



Universidad de Sevilla

Trabajo de Fin de Grado de Farmacia

Revisión bibliográfica

Estudio de las aplicaciones biomédicas de las nanopartículas de plata

Teresa Fernández Bueno

Departamento de Química Inorgánica

Tutora: María Isabel Domínguez Leal

Cotutora: Svetlana Ivanova



Facultad de Farmacia

C/Profesor García González 2

Sevilla, septiembre 2017

Índice

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS DE LA REVISIÓN	5
METODOLOGÍA	5
DESARROLLO Y DISCUSIÓN	8
-Síntesis de nanopartículas de plata	8
-Toxicidad de las nanopartículas de plata en humanos	10
-Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas de plata	11
AgNps como agentes virucidas	12
AgNps y su acción potencial en cáncer	12
AgnPs y su aplicación como antiparasitario	13
AgNps y su efecto antibacteriano	14
-Influencia del tamaño, forma y aglomeración de las nanopartículas de plata para ser bactericida	17
-Mecanismos de acción bactericida	22
CONCLUSIONES	27
REFERENCIAS	28

RESUMEN

La nanociencia es un campo de investigación surgido en los años 60 que estudia los materiales con un tamaño de entre 10 y 100 nanómetros. Los nanomateriales tienen aplicaciones en múltiples campos tales como medicina, ingeniería, industria de los alimentos, industria textil, bioingeniería, construcción, cosmética e industria farmacéutica. Entre los nanomateriales, las nanopartículas metálicas resultan especialmente atractivas por su potencial aplicación en biomedicina. La plata ha sido utilizada a lo largo de los años como antiséptico y antiinfeccioso para tratar múltiples enfermedades. Se ha investigado, y sigue siendo una línea de investigación abierta, el uso de las nanopartículas de plata (AgNPs) como antibacteriano, puesto que parecen ser una alternativa viable contra las bacterias multirresistentes ya que, de acuerdo a los estudios realizados, estas bacterias no presentan una resistencia significativa a la plata, sin que haya, hasta el momento, indicios de toxicidad en células humanas.

Esta revisión bibliográfica se centra en el estudio de las aplicaciones biomédicas de las nanopartículas de plata y en cómo afectan sus características fisicoquímicas (tamaño, forma y aglomeración) a sus propiedades antibacterianas.

Palabras clave: nanopartículas de plata (AgNPs), influencia de tamaño y forma, aplicaciones biomédicas, propiedades antibacterianas.

INTRODUCCIÓN

La plata es un elemento de origen natural con un peso atómico de 107,87 y un número atómico de 47. En la naturaleza puede encontrarse como elemento puro, pero ocurre comúnmente en minerales. Presenta tres estados de oxidación Ag [+1], Ag [+2] y Ag [+3] (siendo la plata metálica Ag [0]). Sólo el estado Ag [+1] es suficientemente estable para su uso como antibiótico (Rai et al., 2012).

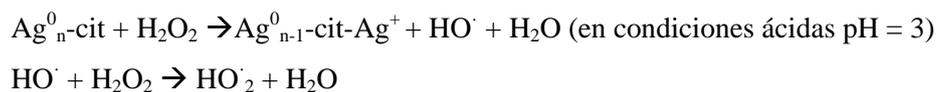
En la antigüedad, la plata fue utilizada por los griegos, los romanos y los egipcios para la conservación de agua y alimentos (Alexander, 2009). Heródoto mencionó por primera vez que los persas usaban recipientes de plata para el transporte de agua. Hipócrates utilizó preparaciones de plata para el tratamiento de úlceras y promovió su uso medicinal, lo cual se mencionó en una farmacopea publicada en Roma en 69 A. C. (Hills, Pillsbury, 1939). Los macedonios fueron los primeros en utilizar placas de plata para lograr una mejor cicatrización de heridas y para prevenir o tratar infecciones quirúrgicas.

En el siglo XVII la plata se describió como un elemento médico multidisciplinar y se utilizó para tratar la epilepsia y el cólera (Edwards-Jones, 2009). El primero documento científico que describe el uso médico de la plata ha sido atribuido a F. Crédé, quién, a finales del siglo XIX utilizó una disolución de nitrato de plata al 1 % como colirio en los recién nacidos, eliminando la ceguera causada por las infecciones oculares post-parto y, en 1901, para la antisepsia interna (Russell, Hugo, 1994). A comienzos del siglo XX un cirujano llamado W.D Halstead introdujo el uso de un vendaje de plata que estuvo en la lista de Physician's Desk Reference hasta 1955 (Silver et al., 2006). La Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (FDA) aprobó las disoluciones electrocoloidales de plata para su uso como agentes antibacterianos. En el mismo período, A.C. Barnes en Filadelfia patentó Argyrol, un derivado de proteínas con óxido de plata, que contenía un 25% de plata, como un antiséptico local para prevenir infecciones oculares.

El uso de nitrato de plata (0,5%) en compresas para el tratamiento de heridas por quemaduras fue explorado por primera vez por Moyer et al. (Moyer et al. 1965) funcionando correctamente para tratar la infección por *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, el desarrollo de resistencia bacteriana al nitrato de plata (Cason et al., 1966) (Cason, Lowbury 1968) provocó un cambio de formulación, utilizándose sulfadiazina de plata, una combinación de plata y sulfonamida. Se han estudiado otras combinaciones como sulfadiazina de plata con clorhexidina (Fraser et al., 2004) y sulfadiazina de plata y nitrato de cerio (Flammacerium) (Garner y Heppell 2005a,

2005b). Actualmente, el British National Formulary (2011) autoriza el uso externo de nitrato de plata (40-95%) en verrugas, granulomas umbilicales, sobre-granulación del tejido y cauterización y el uso de sulfadiazina de plata (1%) para la profilaxis y el tratamiento de heridas por quemaduras, como tratamiento alternativo en la infección en úlceras en la pierna y úlceras de presión a corto plazo y como complemento a la profilaxis de la infección en injertos de piel y abrasiones extensas (BNF 2011).

Durante la segunda mitad del siglo XX, la plata también se empleó como desinfectante, especialmente en conjunción con peróxido de hidrógeno. La eficacia de numerosos productos para la industria alimentaria, piscinas, desinfección de superficies y equipos se basaron en la evidencia de un efecto sinérgico de ambos compuestos. De hecho, se ha demostrado que la plata actúa como catalizador en la reacción de Fenton para producir radicales libres hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), altamente oxidantes (Duesterberg et al., 2008).



El empleo de la plata en aplicaciones sanitarias ha sido revisado por Edwards-Jones (2009), quién señala que, dado su coste, el uso de los dispositivos con nanopartículas de plata ha de estar justificado por sus beneficios, como lo ilustra la utilización de partículas nano-cristalinas en vendajes de plata o en catéteres urinarios (Hsu et al., 2010).

En forma de nanopartículas, la plata y otros metales nobles, muestran excelentes propiedades para aplicaciones biotecnológicas (Hackenberg et al., 2012) (Shang et al., 2007) (Dipankar, Murugan, 2012). En particular, para las AgNPs se ha establecido una amplia gama de aplicaciones biomédicas (Neto et al., 2008), debido a su capacidad antibacteriana y toxicidad selectiva a los microorganismos (Wong, Liu, 2010). Este hecho ha renovado el interés científico por este metal (Maillard, Denyer 2006a) (Marambio-Jones, Hoek, 2010) (Stiufiuc et al., 2013). Las AgNP son ampliamente utilizadas en campos industriales para el revestimiento de catéteres venosos, fabricación de prótesis vasculares, fabricación de apósitos para el tratamiento para heridas crónicas y úlceras (Dipankar, Murugan, 2012) o como constituyente incorporado al cemento para el realineamiento de las fracturas óseas (Wong, Liu, 2010). También se utilizan en la purificación de agua filtrada (Chaloupka et al., 2010) y en la pintura de las paredes para proporcionar un medio aséptico en las habitaciones de pacientes hospitalizados (Ahamed et al., 2010).

Las propiedades que deben mostrar las AgNPs para aplicaciones biomédicas, incluyen eficacia prolongada, altos niveles de actividad bactericida y bacteriostática, capacidad de prevenir infecciones en un amplio espectro de bacterias, alta biocompatibilidad y baja toxicidad *in vivo*

(Gnanadhas et al., 2013). En particular, la forma y la concentración de las AgNPs en disolución, son factores importantes para asegurar el contacto efectivo de las partículas con las membranas bacterianas y en la determinación de la cantidad de AgNPs para inhibir eficazmente a las bacterias (Pal et al., 2007).

La capacidad de las AgNPs para controlar la actividad bacteriana depende de las interacciones con tres componentes estructurales principales de las bacterias: peptidoglicanos de la pared celular, ADN y proteínas, afectando principalmente a las enzimas involucradas en la cadena de transporte de electrones (Gnanadhas et al., 2013).

Un estudio realizado por Xiu et al. (2012) afirma que las nanopartículas *per se* no afectan a la toxicidad contra la bacteria, pero puede servir como portador para liberar los iones de plata en el citoplasma y membrana de la bacteria.

Desde el punto de vista médico, el desarrollo de mecanismos de resistencia contra los antibióticos por microorganismos patógenos ha sido motivo de gran preocupación (Sibanda, Okoh, 2007). Estos mecanismos de resistencia, debido a varias mutaciones enzimáticas y genéticas en los patógenos causantes de enfermedades infecciosas, han alentado a los investigadores a diseñar nuevos antimicrobianos contra agentes patógenos para el control de infecciones (Kollef et al., 2011). Las nanopartículas metálicas son una forma efectiva de controlar muchos microorganismos patógenos y resistentes a los antibióticos.

OBJETIVOS DE LA REVISIÓN

El objetivo principal de esta revisión bibliográfica, es el estudio de las diversas aplicaciones de las nanopartículas de plata en el campo de la biomedicina y la influencia que puede tener en sus propiedades antimicrobianas un cambio en el tamaño y la forma de estas nanopartículas.

METODOLOGÍA

Para realizar la presente revisión bibliográfica se han consultado artículos científicos publicados a lo largo de los últimos cinco años, utilizando para ello las bases de datos ScienceDirect, Web of Knowledge (WOS) y Pubmed que la Universidad de Sevilla pone a disposición de los alumnos.

Para la búsqueda en la base de datos ScienceDirect se ha introducido, en primer lugar, el descriptor “silver nanoparticles”, obteniéndose de esta forma 23.078 resultados en los últimos cinco años (2012-2016). Filtrando por “journals” y por áreas de investigación (“Biochemistry”, “Chemistry”, “Immunology and Microbiology”, “Medicine and Dentistry” y “Pharmacology, Toxicology and Pharmaceutical Science”, se reduce a 11.712 artículos. A continuación, se han añadido los “topics”: “silver”, “surface”, “silver nanoparticle”, “nanoparticle”, “silver

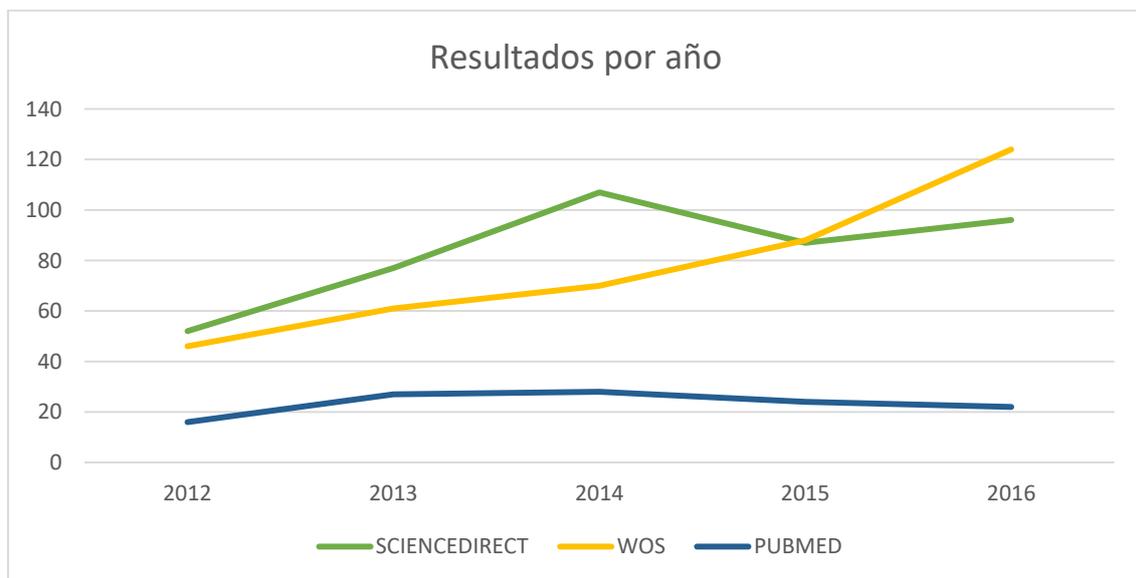
nanoparticles” y “nanoparticles”,—obteniendo así 1074 trabajos. Finalmente, se ha añadido “antimicrobial applications” a la búsqueda anterior obteniéndose 419 resultados.

En WOS, utilizando el descriptor “silver nanoparticles” se han encontrado 30.068 publicaciones en los últimos cinco años, y refinando por área de investigación: “Chemistry”, “Biochemistry molecular”, “Pharmacology y pharmacy”, “Toxicology”, “Microbiology”, “Infectious diseases” e “Immunology”, se han obtenido 7.619 resultados, los cuales se han filtrado por “article” y “review” y se ha añadido el descriptor “antimicrobial applications” a la búsqueda anterior y se han obtenido finalmente 389 trabajos.

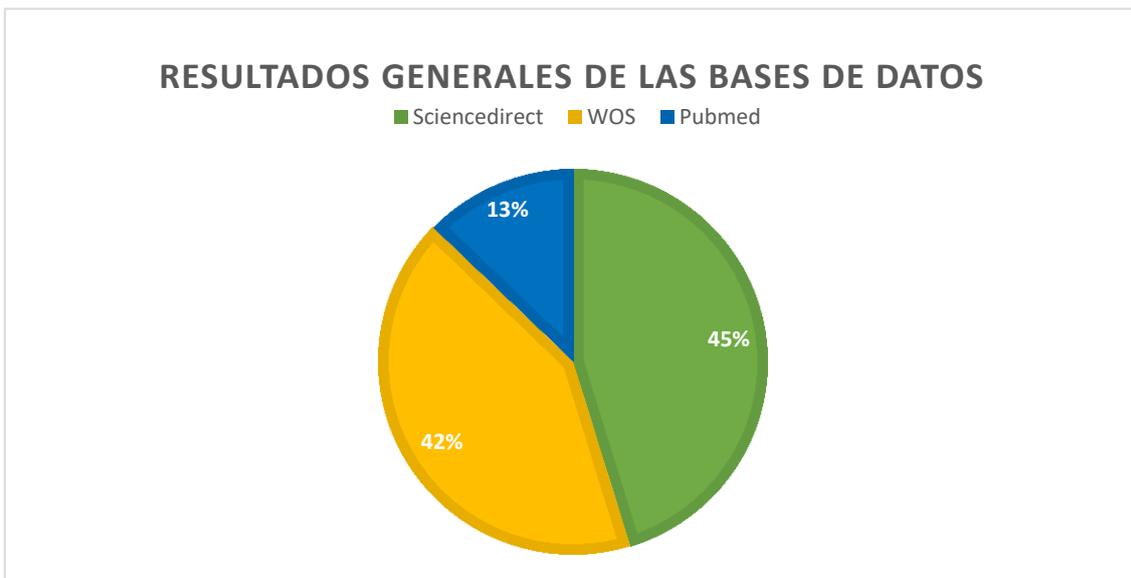
En el caso de la base de datos Pubmed, se han utilizado los mismos descriptores y años de investigación, pero no se ha podido filtrar por área de investigación puesto que es una base de datos que está más especializada en el área clínica. Se encontraron 8750 resultados utilizando “silver nanoparticles” de 2012 a 2016, reduciéndose a 1475 al refinar por especie “humans” y finalmente obteniendo 118 resultados al añadir “antimicrobial applications”.

En todas las bases de datos, los resultados se han ordenado en orden decreciente de relevancia para así obtener las publicaciones de mayor impacto.

Para analizar los resultados obtenidos en las diferentes bases de datos y poder compararlos a nivel global, se han realizado las siguientes gráficas:



Gráfica 1: Comparación de los resultados por año utilizando el descriptor “silver nanoparticles” + “antimicrobial applications” en las distintas bases de datos.



Gráfica 2: Comparación de los resultados finales buscados en cada base de datos con los descriptores “silver nanoparticles” + “antimicrobial applications”

En la gráfica 1 se observa que el número de estudios dedicados a las aplicaciones antimicrobianas de las nanopartículas de plata ha ido incrementándose a lo largo de los años. Tanto WOS como ScienceDirect, muestran que es un campo que está siendo muy estudiado en los últimos años, puesto que, aunque se ha filtrado por las áreas de investigación que interesaban para la revisión, se han obtenido mayor número de resultados que en Pubmed. Cabe mencionar, que se han encontrado resultados más generales en estas dos bases de datos, siendo esto útil para conocer cómo se comporta la plata como antimicrobiano y qué influencia tiene en esta propiedad un cambio de forma o superficie en las nanopartículas de plata.

Pubmed, sin embargo, destaca por su bajo número de resultados, como se observa en ambas gráficas, en comparación con ScienceDirect y WOS, pero ha resultado de gran utilidad para buscar revisiones más especializadas en el campo de la medicina, sobre todo para encontrar artículos que hagan referencia a las aplicaciones biomédicas que tienen las nanopartículas de plata, incluyendo ensayos clínicos realizados.

Una vez concluida la búsqueda en las bases de datos, se ha procedido a la lectura de los artículos encontrados más interesantes para la presente revisión bibliográfica-

A escala global, puede concluirse que el estudio de las aplicaciones biomédicas de las nanopartículas es una rama de la nanotecnología que está actualmente en crecimiento y lo seguirá haciendo conforme pasen los años por su gran interés científico y su carácter multidisciplinar, lo cual hace que sea una línea de investigación prometedora.

DESARROLLO Y DISCUSIÓN

Síntesis de nanopartículas de plata

La síntesis de nanopartículas de plata es de gran interés para la comunidad científica debido a su amplia gama de aplicaciones (Popescu et al., 2010). Se conocen varias rutas para la síntesis de nano-estructuras de plata, que pueden clasificarse en métodos físicos (Kholoud M.M. et al., 2010), químicos (Zhang et al., 2011) (Roldán et al., 2013) (Kosmala et al., 2011) (Asanithi, et al., 2012) y biológicos (Shivaji et al., 2011) (Li et al. (2012) (Mourato et al., 2011).

Los métodos físicos y químicos son los de uso más extendido, sin embargo, son bastante caros y peligrosos para el medio ambiente, ya que implican el uso de compuestos químicos peligrosos. Por ello, actualmente se están desarrollando procesos experimentales biológicos para la síntesis de nanopartículas.

Hay dos enfoques para la síntesis de las nanopartículas de plata, conocidos como “top-down” y “bottom-up”, esquematizados en la figura 1. En la aproximación “top-down”, que implica principalmente métodos físicos de síntesis, se parte de material a granel, el cual se descompone en partículas finas por reducción de tamaño con diversas técnicas, como molienda, pulverización catódica y ablación térmica/láser. Así por ejemplo, en la ablación térmica las nanopartículas se producen por evaporación-condensación utilizando un horno tubular a presión atmosférica, donde se funde el material en el horno y es vaporizado por un gas portador. La generación de nanopartículas de plata utilizando horno de tubo tiene numerosos inconvenientes, pues ocupa un gran espacio y consume mucha energía, necesitando mucho tiempo para alcanzar la estabilidad térmica. Una de las mayores limitaciones de este método son las imperfecciones en la estructura superficial del producto y en sus propiedades (Vijay et al., 2014) (Prathna et al., 2011).

En la aproximación “bottom-up”, las nanopartículas pueden ser sintetizadas usando sustancias químicas y biológicas por métodos de autoensamblaje de átomos a nuevos núcleos que crecen en una partícula a nano escala. La reducción química es la técnica más utilizada para sintetizar nanopartículas de plata según este enfoque (Hurst et al., 2006). Se utilizan agentes reductores orgánicos e inorgánicos tales como borohidruro de sodio (NaBH_4), citrato de sodio, ascorbato de sodio, hidrógeno, reactivo de Tollen, N,N-dimetilformamida (DMF) y copolímeros de polietilenglicol (PEG) para la reducción de iones plata (Ag^+) ya sea en disolución acuosa o no acuosa (Iravani et al., 2014). Se utilizan, además, agentes protectores como la octadecilamina para dar estabilidad a las nanopartículas. Una de las mayores ventajas de este método, es que se

sintetizan gran cantidad de nanopartículas en un periodo corto de tiempo, pero se utilizan compuestos muy tóxicos que dan lugar a subproductos no ecológicos (Reddy et al., 2015).

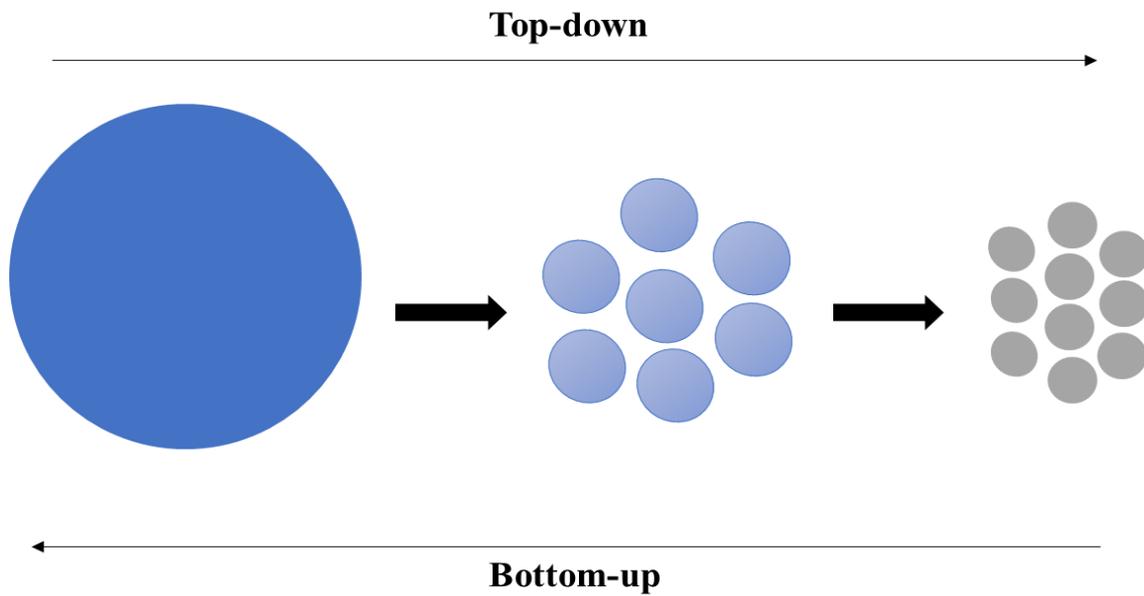


Figura 1. Esquema de los métodos “top-down” y “bottom-up”. (Figura adaptada de Kapuścińska, Nowak, 2016).

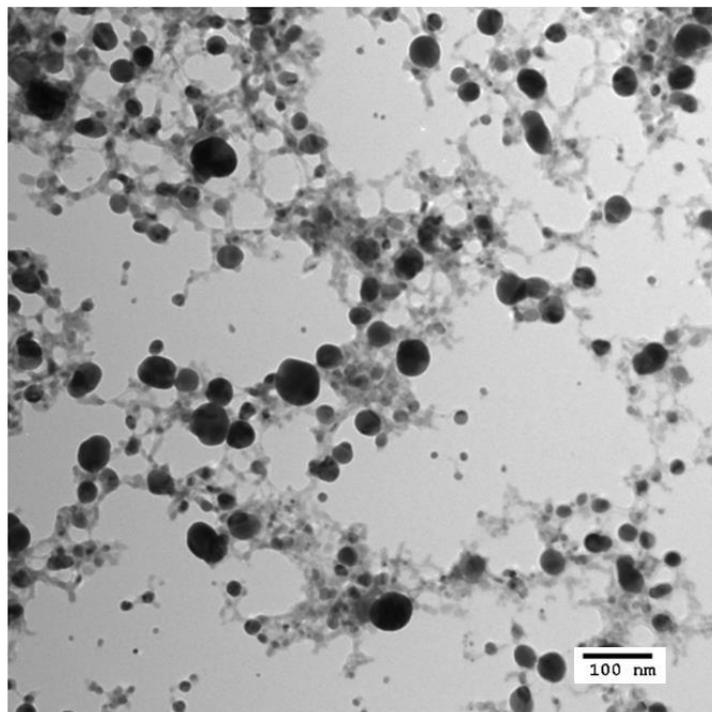


Figura 2: Nanopartículas de plata en una solución coloidal de plata

En la síntesis biológica de AgNps, los agentes reductores y estabilizantes tóxicos son reemplazados por moléculas no tóxicas (proteínas, carbohidratos, antioxidantes...) que se producen en organismos vivos, incluyendo bacterias (Shivaji et al., 2011), hongos (Li et al., 2012 y levaduras (Mourato et al., 2011). Para esta síntesis, se han utilizado componentes naturales económicos tales como limón, aloe vera, algas marinas, alfalfa, té, mostaza, loto y tulsi. Los posibles mecanismos de síntesis biológica, también llamada síntesis verde, incluyen tanto la vía enzimática, con la utilización de la NAPH reductasa, como la reducción no enzimática (Gpe et al., 2014).

El avance de la síntesis verde o biológica sobre los métodos físicos y químicos es apreciable puesto que es un método respetuoso con el medio ambiente, rentable y muy útil para la síntesis a gran escala de nanopartículas. Además, no hay necesidad de utilizar altas temperaturas, presión o productos químicos tóxicos (Dhuper et al., 2012). Hasta la fecha se han llevado a cabo muchos estudios sobre la síntesis biológica de nanopartículas de plata usando microorganismos. Gracias a las propiedades antioxidantes o reductoras que tienen, son responsables de la reducción de compuestos metálicos para obtener nanopartículas. Sin embargo, actualmente la síntesis mediada por microorganismos no es de viabilidad industrial debido a las condiciones altamente asépticas que son necesarias. Por ello, el uso de extractos de plantas es potencialmente ventajoso sobre la síntesis con microorganismos, debido a la mejora en el proceso de síntesis y el menor riesgo biológico que conlleva. Además, este tipo de síntesis permite optimizar la forma y el tamaño de las nanopartículas sintetizadas (Kalishwaralal et al., 2010).

Toxicidad de las nanopartículas de plata

Existen varias formas posibles para la administración de nanopartículas de plata tales como contacto dérmico, administración oral, inhalación y circulación sanguínea. Los macrófagos son las primeras células que las AgNPs se encuentran en el cuerpo humano (Pratsinis et al., 2013). Se conoce que el tamaño de AgNP determina su modo de citotoxicidad para macrófagos murinos. La toxicidad de las AgNPs (<10 nm) está mediada por los iones Ag^+ liberados, siendo el hígado el principal órgano diana, seguido del bazo, los pulmones y los riñones. Un estudio mostró el efecto de AgNPs de 20 nm y 100 nm sobre ratas Wistar WU tratadas con 6 mg/kg, observándose un aumento en el peso del bazo. Además, los parámetros de la química clínica también mostraron daño en el hígado (De Jong et al., 2013).

Otro estudio sobre la toxicidad por inhalación de AgNPs mostró que tenían una influencia biológica insignificante en las mucinas neutras de la mucosa respiratoria de ratas Sprague-Dawley (SD) expuestas a AgNPs a concentraciones de 0,5-61 $\mu g/m^3$ (Hyun et al., 2008). En otro

trabajo se puso de manifiesto que las AgNPs tuvieron un impacto insignificante en la cavidad nasal y los pulmones de ratones (Lee et al., 2009). Por otra parte, los niveles de plata en trabajadores que fabricaban nanomateriales expuestos a concentraciones de plata de 0,35-1,35 g/m³ eran de sólo 0,0135-0,034 mg/m³ para la sangre y 0,043 mg/m³ para la orina y no hubo resultados concluyentes sobre su estado de salud (Lee et al., 2012).

A pesar de que la mayoría de los productos de consumo que contienen Ag son de aplicación tópica, el riesgo de absorción percutánea es muy bajo ya que la epidermis humana es una capa relativamente impenetrable (a excepción de las abrasiones dérmicas, heridas y cortes. Lansdown argumenta que, aunque existe un uso creciente de Ag en hilos y fibras textiles, no hay evidencia de aumento de plata en la sangre o acumulación de precipitados de plata en la piel por exposición crónica y los riesgos de argyria en estos casos se han considerado insignificantes (Lansdown, 2006). De la misma manera, los riesgos tóxicos asociados con la ingestión de plata por vía oral son bajos.

Aunque se han publicado muchos estudios toxicológicos utilizando AgNP, todavía es difícil llegar a una conclusión definitiva sobre su toxicidad. Las AgNPs pueden tener diferentes propiedades toxicológicas debido a los diferentes métodos de síntesis, sus diferentes tamaños, la presencia o ausencia de agentes bloqueantes o estabilizadores, los diferentes organismos y / o células de cultivo. Por lo tanto, sus riesgos deben evaluarse caso por caso.

Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas de plata

La plata se ha utilizado desde la antigüedad como agente para el tratamiento de muchas enfermedades. De hecho, antes del descubrimiento de los antibióticos, la plata se utilizó por su actividad antiséptica, específicamente para el tratamiento de heridas abiertas y quemaduras. La potente actividad antimicrobiana frente a las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Sondi, Salopek-Sondi, 2004) (Wei et al., 2009), la baja toxicidad para las células y la posibilidad de desarrollar una nueva generación de antibióticos, hacen de las AgNPs una alternativa para superar el problema de la resistencia a antibióticos.

Además de su aplicación como agente antibacteriano, las AgNPs encuentran también uso en otros campos de la medicina como en diagnóstico, terapéutica y eficacia antiparasitaria, administración de fármacos para enfermedades potencialmente mortales o agentes virucidas (Yen et al., 2009). A continuación se recogen ejemplos de sus principales aplicaciones, centrándose la revisión en su empleo como agente antibacteriano.

-AgNps como agentes virucidas

Se ha demostrado que las AgNPs inhiben el VIH-1, el virus Tacaribe (TCRV), el virus de la hepatitis B (VHB), el virus respiratorio sincitial recombinante (VSR), el virus de la viruela del mono, el norovirus murino (MNV) -1 y el virus A / H1N1 de la gripe (Park et al., 2014). Xiang et al. (Xiang et al., 2013) demostraron que las AgNPs tienen efectos beneficiosos en la prevención de la infección por el virus de la influenza A / Human / Hubei / 3/2005 (H3N2) tanto *in vitro* como *in vivo*. En este estudio se utilizó el subtipo H3N2 del virus influenza como un modelo para investigar la actividad virucida, realizándose una serie de ensayos *in vitro* (MTT, hemaglutinina, citometría de flujo, inmunofluorescencia y TEM) e *in vivo* (modelo del ratón infectado). *In vitro* se ha observado que las AgNPs protegen significativamente a las células contra la infección viral aumentando su viabilidad, inhibiendo el crecimiento del virus y disminuyendo la apoptosis celular inducida por el subtipo H3N2. Las AgNP interactuaron con las partículas virales y destruyeron sus estructuras morfológicas de una manera dependiente del tiempo. Además, la administración intranasal de AgNP aumentó significativamente la supervivencia en ratones, impidió el crecimiento del virus en sus pulmones e inhibió el desarrollo de lesiones pulmonares patológicas lográndose una alta supervivencia de las ratas. En conjunto, los resultados indican que las AgNP tienen una actividad antiviral prometedora contra el virus influenza A a través de múltiples mecanismos, lo que demuestra que el desarrollo de AgNPs optimizadas y la investigación adicional de sus mecanismos antivirales relevantes serán críticos para controlar brotes de gripe.

Otro estudio observó (Gaikwad et al., 2013) que las AgNPs eran capaces de controlar la infectividad viral, probablemente bloqueando la interacción del virus con la célula. Este bloqueo podría depender del tamaño y potencial zeta de las AgNPs. Con respecto a la influencia del tamaño de las nanopartículas en la actividad antiviral, se observó que las AgNPs producidas por especies de *F. oxysporum* y *Curvularia*, con un tamaño de 4-13 nm y 5-23 nm, respectivamente, tenían una mejor actividad antiviral (80-90 % de inhibición) contra virus HSV-1 y HPIV-3 y eran menos citotóxicos para células Vero. Por el contrario, las AgNP producidas por especies de *Alternaria* y *Phoma*, con un intervalo de tamaño de 7-20 nm, mostraron menos actividad antiviral. Por lo tanto, AgNPs de menor tamaño fueron capaces de unirse mejor al virus inhibiendo su replicación.

-AgNps y su aplicación potencial en cáncer

Las AgNPs han demostrado tener efectos antitumorales prometedores. Se ha observado que una baja concentración de AgNPs pueden causar daños en el ADN y aberraciones cromosómicas

(genotoxicidad), aunque no se ha registrado una citotoxicidad significativa (Zhang et al. 2014). Sin embargo, otro grupo de investigadores (Lima et al., 2014) han demostrado que no se observan efectos de genotoxicidad para diferentes células de cultivo humano tratadas con hasta 10 mg/ml de AgNPs capsuladas (diámetro 6-80 nm).

La generación de muchos datos toxicológicos sobre nanopartículas a veces crea una percepción negativa de su uso. Sin embargo, la toxicidad en sí misma puede ser útil para las terapias contra el cáncer puesto que se han logrado resultados positivos al incorporar AgNPs en tratamientos contra el cáncer. No sólo pueden interactuar pasivamente con las células, sino también mediar activamente en los procesos moleculares para regular las funciones celulares. Un ejemplo de esta aplicación es su uso en leucemia mieloide aguda (LMA). Varios investigadores han concluido que las nanopartículas de plata inducen un efecto citotóxico contra las células leucémicas, como por ejemplo contra las células de Jurkat, K562 y THP-1. Recientemente, Guo et al. (Guo et al., 2013) han estudiado que las AgNPs recubiertas con PVP (N-vinil-2-pirrolidona) pueden inhibir la viabilidad de las células de leucemia mieloide aguda (LMA), incluyendo los casos aislados de pacientes con LMA en concentraciones bajas, lo que sugiere un enfoque novedoso para el tratamiento de LMA en el futuro. En otro estudio, llevado a cabo por el mismo grupo (Guo et al., 2014), se ha demostrado que las AgNPs son capaces de entrar en las células K562, una línea celular de LMC (leucemia mieloide crónica), de manera dosis-dependiente y localizarse dentro de los endosomas, provocando la supresión de la proliferación de éstas células.

-AgNps y su aplicación como antiparasitario

Las AgNPs también han demostrado tener un papel importante contra las enfermedades parasitarias. Las enfermedades parasitarias como la malaria, la tripanosomiasis y la leishmaniosis amenazan la vida y representan un problema de salud mundial. Así por ejemplo, la leishmaniosis está aumentando rápidamente en todo el mundo y, desafortunadamente, los fármacos antileishmaniosis tienen muchas desventajas. Por ello, el control y manejo de estas enfermedades es un desafío para los científicos, debido a la ineficacia de las terapias farmacológicas disponibles, pudiendo ser las AgNPs la alternativa para tratar estas enfermedades. Se ha estudiado la actividad de las AgNPs contra los parásitos de la leishmaniosis (Allahverdiyev et al. 2011). Para ello se evaluó el efecto *in vitro* de AgNPs sobre las propiedades morfológicas, el crecimiento, la proliferación, la actividad metabólica, la infectividad y el índice de infección (porcentaje de macrófagos infectados multiplicado por el número medio de amastigotes por macrófago) de *Leishmania tropica* en función de la presencia o ausencia de irradiación UV. Los AgNPs inhibieron las actividades biológicas de *L. tropica* y,

además, este efecto aumentó bajo luz UV. El efecto observado de la luz UV sobre la actividad anti-leishmaniana de los AgNPs se atribuyó a la capacidad de los AgNP para liberar iones de plata. La influencia infecciosa de *Leishmania* bajo la acción de AgNPs, especialmente observada junto con la luz UV, se explicó por la interacción de AgNPs con el lipofosfoglicano de la superficie parasitaria y con moléculas de glicoproteína que son las responsables de la infectividad. Tales hallazgos son importantes no sólo en el tratamiento de la leishmaniasis, sino también en el control de su propagación mediante la aplicación de AgNPs en vectores como la mosca de arena, que portan promastigotes infecciosos. Además, los amastigotes parecen ser más sensibles que los promastigotes, incluso a bajas concentraciones de AgNPs que no son nocivas para los macrófagos, como 1-10 mg / L. Esto se supone que es un resultado de la acción de los macrófagos, que después de la exposición a AgNPs puede mejorar la producción de enzimas líticas o óxido nítrico. Este efecto también puede ser causado por la pérdida de la capacidad de amastigotes para afectar negativamente a la producción de ROS.

En otro estudio de Panneerselvam et al. (Panneerselvam et al., 2011) se determinó la actividad antiplasmodios de AgNPs contra *Plasmodium falciparum*. La propiedad antiparasitaria se analizó mediante valores de IC50 cuyos resultados fueron $26 \pm 0,2\%$ a 25: g/mL y $83 \pm 0,5\%$ a 100: g/mL, confirmando actividad antiplasmodios significativa de los AgNPs.

La fascioliasis es otro tipo de infección parasitaria causada por *Fasciola hepática*, comúnmente conocida como la enfermedad del hígado, pues tiene la capacidad de infectar hígado de varios mamíferos, incluyendo humanos. Gherbawy et al. (Gherbawy et al., 2013) estudiaron las propiedades antifasciolosis de las AgNPs producidas por *Trichoderma harzianum* y también compararon la actividad de las AgNPs con el fármaco eficaz tricabendazol, comercialmente disponible. Para ello estudiaron los huevos de *Fasciola hepática* y observaron cómo actuaban éstos sin el fármaco, en presencia de tricabendazol y con nanopartículas de plata asociadas a tricabendazol. Los resultados mostraron que el 100% de los huevos sin tratar eclosionaban, mientras que en los tratados con tricabendazol sólo eclosionaban el 29,4% y únicamente un 9,4% de los huevos en presencia de tricabendazol con AgNps. El estudio concluyó que las AgNPs tienen una considerable actividad antifasciolosis en comparación con el triclabendazol, pues las nanopartículas de plata dañan la membrana de las células de los huevos, impidiendo que éstos eclosionen y puedan ser infectivos al alcanzar la madurez.

-AgNps y su aplicación como agente antibacteriano

Las nanopartículas de plata, llamadas plata coloidal o metal plata, han demostrado ser un agente antimicrobiano eficaz, destruyendo las membranas bacterianas a través de contacto directo, por

lo que han sido encapsuladas en muchos dispositivos médicos para conferir propiedades antimicrobianas a vendajes, suturas, exfoliantes quirúrgicos y catéteres (Pollini et al., 2011).

Las partículas de plata se han introducido como agentes antimicrobianos utilizados en el curado de heridas, prótesis óseas, prótesis cardiacas y resinas compuestas dentales. La plata junto con la zeolita, un material cristalino poroso de aluminosilicato hidratado, ha sido incorporada en acondicionadores de tejidos, resinas acrílicas y enjuagues bucales. Los adhesivos ortodónticos con nanopartículas de plata tienen elevada capacidad antibacteriana sin comprometer sus propiedades físicas (Chladek et al., 2012) (Nam, 2011).

Además, las nanopartículas son seguras en su aplicación en la mucosa, heridas y epidermis. De este modo, las nanopartículas pueden actuar como componentes activos de productos de higiene bucal, tales como enjuagues bucales o pasta de dientes líquidos. La actividad antibacteriana permite la protección del ambiente oral contra la proliferación excesiva de la flora bacteriana, fortaleciendo la protección contra la caries dental. Las AgNPs aceleran el proceso de curación de la piel mejorando el proceso de regeneración de la epidermis. Por lo tanto, pueden aplicarse sobre la piel quemada o herida y la mucosa. La formulación galénica, como ungüentos y cremas que contienen nanopartículas de plata, se puede aplicar en las áreas afectadas. También, se pueden usar disoluciones coloidales de plata para lavar áreas afectadas antes de aplicar un fármaco en forma sólida (Guzmán et al., 2012).



Figura 3: a) Úlcera de dos semanas sin tratar b) Úlcera tras diez días tratada con gel de plata nanocristalina c) Cicatrización de la úlcera tras tratarla durante 23 días con el gel de plata nanocristalina (Adhya et al., 2014).

En la figura 3 (Adhya et al., 2014), se muestra cómo actúa un gel que contiene nanopartículas de plata sobre una quemadura de segundo grado como una alternativa a la sulfadiazina de plata (SSD), puesto que, aunque se ha utilizado ampliamente en quemaduras, induce citotoxicidad, leucopenia y argiria.

En otro estudio (Hebeisha et al. 2014), se prepararon nanopartículas de plata en polvo y disoluciones altamente concentradas de AgNPs, utilizando almidón disuelto alcalino que actúa con una doble función: reducir la Ag (+1) a Ag (0) y estabilizar las nanopartículas creadas. Se prepararon disoluciones coloidales de AgNPs con diferentes concentraciones (60, 125 y 250 ppm) a partir de una disolución de 30.000 ppm. Estas disoluciones se usaron para el tratamiento de telas de algodón según la técnica “pad-dry-cure”. Las telas de algodón cargadas con las tres concentraciones diferentes de disoluciones coloidales de AgNPs fueron evaluadas en diversas aplicaciones médicas, como antimicrobianos, para cicatrización de heridas, y como antiinflamatorios, asimismo se evaluó su toxicidad. La eficacia antimicrobiana contra microorganismos, incluyendo bacterias y hongos, del vendaje que contenía 250 ppm de AgNPs fue mayor que para los que contenían 60 y 125 ppm, como se indica por la zona de inhibición. Se concluye que las telas de algodón tratadas con AgNPs tienen un potencial prometedor como tejidos inteligentes con fines médicos, así como en diversos campos biológicos

Otro ejemplo de la aplicación como bactericida de las nanopartículas de plata, en este caso en odontología, es el ensayo clínico in-vivo desarrollado por Farhadian et al. (Farhadian et al., 2016) para comparar un retenedor ortodóncico convencional, que provoca la acumulación de placa (*Streptococcus mutans*) y desmineralización del esmalte, con uno que contiene nanopartículas de plata en su base acrílica, para comprobar cómo afecta al crecimiento de la bacteria *Streptococcus mutans* en la superficie palatina de los dientes

Para realizar el ensayo, se escogieron al azar sesenta y seis pacientes de ortodoncia en la fase de desunión, con grupos de 2 emparejados por sexos y grupos con aleatorización de bloques estratificados: el grupo 1 (T1) recibió retenedores extraíbles convencionales y el grupo 2 (T2) los que contenían nanopartículas de plata (de aproximadamente 40 nm de tamaño y 500 ppm en concentración). Después del tratamiento ortodóncico integral, los pacientes que no revelaron evidencia clínica de caries dental, bolsas periodontales, o enfermedad sistémica se consideraron apropiados para este estudio. Se tomaron muestras con esponja de la zona palatal superior del paciente en el sitio dental de la colocación del retenedor. Para el grupo 1, una semana después del aparato ortodóncico fijo y para el grupo 2, siete semanas después. Se compararon el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *S. mutans* entre los dos grupos, 7 semanas después de la administración del retenedor. Los resultados se analizaron utilizando el análisis de

la covarianza. Los participantes y los evaluadores fueron cegados en los grupos de asignación. Los resultados se recogen en la tabla 1. Se analizaron 29 pacientes en el grupo de control y 32 en el grupo de intervención. En T1, el grupo control tenía un conteo de colonias de *S. mutans* mayor con respecto al grupo de intervención. El análisis de la prueba de covarianza mostró una significativa reducción de las colonias en el grupo de intervención después de 7 semanas. La diferencia media de los recuentos de colonias entre los 2 grupos fue de 40,31 (intervalo de confianza del 95%, 24,83-55,79, P \ 0,001).

Tabla 1. Comparación de T1 (7 días después de la separación) y T2 (7 semanas después de la administración del retenedor)

	Intervención	Control	Diferencia (control - intervención)	IC 95%		
				Límite inferior	Límite superior	Valor P
<i>S. mutans</i> en T1	58.84 (37.2)	64.34 (41.3)	5.50	-14.61	25.61	0.586
<i>S. mutans</i> en T2	33.00 (18.6)	73.3 (39.1)	40.31	24.83	55.79	0.000

Por tanto, las nanopartículas de plata incorporadas en retenedores acrílicos, con una concentración de 500 ppm y tamaño de 40 nm, tuvieron un fuerte efecto antimicrobiano contra *S. mutans*, disminuyendo las Unidades Formadoras de Colonias en condiciones clínicas. Además, las AgNPs tienen potencial para resolver el problema de las bacterias multirresistentes a los antibióticos, porque es poco probable que los microorganismos desarrollen resistencia contra la plata. De hecho, la plata ataca a un gran número de dianas en la célula bacteriana y, además, también se ha demostrado que las nanopartículas de plata perturban la formación de biofilms (Chen et al., 2011). Los biofilms se forman debido a la unión de bacterias a superficies sólidas, resultando en un aglomerado de células bacterianas que aumentan la resistencia a la terapia de fármacos, desinfectantes y forman patógenos que evaden las respuestas inmunitarias del huésped y establecen infecciones crónicas (Kalishwaralal et al., 2010).

Influencia de diversos factores en la función bactericida de las nanopartículas de plata

La actividad biocida de las AgNPs y su interacción e impacto biológico depende de varias características fisicoquímicas, como por ejemplo tamaño, forma y superficie, carga superficial y recubrimiento, aglomeración y velocidad de disolución.

-Tamaño

El tamaño controlado de los nanomateriales es el prerrequisito más importante para el desarrollo rápido de la nanomedicina, y para su uso como herramienta en infecciones contra microorganismos y en aplicaciones clínicas (Brigger et al., 2002). La mayor acción antibacteriana se ha demostrado para las partículas más pequeñas dentro del tamaño nanométrico, tamaño que parece mejorar la permeabilidad de las células microbianas a los iones de plata, facilitando su muerte celular (Devi et al., 2014).

Shameli et al. (Shameli et al., 2012) estudiaron la actividad antibacteriana de diferentes agentes de AgNP con PEG (polietilenglicol) contra bacterias Gram positivas (*S. aureus*) y Gram negativas (*Salmonella typhimurium*). Concluyeron que la actividad antibacteriana de AgNPs con PEG pueden ser controlada regulando el tamaño de las nanopartículas, siendo mayor la actividad cuanto menor es el tamaño de partícula.

Ivask et al. (Ivask et al., 2014) concluyeron que el mecanismo por el cuál las AgNps de 20-80 nm inducen toxicidad es por medio de la liberación de plata, mientras que las nanopartículas de 10 nm resultaron ser más tóxicas para *E. coli*, debido al mayor contacto de las nanopartículas sobre la superficie de la bacteria, a causa de su menor tamaño de nanopartícula. Esta conclusión se basó en el hecho de que AgNps de 10 nm tenían un contacto más eficiente que las AgNps de 20-80 nm, lo que conducía a una mayor biodisponibilidad intracelular de plata.

-Forma

Se sabe que la forma de las nanopartículas de plata puede afectar dramáticamente a sus propiedades físicas y químicas, como por ejemplo en el color de sus disoluciones coloidales. En un estudio llevado a cabo por Huang y Nancy (Huang, Nancy, 2010), se realizaron doce disoluciones de nanopartículas de plata coloidales y se observó cómo un cambio en la forma y el tamaño de las nanopartículas de platas se ponía de manifiesto en un cambio de color visible. Para ello crearon curvas de calibración nano-ópticas, que correlacionan la forma y el tamaño medidos por HRTEM con sus espectros LSPR (localized surface plasmon resonance). Las nanopartículas de plata de mayor tamaño absorben radiación de mayor longitud de onda. Por otro lado, la forma también influye en el color observado, de modo que, combinando partículas de distintos tamaños y morfologías se consiguen absorciones en todo el intervalo del espectro visible (figura 4). Estas nanopartículas podrían ser empleadas como marcadores ópticos en el estudio de eventos dinámicos tanto *in situ* como *in vivo*.

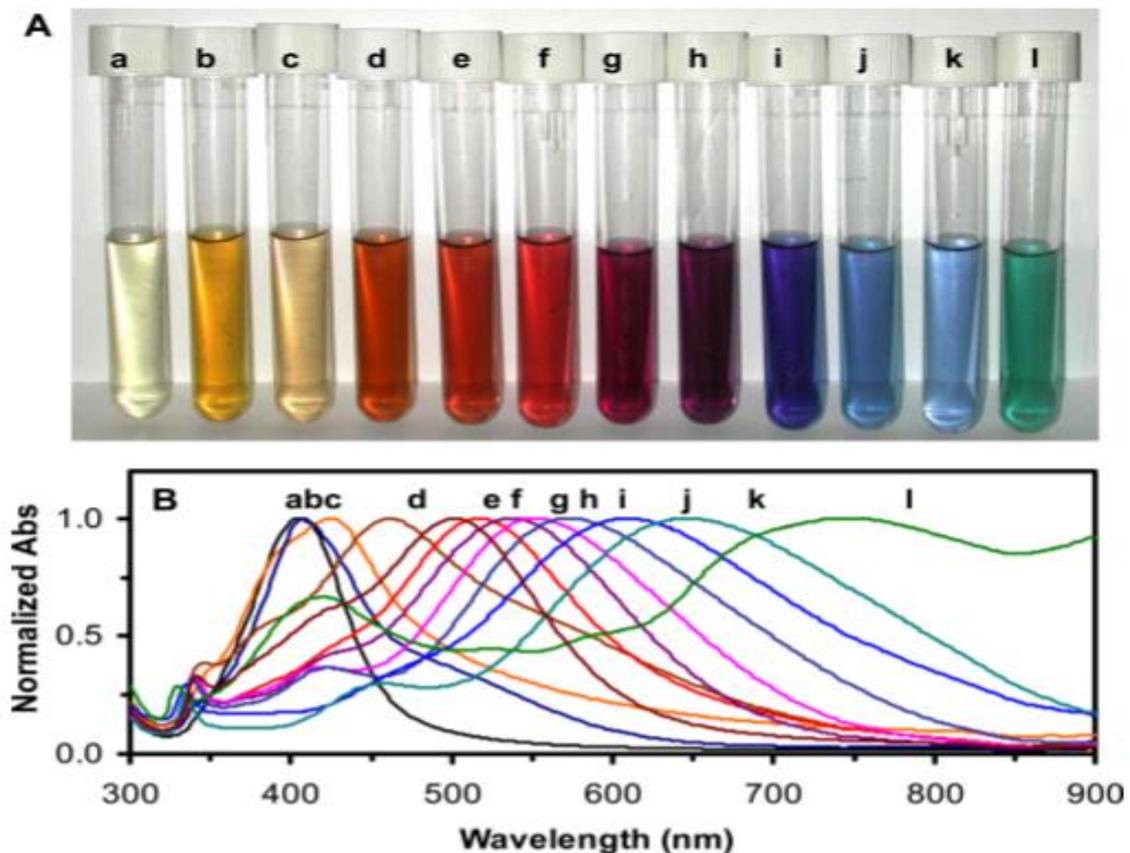


Figura 4. Variación del color de las disoluciones coloidales de AgNPs en función de su tamaño y forma (Huang, Nancy, 2010)

Las formas más frecuentemente utilizadas en el campo de la biomedicina incluyen nanopartículas esféricas, nanofibras, nanobarras, nanopartículas triangulares y nanocubos (Rycenga et al., 2011).

Pal et al. (2007) demostraron que las actividades también dependían de la forma de los AgNPs, e investigaron las propiedades antibacterianas de AgNPs de diferentes formas contra la bacteria Gram-negativa *E. coli*, siendo las nanopartículas triangulares las de mayor actividad, al tener mayor densidad de átomos en sus caras.

Según otro estudio llevado a cabo por Akbar et al. (Akbar et al., 2013), se sintetizaron nanopartículas de plata con forma de cubo, triángulo, esfera y fibra, por diferentes métodos químicos y físicos, para estudiar el efecto que tenía la morfología y la distribución de tamaño en su actividad antibacteriana. Se utilizaron cepas de bacterias de *Escherichia coli*, *Bacillus* y *Estafilococos*, y tras cultivarlas en agar nutriente a 37° durante 24 horas, se sembró cada bacteria en otro agar nutriente que contenía las muestras de nanopartículas con diferentes estructuras, comprobándose la supervivencia de las bacterias. Con el fin de encontrar la

distribución de tamaño de partícula, se realizó un análisis DLS, que se basa en la dispersión de luz láser en disolución acuosa. En la figura 5 se observa que el tamaño medio de partícula de las nanofibras era de 92 nm, 450 el de los nano-cubos, 17 nm para las nano-esferas y 50 nm para las nanopartículas triangulares.

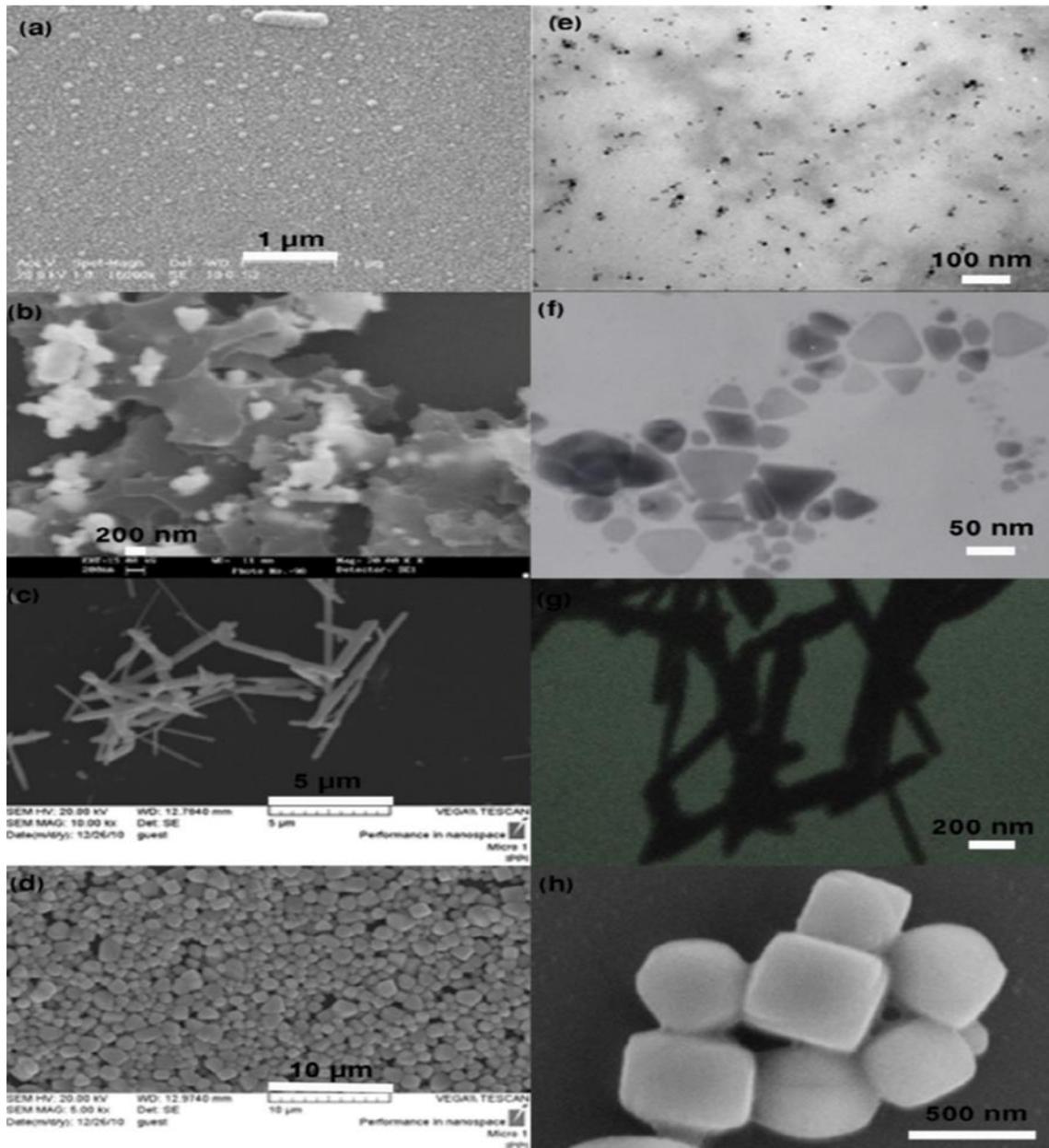


Figura 5. Imágenes de MEB y MET de nanopartículas de plata esféricas (a) y (e), triangulares (b) y (f), de barra (c) y (g) y en forma de cubo (d) y (h) (Akbar et al., 2013).

Se realizaron las mediciones antimicrobianas con *E. Coli*, *Bacillus* y *Estafilococos*. Para los cuatro tipos de nano estructuras, se observaron comportamientos antimicrobianos diferentes, sin embargo, la actividad frente a *E. Coli* y *Bacillus* fue semejante, mientras que frente a

Estafilococos fue diferente. La mayor actividad antibacteriana la tuvo la forma esférica, seguida de la forma cúbica, la de fibra y la triangular en *E. Coli* y en *Bacillus*. En el caso de las bacterias *Estafilococo*, la mayor actividad la presentó la forma de triángulo, seguida de la esférica y la de fibra, como se observa en la figura 6. Se puede concluir que la capacidad antibacteriana de las nanopartículas de plata depende tanto de la forma de la nanopartícula como del tipo de bacteria y de su membrana celular.

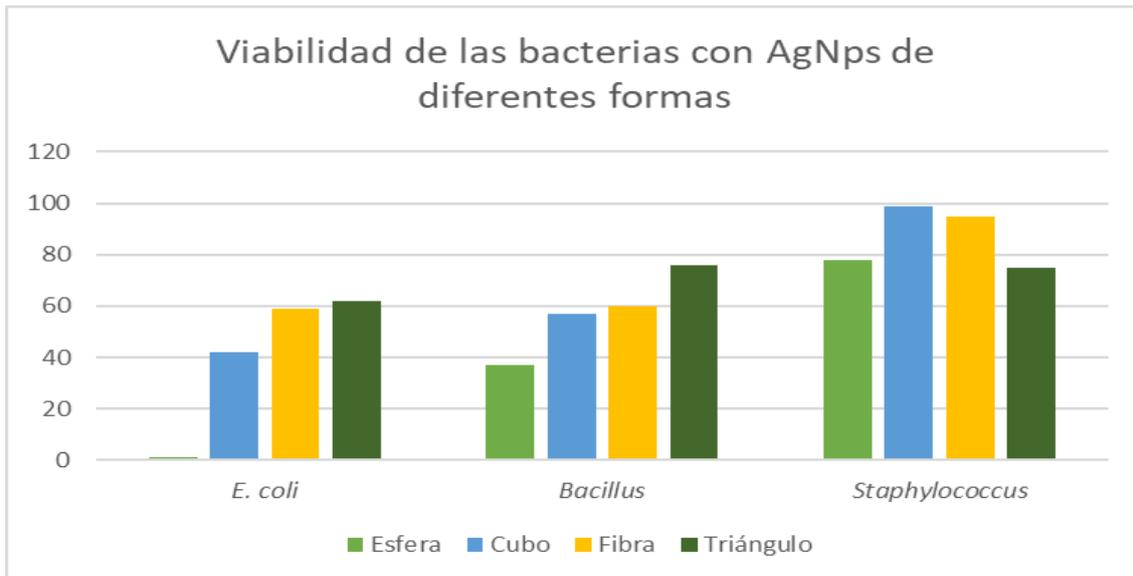


Figura 6: Viabilidad de las bacterias ante diferentes formas de nanopartículas de plata. (Figura adaptada de Akbar et al., 2013).

-Concentración

Shrivastava et al. (Shrivastava et al., 2007) sugirieron que la actividad de los AgNPs contra las bacterias gram-negativas depende de su concentración. Se ha demostrado que la concentración de AgNPs que previene el crecimiento bacteriano es diferente para cada tipo de bacteria. Se ha observado que *Staphylococcus aureus* es más resistente a las nanopartículas, pues necesita una concentración de AgNPs mayor de 100 µg/ml, mientras que *E. coli* y *Salmonella typhi* presentaban inhibición con una concentración de 25 µg/ml.

Otro estudio llevado a cabo por Kim et al. (Kim et al., 2007) también estudió la actividad antimicrobiana de AgNPs contra *E. coli* y *Staphylococcus aureus* y demostraron que *E. coli* se inhibía a baja concentración, mientras que los efectos inhibidores del crecimiento sobre *S. aureus* fueron menos marcados. Esto lo llevaron a cabo realizando un cultivo bacteriano con dichas bacterias y AgNPs y calculando el CMI (Concentración Mínima Inhibitoria), cuyo resultado fue de 3,3 nM para *E. Coli* y más de 33 nM para *S. aureus*.

Estos resultados sugieren que los efectos antimicrobianos de las nanopartículas de plata pueden estar asociados con ciertas características de algunas especies bacterianas, como la capa de peptidoglicano, que es más gruesa en bacterias Gram + (*S. aureus*) que en Gram – (*E. Coli* y *S. typhi*).

-Otros factores

Las NPs tienen tendencia a formar aglomerados o agregados (Oberdörster et al., 2005). Los aglomerados son grupos de partículas unidas mediante fuerzas relativamente débiles de tipo van der Waals, electrostáticas o de tensión superficial, que pueden redispersarse por medios mecánicos. Mientras que los agregados son grupos de partículas fuertemente asociadas cuya redispersión por medios mecánicos es más complejo. Estos dos fenómenos pueden cambiar el lugar de depósito de las AgNPs en el organismo, ya que un agregado o aglomerado de NPs se deposita en unas zonas u otras debido al distinto diámetro hidrodinámico. Además, también se modifica la toxicidad, ya que al ser una estructura compacta, el área superficial es menor y por tanto la toxicidad también será menor (Galvez y Tanarro, 2010).

Se sabe que en la mayoría de las nanopartículas se produce aglomeración. Se ha demostrado que la aglomeración de AgNPs se produce en los medios de cultivo y dentro del citoplasma y los núcleos de las células HepG2 (Kim et al., 2009),

Otros estudios han encontrado que los efectos biológicos de las AgNPs dependen de las diferentes cargas superficiales de sus revestimientos, que pueden afectar a la interacción de AgNPs con los sistemas vivos (Powers et al., 2011).

Se puede concluir que las diferentes formas y tamaños de partícula, así como la aglomeración de éstas, su carga superficial y su concentración, influyen en la actividad biocida contra diferentes bacterias.

Mecanismos de acción bactericida de las nanopartículas de plata

La disolución de AgNPs como resultado de la oxidación superficial conduce a la producción de plata iónica que presenta un importante rol antimicrobiano. La velocidad de disolución depende de las propiedades químicas y superficiales de la partícula y se ve afectada por el medio. El ion plata [Ag^+], además de unir aniones y proteínas en sistemas biológicos, se enlaza fuertemente a los receptores de la superficie celular de bacterias, levaduras y hongos. Se une principalmente a grupos donadores de electrones de moléculas biológicas como azufre, oxígeno y nitrógeno. La unión del ion plata a grupos sulfhidrilo y proteínas en las membranas celulares parece ser clave en la acción antimicrobiana (Lansdown, 2006).

Aunque generalmente se reconoce que la plata iónica es la responsable de la actividad antimicrobiana, el modo por el cual mata a las células bacterianas no se ha establecido aún. Se han propuesto cuatro posibles mecanismos intracelulares (Melaiye, Youngs, 2005) (Hermans, 2006) (Silver, 2003) (Russell, Hugo, 1994). En todos ellos, la unión de la plata a la membrana celular y su absorción intracelular es el primer paso obligatorio, ya que las bacterias acumulan plata en contra de gradiente hasta que se alcanza la muerte celular en bacterias.

El primer mecanismo propuesto (Gravante et al., 2009) (Bragg, Rainnie, 1974) implica la inhibición de las enzimas necesarias para la vida de la célula bacteriana por interacción química con el ion plata. El ion plata es capaz de bloquear el sistema de transporte de electrones de las bacterias. Se sabe que concentraciones de 15 mg/ml de plata iónica inhiben la oxidación de glucosa, glicerol, fumarato, succinato, D-Lactato, L-Lactato y otras sustancias endógenas en *E. Coli* (Slawson et al., 1990). Se ha demostrado que la plata iónica inhibe enzimas de la cadena respiratoria en dos sitios específicos: entre el citocromo b y el citocromo d y entre el sitio de entrada de sustrato en la cadena respiratoria y la flavoproteína, en las regiones NADH y succinato deshidrogenasa. A concentraciones tan bajas como 2 mg/ml de plata iónica, la absorción de fosfato inorgánico se inhibe y se produce el flujo de salida del fosfato acumulado (Bragg, Rainnie, 1974). Además, el ion plata interactúa con los grupos tioles, que se encuentran en las enzimas que contienen el aminoácido cisteína. Cuando la plata se une a este grupo, la enzima se desactiva, lo que provoca la muerte celular de las bacterias. Sin embargo, las células pueden eludir este mecanismo produciendo grandes cantidades de glutatión (Russell, Hugo WB, 1994).

El segundo mecanismo (Slawson et al., 1990) por el que la plata iónica mata a las células de las bacterias es a través de la interacción y ruptura de la pared celular. La membrana bacteriana contiene tanto cargas catiónicas como aniónicas en la superficie. La plata catiónica se unirá electrostáticamente a las porciones aniónicas de la membrana. Esto puede inhibir el movimiento de las bacterias o hacer que la membrana se rompa. Se ha demostrado que la plata iónica induce la salida del manitol, succinato, glutamina y prolina de las membranas celulares bacterianas. Además, la unión de la plata a la membrana puede inhibir el paso de nutrientes a través de ésta, y/o interferir en los gradientes de concentración normales de la célula, provocando su muerte celular.

Un tercer mecanismo (Slawson et al., 1990) implica la interacción de la plata iónica con el ADN de las células bacterianas. Las células eucariotas no se ven afectadas por este mecanismo, ya que el ADN está contenido dentro del núcleo. Se ha demostrado que la plata interactúa con la guanina-citosina y la adenina-timina. Esta interacción de la plata con el nitrógeno de la guanina-

citocina y la interacción con el par adenina-timina causa la dimerización de la timina en presencia de luz UV. Ambas interacciones resultarán en una mutación del ADN bacteriano y, finalmente, en la muerte celular .

La cuarta interacción (Lansdown, 2002) (Legler et al., 2001) implica la destrucción de una bacteria celular por radicales libres. Estos radicales libres, tales como radical superóxido, radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno (ROS) se generan durante el metabolismo aeróbico de la célula y poseen potencial antimicrobiano (Xu et al., 2012) . Esto se debe a que la plata puede unirse a muchos aminoácidos en la célula bacteriana, incluyendo arginina y ácido glutámico. Cuando la plata se une a estos aminoácidos, se forma un complejo organometálico que se rompe posteriormente, generando radicales libres dentro de la célula. La acumulación de radicales libres en la célula puede perjudicar la cadena de transporte de electrones, inactivar el ADN bacteriano y el ARN y dañar y romper la membrana celular, uniéndose a proteínas con cisteína y grupos tioles, precipitándolas y causando muerte celular.

Hay que mencionar que las bacterias Gram positivas son menos susceptibles a Ag^+ que las bacterias Gram negativas. Esto puede ser debido a que la pared celular de las Gram positivas contiene más peptidoglicano que las Gram negativas. Como la pared celular en Gram positivas es más gruesa, la plata cargada positivamente se une al peptidoglicano cargado negativamente, pudiendo quedar allí retenida la plata (Ankanna et al., 2010).

El hecho de que la resistencia a los iones plata sea bastante infrecuente sugiere que varios de los mecanismos propuestos puedan ocurrir simultáneamente. Por tanto, con el fin de producir un microorganismo resistente a la plata en el laboratorio, debe superar los cuatro mecanismos de acción. En la figura 7 se resumen los mecanismos de acción bactericida de las nanopartículas de plata en diferentes bacterias y en la tabla 2 se muestra el mecanismo de acción por el que actúan las AgNps contra diferentes bacterias (Franci et al. 2015).

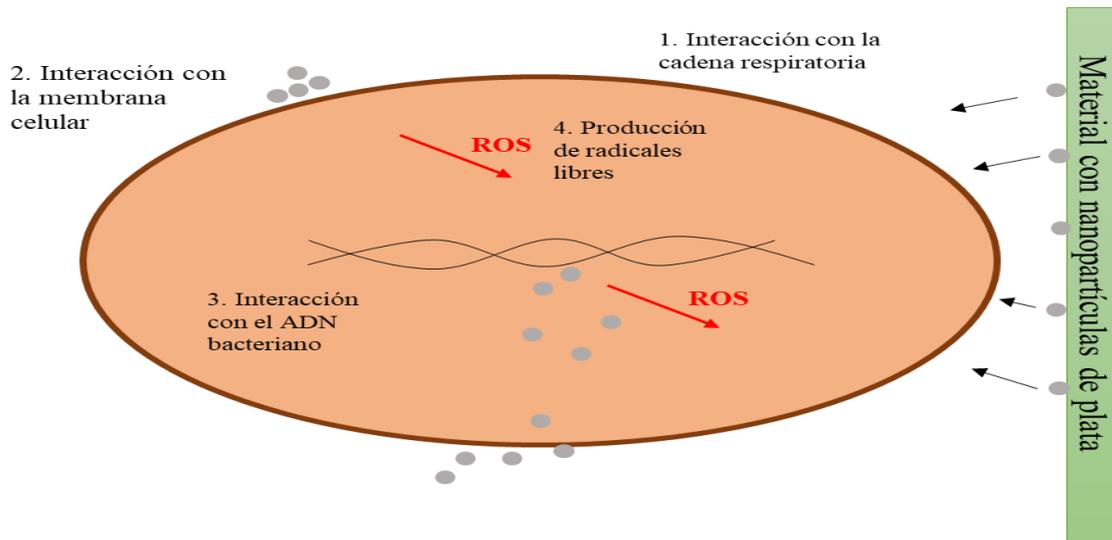


Figura 7. Mecanismos de acción conocidos por los que las nanopartículas de plata actúan como agentes antimicrobianos (Franci et al. 2015).

Tabla 2: Mecanismos por los que se lleva a cabo la muerte celular de diferentes bacterias por las nanopartículas de plata. (Franci et al., 2015).

Bacteria	Mecanismo de acción
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Alteración de la pared celular y citoplasma
<i>Escherichia coli</i>	Alteración de la permeabilidad de la membrana y respiración
<i>Enterococcus faecalis</i>	Alteración de la pared celular y citoplasma
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Alteración de la membrana
<i>Listeria monocytogenes</i>	Cambios morfológicos, separación de la membrana citoplasmática de la pared celular, plasmolisis
<i>Micrococcus luteus</i>	Alteración de la membrana
Nitrifying bacteria	Inhibición de la actividad respiratoria
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Daño irreversible a las células de la bacteria; Alteración de la permeabilidad de la membrana y respiración
<i>Proteus mirabilis</i>	Alteración de la pared delular y citoplasma
<i>Staphylococcus aureus</i>	Daño irreversible a la célula bacteriana
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Inhibición de la replicación del ADN bacteriano, daño a la membrana citoplasmática bacteriana y modificación de los niveles de ATP intracelular
<i>Salmonella typhi</i>	Inhibición de la replicación del ADN bacteriano, daño a la membrana citoplasmática bacteriana y modificación de los niveles de ATP intracelular
<i>Vibrio cholerae</i>	Alteración de la permeabilidad de la membrana y la respiración

CONCLUSIONES

En los últimos cinco años se ha producido un aumento de las aplicaciones de las nanopartículas de plata en el campo de la biomedicina. Para la síntesis de estas nanopartículas cada vez se recurre más a los métodos biológicos, por ser más eficientes y ecológicos, permitiendo obtener nanopartículas con la forma y el tamaño deseado, siendo estas dos características clave en sus propiedades bactericidas. Según los estudios revisados, partículas más pequeñas y con geometrías que permitan tener un mayor número de átomos expuestos, presentar mayor capacidad antibacteriana. Como ejemplos de uso como bactericida de las AgNps se pueden destacar los vendajes que aceleran el proceso de cicatrización y la inhibición de crecimiento bacteriano, catéteres recubiertos con nanopartículas de plata que impiden la formación de biofilms, responsables de infecciones y complicaciones clínicas. Hay que señalar también que las AgNps son una alternativa viable a los antibióticos frente a los patógenos multirresistentes.

Por otra parte, resulta interesante el empleo de AgNps como virucida, destacando su capacidad de inhibir al virus influenza (H3N2), el virus Tacaribe (TCRV), el virus de la hepatitis B (VHB), el virus respiratorio sincitial recombinante (VSR), el virus de la viruela del mono, el norovirus murino (MNV) -1 y el virus A / H1N1 de la gripe. Otra de sus aplicaciones es como antiparasitario, siendo el uso de nanopartículas de plata una alternativa viable para la infección por *Fasciola hepática*.

No obstante, hay que seguir investigando este campo pues aún no se conocen con exactitud los mecanismos por los que las AgNps actúan a nivel celular y a qué nivel afectan en el organismo humano.

REFERENCIAS

- Adhya A, Brain J, Ray O, Hazra A, Adhikari S, Dutta G, et al. Healing of burns wound by topical treatment: A randomized controlled comparison between sulfadiazide silver and nano crystalline silver. *J Basic Clin Pharma* 2015; 6:29-34.
- Ahamed M, Alsalhi MS, Siddiqui MKJ. Silver nanoparticle applications and human health. *Clin Chim Acta* 2010; 411:1841–1848.
- Akbar A, Estakhri S, Reza M, Sima Eshghi S. Controlling the Geometry of Silver Nanostructures for Biological Applications 2013. *Physics Procedia* 40. 76 – 83.
- Alexander J, History of the medical use of silver *Surg. Infect.* 2009; 10, 289.
- Allahverdiyev AM, Abamor ES, BagirovaM, Ustundag CB, Kaya C, Kaya F. et al. Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. *Int J Nanomed.* 2011; 6: 2705–2714.
- Ankanna S, Prasad TNVKV, Elumalai EK, Savithamma N. Production of biogenic silver nanoparticles using *Boswellia ivalifoliolata* stem bark. *Dig J Nanomater Biostruct* 2010; 5: 369–72.
- Asanithi P, Chaiyakun S, LimsuwanP. Growth of Silver Nanoparticles. *Journal of Nanomaterials.* 2012; 2012: 8 páginas.
- Bragg PD, Rainnie DJ. The effect of silver ions on the respiratory chain of *E. coli*. *Can J Microbiol* 1974; 20(6): 883–889.
- Brigger I, Dubernet C, Couvreur P, Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug. Deliv. Rev.* 54. 2002; 631–651.
- British National Formulary. Issue 58. Oxford: Pharmaceutical Press; 2011
- Cason JS, Jackson DM, Lowbury EJ, Ricketts CR. Antiseptic and aseptic prophylaxis for burns: use of silver nitrate and of isolators. *Br Med J*, 2. 1966; 1288–1294.
- Cason JS, Lowbury EJ. Mortality and infection in extensively burned patients treated with silver-nitrate compresses. *Lancet*, 1, 1968; 651–654.
- Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends Biotechnol* 2010; 28:580–588.

Chen M, Yang Z, Wu H, Pan X, Xie X, Wu C. Antimicrobial activity and the mechanism of silver nanoparticle thermosensitive gel. *Int J Nanomed.* 2011; 6: 2873–2877.

Chladek G, Kasperski J, Barszczewska-Rybarek I, Zmudzki J. Sorption, solubility, bond strength and hardness of denture soft lining incorporated with silver nanoparticles. *Int J Mol Sci Colloids Surf B: Biointerfaces* 2010; 77: 257–62.

Dhuper S, Panda D, Nayak PL. Green synthesis and characterization of zero valent iron nanoparticles from the leaf extract of *Mangifera indica*. *Nano Trends: J Nanotech App* 2012; 13(2): 16–22.

Dipankar C, Murugan S: The green synthesis, characterization and evaluation of the biological activities of silver nanoparticles synthesized from *Iresine herbstii* leaf aqueous extracts. *Colloids Surf B* 2012; 98: 112–119.

Duesterberg C.K , Mylon S.E, Waite T.D , *Environ. Sci. Technol.* 42. 2008; 8522–8527.

Durán N., Durán M., Bispo de Jesus M., Seabra A. B., Fávoro W.J., Nakazato G., Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2016; 12: 789–799.

Edwards-Jones V. The benefits of silver in hygiene, personal care and healthcare. *Lett Appl Microbiol.* 49, 2009; 147–152.

Farhadian N., Usefi R., Khanizadeh S., Ghaderi E., Farhadian M., Miresmaeili A. Streptococcus mutans counts in patients wearing removable retainers with silver nanoparticles vs those wearing conventional retainers: A randomized clinical trial. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2016; 149: 155-60.

Franci G., Falanga A., Galdiero S., Palomba L., Rai M., Morelli G., Galdiero M., Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents,. *Molecules.* 2015; 20: 8856-8874.

Fraser JF, Cuttle L, Kempf M, Kimble RM. (2004). Cytotoxicity of topical antimicrobial agents used in burn wounds in Australasia. *ANZ J Surg* 2004; 74: 139–142.

Freeman AI, Halladay LJ, Cripps P. The effect of silver impregnation of surgical scrub suits on surface bacterial contamination. *Vet J.* 2012; 192: 489–493.

Gaikwad S. IngleA, Gade A, Rai M, Falanga A, Incoronato A et al. Antiviral activity of mycosynthesized silver nanoparticles against herpes simplex virus and human parainfluenza virus type 3. *Int J Nanomed.* 2013; 8: 4303–4314.

Gálvez, V, Tanarro C. Toxicología de las nanopartículas. Seguridad y salud en el trabajo. 2010; 56: 6-12.

Garner JP, Heppell PS. The use of Flammacerium in British Burns Units. Burns, 2005a; 31: 379–382.

Garner JP, Heppell PS. Cerium nitrate in the management of burns. Burns, 2005b; 31: 539–547.

Ge L, Li Q, Wang M, Ouyang J, Li X, Xing MM. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. International Journal of Nanomedicine. 2014; 9: 2399-2407.

Gherbawy YA, Shalaby IM, Abd El-sadek MS, Elhariry HM, Banaja AA. The anti-fasciolosis properties of silver nanoparticles produced by *Trichoderma harzianum* and their improvement of the anti-fasciolosis drug triclabendazole. Int J Mol Sci. 2013; 14: 21887–21898.

Gnnadhas DP, Ben Thomas M, Thomas R, Raichur AM, Chakravortty D: Interaction of silver nanoparticles with serum proteins affects their antimicrobial activity in vivo. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57: 4945–4955.

Gravante G, Caruso R, Sorge R, Nicoli F, Gentile P, Cervelli V. Nanocrystalline silver: a systematic review of randomized trials conducted on burned patients and an evidence-based assessment of potential advantages over older silver formulations. Ann Plast Surg 2009; 63(2): 201–505.

Guo D, Zhu L, Huang Z, Zhou H, Ge Y, Ma W, Wu J et al. Anti-leukemia activity of PVP-coated silver nanoparticles via generation of reactive oxygen species and release of silver ions. Biomaterials. 2013; 34(32):7884–7894.

Guo D, Zhao Y, Zhang Y, Wang Q, Huang Z, Ding Q. The cellular uptake and cytotoxic effect of silver nanoparticles on chronic myeloid leukemia cells. J Biomed Nanotechnol 2014; 10(4): 669–678.

Guo R, Song Y, Wang G, Murray RW, Does Core Size Matter in the Kinetics of Ligand Exchanges of Monolayer-Protected Au Clusters. J. Am. Chem. Soc. 2005; 127: 2752- 2757.

Hackenberg S, Scherzed A, Kessler M, Hummel S, Technau A, Froelich K et al. Silver nanoparticles: evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. Toxicol Lett 2011; 201: 27–33.

Hartemann P, Goeffert M, Blech MF. Efficacité bactericide du peroxide d'hydrogène sur Escherichia coli. Ann Med Nancy 1995; 34: 85–88.

Hebeisha A, El-Rafiea M, El-Sheikha M, Amany A, Seleemb, Mehrez El-Naggara E. . Antimicrobial wound dressing and anti-inflammatory efficacy of silver nanoparticles. International Journal of Biological Macromolecules. 2014; 65: 509-515.

Hermans MH. Silver-containing dressings and the need for evidence. AJN 2006;106(12): 60-83.

Hill W.R, Pillsbury D.M., Argyria–The Pharmacology of Silver, Williams & Wilkins, Baltimore, 1939.

Hsu SH, Tseng HJ, Lin YC. The biocompatibility and antibacterial properties of waterborne polyurethane-silver nanocomposites. Biomaterials, 2010; 31: 6796–6808.

Huang T, Nancy X., Synthesis and characterization of tunable rainbow colored colloidal silver nanoparticles using single-nanoparticle plasmonic microscopy and spectroscopy. J. Mater. Chem., 2010; 20: 9867-9876.

Hyun JS; Lee BS; Ryu HY; et al. Effects of repeated silver nanoparticles exposure on the histological structure and mucins of nasal respiratory mucosa in rats. Toxicol Lett. 2008; 182(1-3):24-28.

Iravani S, Korbekandi H, Mirmohammadi SV, Zolfaghari B. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. Res Pharm Sci 2014; 9(6): 385–406.

Ivask A, El-Badawy A, Kaweeteerawat C, Boren D, Fischer H, Ji Z, et al. Toxicity mechanisms in Escherichia coli vary for silver nanoparticles and differ from ionic silver. ACS Nano 2014; 8: 374-86.

Johnston J, Hutchison G, Christensen M, Peters S, Hankin S, and Stone V et al. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. Crit Rev Toxicol. 2010; 40: 328–346.

Kalishwaralal K, Barath-Manikanth S, Pandian SR, Deepak V, Gurunathan S. Silver nanoparticles impede the biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus epidermidis. Colloids Surf B Biointerfaces. 2010; 79: 340–344.

Kalishwaralal K, Deepak V, Pandian RK, Kottaisamy Barathmani SM, Kartikeyan KS, Gurunahan BS. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Brevibacterium casei*. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2010; 77: 257–62.

Kapuścińska A., Nowak I. Silver nanoparticles as a challenge for modern cosmetology and pharmacology. *Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics. Applications of Nanobiomaterials* 2016; 10(15): 395–417.

Kholoud M.M. El-Nour A, Eftaiha A, Al-Warthan A, Ammar R. Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arab. J. Chem*. 2010; 3: 135–140.

Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ et al., Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine* 2007; 3:95–101.

Kim S, Choi J, Choi J, ChungK, Park K, YJi, Ryu D et al. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol In Vitro*. 2009; 23: 1076–1084.

Kollef MH, Golan Y, Micek ST, Shorr AF, Restrepo MI. Appraising Contemporary Strategies to Combat Multidrug Resistant Gram-Negative Bacterial Infections—Proceedings and Data From the Gram-Negative Resistance Summit, *Clinical Infectious Diseases*. 2011; 53(2): 33-55.

Komala, A. et al. Synthesis of silver nano particles and fabrication of aqueous Ag inks for inkjet printing. *Mater. Chem. Phys*. 2011; 129: 1075–1080.

Lansdown ABG. Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action. *J Wound Care* 2002; 11: 125–30.

Lansdown ABG. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. *Curr Probl Dermatol* 2006 ;33: 17–34.

Leaper DJ. Silver dressings: their role in wound management. *Int Wound J*. 2006; 3: 282–294.

Lee HY, et al. Genomics-based screening of differentially expressed genes in the brains of mice exposed to silver nanoparticles via inhalation. *J Nanopart Res*. 2009; 12: 1567–1578.

Lee JH, et al. A health surveillance case study on workers who manufacture silver nanomaterials. *Nanotoxicology*. 2012; 6: 667–669.

Legler AV, Kazachenko AS, Kazbanov VI, Per'yanova OV, Veselova OF. Synthesis and antimicrobial activity of silver complexes with arginine and glutamic acid. *Pharm Chem J* 2001; 235: 501–3.

Li, G. et al. (2012) Fungus-mediated green synthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus terreus*. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13: 466–476.

Lima RD, et al. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *J Appl Toxicol.* 2012; 32: 867–879.

Maillard J-Y, Denyer SP. (2006a) Focus on silver. European Wound Management Association (EWMA) position document: The role of topical antimicrobials in managing wound infection. London: MEP Ltd.

Marambio-Jones C, Hoek EMV. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential applications for human health and the environment. *J Nanopart Res,* 2010; 12:1531–1551.

Melaiye A, Youngs WJ. Silver and its application as an antimicrobial agent. *Expert Opin Ther Patents* 2005; 15(2): 125–30.

Mourato, A. et al. Biosynthesis of crystalline silver and gold nanoparticles by extremophilic yeasts. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2011, 8 pages.

Moyer CA, Brentano L, Gravens DL, Margraf HW, Monafó WW Jr. Treatment of large human burns with 0.5 per cent silver nitrate solution. *Arch Surg,* 1965; 90: 812–867.

Nam KY. In vitro antimicrobial effect of the tissue conditioner containing silver nanoparticles. *J Adv Prosthodont.* 2011; 3: 20-4.

Neto EAB, Ribeiro C, Zucolotto V: Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. In Embrapa. 2008.O157:H7. *Biometals* 2012; 25: 45-53.

Oberdorster, G, Oberdorster, E y Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005; 113: 823-839.

Pal S, Tak YK, Song JM. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 1712–1720.

Panneerselvam C, Ponarulselvam S, Murugan K. Potential anti-plasmodial activity of synthesized silver nanoparticle using *Andrographis paniculata* Nees (Acanthaceae). *Archives App Sci Res* 2011; 3: 208–217.

Park S, Hye Park H, Kim, S, Jung S Kim, Kand W, Ko P. Antiviral properties of silver nanoparticles on a magnetic hybrid colloid. *Appl Environ Microbiol.* 2014; 80:2343–2350.

Pollini M, Paladini F, Catalano M, et al. Antibacterial coatings on haemodialysis catheters by photochemical deposition of silver nanoparticles. *J Mater Sci Mater Med.* 2011; 22: 2005–2012

Popescu M, Velea A, Lorinczi A. Biogenic production of nanoparticles. *Dig J Nanomater Bios* 2010; 5(4): 1035–40.

Powers CM, et al. Critical contributions of silver ion, particle size, coating, and composition. *Environ Health Persp.* 2011; 119: 37–44.

Prathna TC, Chandrasekaran N, Raichur AM, Mukherje A. Kinetic evolution studies of silver nanoparticles in a bio-based green synthesis process. *Colloids Surf A, Physicochem Eng Aspects* 2011; 37: 212–6.

Pratsinis A, Hervella P, Leroux , Pratsinis S, Sotiriou G. Toxicity of silver nanoparticles in macrophages. *Small.* 2013; 9: 2576–2584.

Pratten J, Nazhat SN, Blaker JJ, Boccaccini AR. In vitro attachment of *Staphylococcus epidermidis* to surgical sutures with and without Ag-containing bioactive glass coating. *J Biomater Appl.* 2004; 19: 47–57.

Rai MK, Deshmukh SD, Ingle AP, Gade AK. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J Appl Microbiol.* 2012; 112(5) :841–852.

Reddy GAK, Joy JM, Mitra T, Shabnam S, Shilpa T. Nano silver – a review. *Int J Adv Pharm* 2012; 2(1): 09–15.

Roldán M, Pellegrini N, Sanctis O. Electrochemical method for Ag-PEG nanoparticles synthesis. *J. Nanopart.* 2013; 7 pages.

Russell AD, Hugo WB. Antimicrobial activity and action of silver. *Prog Med Chem* 1994; 31: 351–370.

Rycenga, Claire M. , Zeng J , Li W, Moran C, Zhang Q et al. Controlling the synthesis and assembly of silver nanostructures for plasmonic applications. *Chem Rev.* 2011; 111: 3669–3712.

Shameli K, Ahmad MB, Jazayeri SD, Shabanzadeh P, Sangpour P, Jahangiri H et al. Investigation of antibacterial properties silver nanoparticles prepared via green method. *Chem Cent J* 2012; 6:73.

Shang L, Wang Y, Huang L, Dong S: Preparation of DNA-silver nano hybrids in multilayer nanoreactors by in situ electrochemical reduction, characterization, and application. *Langmuir* 2007, 23: 7738–7744.

Shivaji S, Madhu S, Singh S. Extracellular synthesis of antibacterial silver nanoparticles using psychrophilic bacteria. *Process. Biochem.* 2011; 46: 1800–1807.

Shrivastava S, Bera T, Roy A, Singh G, Ramchandrarao P, Dash D. 2007. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology* 18: 225103.

Sibanda T, Okoh AI. The challenges of overcoming antibiotic resistance: Plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents. *African Journal of Biotechnology.* 2007; 6(25): 2886–2896.

Silver S, Phung LT, Silver G. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 2006; 33: 627-634.

Silver S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuse of silver compounds. *FEMS Microbiol Rev* 2003; 27: 341–53.

Slawson RM, Lee H, Trevors JT. Bacterial interactions with silver. *Biol Met* 1990; 3:1514.

Sondi I, Salopek-Sondi B. 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci* 2004; 275: 177–182.

Stiufiuc, R, Iacovita, C, Lucaciu C, Stiufiuc, G, Dutu, AG, Braescu C et al. SERS active silver colloids prepared by reduction of silver nitrate with short-chain polyethylene glycol. *Nanoscale Res. Lett.* 2013, 8: 47

Vijay PPN, Pammi SVN, Kollu P, Satyanarayana KVV, Shameem U. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Boerhaavia diffusa* plant extract and their anti-bacterial activity. *Ind Crops Prod* 2014; 52: 562–566.

Wei D, Sun W, Qian W, Ye Y, Ma X. The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity *Carbohydrate Research*. 2009; 34(23):2375-2382

Wong KKY, Liu X: Silver nanoparticles-the real “silver bullet” in clinical medicine? *Med Chem Commun* 2010, 1:125–131.

Xiang D, et al. Inhibition of A/Human/Hubei/3/2005 (H3N2) influenza virus infection by silver nanoparticles in vitro and in vivo. *Int J Nanomed*. 2013; 8: 4103–4114.

Xiu ZM, Zhang QB, Puppala HL, Colvin L, Alvarez PJ. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano Lett* 2012; 12: 4271-5.

Xu H, Qu F, Xu H, Lai W, Wang YA, Aguilar ZP, et al. Role of reactive oxygen species in the antibacterial mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli* O157:H7. *Biometals* 2012 ;25 :45-53.

Yen HJ, Hsu SH, Tsai CL. 2009. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small* 2009; 5:1553–1561.

Zhang T, Wang L, Chen Q, Chen C. Cytotoxic potential of silver nanoparticles. *Yonsei Med J*. 2014; 55: 283–291.

Zhang Q, Li N, Goebel J, Lu Z, Yin A systematic study of the synthesis of silver nanoplates: is citrate a ‘magic reagent. *J. Am. Chem. Soc*. 2011; 133: 18931–18939.