxicidad, una biocompatibilidad relativamente buena y una interacción selectiva con determinadas células del cuerpo humano, lo que justifica su uso y producción en el ámbito de la farmacia y la medicina (56).

4.2.2. Síntesis

De igual modo que con las AuNPs, existen diferentes rutas para sintetizar AgNPs. Estas se pueden clasificar en dos grandes grupos:

- Métodos *top-down*: se producen AgNPs a partir de plata en estado metálico en estado sólido o en forma de aerosol, que se reduce en tamaño hasta formar AgNPs estables (57). Dentro de estos métodos están los métodos físicos de fabricación de nanopartículas, como la molienda de bolas, la ablación láser o la pulverización catódica (62).
- Métodos *bottom-up*: consisten en la nanoestructuración y estabilización de átomos de plata a través de diferentes métodos hasta formar AgNPs (57). Se puede partir de átomos, moléculas o partículas coloidales (56). Dentro de estos métodos están los métodos químicos o los métodos biológicos (63).

Cada método tiene sus ventajas y desventajas. Por ejemplo, los métodos físicos se utilizan generalmente para obtener grandes cantidades de NPs, aunque también consumen unas grandes cantidades de energía y pueden requerir el uso de un equipamiento e instrumentación cara, así como unas condiciones de presión y temperatura elevadas (64).

Por otra parte, los métodos químicos de síntesis son muy amplios, e incluyen los métodos electroquímicos, la síntesis mediante el método sol-gel y la reducción química.

Este tipo de métodos se utilizan especialmente para obtener AgNPs con forma esférica a un coste relativamente bajo (64). Con estos métodos, se parte de un precursor metálico, un agente reductor y un agente estabilizante, por lo que son relativamente sencillos de llevar a cabo y en algunos casos son escalables. Sin embargo, estos procesos generalmente requieren la utilización de compuestos tóxicos o solventes, que pueden producir sustancias contaminantes para el medio ambiente o residuos peligrosos (65).

Por último, otra posible ruta de gran importancia en la actualidad es el método biológico o método biomimético (aunque generalmente en la literatura científica se emplea más el primer término). El método biológico consiste en la síntesis de AgNPs utilizando microorganismos como hongos o bacterias como mediadores, que emplean extractos naturales como reactivos (66). En este caso, se trata de procesos mucho más complejos debido a la necesidad de mantener en buenas condiciones el medio de crecimiento de los microorganismos y de implementar procesos de separación de los productos generados. El método biológico se trata de un proceso mucho más sostenible con el medio ambiente y no genera apenas sustancias tóxicas, por lo que constituye el mayor reto para las futuras líneas de investigación en este aspecto (67).

De entre todos los métodos, la ruta más empleada para sintetizar AgNPs es el método químico por reducción (68). En este método se utiliza una sal de plata, un agente reductor y un estabilizante o agente de terminación de cadena (*"capping agent"*), para controlar el crecimiento de la NP. La sal de plata más empleada es el nitrato de plata, por su bajo coste y buena estabilidad. El agente reductor puede ser, por ejemplo, el borohidruro de sodio, el citrato de sodio, el ascorbato de sodio y el hidrógeno gas (68). De entre estos, el borohidruro de sodio es el agente reductor más empleado por su elevado poder reductor y su capacidad de actuar también como agente estabilizante y evitar la agregación de AgNPs durante su descomposición (69). En cuanto a otros estabilizantes empleados, destacar el uso de diferentes surfactantes y ligandos, así como polímeros que contienen grupos funcionales como la polivinilpirrolidona (PVP), el poli(etilen glicol) (PEG), el ácido polimetacrílico o el polimetil metacrilato (PMMA), entre otros (68). En cuanto al agente de terminación de cadena más empleado, destacar el uso del ácido cítrico (17). Este agente de terminación (*"capping agent"*) se trata de un

surfactante o polímero que se une a la nanopartícula en forma de recubrimiento, disminuyendo su tensión superficial y evitando su aglomeración (17).

La síntesis de AgNPs en presencia de citrato sódico (Cit-AgNPs) es muy común y existen diferentes rutas para llevarla a cabo en medio acuoso. En este tipo de rutas de síntesis, el citrato sódico actúa como agente reductor y también como estabilizante, ya que se queda adherido a la superficie de la AgNP y la estabiliza. Una de las rutas de síntesis de este tipo es la propuesta por Bastus et al. (70), que consiste en:

- Se mezcla citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) y ácido tánico ($\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_4$) y se calienta mientras se mantiene en agitación continua.
- Cuando la solución comienza a hervir, se añade nitrato de plata (AgNO_3) y se mantiene en agitación para que se formen las AgNPs.
- La solución se centrifuga, una vez atemperada, y se recogen las AgNPs sedimentadas, que se pueden redispersar en una solución de citrato sódico.

En esta ruta, tanto el ácido tánico como el ácido cítrico actúan como agentes reductores, y el ácido tánico controla especialmente el tamaño de las AgNPs, permitiendo alcanzar una distribución de tamaño de partícula muy estrecha (17).

Por último, destacar que las AgNPs se pueden sintetizar también en un sistema bifásico agua-fase orgánica para producir AgNPs uniformes y de tamaño controlable. En este caso, el precursor metálico y el agente reductor se separan en dos fases, por lo que la velocidad de interacción se puede controlar a través de la intensidad del transporte en la interfase entre las fases acuosas y orgánicas (68). La síntesis de AgNPs en un solvente orgánico se puede realizar de una manera similar a la descrita en el apartado anterior con las AuNPs. Por ejemplo, Mari et al. (71) describieron un método para sintetizar AgNPs estabilizadas con alcanotiol con un diámetro de 4,2 nm aproximadamente. Este proceso consiste en:

- Disolver, por una parte, tiosulfato sódico pentahidratado en agua y, por otra parte, 1-bromodecano en etanol.
- Mezclar ambas disoluciones y mantenerlas en agitación a reflujo durante 3 horas. Tras este tiempo, tiene lugar la reacción:



- Recoger los cristales de S-dodeciltiosulfato de sodio mediante un papel de filtro y volver a cristalizarlos, ahora solo en etanol.
- Añadir nitrato de sodio (AgNO_3) a una solución de S-dodeciltiosulfato de sodio en etanol y agitar unos minutos.
- Añadir borohidruro de sodio (NaBH_4) a la mezcla, previamente disuelto en etanol, y ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), agitando a 50 °C durante 3 horas.
- Centrifugar la mezcla resultante y recoger las AgNPs sedimentadas, que se dejan secar hasta obtener las AgNPs finalmente.

4.2.3. Funcionalización

En el caso de las AgNPs, como en muchas otras nanopartículas, es importante llevar a cabo una modificación superficial para estabilizarlas y que no tiendan a aglomerarse ya que, si se da el caso, su tamaño global será mayor y su actividad antimicrobiana se verá mermada, de acuerdo a la relación descrita anteriormente (57). Una de las formas de evitar esta agregación es controlar la carga superficial de las AgNPs. Cuando esta es mayor de +30 mV o menor de -30 mV (72), las NPs sufren fuerzas de repulsión entre ellas, que impiden su aglomeración.

Por otra parte, las AgNPs también se pueden sintetizar con diferentes agentes químicos que presenten actividad antimicrobiana por sí mismos, con el objetivo de promover esta funcionalidad en las AgNPs también. Ejemplos de estas sustancias, que pueden ser polímeros o compuestos orgánicos, son el quitosano, cuyo recubrimiento sobre AgNPs ha demostrado aumentar la actividad antimicrobiana contra *S. Aureus*, *P. aeruginosa* y *Salmonella typhimurium* (73).

Otro ejemplo lo tenemos en el estudio realizado por Ashmore et al. (74), que analizaron la actividad antimicrobiana de las AgNPs frente a *E. coli*, comparando esta actividad con la de las AgNPs recubiertas con PVP y con un polímero sintético. Se mostró como la inhibición del crecimiento bacteriano fue el doble de efectivo en el caso de las AgNPs recubiertas con el polímero respecto de las AgNPs sin recubrir, a pesar de contener una concentración de plata menor.

Otro estudio (75) demuestra también el efecto de la funcionalización de las AgNPs con moléculas orgánicas de origen natural, concretamente con quitosano y extracto de alga

marina marrón. En este trabajo se sintetizaron AgNPs con actividad antimicrobiana frente a *Salmonella enterica* y *Bacillus cereus*, entre otras bacterias, y se demostró como la actividad antimicrobiana frente a estas bacterias era mayor en las AgNPs funcionalizadas con estas moléculas orgánicas que en las AgNPs sin funcionalizar.

4.2.4. Aplicaciones

Al igual que las AuNPs, cuando las AgNPs se modifican superficialmente con las moléculas adecuadas, estas se pueden emplear como agentes de transporte o “*carriers*” para la liberación localizada de determinados compuestos terapéuticos, así como en la detección y el diagnóstico de diferentes enfermedades y en los campos de la óptica y la química, ya que pueden emplearse como sensores para la captación de imágenes (56).

Sin embargo, su excepcional actividad antibacteriana es la que ha captado una mayor atención por parte de los investigadores (57). El uso de AgNPs cobra una mayor relevancia en la época actual, ya que con el paso del tiempo aparecen un número cada vez mayor de patógenos resistentes a los antibióticos y medicamentos, que hace necesario el desarrollo de nuevos medicamentos o tratamientos que permitan desactivar este tipo de patógenos (57).

Las AgNPs han mostrado actividad antibacteriana frente a un número muy alto de patógenos, como *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, entre otros (57).

Por otra parte, diversos estudios han demostrado la actividad antimicrobiana de las AgNPs cuando se administran en combinación con determinados antibióticos. Por ejemplo, en un estudio reciente, se utilizaron AgNPs conjuntamente con antibióticos como el cloranfenicol, la kanamicina A y la ampicilina, entre otros, observando por ejemplo que el tratamiento con AgNPs y cloranfenicol fue capaz de inhibir el crecimiento de *E. coli*, *S. typhimurium* y *S. aureus* hasta un 50 %. Por otra parte, el tratamiento con AgNPs y kanamicina consiguió inhibir el crecimiento de los mismos patógenos hasta un 95 % (76). Se cree que este efecto sinérgico se debe a la alteración de la integridad y del

potencial de la membrana celular que causan las AgNPs, aumentando su permeabilidad y permitiendo el paso del antibiótico de manera más eficiente (57).

Diversos autores han analizado también la capacidad de las AgNPs para combatir infecciones bacterianas “*in vivo*”. Por ejemplo, Alizadeh et al. (77) demostraron como, utilizando las AgNPs conjugadas con el antibiótico azlocilina, se consigue una mayor actividad antibacteriana frente a *P. aeruginosa*. Este estudio también mostró como la conjugación azlocilina – AgNPs es capaz de reducir la colonización del mismo patógeno en el bazo de ratones.

Por último, otro ejemplo lo tenemos en el artículo de Farooq et al. (78). En este estudio, se sintetizaron AgNPs conjugadas con el antibiótico rifampicina por el método químico, siguiendo el método Tarkevich (18), obteniendo AgNPs con un tamaño de $15-18 \pm 4$ nm. Se demostró como las AgNPs sintetizadas conjugadas con este antibiótico eran más activas frente a *S. aureus* y *K. pneumoniae* que el medicamento por sí solo.

Por otra parte, a la hora de administrar un medicamento con AgNPs, es importante tener en cuenta el perfil genético y molecular del paciente, con el objetivo de minimizar los posibles efectos adversos que puedan tener las AgNPs sobre el paciente (79). En este aspecto, diferentes organizaciones internacionales, como la FDA (Food and Drug Administration), la ISO (International Organization for Standardization) o la BSI (British Standards Institution) están promoviendo el uso de la nanotecnología en el ámbito médico de manera segura, facilitando su desarrollo e implementación, así como destacando la importancia de su uso de forma segura para el paciente (80).

En este sentido, existen a nivel comercial diferentes apósitos para heridas que contienen en su composición AgNPs (79). En la tabla 3 se muestran algunos de ellos.

A pesar de que los productos mencionados en la tabla 3 son fáciles de aplicar y mantienen una humedad adecuada en la herida, entre otras ventajas, su uso aún tiene una eficacia y seguridad dudosa, así como una relación eficacia-precio no muy buena (79).

Por otra parte, existen también medicamentos aprobados clínicamente que contienen AgNPs en su composición y que muestran una actividad antimicrobiana excepcional. Un ejemplo lo tenemos en el estudio realizado por Masri et al. (81), donde se sintetizaron

AgNPs conjugadas con los medicamentos aprobados clínicamente cefradina y vildagliptina por el método químico. Se comprobó cómo las AgNPs conjugadas con estos medicamentos tenían una actividad antimicrobiana frente a *E. coli K1*, *MRSA*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *B. cereus* y *S. pyogenes* mayor que el medicamento por sí solo.

En este aspecto, a la hora de administrar medicamentos que contengan AgNPs en su composición, es crucial tener en cuenta el posible efecto adverso que puede tener la ingesta de estas NPs en una concentración elevada sobre el paciente. En esta línea, han surgido diversos estudios para conocer en más detalle los posibles efectos citotóxicos que pueden tener la exposición a altas dosis de AgNPs, tanto en la piel (82), como en el sistema respiratorio (83) o en el sistema digestivo (84). A pesar de estos estudios, todavía no hay ninguna ley ni reglas claras en relación a la circulación y comercialización de este tipo de NPs, que permitan asegurar su uso de forma segura para el paciente (56). De hecho, se ha demostrado como la exposición crónica a AgNPs en humanos puede provocar su acumulación en el cuerpo humano, dando lugar a una condición conocida como argiria, que provoca que el color de la piel se vuelva azul-gris y se produzca la decoloración del ojo (79).

Tabla 3. Apósitos para heridas comerciales aprobados clínicamente que contienen AgNPs (79)

Nombre	Empresa	Características	Usos clínicos
Acticoat®	Smith and Nephew	Apósito para heridas con AgNPs en forma cristalina	Heridas como quemaduras o úlceras, para prevenir la infección bacteriana y curar la herida
Silverline®	Spiegelberg	Catéter ventricular de poliuretano recubierto con AgNPs	Evitar infecciones en el catéter. Se puede adaptar para utilizarlo para realizar derivaciones (“shunts”)
SilvaSorb®	Medline industries	Diferentes productos antibacterianos: gel de manos, apósitos para heridas, rellenos, ...	Evitar infección bacteriana en heridas, desinfectar la piel e higiene personal de manos

ON-Q I-Flow Catéter recubierto con
SilverSoaker® Corporation AgNPs

Liberación de medicamentos
como anestesia local o
analgésicos, tratamiento con
antibióticos, tratamiento del
dolor postoperatorio

4.3. Discusión de resultados

Como se ha observado en la revisión bibliográfica realizada en este capítulo, el uso de las nanopartículas de oro y plata está muy extendido actualmente en el ámbito de la medicina y la farmacia y sus aplicaciones son muy numerosas. Se trata de un tema en pleno auge y la información disponible en este ámbito es ingente.

Por una parte, se ha observado como existen características comunes entre ambos metales, como por ejemplo las diferentes rutas que existen para sintetizar las nanopartículas. Destacar que, en ambos casos, la ruta por reducción química es la más empleada, y el protocolo para sintetizar las nanopartículas a escala laboratorio es muy similar, variando evidentemente las especies químicas implicadas en cada caso. Además, se ha mostrado que en ambos casos la tendencia actual en el campo de la síntesis de nanopartículas es la “síntesis verde” o ruta biológica, que destaca por emplear microorganismos y extractos naturales sintetizados por ellos mismos, dejando de lado el empleo de solventes o de otros compuestos que producen sustancias tóxicas y contaminantes para el medio ambiente. Este tipo de síntesis supone, por tanto, un gran reto para el futuro y está en línea con los conceptos de sostenibilidad y “síntesis química verde” que están tan presentes en la sociedad actual. Sin embargo, aún queda un largo camino por investigar en este aspecto, ya que, tal y como se ha visto, la síntesis de nanopartículas por este método no permite un control exhaustivo del tamaño y de la forma de las nanopartículas sintetizadas.

Por otra parte, se ha observado como existen aplicaciones similares para ambos tipos de nanopartículas, destacando su uso como agente de transporte o “carrier” para la liberación controlada de medicamentos en el cuerpo humano o su empleo para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Sin embargo, la principal aplicación por la

que destaca cada nanopartícula es diferente: mientras que las nanopartículas de oro destacan especialmente en los campos de liberación controlada de medicamentos, imagen, diagnóstico y tratamiento de enfermedades, sobre todo en los campos relacionados con el cáncer, las nanopartículas de plata destacan especialmente por sus propiedades antibacterianas y por su capacidad para desactivar un amplio número de patógenos distintos. En este aspecto, se ha mostrado que, en todos los artículos expuestos en esta revisión, cuando se utilizan nanopartículas conjuntamente con un medicamento, la utilización de las nanopartículas mejora la eficacia del medicamento con el que se asocia, haciendo que el tratamiento de la enfermedad se pueda realizar de manera más efectiva. Este hecho supone una gran ventaja en la sociedad actual, donde existe un número cada vez mayor de patógenos resistentes a los antibióticos, por lo que con la ayuda de las nanopartículas podríamos hacer frente a ellos.

Destacar también que, aunque en este trabajo se ha hablado únicamente de las nanopartículas de oro y de plata, al ser las más estudiadas actualmente en el ámbito científico, existen otras nanopartículas metálicas con aplicaciones en el ámbito de la salud, aunque los conocimientos acerca de ellas no están tan extendidos. Podemos destacar, por ejemplo, las nanopartículas de titanio (85), platino (85,86), paladio (86,87) y cobre (88). A pesar de que no se ha hablado de estas nanopartículas metálicas en este trabajo, los fundamentos acerca de su síntesis, funcionalización y aplicaciones son similares a los de las nanopartículas de oro y de plata (85).

Por último, se ha observado también como existen diferentes líneas de investigación abiertas que se espera que se desarrollen en el futuro. Además de la síntesis de nanopartículas por el método biológico mencionado anteriormente, podemos destacar el campo de la nanoseguridad, es decir, analizar los posibles efectos adversos que estas nanopartículas podrían tener en nuestro cuerpo cuando las ingerimos, ya que, cuando se administran en el cuerpo humano, es de esperar que surja una preocupación por parte del paciente sobre estos posibles efectos adversos, causados principalmente por el desconocimiento en este campo. Con la ayuda de la investigación y el desarrollo, se podrá arrojar cada vez más luz sobre estos efectos adversos, de modo que con el paso del tiempo la utilización de las nanopartículas metálicas en el sector de la salud se realice

de forma más habitual y segura, siendo capaces así de aprovechar la multitud de ventajas que se asocian con su empleo y que han sido demostradas científicamente.

5. CONCLUSIONES

De entre las principales conclusiones que podemos extraer de este trabajo, podemos destacar que:

1. Se han identificado las nanopartículas de oro y de plata como las principales nanopartículas metálicas con aplicaciones en medicina y farmacia.
2. Se han presentado las principales rutas empleadas para sintetizar estas nanopartículas metálicas, destacando especialmente la síntesis química por reducción.
3. La síntesis de nanopartículas es un proceso complejo, siendo crucial el control tanto de la forma como del tamaño de las nanopartículas sintetizadas. Esto requiere la optimización de estas reacciones químicas.
4. La síntesis biológica puede constituir la principal línea de investigación futura en este ámbito, algo que está en línea con los conceptos de “química verde” y sostenibilidad tan presentes en la situación actualidad.
5. Las nanopartículas se pueden funcionalizar superficialmente con diferentes especies químicas para dotarlas de unas propiedades determinadas, que son muy variadas y dependen del compuesto empleado en la funcionalización.
6. Se han descrito las principales propiedades de las nanopartículas de oro y de plata, destacando especialmente las propiedades ópticas en las nanopartículas de oro, y las propiedades antibacterianas en las de plata.
7. Se han mostrado las principales aplicaciones que presentan las nanopartículas metálicas en el campo de la medicina y la farmacia, destacando especialmente

la liberación controlada de medicamentos, el diagnóstico y tratamiento de enfermedades o la obtención de imágenes o “*imaging*”, entre otras.

8. Se han identificado diferentes líneas de investigación futuras, como la síntesis biológica de nanopartículas mencionada anteriormente, o el campo de la nanoseguridad, que está relacionado especialmente con la ingesta de antibióticos que contengan nanopartículas de plata.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Khan AK, Rashid R, Murtaza G, Zahra A. Gold nanoparticles: Synthesis and applications in drug delivery. *Trop J Pharm Res.* 2014;13(7):1169–77.
2. Dobrucka R. Selected Applications of Metal Nanoparticles in Medicine and Pharmacology. 2019;15(4):449–57.
3. Steckiewicz KP, Inkielewicz-Stepniak I. Modified nanoparticles as potential agents in bone diseases: Cancer and implant-related complications. *Nanomaterials.* 2020;10(4).
4. Yaqoob AA, Ahmad H, Parveen T, Ahmad A, Oves M, Ismail IMI, et al. Recent Advances in Metal Decorated Nanomaterials and Their Various Biological Applications: A Review. *Front Chem.* 2020;8(May):1–23.
5. Pelaz B, Alexiou C, Alvarez-Puebla RA, Alves F, Andrews AM, Ashraf S, et al. Diverse Applications of Nanomedicine. *ACS Nano.* 2017;11(3):2313–81.
6. Munir KS, Wen C, Li Y. Carbon Nanotubes and Graphene as Nanoreinforcements in Metallic Biomaterials: a Review. *Adv Biosyst.* 2019;3(3):1–24.
7. Shaalan M, Saleh M, El-Mahdy M, El-Matbouli M. Recent progress in applications of nanoparticles in fish medicine: A review [Internet]. Vol. 12, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.* Elsevier B.V.; 2016. 701–710 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.005>
8. Ashraf; S, Pelaz; B, Pino; P del, Carril; M, Escudero; A, Parak; WJ, et al. Gold-Based Nanomaterials for Applications in Nanomedicine. *Discuss Faraday Soc* [Internet]. 2016;11:169–202. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-22942-3>
9. Hu X, Zhang Y, Ding T, Liu J, Zhao H. Multifunctional Gold Nanoparticles: A Novel Nanomaterial for Various Medical Applications and Biological Activities. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8(August):1–17.
10. Ramalingam V. Multifunctionality of gold nanoparticles: Plausible and convincing properties. *Adv Colloid Interface Sci* [Internet]. 2019;271:101989. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.101989>
11. Myroshnychenko V, Rodríguez-Fernández J, Pastoriza-Santos I, Funston AM, Novo C, Mulvaney P, et al. Modelling the optical response of gold nanoparticles. *Chem Soc Rev.* 2008;37(9):1792–805.

12. Personick ML, Mirkin CA. Making sense of the mayhem behind shape control in the synthesis of gold nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2013;135(49):18238–47.
13. Sharifi M, Attar F, Saboury AA, Akhtari K, Hooshmand N, Hasan A, et al. Plasmonic gold nanoparticles: Optical manipulation, imaging, drug delivery and therapy. *J Control Release [Internet].* 2019;311–312:170–89. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.08.032>
14. Goodacre R, Graham D, Faulds K. Recent developments in quantitative SERS: Moving towards absolute quantification. *TrAC - Trends Anal Chem [Internet].* 2018;102:359–68. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.005>
15. Brust M, Walker M, Bethell D, Schiffrin DJ, Whyman R. Synthesis of Thiol-derivatised Gold Nanoparticles in. 2000;801–2.
16. Lin CAJ, Sperling RA, Li JK, Yang TY, Li PY, Zanella M, et al. Design of an amphiphilic polymer for nanoparticle coating and functionalization. *Small.* 2008;4(3):334–41.
17. Hühn J, Carrillo-Carrion C, Soliman MG, Pfeiffer C, Valdeperez D, Masood A, et al. Selected standard protocols for the synthesis, phase transfer, and characterization of inorganic colloidal nanoparticles. *Chem Mater.* 2017;29(1):399–461.
18. Turkevich; J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc.* 1951;11:55–75.
19. Piella J, Bastús NG, Puntès V. Size-Controlled Synthesis of Sub-10-nanometer Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles and Related Optical Properties. *Chem Mater.* 2016;28(4):1066–75.
20. Alkilany AM, Nagaria PK, Hexel CR, Shaw TJ, Murphy CJ, Wyatt MD. Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: Molecular origin of cytotoxicity and surface effects. *Small.* 2009;5(6):701–8.
21. Ye X, Zheng C, Chen J, Gao Y, Murray CB. Using binary surfactant mixtures to simultaneously improve the dimensional tunability and monodispersity in the seeded growth of gold nanorods. *Nano Lett.* 2013;13(2):765–71.
22. Pham T, Jackson JB, Halas NJ, Lee TR. Preparation and characterization of gold nanoshells coated with self-assembled monolayers. *Langmuir.* 2002;18(12):4915–20.
23. Senthil Kumar P, Pastoriza-Santos I, Rodríguez-González B, Javier García De Abajo F, Liz-Marzán LM. High-yield synthesis and optical response of gold nanostars. *Nanotechnology.* 2008;19(1):1–7.
24. Luangpipat T, Beattie IR, Chisti Y, Haverkamp RG. Gold nanoparticles produced in a microalga. *J Nanoparticle Res.* 2011;13(12):6439–45.
25. Rivera-Gil P, Jimenez De Aberasturi D, Wulf V, Pelaz B, Del Pino P, Zhao Y, et al. The challenge to relate the physicochemical properties of colloidal nanoparticles to their cytotoxicity. *Acc Chem Res.* 2013;46(3):743–9.
26. Lee SH, Rusakova I, Hoffman DM, Jacobson AJ, Lee TR. Monodisperse SnO₂-coated gold nanoparticles are markedly more stable than analogous SiO₂-coated gold nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2013;5(7):2479–84.
27. Dreaden EC, Alkilany AM, Huang X, Murphy CJ, El-Sayed MA. The golden age: Gold nanoparticles for biomedicine. *Chem Soc Rev.* 2012;41(7):2740–79.

28. Roux S, Garcia B, Bridot JL, Salomé M, Marquette C, Lemelle L, et al. Synthesis, characterization of dihydrolipoic acid capped gold nanoparticles, and functionalization by the electroluminescent luminol. *Langmuir*. 2005;21(6):2526–36.
29. Brewer SH, Glomm WR, Johnson MC, Knag MK, Franzen S. Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces. *Langmuir*. 2005;21(20):9303–7.
30. Mayya KS, Schoeler B, Caruso F. Preparation and Organization of Nanoscale Polyelectrolyte-Coated Gold Nanoparticles. 2003;(3):183–8.
31. Mahl D, Greulich C, Meyer-Zaika W, Köller M, Epple M. Gold nanoparticles: Dispersibility in biological media and cell-biological effect. *J Mater Chem*. 2010;20(29):6176–81.
32. Duncan B, Kim C, Rotello VM. Gold nanoparticle platforms as drug and biomacromolecule delivery systems. *J Control Release [Internet]*. 2010 Nov 20 [cited 2021 Oct 5];148(1):122. Available from: [/pmc/articles/PMC2952284/](#)
33. Wójcik M, Lewandowski W, Król M, Pawłowski K, Mieczkowski J, Lechowski R, et al. Enhancing anti-tumor efficacy of Doxorubicin by non-covalent conjugation to gold nanoparticles - in vitro studies on feline fibrosarcoma cell lines. *PLoS One [Internet]*. 2015 Apr 1 [cited 2021 Oct 5];10(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25928423/>
34. Thiruvengadam M, Chung IM, Gomathi T, Ansari MA, Gopiesh Khanna V, Babu V, et al. Synthesis, characterization and pharmacological potential of green synthesized copper nanoparticles. *Bioprocess Biosyst Eng [Internet]*. 2019;42(11):1769–77. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02173-y>
35. Paul Podsiadlo †,||, Vladimir A. Sinani †,||, Joong Hwan Bahng ‡, Nadine Wong Shi Kam †, Jungwoo Lee ‡ and, Nicholas A. Kotov* †,‡,§. Gold Nanoparticles Enhance the Anti-Leukemia Action of a 6-Mercaptopurine Chemotherapeutic Agent. *Langmuir [Internet]*. 2007 Jan 15 [cited 2021 Oct 5];24(2):568–74. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la702782k>
36. Joshi H, Bhumkar D, Joshi K, Pokharkar V, Sastry M. Gold nanoparticles as carriers for efficient transmucosal insulin delivery. *Langmuir [Internet]*. 2006 Jan 3 [cited 2021 Oct 5];22(1):300–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16378435/>
37. Singh P, Pandit S, Mokkapati V, Garg A, Ravikumar V, Mijakovic I. Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer. *Int J Mol Sci [Internet]*. 2018 Jul 6 [cited 2021 Oct 5];19(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29986450/>
38. Rizk H, Christoforou N, Lee S. Optimization of anti-cancer drugs and a targeting molecule on multifunctional gold nanoparticles. *Nanotechnology [Internet]*. 2016 Mar 23 [cited 2021 Oct 5];27(18). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27004512/>
39. Murphy CJ, Thompson LB, Alkilany AM, Sisco PN, Boulos SP, Sivapalan ST, et al. The Many Faces of Gold Nanorods. *J Phys Chem Lett [Internet]*. 2010 Oct 7 [cited 2021 Oct 5];1(19):2867–75. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jz100992x>
40. Singh AP, Mustafi NN, Sharma YC, Agarwal AK. Introduction to Alternative Fuels and Their Utilization Strategies in Internal Combustion Engines. *Energy, Environment, and Sustainability*. 2020. 3–6 p.
41. Jing H, Zhang Q, Large N, Yu C, Blom D, Nordlander P, et al. Tunable plasmonic

- nanoparticles with catalytically active high-index facets. *Nano Lett* [Internet]. 2014 Jun 11 [cited 2021 Oct 5];14(6):3674–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24842375/>
42. Kwatra D, Venugopal A, Anant S. Nanoparticles in radiation therapy: a summary of various approaches to enhance radiosensitization in cancer. *Transl Cancer Res* [Internet]. 2013 [cited 2021 Oct 5];2(4). Available from: <https://tcr.amegrouops.com/article/view/1550/html>
 43. Jain S, Coulter J, Hounsell A, Butterworth K, McMahon S, Hyland W, et al. Cell-specific radiosensitization by gold nanoparticles at megavoltage radiation energies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* [Internet]. 2011 Feb 1 [cited 2021 Oct 5];79(2):531–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21095075/>
 44. Ou J, Zhou Z, Chen Z, Tan H. Optical Diagnostic Based on Functionalized Gold Nanoparticles. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2021 Oct 5];20(18). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31491861/>
 45. Baek S, Singh R, Kim T, Seo J, Shin U, Chrzanowski W, et al. Triple Hit with Drug Carriers: pH- and Temperature-Responsive Theranostics for Multimodal Chemo- and Photothermal Therapy and Diagnostic Applications. *ACS Appl Mater Interfaces* [Internet]. 2016 Apr 27 [cited 2021 Oct 5];8(14):8967–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26926826/>
 46. Aldewachi H, Chalati T, Woodroffe M, Bricklebank N, Sharrack B, Gardiner P. Gold nanoparticle-based colorimetric biosensors. *Nanoscale* [Internet]. 2017 Jan 7 [cited 2021 Oct 5];10(1):18–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29211091/>
 47. Zhou J, Cao Z, Panwar N, Hu R, Wang X, Qu J, et al. Functionalized gold nanorods for nanomedicine: Past, present and future. *Coord Chem Rev*. 2017 Dec 1;352:15–66.
 48. El-Husseini DM, Helmy NM, Tammam RH. The effect of gold nanoparticles on the diagnostic polymerase chain reaction technique for equine herpes virus 1 (EHV-1). *RSC Adv* [Internet]. 2016 Jun 7 [cited 2021 Oct 5];6(60):54898–903. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/ra/c6ra08513j>
 49. Lusic H, Grinstaff MW. X-ray-Computed Tomography Contrast Agents. *Chem Rev* [Internet]. 2012 Mar 13 [cited 2021 Oct 5];113(3):1641–66. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr200358s>
 50. Cormode D, Naha P, Fayad Z. Nanoparticle contrast agents for computed tomography: a focus on micelles. *Contrast Media Mol Imaging* [Internet]. 2014 Jan [cited 2021 Oct 5];9(1):37–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24470293/>
 51. Kłębowski B, Depciuch J, Parlińska-Wojtan M, Baran J. Applications of Noble Metal-Based Nanoparticles in Medicine. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 Dec 13 [cited 2021 Oct 5];19(12):4031. Available from: [/pmc/articles/PMC6320918/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31491861/)
 52. Rahman W, Corde S, Yagi N, Abdul Aziz S, Annabell N, Geso M. Optimal energy for cell radiosensitivity enhancement by gold nanoparticles using synchrotron-based monoenergetic photon beams. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2014 May 19 [cited 2021 Oct 5];9(1):2459–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24899803/>
 53. Mackey MA, Ali MRK, Austin LA, Near RD, El-Sayed MA. The Most Effective Gold Nanorod Size for Plasmonic Photothermal Therapy: Theory and In Vitro Experiments. *J Phys Chem B* [Internet]. 2014 Feb 6 [cited 2021 Oct 5];118(5):1319–26. Available from:

<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp409298f>

54. Liu C, Li S, Gu Y, Xiong H, Wong W, Sun L. Multispectral Photoacoustic Imaging of Tumor Protease Activity with a Gold Nanocage-Based Activatable Probe. *Mol Imaging Biol* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2021 Oct 5];20(6):919–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29736563/>
55. Xu L, Wang YY, Huang J, Chen CY, Wang ZX, Xie H. Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. *Theranostics*. 2020;10(20):8996–9031.
56. Kowalczyk P, Szymczak M, Maciejewska M, Laskowski Ł, Laskowska M, Ostaszewski R, et al. All that glitters is not silver-A new look at microbiological and medical applications of silver nanoparticles. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. p. 1–29.
57. Bruna T, Maldonado-Bravo F, Jara P, Caro N. Silver nanoparticles and their antibacterial applications. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13).
58. Seong M, Lee DG. Silver Nanoparticles Against Salmonella enterica Serotype Typhimurium: Role of Inner Membrane Dysfunction. *Curr Microbiol* 2017 746 [Internet]. 2017 Mar 21 [cited 2021 Oct 12];74(6):661–70. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-017-1235-9>
59. Gomaa EZ. Silver nanoparticles as an antimicrobial agent: A case study on Staphylococcus aureus and Escherichia coli as models for Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Gen Appl Microbiol*. 2017;63(1):36–43.
60. Lu Z, Rong K, Li J, Yang H, Chen R. Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *J Mater Sci Mater Med* 2013 246 [Internet]. 2013 Feb 26 [cited 2021 Oct 12];24(6):1465–71. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10856-013-4894-5>
61. Abbaszadegan A, Ghahramani Y, Gholami A, Hemmateenejad B, Dorostkar S, Nabavizadeh M, et al. The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: A preliminary study. *J Nanomater*. 2015;2015.
62. Herrera B, Bruna T, Guerra D, Yutronic N, Kogan MJ, Jara P, et al. Silver Nanoparticles Produced by Magnetron Sputtering and Selective Nanodecoration onto α -Cyclodextrin/Carboxylic Acid Inclusion Compounds Crystals. *Adv Nanoparticles* [Internet]. 2013 May 21 [cited 2021 Oct 12];2(2):112–9. Available from: http://www.scirp.org/Html/7-2610045_31478.htm
63. Li Y, Pi QM, You HH, Li JQ, Wang PC, Yang X, et al. A smart multi-functional coating based on anti-pathogen micelles tethered with copper nanoparticles: Via a biosynthesis method using l-vitamin C. *RSC Adv* [Internet]. 2018 May 17 [cited 2021 Feb 27];8(33):18272–83. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2018/ra/c8ra01985a>
64. Yaqoob AA, Umar K, Ibrahim MNM. Silver nanoparticles: various methods of synthesis, size affecting factors and their potential applications—a review. *Appl Nanosci* 2020 105 [Internet]. 2020 Mar 13 [cited 2021 Oct 12];10(5):1369–78. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13204-020-01318-w>
65. Tran QH, Nguyen VQ, Le A-T. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol* [Internet]. 2013 May 14 [cited 2021 Oct 12];4(3):033001. Available from:

<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/2043-6262/4/3/033001>

66. Balaji DS, Basavaraja S, Deshpande R, Mahesh DB, Prabhakar BK, Venkataraman A. Extracellular biosynthesis of functionalized silver nanoparticles by strains of *Cladosporium cladosporioides* fungus. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2009 Jan 1;68(1):88–92.
67. Zhang X-F, Liu Z-G, Shen W, Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci* 2016, Vol 17, Page 1534 [Internet]. 2016 Sep 13 [cited 2021 Oct 12];17(9):1534. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/17/9/1534/htm>
68. Ge L, Li Q, Wang M, Ouyang J, Li X, Xing MMQ. Nanosilver particles in medical applications: Synthesis, performance, and toxicity. *Int J Nanomedicine*. 2014;9(1):2399–407.
69. Moore K. A new silver dressing for wounds with delayed healing. *Wounds UK*. 2006;2(2):70–8.
70. Bastús NG, Merkoçi F, Piella J, Puentes V. Synthesis of Highly Monodisperse Citrate-Stabilized Silver Nanoparticles of up to 200 nm: Kinetic Control and Catalytic Properties. *Chem Mater* [Internet]. 2014 May 13 [cited 2021 Oct 12];26(9):2836–46. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cm500316k>
71. A M, P I, G M, L P, A M, S K, et al. High yield synthesis of pure alkanethiolate-capped silver nanoparticles. *Langmuir* [Internet]. 2010 Oct 1 [cited 2021 Oct 12];26(19):15561–6. Available from: <https://europepmc.org/article/med/20822171>
72. Saeb ATM, Alshammari AS, Al-Brahim H, Al-Rubeaan KA. Production of silver nanoparticles with strong and stable antimicrobial activity against highly pathogenic and multidrug resistant bacteria. *Sci World J*. 2014;2014.
73. Jena P, Mohanty S, Mallick R, Jacob B, Sonawnae A. Toxicity and antibacterial assessment of chitosan-coated silver nanoparticles on human pathogens and macrophage cells. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2012 Apr 3 [cited 2021 Oct 12];7:1805–18. Available from: <https://www.dovepress.com/toxicity-and-antibacterial-assessment-of-chitosan-coated-silver-nanopa-peer-reviewed-fulltext-article-IJN>
74. Ashmore D, Chaudhari A, Barlow B, Barlow B, Harper T, Vig K, et al. Evaluation of *E. coli* inhibition by plain and polymer-coated silver nanoparticles. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2018 Apr 23 [cited 2021 Oct 12];60. Available from: <http://www.scielo.br/j/rimts/a/9fGVSPHRyNtBbW3MHKw6w4P/?lang=en>
75. Rezazadeh NH, Buazar F, Matroodi S. Synergistic effects of combinatorial chitosan and polyphenol biomolecules on enhanced antibacterial activity of biofunctionalized silver nanoparticles. *Sci Reports* 2020 101 [Internet]. 2020 Nov 12 [cited 2021 Oct 12];10(1):1–13. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-76726-7>
76. Vazquez-Muñoz R, Meza-Villezcás A, Fournier PGJ, Soria-Castro E, Juárez-Moreno K, Gallego-Hernández AL, et al. Enhancement of antibiotics antimicrobial activity due to the silver nanoparticles impact on the cell membrane. *PLoS One*. 2019;14(11):1–18.
77. Alizadeh A, Salouti M, Alizadeh H, Kazemizadeh AR, Safari AA, Mahmazi S. Enhanced antibacterial effect of azlocillin in conjugation with silver nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa*. *IET Nanobiotechnology* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2021 Oct 12];11(8):942–7. Available from:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1049/iet-nbt.2017.0009>

78. Khan A, Farooq U, Ahmad T, Sarwar R, Shafiq J, Raza Y, et al. Rifampicin conjugated silver nanoparticles: A new arena for development of antibiofilm potential against methicillin resistant staphylococcus aureus and klebsiella pneumonia. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:3983–93.
79. Sood R, Chopra DS. Regulatory Approval of Silver Nanoparticles. *Appl Clin Res Clin Trials Regul Aff*. 2018;5(2):74–9.
80. Biocompatibility Safety Assessment of Medical Devices: FDA, ISO, and J | [mddionline.com](https://www.mddionline.com) [Internet]. [cited 2021 Oct 12]. Available from: <https://www.mddionline.com/testing/biocompatibility-safety-assessment-medical-devices-fda-iso-and-japanese-guidelines>
81. Masri A, Anwar A, Ahmed D, Siddiqui RB, Shah MR, Khan NA. Silver nanoparticle conjugation-enhanced antibacterial efficacy of clinically approved drugs cephadrine and vildagliptin. *Antibiotics*. 2018;7(4):1–12.
82. Sapkota K, Narayanan KB, Han SS. Environmentally Sustainable Synthesis of Catalytically-Active Silver Nanoparticles and Their Cytotoxic Effect on Human Keratinocytes. *J Clust Sci* 2017 283 [Internet]. 2017 Feb 3 [cited 2021 Oct 12];28(3):1605–16. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10876-017-1169-1>
83. Foldbjerg R, Irving ES, Hayashi Y, Sutherland DS, Thorsen K, Autrup H, et al. Global Gene Expression Profiling of Human Lung Epithelial Cells After Exposure to Nanosilver. *Toxicol Sci* [Internet]. 2012 Nov 1 [cited 2021 Oct 12];130(1):145–57. Available from: <https://academic.oup.com/toxsci/article/130/1/145/1666922>
84. Gaiser BK, Hirn S, Kermanizadeh A, Kanase N, Fytianos K, Wenk A, et al. Effects of Silver Nanoparticles on the Liver and Hepatocytes In Vitro. *Toxicol Sci* [Internet]. 2013 Feb 1 [cited 2021 Oct 12];131(2):537–47. Available from: <https://academic.oup.com/toxsci/article/131/2/537/1642155>
85. McNamara K, Tofail SAM. Nanoparticles in biomedical applications. *Adv Phys X* [Internet]. 2017;2(1):54–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/23746149.2016.1254570>
86. Siddiqi KS, Husen A. Green Synthesis, Characterization and Uses of Palladium/Platinum Nanoparticles. *Nanoscale Res Lett* [Internet]. 2016;11(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s11671-016-1695-z>
87. Yaqoob SB, Adnan R, Rameez Khan RM, Rashid M. Gold, Silver, and Palladium Nanoparticles: A Chemical Tool for Biomedical Applications. *Front Chem*. 2020;8(June):1–15.
88. Kruk T, Szczepanowicz K, Stefańska J, Socha RP, Warszyński P. Synthesis and antimicrobial activity of monodisperse copper nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2015;128:17–22.