

Artículo de revisión

Nanopartículas de plata: tecnología para su obtención, caracterización y actividad biológica

Gerardo Leyva Gómez*

* Laboratorio de Tejido Conjuntivo, Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados del Instituto Nacional de Rehabilitación, Distrito Federal, México.

Dirección para correspondencia:
Gerardo Leyva Gómez
Calzada México-Xochimilco
Núm. 289,
Col. Arenal de Guadalupe,
14389, Delegación Tlalpan,
Distrito Federal, México.
E-mail:
gerardoleyva@hotmail.com

Este artículo puede ser consultado en versión completa en:
<http://www.medicgraphic.com/rid>

Palabras clave: Quemaduras, plata, nanotecnología, nanopartículas, nanopartículas de plata.

Key words: Burn, silver, nanotechnology, nanoparticles, silver nanoparticles.

Resumen

La nanotecnología ha cambiado la perspectiva funcional de los materiales empleados en la medicina, ofreciendo éstos una mejor funcionalidad debido principalmente a su tamaño nanométrico. Un ejemplo son las nanopartículas de plata que exhiben diferentes propiedades una vez aplicadas a los sistemas biológicos, en comparación con los sistemas tradicionales de tratamiento. El tamaño nanométrico les confiere la habilidad para penetrar distintas membranas biológicas como la pared bacteriana, incrementando su efecto bactericida. Esta revisión aborda de manera general los procesos empleados en la obtención de las nanopartículas de plata como un ejemplo de la tecnología empleada en el diseño de estos vehículos; los parámetros de calidad aplicados para resguardar su funcionalidad y una explicación de su mecanismo de acción antibacteriana en vista de una evaluación terapéutica eficaz y como punto de referencia del impacto del desarrollo de materiales a través de la nanotecnología.

Abstract

Nanotechnology has changed the functional perspective of the materials used in medicine, providing a better functionality mainly due to its nanometric size. An example are silver nanoparticles that exhibit different properties once they are applied to biological systems compared with traditional systems of treatment. The nanoscale gives them the ability to penetrate different biological membranes, such as bacterial cell wall thereby increasing their bactericidal effect. The purpose of this review is to address the processes used for obtaining silver nanoparticles, as an example of the technology used in the design of these vehicles, the quality parameters applied to protect its functionality and an explanation of its mechanism of antibacterial action for an effective therapeutic evaluation and as a reference point of impact of the development of materials through nanotechnology.

Introducción

Hasta el momento, diversos estudios indican que las infecciones se correlacionan con la mortalidad en los hospitales. En el caso de pacientes con quemaduras menos extensas, las infecciones pueden incrementar la morbilidad y la estadía en el hospital. La infección es uno de los indicadores en el ámbito del aseguramiento de la calidad en la atención de quemados.¹ Dentro de los agentes empleados para combatir las infecciones en estos padecimientos se encuentra la plata. Durante siglos, la plata ha sido utilizada como un agente antimicrobiano cuyo uso ha disminuido debido a la innovación de una amplia gama de antibióticos. Sin embargo, la resistencia causada por el abuso a varios antibióticos ha motivado el resurgimiento de su empleo en el control de infecciones.²

Una de las grandes innovaciones de las últimas décadas en el área de desarrollo y formulación de medicamentos es la aplicación de la nanotecnología para mejorar la eficacia de los fármacos en espacio y tiempo dentro del organismo. Los distintos materiales empleados como matrices de transporte y liberación ofrecen un perfil farmacocinético controlado, una posible administración dirigida hacia el órgano blanco mediante el uso de materiales con afinidad hacia ciertos compuestos biológicos (como puede ser la adsorción de biopolímeros, anticuerpos o sustratos de rutas metabólicas) y una distribución enmascarada por las propiedades de la matriz que ofrecen protección al fármaco encapsulado contra su posible degradación, eliminación, incremento en el cruce a través de distintas barreras biológicas (nivel intestinal, barrera hematoencefálica, etcétera) y reducción de toxicidad.

Son varios factores que en conjunto ofrecen ventajas incomparables para una nueva terapéutica.^{3,4}

Definición de nanopartículas: Las nanopartículas (Nps) para propósitos farmacéuticos se definen en el *Handbook of Pharmaceutical Technology* como las partículas coloidales sólidas con un rango de tamaño de 1 a 1,000 nm. Consisten de materiales macromoleculares y se pueden usar terapéuticamente también como transportadores de fármacos en los cuales el principio activo (fármaco o material activo biológicamente) está disuelto, entrampado o encapsulado, o en el cual el principio activo está adsorbido o enlazado covalentemente.⁶

Debido a su amplio rango de aplicaciones se han desarrollado diversos métodos de fabricación de nanopartículas de plata (Nps-Ag), así como diversos compuestos que contienen iones de plata o plata metálica.⁵

Procesos de obtención

De manera general, los métodos de preparación de Nps se clasifican como *top-down* (utilizan métodos físicos, procesos de molienda) y como *bottom-up* (métodos químicos en solución coloidal, procesos de formación de partículas a partir de una solución) (*Figura 1*). Los métodos *top-down* son aquellos que reducen el tamaño de agregación del material hasta llegar a un tamaño nanométrico con un consumo considerable de energía, mientras que los métodos *bottom-up* involucran la obtención de un estado de agregación nanométrico partiendo de una dispersión molecular, es decir, es una vía contraria a la primera.

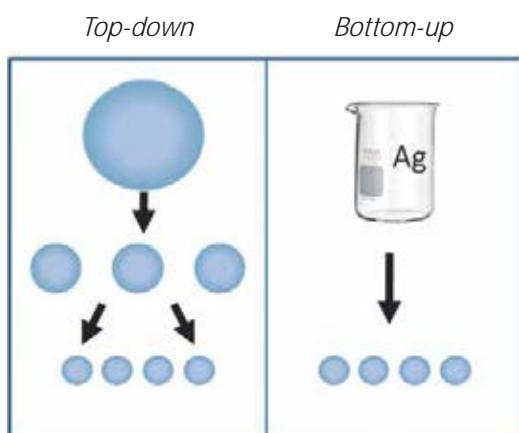


Figura 1. Métodos generales de obtención de Nps. Método de obtención a partir de algo más grande *top-down* y método de obtención a partir de algo más pequeño *bottom-up*.

Mientras que los métodos físicos tienen la ventaja de ser capaces de producir grandes cantidades de Nps, a su vez, tienen la desventaja de no tener un suficiente control sobre el tamaño de la partícula, produciendo Nps con un amplio rango de tamaño que pueden originar un efecto poco controlable y predecible cuando es administrado en un sistema biológico. En la *figura 2A* se muestra el análisis del tamaño de una partícula de un lote con una distribución amplia en tamaño de Nps, mientras que la *figura 2B* se refiere a un lote que presenta dos distribuciones de partículas definidas.

De esta manera, los métodos de síntesis química coloidal tienen la capacidad de sintetizar Nps uniformes con un tamaño de partícula estrecho (*Figura 2C*).

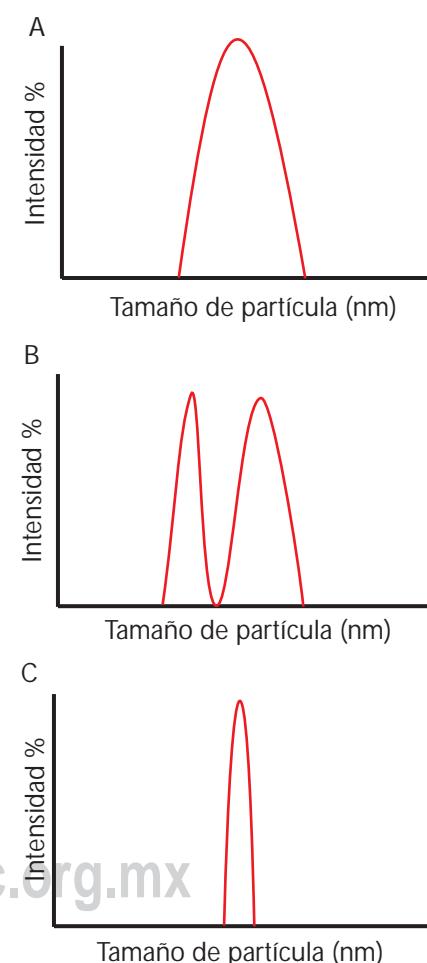
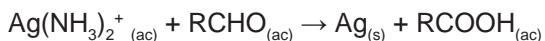


Figura 2. Distribución del tamaño de la partícula según los métodos de obtención de Nps. La escala de por ciento de intensidad es una escala relativa del conteo de fotones dispersados por la muestra.

El método más común para la preparación de Nps-Ag consiste en la reducción de una solución salina de plata con un agente reductor como el borohidruro de sodio, el citrato o el ascorbato. La tendencia de los métodos de síntesis, actualmente, se enfoca en el uso de compuestos que no causan daño al medio ambiente.⁷⁻⁹ Otros métodos consisten en la condensación de gases, irradiación láser y deposición sonoquímica.⁷

La síntesis de Tollens^{9,10} es un método bien establecido para obtener Nps-Ag con un tamaño de partícula controlado. La reacción involucra la reducción de una solución amoniacal de plata, utilizando ya sea aldehídos o azúcares reductores. El proceso que se lleva a cabo es el siguiente:



En donde «ac» se refiere a una solución acuosa y «s» a la formación de un precipitado en el medio de reacción.

Se pueden emplear varios agentes reductores tales como el formaldehído, la glucosa, la galactosa, la maltosa y la lactosa. Se ha visto que el tamaño de las Nps-Ag depende fuertemente de la concentración de amonio y del pH del medio durante el proceso de reducción. Normalmente, se obtienen Nps de un tamaño aproximado de 25 nm empleando maltosa como agente reductor y lauril sulfato de sodio, Tween 80, polivinilpirrolidona 360 o ácidos grasos como agentes estabilizantes.

A su vez, es importante señalar que la acción antibacteriana de las Nps-Ag es altamente dependiente del tamaño de la partícula, morfología y dosis.¹¹ Las Nps deben de ser lo suficientemente pequeñas para penetrar las membranas celulares y con ello afectar el proceso intracelular. Es razonable pensar que la interacción de las partículas con la bacteria depende del área superficial disponible (partículas pequeñas con una mayor área superficial disponible para la interacción tienen más efecto bactericida que las partículas grandes). Además de la selección de un método de preparación de las Nps apropiado para garantizar un tamaño de partícula bajo, es esencial la elección del agente estabilizante superficial para mantener un tamaño de partícula uniforme y una dispersión estable en el transcurso del tiempo (*Figura 3*).

Parámetros de calidad

La evaluación de la calidad de estas formulaciones se lleva a cabo mediante el registro del tamaño de la partícula, la morfología, el potencial zeta y la estabilidad, y

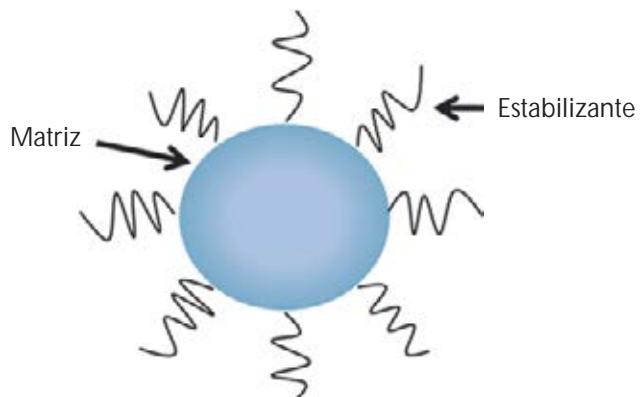


Figura 3. Representación esquemática de la estructura de una Np.

el perfil de resonancia de plasmones. La determinación de la distribución del tamaño de la partícula se realiza mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz, y el estudio de su morfología mediante microscopía electrónica de barrido o también microscopía electrónica de transmisión. Respecto a su estabilidad, las Nps-Ag han mostrado en algunos casos ser estables durante dos meses en dispersión acuosa;¹⁰ esta evaluación se registra por medición del potencial zeta de acuerdo con su movilidad electroforética que puede ser registrada por la técnica de velocimetría de láser Doppler. La caracterización de estas formulaciones también involucra el registro del perfil de resonancia de plasmones superficiales en espectrofotometría de UV-vis (esta banda es atribuida a la excitación colectiva del gas de electrones en las partículas, con un cambio periódico en la densidad de electrones en la superficie), entre otros.

La relación entre la efectividad de estabilización y el poder antibacteriano tiene un vínculo en la medida de que los aglomerados de partículas provenientes de fenómenos de desestabilización pueden tener menor efecto antibacteriano por una disminución en el área superficial, limitando su capacidad de penetrar la membrana celular.

Dispersión dinámica de la luz. Un haz de luz producido por una lámpara de helio-neón es filtrado a través de un monocromador y, finalmente, éste incide sobre una celda que contiene a la dispersión de las Nps. Los detectores comúnmente situados a 90° o 173° respecto al plano de ubicación de la celda registran la dispersión de fotones provenientes de la inflexión del láser incidente (*Figura 4*). Finalmente, la señal es convertida a registros digitales donde es posible analizar los gráficos de distribución del tamaño

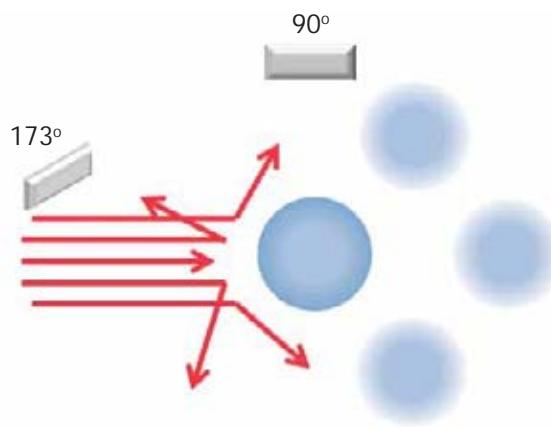


Figura 4. Detección de la dispersión de luz producida por la incidencia sobre Nps. Detector de 90° y 173°.

de la partícula. Algunos parámetros importantes durante la medición son la absorción de luz por parte de la muestra a la longitud de onda del láser, constante dieléctrica del medio en que se encuentran dispersas las Nps y la temperatura de medición.¹²

Velocimetría de láser Doppler. Es una técnica establecida en ingeniería para el estudio de la velocidad de un fluido con precisión en una amplia variedad de situaciones. Un haz del láser es dividido en dos haces de igual intensidad que se enfocan en un punto común en el campo de flujo. En el punto donde los haces se cortan, se forma un modelo de interferencia, definiendo el volumen de medición. Las partículas que se mueven a través del volumen de medición dispersan luz de intensidad variable que es recolectada con un detector. La frecuencia de salida resultante del detector está directamente relacionada con la velocidad de la partícula, y ésta con el potencial zeta —o en otras palabras—, con la densidad de carga sobre la superficie de la partícula y, a su vez, con la estabilidad en solución. Valores ≤ 30 o ≥ 30 mV describen un sistema estable mantenido por un mecanismo exclusivo de cargas.¹²

Mecanismos de acción antibacteriana

Varios estudios indican que las Nps-Ag se pueden adherir a la membrana celular, alterando la permeabilidad celular y funciones respiratorias de la célula. Es posible que las Nps-Ag no sólo interactúen con la superficie de la membrana, sino que también penetren al interior de la bacteria (*Cuadro I*).

La función que pueden tener los agentes de superficie de las Nps, aparte de su mecanismo de estabilización, es su actividad antimicrobiana. Por ejemplo, se

Cuadro I. Microorganismos empleados para evaluar la actividad bactericida de Nps-Ag.

Efecto de las Nps-Ag sobre cepas de bacterias	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	3, 8, 9
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	8, 9
<i>Staphylococcus aureus</i>	3, 8, 9
<i>Enterococcus faecalis</i>	9
<i>Enterococcus faecium</i>	9
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9

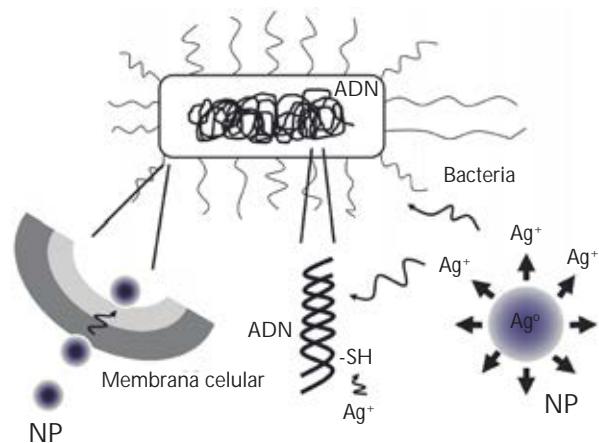


Figura 5. Mecanismos de acción antibacteriana de Nps-Ag.

ha visto que las Nps-Ag estabilizadas con lauril sulfato de sodio tienen mayor actividad antibacteriana que las formulaciones con Tween 80 mediante un mecanismo de sinergia. Es posible que el lauril sulfato de sodio como surfactante iónico pueda penetrar o alterar la pared celular, especialmente en las bacterias Gram positivas. De tal manera que el efecto bactericida de las Nps-Ag puede ser un sinergismo de los siguientes mecanismos: **1)** El material estabilizante y las Nps-Ag desestabilizan la membrana bacteriana, y con esto, alteran su permeabilidad, provocando un daño irreversible. **2)** Las Nps-Ag se internalizan en la bacteria con facilidad debido a su tamaño diminuto. **3)** Las Nps-Ag en su trayecto van liberando iones de plata que funcionan como un reservorio del agente bactericida alterando el citoplasma. **4)** Los iones de plata se enlanzan con grupos sulfhidrilos de biomoléculas

y con compuestos fosforosulfurados como el ADN inactivando a la bacteria.¹⁰ Estos mecanismos pueden darse simultáneamente (*Figura 5*).

De manera general, estableciendo una comparación entre la actividad antibacteriana de las Nps-Ag y los iones de plata se ha comprobado que los primeros presentan esa actividad en niveles nanomolares; mientras que los últimos lo exhiben en niveles macromolares, evidenciando su efectividad por el diseño de formulación. Se ha observado un aspecto sinérgico cuando las Nps-Ag son oxidadas por el medio, y un fenómeno de desorción provoca la liberación de iones de plata, de tal manera que cuando es comparada la misma formulación con o sin la presencia de oxígeno, se observa un mayor efecto antibacteriano en la presencia de este oxidante.

Los estudios actuales en el tema de Nps-Ag se centran en nuevas plataformas de síntesis a nanoscala, empleo de biorreactores para su obtención, nuevas aplicaciones (ya sea por combinación con otros materiales o por modificaciones en el arreglo espacial), amplios estudios de citotoxicidad y evaluación del grado de efecto bactericida en distintas cepas bacterianas.

Las investigaciones actuales se perfilan para que en un futuro se pueda disponer de formulaciones bactericidas de Nps-Ag de mayor seguridad y de una eficacia más prolongada.

Bibliografía

1. Appelgren P, Björnhagen V, Bragderyd K, Jonsson CE, Ransjö U. A prospective study of infections in burn patients. *Burns* 2002; 28: 39-46.
2. Wei D, Sun W, Qian W, Ye Y, Ma X. The synthesis of chitosan-based nanoparticles and their antibacterial activity. *Carb Res* 2009; 344: 2375-2382.
3. Spadaro D, Barletta E, Barreca F, Currò G, Neri F. Synthesis of PMA stabilized silver nanoparticles by chemical reduction process under a two-step UV irradiation. *Appl Surf Sci* 2010; 256: 3812-3816.
4. Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ. The presence and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine* 2007; 3: 20-31.
5. Kreuter J. Nanoparticles- a historical perspective. *Int J Pharm* 2007; 331: 1-10.
6. Le AT, Tam LT, Tam PD, Huy PT, Huy TQ, Hieu NV et al. Synthesis of oleic acid-stabilized silver nanoparticles and analysis of their antibacterial activity. *Mat Sci Eng C* 2010; 30: 910-916.
7. Sheikh N, Akhavan A, Kassaei MZ. Synthesis of antibacterial silver nanoparticles by gamma irradiation. *Physica E* 2009; 42: 132-135.
8. Guzman M, Dille J, Godet S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against Gram positive and Gram negative bacteria. *Nanomed Nanotech Biol Med* 2011; 8: 37-45.
9. Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv Colloid Interface Sci* 2009; 145: 83-96.
10. Le AT, Tam LT, Tam PD, Huy PT, Huy TQ, Hieu NV et al. Synthesis of oleic acid-stabilized silver nanoparticles and analysis of their antibacterial activity. *Mater Sci Eng C* 2010; 30: 910-916.
11. Breunig M, Bauer S, Goepferich A. Polymers and nanoparticles: Intelligent tools for intracellular targeting? *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 68: 112-128.
12. Zetasizer Nano Series User Manual. Malvern instruments. Worcestershire, UK; 2004.