



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**SÍNTESIS Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
NANOHÍBRIDOS BASADOS EN HIDROGEL Y NANOPARTÍCULAS DE PLATA
TAMAÑO CONTROLABLE**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA
MÉDICA**

**AUTOR: RODRIGO BASTÍAS GONZÁLEZ
PROFESOR GUÍA: Dr. ESTEBAN DURÁN LARA**

TALCA-CHILE

2019

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a todo el equipo de DURAN LAB Bio & Nanomaterials por su entrega y apoyo a la investigación, destacando el compromiso del profesor Esteban Durán Lara quién me permitió formar parte de este proyecto.

También agradecer al Fondo Nacional de Desarrollo científico y Tecnológico, que mediante Fondecyt de iniciación N° 11170155 (2018-2020) permitió la realización de esta investigación y trabajo.

Junto con ello mencionar el apoyo del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Talca para el desarrollo de protocolos y procedimientos microbiológicos.

DEDICATORIA

“Esta memoria de pregrado es dedicada a mis padres Elizabeth González Falcón y Carlos Bastías Alzamora por su cariño, esfuerzo e incondicional dedicación durante cada etapa de mi vida. A mi novia Catalina Lara Salinas por todo su tiempo, amor y apoyo permanente. Y finalmente a todos mis familiares y amigos que han estado siempre conmigo.”

ÍNDICE

1. Resumen.....	4
2. Introducción.....	5
3. Marco teórico.....	7
3.1 Infecciones bacterianas.....	7
3.1.1 <i>Staphylococcus</i> y sus características morfológicas.....	7
3.1.2 Infecciones de piel y tejidos blandos causados por <i>Staphylococcus aureus</i>	8
3.1.3 Tratamientos actuales de infecciones cutáneas y tejidos blandos.....	10
3.2 Hidrogeles.....	11
3.2.1 Generalidades de los hidrogeles.....	11
3.2.2 Características modificables de los hidrogeles.....	15
3.2.3 Usos actuales de hidrogeles.....	16
3.3 Actividad antibacteriana de metales y nanopartículas de plata.....	18
3.3.1 Generalidades de la actividad antibacteriana de metales.....	18
3.3.2 Nanopartículas de plata.....	19
3.3.3 Propiedades fisicoquímicas de nanopartículas de plata.....	24
3.3.3.1 Tamaño.....	24
3.3.3.2 Forma.....	24
3.3.3.3 Superficie.....	25
3.3.4 Mecanismos antibacterianos de nanopartículas de plata.....	25
3.3.4.1 Alteración de paredes celulares.....	25
3.3.4.2 Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	26
3.3.4.3 Inducción de efectos antibacterianos intracelulares.....	26
4. Hipótesis.....	28
5. Objetivos generales y específicos.....	28
6. Metodología.....	29
6.1 Materiales.....	29
6.2 Métodos.....	29
6.2.1 Síntesis de hidrogeles.....	29

6.2.2 Síntesis de nanohíbridos de hidrogel con nanopartículas de plata.....	30
6.2.3 Estudios de hinchazón.....	31
6.2.4 Espectroscopía infrarroja.....	31
6.2.5 Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM).....	32
6.2.6 Análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	32
6.2.7 Determinación de la actividad antibacteriana de los nanohíbridos sintetizados contra <i>Staphylococcus aureus</i> mediante difusión en agar...	32
6.2.8 Ensayo cuantitativo de la actividad antimicrobiana de los nanohíbridos sintetizados contra <i>Staphylococcus aureus</i>	33
7. Resultados.....	34
7.1 Síntesis de hidrogeles.....	34
7.2 Síntesis de nanohíbridos de hidrogel con nanopartículas de plata.....	34
7.3 Estudios de hinchazón.....	35
7.4 Espectroscopía infrarroja.....	36
7.5 Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM).....	36
7.6 Análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	37
7.7 Determinación de la actividad antibacteriana de los nanohíbridos sintetizados contra <i>Staphylococcus aureus</i> mediante difusión en agar.....	39
7.8 Ensayo cuantitativo de la actividad antimicrobiana de los nanohíbridos sintetizados contra <i>Staphylococcus aureus</i>	40
8. Discusión.....	41
8.1 Síntesis del hidrogel de polivinilalcohol con ácido maleico.....	41
8.2 Síntesis de nanohíbridos basados en hidrogel y nanopartículas de plata.....	42
8.3 Estudio de hinchazón de hidrogeles.....	43
8.4 Espectroscopía infrarroja.....	44
8.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	44
8.6 Determinación de la actividad antibacteriana de los nanohíbridos sintetizados frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	46
9. Conclusiones.....	48
10. Referencias bibliográficas.....	49

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. El tamaño de la malla de hidrogel media la difusión de fármacos.....	14
Figura 2. Cinco enfoques principales utilizados para obtener conjugados hidrogel-nanopartículas con distribución uniforme.....	21
Figura 3. Múltiples mecanismos de acción antimicrobiana de nanopartículas.....	27
Figura 4. Comparativa discos hidrogel PVA-AML en ausencia y presencia de nanopartículas de plata.....	34
Figura 5. Ensayo de índice de hinchazón.....	35
Figura 6. Espectro típico de espectroscopía infrarroja del hidrogel de polivinilalcohol con agente entrecruzante ácido maleico.....	36
Figura 7. Imágenes de microscopía electrónica de barrido.....	37
Figura 8. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión.....	38
Figura 9. Imagen de halos de inhibición de Hidrogeles PVA-AML con nanopartículas de plata.....	39
Tabla 1. Medidas y promedio de halos de inhibición de Hidrogeles PVA-AML con nanopartículas de plata.....	39
Tabla 2. Ensayo cuantitativo de actividad antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i>	40

1. RESUMEN

El avance de los sistemas de administración es un tema esencial cuando se habla de infecciones bacterianas, generando actualmente una búsqueda para crear nuevos formatos mediante los cuales se pueda generar una mayor eficiencia al momento de la erradicación de los microorganismos. En este ámbito los hidrogeles, siendo redes poliméricas hidrofílicas con capacidad de absorción y liberación de moléculas, han sido estudiados como una forma plausible de generar una administración localizada y sostenida en el tiempo, pero aun con un sistema de administración adecuado debido al mal uso antibiótico, puede que algunas cepas bacterianas no sean sensibles a fármacos de elección, por lo cual se ha trabajado con diferentes materiales antimicrobianos, como lo son las nanopartículas de plata, las cuales presentan efectividad en la eliminación de bacterias al utilizar mecanismos de erradicación múltiples y simultáneos.

Al comprender y combinar estos factores se pudo generar nanohíbridos de hidrogel con nanopartículas de plata, ocupando este polímero como soporte para la síntesis de las nanoestructuras. Esto permitió modificar el diámetro de las nanopartículas de forma dependiente a las concentraciones del agente reticulador, logrando determinar que, en base a la matriz porosa de los hidrogeles, las nanopartículas de plata pueden ser modificables en tamaño además de que estos polímeros formados en base a polivinilalcohol (PVA) y diferentes proporciones de ácido maleico (AML) son viables para la síntesis de estas estructuras nanométricas. También, al analizar los ensayos de actividad antibacteriana en placa y de forma cuantitativa se demostró que estos nanohíbridos presentan una actividad efectiva frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 provocando un efecto antibacteriano inversamente proporcional al tamaño de las nanopartículas formadas.

Palabras claves: Hidrogel, nanopartículas, plata, *Staphylococcus*, antibacteriano.

2. INTRODUCCIÓN

En la actualidad las infecciones bacterianas son responsables de una elevada tasa de morbilidad y mortalidad a escala global, donde una de las principales problemáticas descritas corresponde al desarrollo de la resistencia antimicrobiana. Junto con esto, frecuentemente agentes bacterianos provocan infecciones a nivel cutáneo o en estratos superficiales de la piel al presentar heridas expuestas, postoperatorias o quemaduras. Estos son lugares donde los antibióticos con una administración parenteral u oral no son completamente eficaces al no poder alcanzar una concentración idónea en estos tejidos, imposibilitando así la supresión de los microorganismos.

Una de las especies bacterianas que ha generado más revuelo en cuanto a su resistencia actual y la posibilidad de generar infecciones superficiales, inclusive a nivel nosocomial, corresponde a *Staphylococcus aureus*, bacteria grampositiva de la familia *Staphylococcaceae* conocida por presentar resistencia frente a antibióticos y estando bajo vigilancia epidemiológica.

Si bien, la administración de fármacos como lo son los antibióticos sigue un proceso clínico adecuado y es dependiente de factores como el agente etiológico, la sintomatología, el curso patológico, la ubicación de la infección, entre otras, existen falencias al momento de tratar infecciones localizadas como lo son las cutáneas, subdérmicas o de difícil acceso antibiótico debido a una escasa irrigación en la zona afectada, impidiendo en algunos casos, solucionar estos posibles escenarios infecciosos. Además, sumado a esto, existen posibles complicaciones en la administración convencional relacionadas con la toxicidad sistémica de antimicrobianos, la incapacidad para alcanzar una concentración eficaz en el sitio de infección o la dosificación, por lo cual se ha realizado un enfoque en nuevas alternativas de suministro farmacológico, por ejemplo, al utilizar polímeros naturales y/o sintéticos como lo son los hidrogeles.

Las formulaciones basadas en hidrogeles como sistemas de administración han tomado real importancia en el campo de la farmacología, permitiendo encontrar un soporte que se adecua a las necesidades para suministrar medicamentos. Estos corresponden a redes poliméricas tridimensionales las cuales, por sus propiedades fisicoquímicas altamente modificables, permiten absorber una gran cantidad de agua y contener moléculas con propiedades bioactivas debido a su matriz porosa y las interacciones entre los reactantes, como es el caso de antineoplásicos o antibióticos. Caracterizándose, además, por generar una liberación controlada de las moléculas incorporadas, mejorando la eficiencia de los procedimientos terapéuticos utilizados.

Volviendo al espectro de los antibacterianos, bien se conoce el efecto de metales en el crecimiento y desarrollo de microorganismos, basando su efecto principalmente en el estrés oxidativo, como también en mecanismos intracelulares(1). Esta alternativa antimicrobiana ha tomado relevancia debido a que logran prevenir o superar efectivamente mecanismos relacionados con la resistencia a fármacos. Uno de los metales con propiedades antibacterianas es la plata (Ag), material utilizado como antimicrobiano directo con múltiples mecanismos de acción. Observándose una alta correlación entre su uso, la actividad bactericida inherente y la disminución de infecciones. En los últimos tiempos la plata se ha empleado bajo diferentes protocolos de síntesis variando sus estructuras y logrando formar nanopartículas, las cuales además de presentar diámetros nanométricos, fomentan sus propiedades intrínsecas, ampliando inclusive su uso en medicina.

Comúnmente estos modelos de síntesis se basan en el uso de sales metálicas y procesos de reducción, es por ello, que se pretende determinar la generación de nanopartículas de plata en soportes de hidrogel, los cuales son altamente modificables, para obtener nanopartículas de tamaño ajustable con efectos antibacterianos frente a *Staphylococcus aureus*. Analizando que la matriz de los hidrogeles es un soporte viable para protocolos de síntesis de nanopartículas.

3. MARCO TEÓRICO

3.1- Infecciones bacterianas

Las infecciones corresponden a uno de los problemas de salud pública más relevantes en el mundo, influenciado por la gran cantidad de cepas bacterianas patógenas u oportunistas que son causantes de enfermedades. Estas se producen en forma de endemias, brotes, y en el pasado como verdaderas epidemias que lograban afectar a comunidades enteras. En la actualidad una de las razones por la cual se generan grandes problemáticas de salud corresponde a la resistencia antimicrobiana que provoca una ineficacia de fármacos que anteriormente presentaban efecto en bacterias. Esto es debido a diferentes mecanismos implicados, considerándose como una verdadera “resistencia antimicrobiana” cuando emergen fallas inesperadas en el tratamiento antibiótico de pacientes, siendo considerablemente frecuentes para poder ser apreciado como un problema colectivo y encontrándose finalmente nuevas cepas con genes “antibiótico resistentes” no conocidos(2).

Dentro de las infecciones bacterianas, destacan aquellas que presentan una gran frecuencia en humanos, ya sea colonizando áreas anatómicas específicas como también infectando y causando patologías. Dentro de los innumerables microorganismos que cumplen con estas características, se destaca *Staphylococcus aureus* el cual según estimaciones del 2005 el 20% de la población adulta presenta esta bacteria a nivel nasal de forma persistente, mientras que aproximadamente el 30% de la población se encuentra colonizada de forma intermitente(3).

3.1.1- *Staphylococcus* y sus características morfológicas

Dentro de las diferentes especies de *Staphylococcus* tres son las más relevantes clínicamente, dos de ellas son *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus* que en su mayor parte colonizan y logran ser parte de la microbiota comensal del ser humano,

provocando complicaciones en infantes o en estados de inmunodepresión, mientras que la tercera, conocida como *Staphylococcus aureus* es relevante debido a su gran implicancia en infecciones de diverso tipo y gravedad. Se caracteriza por presentar enzimas, toxinas y polisacáridos específicos que la convierten en una especie patógena con múltiples mecanismos de virulencia. El género *Staphylococcus* está conformado por células esféricas gram positivas dispuestas generalmente en racimos irregulares parecidos a uvas, aunque en medios de cultivo líquido también se observan como cocos individuales, pares, tétradas y cadenas presentando en todos los casos un diámetro aproximado de 1 μm . Se debe considerar además, que mientras más jóvenes las células más gram positivas serán en comparación con las ya envejecidas. En cuanto a su desarrollo éstas crecen en casi todos los medios a una temperatura de 37 °C generando colonias redondas, lisas, elevadas y brillantes en agares sólidos, caracterizándose *Staphylococcus aureus* por formar colonias con pigmentos de gris a dorado profundo, a diferencia de otros *Staphylococcus* sin pigmentos(4).

3.1.2- Infecciones de piel y tejidos blandos causadas por *Staphylococcus aureus*

Para hablar de la patogenia y las diferentes infecciones causadas por la especie *Staphylococcus aureus*, es necesario comprender que existe una regulación de la virulencia que involucra una red compleja de circuitos que detectan señales del entorno y el medio ambiente, logrando influir en la activación de factores de transcripción o reguladores maestros que actúan modulando la expresión génica del microorganismo(5). En los últimos veinte años han existido cambios notorios en la epidemiología de las infecciones por *Staphylococcus aureus*, con el número creciente de infecciones asociadas con la atención de salud (nosocomiales), relacionadas con dispositivos protésicos y también como una epidemia de enfermedades comunitarias(6).

Las infecciones a la piel son un tema fundamental cuando se habla de esta bacteria debido a los diferentes tipos de complicaciones relacionadas con las capas dérmicas y siendo esta una de las principales vías de entrada por parte del microorganismo. Una de las causas más importantes son las infecciones estafilocócicas de heridas, posterior a cirugías, traumatismos

o quemaduras, logrando colonizar las lesiones y causar edemas, eritemas y dolor con acumulación de material purulento. Un aspecto importante es que se pueden generar infecciones estafilocócicas piogénicas localizadas, las cuales incluyen, por ejemplo, el impétigo conocido como una manifestación superficial que afecta de forma preferente a pacientes pediátricos en zonas de las extremidades y el rostro, iniciando con pequeñas máculas, avanzando hacia pústulas y finalmente costras. Por otro lado, la foliculitis se presenta como una infección de los folículos pilosos pudiendo expandirse hacia la formación de furúnculos con nódulos elevados, dolorosos y con tejido necrótico intradérmico. Por su parte se pueden presentar en algunos casos ántrax cutáneo los cuales aparecen cuando los furúnculos se extienden en dirección del tejido subcutáneo. Es necesario destacar también algunas alteraciones causadas por toxinas específicas de *Staphylococcus aureus* como el síndrome de piel escaldada, caracterizándose por un eritema perioral localizado generando posteriormente una expansión corporal con signos de desprendimiento de piel causado por toxinas exfoliativas, como también la toxina TSST-1 causante del síndrome de shock tóxico conocido por ser una alteración sistémica con afectación cutánea(7).

Se pueden observar también otros factores de virulencia como moléculas antigénicas de superficie como la proteína A o factores involucrados en la formación de biofilms(8, 9). También la presencia de enzimas generadas por esta especie como la catalasa, la coagulasa, proteasas o lipasas que aportan a la invasión y betalactamasas como mecanismos de resistencia(4). Las toxinas también producidas pueden llevar a una deficiente respuesta del organismo hospedero, logrando degradar células, modificar respuestas inmunes innatas como adaptativas e inclusive eliminar uniones intercelulares que contribuyen a una mayor proliferación del microorganismo, donde dentro de esta categoría encontramos por ejemplo a las toxinas alfa, beta y gamma, leucocidinas y las anteriormente mencionadas toxinas exfoliativas y TSST-1(10, 11).

La primera línea de defensa del hospedero frente al microorganismo a nivel cutáneo es la fagocitosis por parte de los neutrófilos, pero aun así esta bacteria, mediante mecanismos como cápsulas o proteínas de superficie generan una reducción de la opsonización, junto con la liberación de proteínas que previenen la activación del complemento, la quimiotaxis y la

migración de neutrófilos, logrando sobrevivir y prevalecer invadiendo los tejidos expuestos(12).

Según estudios las infecciones cutáneas y de tejidos blandos representan una carga significativa para el sistema de atención en salud, donde la mayor frecuencia de agentes responsables corresponde a *Staphylococcus aureus* y más de la mitad de las cepas presentando resistencia a meticilina. También distinguir la presencia de factores de riesgo como un bajo estrato socioeconómico y la edad, siendo más propensos infantes menores a 5 años(13).

3.1.3- Tratamientos actuales de infecciones cutáneas y tejidos blandos

Diferentes investigaciones han buscado comprobar la efectividad de los tratamientos frente a infecciones cutáneas causadas por *Staphylococcus aureus*, los cuales se basan en diferentes tipos de antibióticos y formatos de uso. Se recomienda actualmente para casos de impétigo ampuloso, no ampuloso y ectimas tratamientos orales o tópicos, utilizando los primeros en casos de lesiones múltiples. Los tratamientos también se realizan con mupirocina o retapamulina dos veces al día durante 5 días en formato tópico, mientras que las terapias orales utilizando dicloxacilina o cefalexina. En el caso de ser provocado por cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes (MRSA) es recomendable tratar con doxiciclina, clindamicina o sulfametoxazol-trimetoprim. Para aquellas infecciones cutáneas purulentas se debe realizar incisiones y drenajes en caso de quistes inflamados, carbuncos, abscesos y furúnculos, realizando de forma posterior una terapia antibiótica dirigida al microorganismo con los antimicrobianos mencionados(14).

Aun considerando el uso de tratamientos actuales, estos no están exentos de problemas. Es debido a los factores de virulencia mencionados en el punto anterior que muchas de las terapias no son completamente efectivas contra cepas de *Staphylococcus aureus*, sobre todo aquellas con resistencia antibiótica. Se observan dificultades para tratar infecciones debido a sus toxinas, factores que influyen en su multiplicación y diseminación, como también agentes

que permiten la aparición de biofilms, factor propicio para escapar del estrés de agentes antimicrobianos, debido a la imposibilidad de penetración y baja retención del fármaco, lo cual resulta de forma inminente que no exista una distribución adecuada y una concentración intracelular correcta. Este es un obstáculo en el tratamiento de las infecciones, dando la capacidad al microorganismos de escapar de la acción farmacológica de los antibióticos, imposibilitando el uso de fármacos tradicionales que no son capaces de eliminar completamente todas las bacterias y, por lo tanto, conducir a una persistencia bacteriana posterior al tratamiento(15).

Cabe destacar que los tratamientos antibióticos sistémicos (como lo son los orales o parenterales) pueden presentar efectos adversos relacionados con los niveles de toxicidad provocados a nivel del organismo. Es por esto que los antimicrobianos tópicos presentan una ventaja frente a los orales en el ámbito de las infecciones cutáneas, ya que la piel es una superficie fácilmente accesible para la absorción de drogas, logrando minimizar la proliferación de bacterias u hongos permitiendo una reducción en los niveles de toxicidad(16).

A causa de estos problemas en la administración sistémica, es por lo que se trabajan actualmente nuevas formas o formulaciones de administración, las cuales pueden lograr ser óptimas para tratar las infecciones dérmicas y de tejidos blandos con componentes conocidos como lo son los antibióticos u otros materiales potencialmente antibacterianos.

3.2- Hidrogeles

3.2.1- Generalidades de los hidrogeles:

En la actualidad debido a los requerimientos de nuevas técnicas de administración de fármacos, se ha generado un aumento en la investigación de sistemas portadores, basándose en la capacidad de co-transportar moléculas con actividad biológica en sitios localizados.

Dependiendo del método, moléculas terapéuticas, diagnósticas o preventivas, logran ser atrapadas o encapsuladas para formar nano conjugados, estos pueden presentarse como liposomas, micelas, nanogeles, dendrímeros, nanoemulsiones, exomas y polimerosomas presentando un rango de tamaño nanométrico (1-1000nm)(17). Cabe destacar que en esta área se encuentran los hidrogeles, destacados por presentar características altamente modificables, obteniendo una especial atención en áreas de biomateriales, farmacología y ambientales.

Los hidrogeles son redes poliméricas hidrofílicas tridimensionales que son capaces de absorber grandes cantidades de agua, fluidos biológicos o moléculas(18). Es destacable la primera facultad mencionada, debido a que estas formulaciones permiten una alta contención de agua dependiendo del hidrogel utilizado, lo que les confiere una analogía física a los tejidos humanos presentando una alta biocompatibilidad. Estas formulaciones se pueden clasificar en dos grandes categorías, los hidrogeles naturales y los sintéticos, donde la diferencia radica principalmente en el uso de componentes como colágeno, fibrina, ácido hialurónico, matrigel y derivados de materiales naturales como quitosano, alginato y fibras especializadas en el caso de hidrogeles naturales, a diferencia de los sistemas sintéticos compuestos por ejemplo de polietilenglicol, de poli (óxido de etileno) o de polivinilalcohol. Debido a estas diferencias de materiales se pueden generar propiedades inherentes a nivel del hidrogel(19).

Como se mencionó, las matrices de los hidrogeles comprenden una amplia gama de polímeros naturales y sintéticos unidos por una variedad de reticulaciones físicas o químicas, existiendo una ventaja en el uso de soportes naturales ya que son análogos a tejidos fisiológicos siendo altamente biocompatibles, mientras que los hidrogeles sintéticos ofrecen una mayor flexibilidad al momento de su síntesis ajustando su composición química y mecánica, permitiendo variar a modo de ejemplo, la concentración del reactivo precursor como también el porcentaje de reticuladores para la formación de poros y el entrecruzamiento de sus redes. Junto con esto destacar también su capacidad y principal función de integrar agentes farmacéuticos en su red hidrófila reticulada, por lo cual los hidrogeles son materiales prometedores para la liberación controlada de fármacos y la ingeniería de tejidos(20).

La asociación “fármaco-hidrogel” necesaria es posible gracias a sus interacciones, pudiendo ser químicas o físicas, yendo desde la conjugación covalente hasta enlaces electrostáticos y asociaciones hidrófobas(21). Por lo tanto, las interrelaciones necesarias en cada caso se basan en el tamaño de la molécula bioactiva y el nivel de liberación que se quiere llegar a lograr. Donde a modo de ejemplo, sustancias pequeñas con interacciones débiles, en hidrogeles con poros de mayor tamaño se administrarán de forma casi inmediata perdiendo el sentido del sistema.

Recalcando el hecho de que se buscan sistemas de administración con una actividad local más efectiva, los hidrogeles han representado un avance en el campo, siendo utilizados en heridas, en infecciones y en enfermedades superficiales. También se pueden depositar de forma inyectable a nivel subdérmico o en apósitos, logrando tratamientos exitosos y mejorando significativamente procesos de cicatrización al presentar buenos efectos antibacterianos(22). Esto permite un contacto íntimo con agentes causantes de infección y/o zonas afectadas por enfermedades a la piel, limitando su efecto a un área determinada y establecida.

Por otro lado, se debe mencionar la liberación lenta o controlada que buscan generar las formulaciones de hidrogel siendo una característica fundamental en este tipo de sistemas como se observa en la figura 1. Los hidrogeles pueden representar una proporción significativa de los protocolos de administración de medicamentos, para dirigir con éxito diferentes fármacos a la velocidad y en el sitio deseado del organismo. Con el desarrollo de nuevos hidrogeles con diferentes características de hidrofobicidad / hidrofiliidad y particularidades estructurales, se podrían lograr tasas de liberación y perfiles de disolución específicos, mejorando así el suministro actual de moléculas más sensibles y emplearse en el tratamiento de afecciones patológicas como la diabetes o incluso el cáncer, mejorando la administración actual(23).

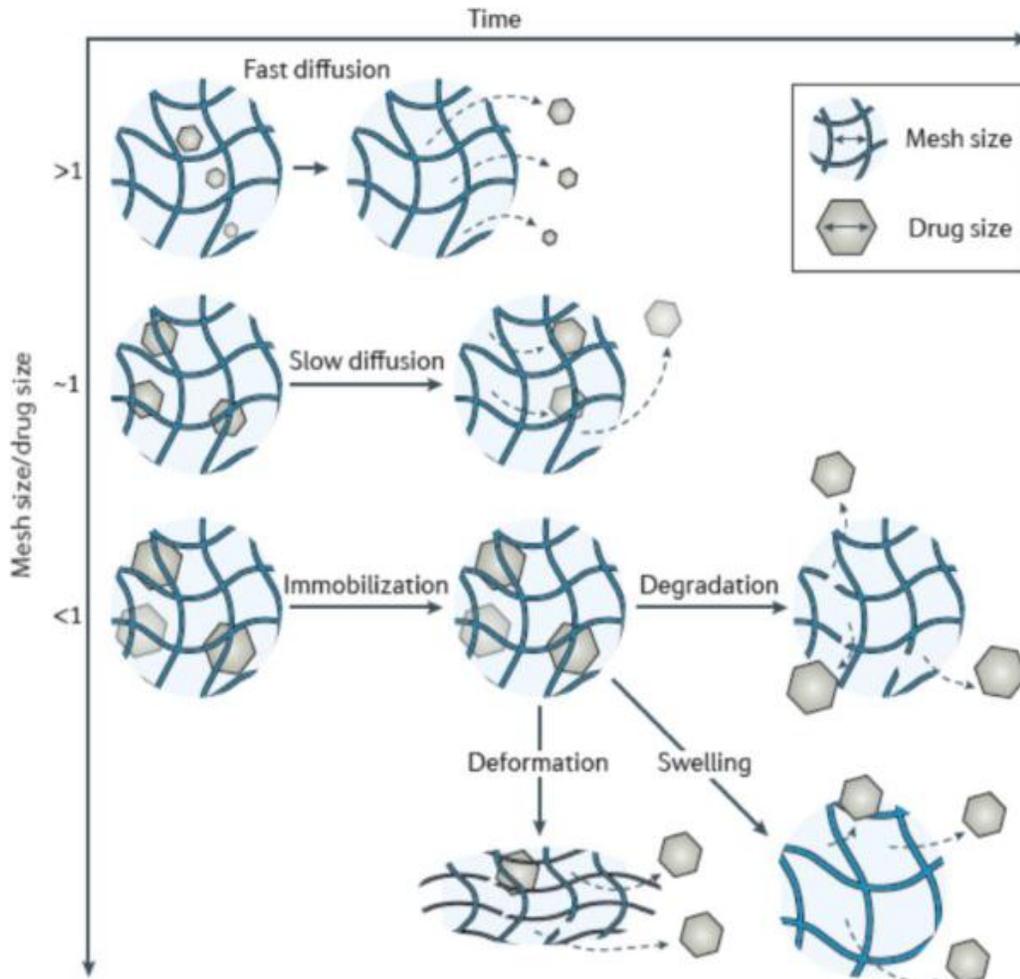


Figura 1. Tomado de Jianyu, L. 2016. El tamaño de la malla de hidrogel media la difusión de fármacos. Se grafica difusión rápida, difusión lenta e inmovilización con liberación por deformación, hinchazón y degradación a partir de las mallas de hidrogel(21).

Según Jianyu, L. *et al.* en la figura 1, el tamaño de los poros formados en las mallas de los hidrogeles media la liberación de las moléculas incorporadas. Dentro del mismo espectro, cuando se genera inmovilización de las partículas existen diversas formas de liberación controlada de fármacos, una de ellas corresponde a la liberación a través de degradación de la red, generando la administración cuando la red polimérica se desintegra, aumentando el tamaño de sus poros y dejando salir al fármaco en cuestión. También se presenta la liberación controlada a través del swelling o hinchazón que se fundamenta en el abultamiento generado por condiciones fisiológicas determinadas permitiendo una amplitud de la estructura y liberando los compuestos incorporados en él. La liberación controlada a través de la

deformación mecánica es otra opción al momento de generar la administración, que permite una liberación del agente bioactivo al verse alterada la estructura tridimensional netamente por estímulos mecánicos o inducido por factores físicos externos(21).

Se ha demostrado que dependiendo del tipo de formulación que presenten los hidrogeles, estos pueden tener una actividad dual frente a microorganismos, una acción directa a modo de contacto por posibles propiedades antibacterianas inherentes del hidrogel, como también una efectividad dada por el agente bioactivo incorporado en sus redes poliméricas que se libera de manera controlada. Un ejemplo de esto es el caso de una formulación generada por aldehído polidextrano y N-(2-hidroxipropil)-3-trimetilamonio cloruro de quitosano conteniendo vancomicina, demostrando así efectos múltiples que fomentan la eliminación del agente patógeno(24).

Como se ha mencionado anteriormente, algunos de los beneficios actuales que se evidencian al trabajar con polímeros de hidrogel, corresponde a la gran cantidad de materiales con los cuales se pueden fabricar y sus capacidades altamente modificables en cuanto a estructura o capacidades de su matriz, las que permiten poder adquirir un diseño compuesto que cumpla con los requerimientos adecuados para una aplicación determinada desde su síntesis.

3.2.2- Características modificables de los hidrogeles

Uno de los beneficios al utilizar formulaciones de hidrogeles se encuentra en el diseño y la sintetización controlada a escala molecular de estructuras, como la densidad del entrecruzamiento, la biodegradación, la tasa de degradación, el tamaño del poro, la resistencia mecánica, la respuesta química y biológica a estímulos como pH, enzimas y temperatura, permitiendo generar propiedades adaptables(25).

Cabe destacar que desde la síntesis se pueden determinar los factores más influyentes para un correcto funcionamiento de las capacidades de un hidrogel en cuanto a la liberación controlada. Existen cuatro puntos que bien trabajados pueden garantizar que la droga sea administrada en la cantidad necesaria, en el punto específico, en las concentraciones óptimas de eficacia y durante el tiempo de tratamiento, estos son la velocidad del flujo, el volumen administrado, el tiempo de degradación y el estímulo que inicia la liberación(26).

El tamaño de los hidrogeles es un factor que establece usualmente su aplicación. Existen formulaciones de diferentes dimensiones a nivel de macrogeles, microgeles y nanogeles, donde el tamaño de sus poros determina su función y la adherencia a nivel de tejidos, como en vasos sanguíneos, vías respiratorias o en el tracto gastrointestinal. Lo que permite inclusive el uso transepitelial y la posibilidad de ser inyectados(21).

Otra característica importante en la estructura de los hidrogeles corresponde al diámetro de los poros utilizados. Esta distribución del tamaño se ve afectada por tres factores fundamentales. El primero y más relevante corresponde a la concentración del agente reticulador que por consiguiente modifica la densidad de los enlaces químicos cruzados en las cadenas del polímero. También lo es la formación de entrecruzamientos físicos y la carga neta del hidrogel. Por lo cual exististe una correlación entre la concentración de los reactivos ocupados para la síntesis y el diámetro de los poros, permitiendo modificar el hidrogel en este aspecto para la incorporación posterior de moléculas con diversos tamaños(20).

3.2.3- Usos actuales de hidrogeles

Basándose en todas las características deseables que presentan los hidrogeles en la actualidad, estos se ocupan en diferentes áreas de la ciencia. Donde se ha logrado un importante desarrollo en campos de la medicina como un sistema efectivo de administración farmacológica, observándose avances en el área de oncología. Se ha generado, por ejemplo, una administración de antineoplásicos locales en cáncer de piel o también conocido como

melanoma, el cual, al presentar un acceso mucho más rápido, facilita la aplicación del hidrogel fomentando una liberación controlada en el tejido afectado por la neoplasia(25).

Al centrarse en otras capacidades como las de absorber diferentes elementos y moléculas en conjunto con grandes cantidades de agua, se han aprovechado las formulaciones de hidrogel para poder filtrar y eliminar pesticidas de aguas contaminadas, que sin duda son un factor de riesgo a la salud de las personas. Esta forma de utilización fue efectiva, eliminándose significativamente el pesticida contaminante. Siendo necesario mencionar que se eligen materiales específicos para la creación del polímero, con la finalidad de que pueda absorber una mayor cantidad de agua y así también residuos peligrosos(27).

Por otro lado, los hidrogeles se han ocupado para ser utilizados en apósitos de heridas o quemaduras evitando así la infección por agentes bacterianos, fomentando un aumento en la tasa de curación y una mejora notable en la cicatrización(28). Así se ha generado un enfoque en el área de la microbiología extendiendo el uso de nanopolímeros para la administración de antibióticos con efectos bactericidas, centrando su efecto en una actividad localizada y sostenida en el tiempo. Es el caso, por ejemplo, de hidrogeles cargados con vancomicina que mostraron resultados exitosos en cuanto al suministro de este antibiótico al ser cargado a hidrogeles de poli (β -éster amino) conocido como PBA(29).

Cabe destacar que las formulaciones basadas en hidrogel recientemente se han ocupado como soporte de partículas metálicas, permitiendo la formación de nanopartículas en sus redes tridimensionales como es el caso de la preparación de nanocompuestos a partir de la sintetización de una película de hidrogel a base de poliacrilamida y poli (N-Isopropil-acrilamida) conteniendo nanopartículas de oro(30). Generando antecedentes de que efectivamente existen protocolos y diseños variables para la formación de nanohíbridos metálicos con propiedades potenciadas y que se asocia su síntesis al uso de polímeros al ser utilizados como moldes.

3.3 Actividad antibacteriana de metales y nanopartículas de plata

3.3.1- Generalidades de la actividad antibacteriana de metales

La búsqueda de diferentes alternativas para combatir las infecciones ha llevado a investigar diferentes materiales que presenten propiedades bactericidas potenciales, para así lograr erradicar microorganismos patógenos. Dentro de estos materiales se encuentra una gran diversidad de metales como el cobre, el oro, el titanio o la plata presentando características favorables para su uso. Así se puede observar, por ejemplo, que aleaciones de cobre de alto porcentaje, utilizado como superficie de contacto de alimentos, ayuda a la reducción de microorganismos patógenos como *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* o *Enterobacter cloacae* en la industria alimentaria(31). Como también, que en conjunto de titanio generando un recubrimiento de óxido de titanio y cobre (TiCuO), presenta una eficiente actividad antibacteriana en infecciones periprotésicas, siendo estas una de las complicaciones más graves dentro del área de la ortopedia(32). Por su parte exclusivamente el titanio presenta actividad antibacteriana asociada a procesos fotocatalíticos generando inactivación bacteriana en películas delgadas de nano TiO₂ luego de irradiar luz UV-A durante 20 minutos, siendo asociado con una degradación de ácidos grasos de membranas celulares(33).

Por otro lado, nanopartículas de oro en base a quitosano, demuestra un efecto antimicrobiano sumamente potente contra cepas resistentes a antibióticos como *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* formadoras de biopelículas, manifestando además una baja citotoxicidad en células humanas(34).

Se conoce que la actividad antibacteriana de estos metales se relaciona con la inducción del estrés oxidativo junto con mecanismos no oxidativos intracelulares que provocan, según la literatura, efectos antibacterianos como los son la alteración de la membrana celular, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la liberación de iones metálicos y la inducción de efectos antibacterianos intracelulares(1).

En este ámbito de los metales y materiales, se ha logrado trabajar a escalas dimensionales sumamente bajas, formando nanopartículas, las cuales corresponden a estructuras nanométricas (1×10^{-9}), estas principalmente son formadas a partir de metales lo cual ha permitido obtener recursos con propiedades mejoradas o con una distribución que permite nuevos usos y funciones. Las nanopartículas en base a metales se caracterizan por presentar dimensiones entre 10 a 500 nanómetros lo cual genera una buena interacción biomolecular con estructuras celulares y de superficies, presentando buenas propiedades fisicoquímicas y cargas superficiales(35).

3.3.2- Nanopartículas de plata

Uno de los metales más estudiados corresponde a la plata, elemento químico con número atómico 47, el cual pertenece al grupo de los metales de transición. Presenta propiedades tales como una elevada conductibilidad térmica y eléctrica, una baja toxicidad pudiendo ser utilizada en medicina, además de ser un catalizador de reacciones de oxidación y presentar actividad antibacteriana(36). Estas peculiaridades han sido investigadas y descritas para esclarecer sus efectos a nivel bacteriano, por lo cual se ha propuesto el uso de plata como un elemento útil frente a infecciones ocupando diferentes formulaciones y protocolos para potenciar su uso.

Comúnmente la plata en medicina es utilizada en apósitos de heridas o quemaduras como sulfadiazina argéntica o plata nanocristalina, ambos conteniendo este metal y presentando una actividad similar al utilizarse como fármaco tópico de elección frente a quemaduras con fin de tratar o prevenir infecciones relacionadas(37).

Una de las formas actuales y viables mediante la cual la plata puede ejercer sus efectos antibacterianos, es la formación de nanopartículas. Estas corresponden a partículas que como se mencionó anteriormente poseen dimensiones nanométricas (menores a 100nm). Están compuestas por este elemento metálico y son presentadas para generar respuestas bactericidas a modo de “nanometalo-antibióticos. Es necesario destacar que estas

nanopartículas ya sea de plata u otros metales, se han planteado como posibles soluciones para la resistencia bacteriana debido a su amplio espectro de acción y diversidad de mecanismos activos de forma simultánea(38). Una de las características de estas partículas es que se comportan como una sola unidad con respecto al transporte y la reactividad, que a su vez pueden inmovilizarse logrando recubrimientos sobre superficies e inclusive que al combinarse con diversos polímeros, pueda formar compuestos con acciones antimicrobianas más potentes(39).

La síntesis de nanopartículas de plata se puede realizar por medio de diferentes técnicas, tanto físicas como químicas. Las primeras han sido trabajados desde hace décadas, basándose en la formación de nanopartículas mediante protocolos de evaporación y condensación utilizando altas temperaturas(40). Como también por métodos físicos convencionales como la generación de nanoestructuras mediante descarga por chispa, utilizando el método de descarga por arco permitiendo obtener nanopartículas libres de aniones y cationes en agua pura(41).

En cuanto a la síntesis química, esta se basa principalmente en procesos de reducción de sales metálicas en conjunto con agentes estabilizadores, para generar metales puros. La obtención de nanopartículas de plata se realiza mediante el uso de sales de nitrato de plata o tetracloruro de plata, lo cual produce suspensiones coloidales del metal suficientemente estables para la generación de las nanopartículas en el disolvente(42). Uno de los agentes reductores que se utiliza para su síntesis corresponde al borohidruro de sodio (NaBH_4) siendo capaz de transformar y reducir Ag^+ a Ag^0 , además de comprobarse que actúa como un agente de cobertura para la estabilización de las estructuras formadas(43).

Como se ha mencionado las nanopartículas metálicas ya sea de oro, plata, titanio entre otros, pueden ser sintetizadas bajo diferentes protocolos al utilizar soportes poliméricos como lo son los hidrogeles para su formación, generando nanohíbridos de hidrogel-nanopartículas como se ve a continuación en la figura 2.

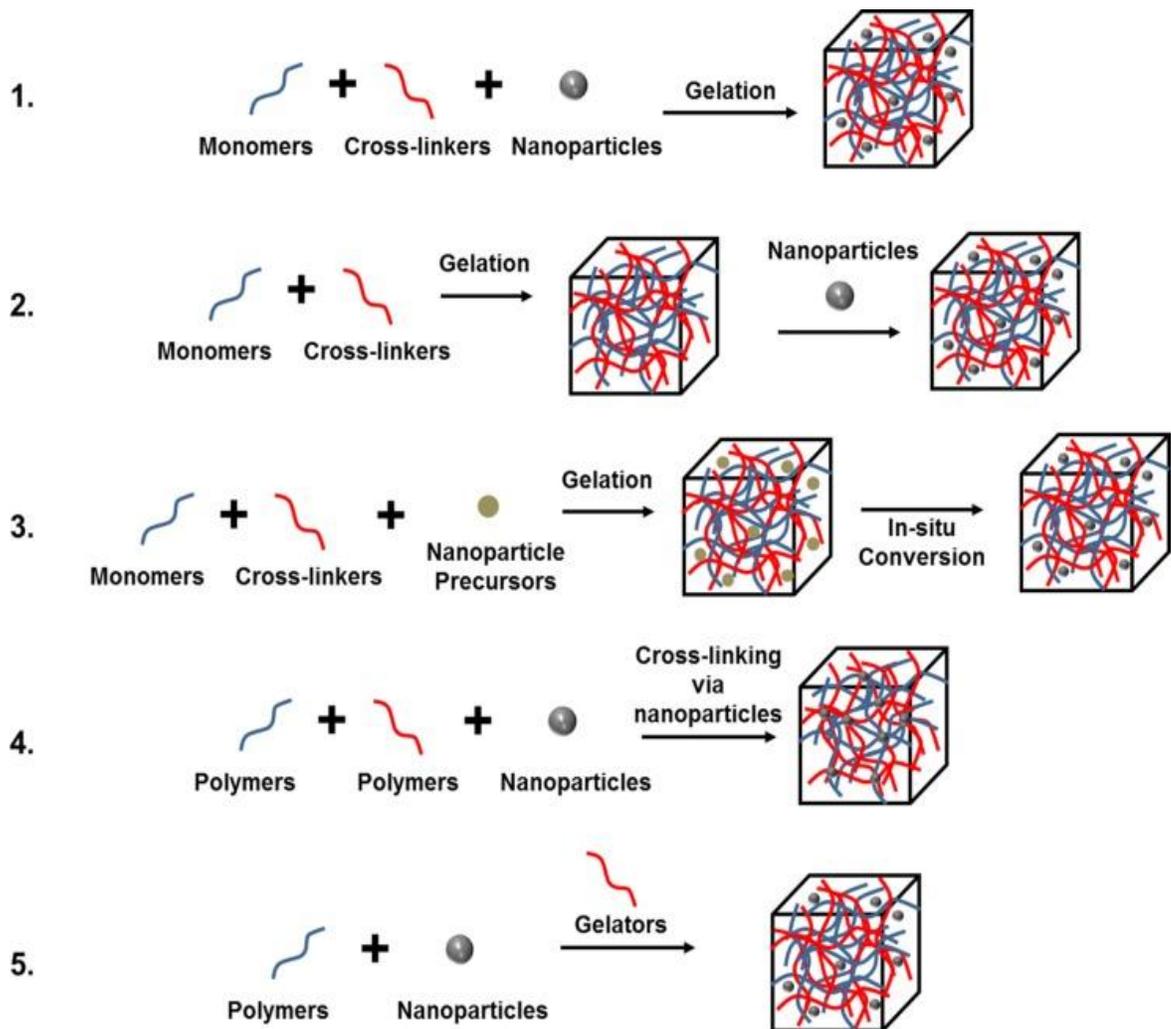


Figura 2: Tomado de Thoniyot, P. 2015. Cinco enfoques principales utilizados para obtener conjugados hidrogel-nanopartículas con distribución uniforme: 1) formación de hidrogel en una suspensión de nanopartículas, 2) incrustación física de las nanopartículas en la matriz de hidrogel después de la gelificación, 3) formación de nanopartículas reactivas dentro de un gel preformado, 4) reticulación usando nanopartículas para formar hidrogeles, 5) formación de gel usando nanopartículas, polímeros y moléculas gelantes distintas(44).

Como se puede observar en la figura 2 existen actualmente múltiples formas potenciales de crear nanohíbridos de plata basados en hidrogel y nanopartículas, algunos incorporándolas posterior a la formación de los polímeros, al momento de su síntesis, como también mediante precursores en la reacción.

La formación de hidrogeles en suspensiones de nanopartículas es uno de los enfoques más simples para la generación de estos nanohíbridos, debido a que se agregan partículas preformadas antes de la gelificación de los polímeros, lo cual ha sido realizado por ejemplo en la síntesis de hidrogeles en base a poliacrilamida conteniendo nanopartículas de oro, utilizando el protocolo de añadir monómeros y agentes reticulantes a la suspensión de nanopartículas, agregar el iniciador de la reacción y provocar la formación de películas del polímero(30). Por otro lado, la incrustación física de las nanopartículas en la matriz de hidrogel posterior a la gelificación suele ser un proceso más complejo debido al uso de técnicas como calentamiento, centrifugación y redistribuciones repetidas, así como también técnicas de “respiración” mediante las cuales el hidrogel formado es deshidratado, hinchado en soluciones de nanopartículas y finalmente lavado para eliminar remanentes(45, 46).

El fenómeno de formación de nanopartículas reactivas dentro de un gel preformado es uno de los procesos más utilizados al ocupar un hidrogel que actúa como soporte de reacción, en el que se sintetizan nanopartículas de metal a partir de precursores, al realizar una serie de tratamientos químicos requeridos. Respecto a este procedimiento se pudo generar hidrogeles de N-isopropil acrilamida y monómeros con grupos tiol que contenían iones de oro incrustados, donde la matriz del hidrogel permitió la generación de nanopartículas cuando se agregó posteriormente borohidruro de sodio, siendo este un agente reductor(47). Otra técnica para la síntesis de nanohíbridos corresponde a la reticulación de hidrogeles usando nanopartículas con grupos de reticulación presentes en su superficie, lo cual mejora la capacidad de formar enlaces entrecruzantes dentro del gel, tal como fue realizado en la formulación de un hidrogel basado en colágeno y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida como reticulante para la síntesis de nanoestructuras, resultando un hidrogel estable en cuanto a la viabilidad celular y reticulación(48). Junto con los protocolos mencionados se conoce además, la síntesis de nanohíbridos mediante la formación de gel

usando nanopartículas, polímeros y moléculas gelantes distintas como lo fue en la creación de una red de hidrogel tridimensional con nanopartículas de sílice recubierto con polianilina, presentando una matriz porosa con expansión de volumen y una red eléctrica constante generando un hidrogel conductor(49).

Es importante mencionar que en la actualidad existe una búsqueda relacionada con la síntesis de nanopartículas de plata con un origen “verde” utilizando métodos simples y respetuosos con el medio ambiente, investigado así el uso extractos de plantas y cortezas con actividad biosintética para la producción de estas partículas antes mencionadas. Un ejemplo claro de esto corresponde al uso de el extracto de hoja de plantas cultivadas in vitro de *Ceropegia thwaitesii*, determinando la producción de nanopartículas con forma esférica y con actividad antimicrobiana contra cepas de *Salmonella typhi* y *Bacillus subtilis*, concluyendo en que la biosíntesis es un proceso útil en el área de los nanomateriales(50)

Para determinar el comportamiento de las nanopartículas de plata se han llevado a cabo estudios que comprueban la efectividad de este metal frente a microorganismos en donde además se intenta dilucidar los mecanismos celulares. Una de estas investigaciones determinó que las nanopartículas presentaban un efecto inhibitor y bactericida sobre bacterias gram positivas y negativas, existiendo una mayor inhibición en las primeras, debido a que las nanoestructuras de plata afectan principalmente al peptidoglicán, confirmando el efecto antibacteriano correspondiente(51).

Las nanopartículas de plata además de sus efectos bacterianos ya mencionados se han logrado asociar a otras funciones intrínsecas, como por ejemplo actividades antiinflamatorias, anticancerígenas y antifúngicas lo que convierte a este metal en una opción viable para realizar tratamientos relacionados a futuro. Y, así mismo, se ha logrado utilizar como herramienta diagnóstica a modo de biosensor para detecciones clínicas y genómicas(52).

3.3.3- Propiedades fisicoquímicas de nanopartículas de plata

3.3.3.1- Tamaño

El tamaño de las nanopartículas de plata es un factor influyente respecto a los efectos que pueden llegar a provocar en los microorganismos, y esto se debe principalmente a que mientras más pequeña sean las partículas con las cuales se trabaja, estas demuestran una mayor interacción directa frente a las bacterias en su superficie. Esta propiedad es una de las más significativas dentro de las nanopartículas, debido a que las dimensiones pueden ser modificadas bajo protocolos de síntesis, obteniendo tamaños ajustables según condición y uso. Esto se ha logrado determinar y se estipula que partículas de 5 nm en comparación con las de 7 nm, 10 nm, entre otras dimensiones, presentan una actividad antibacteriana mayor y más rápida, asociándose también a la concentración de partículas en suspensión(53).

3.3.3.2- Forma

Otra característica relevante en la actividad antibacteriana de las nanoestructuras de plata corresponde a su forma. Actualmente se pueden sintetizar estructuras con formas particulares como nanopartículas, nanoplacas y nanobarras, donde la actividad frente a microorganismos se asocia a las áreas de contacto que puede llegar a establecer, generando así, interacciones con las diferentes superficies celulares bacterianas además de la distribución molecular de la plata. Esta característica se relaciona de gran manera con la propiedad fisicoquímica de la superficie, siendo comprobada al obtener una mayor inhibición de cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* al ocupar nanoplacas en comparación con nanopartículas o nanobarras con menor área de superficie(54).

3.3.3.3- Superficie

La superficie de las nanopartículas de plata es un factor modificable al realizarse tratamientos que involucran la carga superficial, la unión diferencial referida a las bacterias, la agregación y el potencial de disolución, lo cual es optimizable dependiendo del uso antimicrobiano o al crear recubrimientos superficiales asociados a las partículas. Es importante destacar que, dependiendo de estas características de superficie, también cambian los potenciales citotóxicos que presentan las nanopartículas de plata afectando finalmente a los microorganismos(55).

3.3.4 -Mecanismos antibacterianos de nanopartículas de plata

3.3.4.1 -Alteración de paredes celulares

Uno de los mecanismos mediante el cual la plata ejerce su efecto corresponde a la alteración de las paredes celulares bacterianas. Se ha comprobado que las nanopartículas de plata pueden influir en el peptidoglicán de las bacterias, alterando las estructuras secundarias de los péptidos como consecuencia de la interacción de los iones metálicos sumado a la unión de nanopartículas. Esto genera un cambio en la configuración del peptidoglicán y una futura degradación de la pared celular bacteriana. Es destacable, que debido al pequeño tamaño de las nanopartículas de plata estas generan una unión con las paredes de las bacterias, provocando perforaciones y de manera consiguiente generando una acumulación de este nanomaterial con liberación de iones. La unión generada entre las nanopartículas de plata y el peptidoglicán ocurre en los enlaces β -1,4 de N-acetil glucosamina y N-acetil ácido murámico del glicano, escindiendo su enlace y liberándolos. Debido a que este mecanismo de acción se involucra fuertemente con el peptidoglicán, las bacterias más susceptibles a su acción corresponden a las gram positivas dada su gruesa capa característica. Aunque, no obstante, las nanopartículas de plata se unen y acumulan en microorganismos gram negativos debido a la atracción entre las cargas negativas de los polisacáridos y la carga positiva débil de la plata.(51).

3.3.4.2 Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

La generación o inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) corresponde a otro sistema mediante el cual las nanopartículas de plata pueden lograr un efecto antibacteriano. Este se relaciona en gran manera con la liberación de iones y la formación de estas especies. Se han realizado mediciones de los niveles de ROS en microorganismos tratados con nanopartículas de plata y se determinó que poco tiempo después, luego de 3 horas, la concentración de especies reactivas aumentó significativamente alterando a los microorganismos. Es bien conocido el efecto de estos agentes en las estructuras celulares, generando citotoxicidad, asociando la presencia de ROS al daño de membrana celular, proteínas, ADN y sistemas intracelulares vitales para el microorganismo como lo es la cadena transportadora de electrones(56).

3.3.4.3 Inducción de efectos antibacterianos intracelulares

Otro mecanismo potencial que se asocia a las nanopartículas de plata corresponde a los efectos intracelulares degenerativos. Como es mencionado anteriormente, al momento de que este nanomaterial se encuentra en presencia del microorganismo, genera una liberación de iones de plata debido a agentes oxidantes de la misma célula. Estos pueden penetrar componentes bacterianos a nivel celular como lo es el peptidoglicán, proteínas citosólicas, e inclusive el ADN a nivel de transcripción y transducción. Asociando que, cuando estos iones se encuentran unidos a una estructura, impiden sus funciones vitales evitando que los microorganismos expuestos puedan desarrollarse y replicarse(57, 58).

Los efectos antibacterianos de las nanopartículas de plata mencionados de forma reciente, y sobre todo los de características intracelulares se pueden resumir en la figura 3.

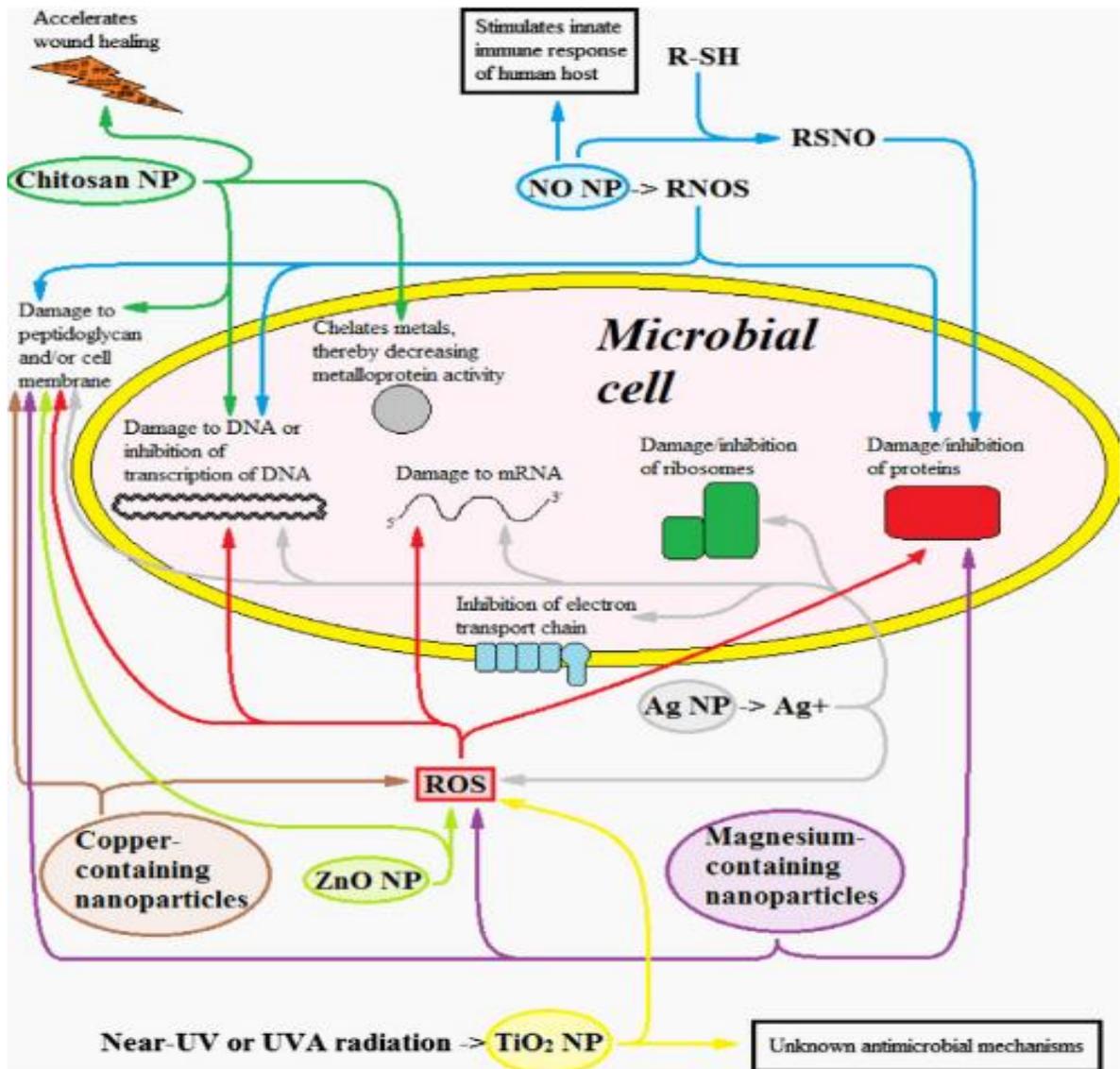


Figura 3. Tomado de Pelgrift, R. 2013. Múltiples mecanismos de acción antimicrobiana de nanopartículas, incluyendo nanopartículas de óxido de zinc, dióxido de titanio, quitosano, magnesio, cobre, liberadoras de óxido nítrico y nanopartículas de plata(59).

Se puede observar que según la figura 3, las nanopartículas de plata son una de las que más efectos antibacterianos presenta, afectando componentes bacterianos como el peptidoglicán, generando especies reactivas de oxígeno, causando daño a nivel de ADN, ARN y ribosomas, acompañado de inhibición sobre la cadena transportadora de electrones y estructuras ribosomales(59).

4. HIPÓTESIS

Si es posible controlar el tamaño del poro en la matriz de un hidrogel basado en polivinilalcohol (PVA), entonces será factible utilizarla como molde para sintetizar nanopartículas de plata de tamaño ajustable.

5. OBJETIVOS

Objetivo general:

Sintetizar nanopartículas de plata de tamaño ajustable utilizando la matriz de un hidrogel basado en polivinilalcohol (PVA), con actividad antibacteriana potencial contra cepas de *Staphylococcus aureus*.

Objetivos específicos:

- I- Sintetizar y caracterizar un hidrogel basado en polivinilalcohol (PVA) utilizando como agente entrecruzante ácido maleico.
- II- Sintetizar nanopartículas de plata (AgNP's) utilizando como molde de tamaño la matriz de los hidrogeles previamente formados.
- III- Caracterizar las nanopartículas de plata (AgNP's)
- IV- Evaluar la actividad antibacteriana de los nanohíbridos sintetizados contra cepas de *Staphylococcus aureus*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1- Materiales

Polivinilalcohol (PVA), ácido maleico (AML), ácido clorhídrico (HCl), bicarbonato de sodio (NaHCO_3), nitrato de plata (AgNO_3) y borhidruro de sodio (NaBH_4) para la síntesis de hidrogeles con nanopartículas de plata. Buffer fosfato salino (PBS), buffer acetato adquiridos de Sigma-Aldrich y agua Milli-Q® reactivos para preparar soluciones. *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, agar BHI, caldo Luria-Bertani, agua peptonada comprados en Merck para estudios microbiológicos y agua destilada.

6.2- Métodos

6.2.1- Síntesis de hidrogeles

La síntesis de los hidrogeles se realizó a través de una reacción de esterificación, el cual es un proceso que se basa en la formación de un éster, siendo este un compuesto derivado de la reacción química entre un ácido carboxílico y un alcohol. En este caso fue ocupado polivinilalcohol (PVA) y diferentes concentraciones de ácido maleico (AML) como agente entrecruzante, utilizando agua como solvente y HCl como catalizador.

La reacción se preparó en un balón de 50 mL donde se agregó 1g de polivinilalcohol (PVA) y ácido maleico (AML) a diversas concentraciones 10, 20 y 30% p/p, esto se realizó en 13 mL de agua destilada y 80 μL de HCl colocándose en reflujo con agitación constante por 3 horas entre 80 y 90 °C.

Posteriormente la reacción fue colocada en un horno a 70 °C durante 5 horas hasta obtener una reticulación completa requerida, finalizando con un lavado repetido del hidrogel obtenido con bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y agua destilada para eliminar el exceso de ácido de la reacción.

De forma subsiguiente, para eliminar completamente los residuos de ácido al interior del hidrogel y que este no interfiera con la formación de nanopartículas de plata, se realizó un lavado repetido con agua ultra pura (Milli-Q®), asistiendo la liberación mediante el uso de un sonicador y confirmando la liberación de iones de forma inmediata con un medidor de pH.

Luego este hidrogel se dejó secar a temperatura ambiente en placas petri para continuar con el proceso de la formación de nanopartículas.

6.2.2- Síntesis de nanohíbridos de hidrogel con nanopartículas de plata

Los hidrogeles que se sintetizaron con diferentes proporciones de entrecruzante fueron utilizados para producir las nanopartículas de plata ($\text{Ag Np}'\text{s}$). Así, los hidrogeles obtenidos por la reacción anterior son inmersos en una solución 50 mM de nitrato de plata (AgNO_3) por 18 horas bajo agitación constante hasta obtener la máxima absorción de la solución.

Se realizó un lavado del hidrogel con agua ultra pura (Milli-Q®), para eliminar los residuos superficiales de plata, donde luego los productos fueron transferidos a un vaso que contenía una solución 20 mM de borohidruro de sodio (NaBH_4) durante 30 minutos para reducir los iones Ag^+ a las nanopartículas respectivas. Finalizando con un lavado con agua destilada y secándolo a temperatura ambiente.

Para finalizar se realizó una liofilización del hidrogel con nanopartículas de plata para eliminar toda el agua en su interior y que este pueda ser utilizado en diferentes pruebas, como lo es la determinación de su actividad antibacteriana.

6.2.3- Estudios de hinchazón

Para la realización del estudio de hinchazón de los hidrogeles sintetizados fue necesario obtener piezas de hidrogel seco con un espesor entre 0,4 y 0,5 mm presentando 1 cm³. Estos fueron puestos en una solución buffer fosfato salino (PBS) con un pH 7,4 a 0,1M y buffer acetato pH 3,0 a 0,1M para su hidratación e hinchazón a 25 °C. Estas piezas de hidrogel hinchados fueron extraídas de las soluciones en intervalos de tiempo regulares entre las 0 y 21 horas, secando superficialmente con papel absorbente. Estos fragmentos de hidrogel se pesaron y posteriormente fueron colocados en la misma solución, realizando las mismas mediciones hasta que se alcanzó un peso constante. Para calcular la hinchazón que se provoca al someter al hidrogel en este proceso, se ocupó la siguiente fórmula: $\%W = \frac{Ms - Md}{Md} \times 100$, donde %W es el índice de hinchazón, Ms es el hidrogel hidratado o hinchado y Md es el hidrogel seco.

6.2.4- Espectroscopía infrarroja

Se determinaron los espectros infrarrojos de los hidrogeles de polivinilalcohol con ácido maleico en diferentes concentraciones al 10, 20 y 30% mediante espectroscopía infrarroja transformada de Fourier utilizando un espectrómetro Nicolet Nexus 470 dentro de los intervalos espectrales de 4000-400 cm⁻¹. Donde todos los espectros se obtuvieron en pellets de KBr a partir de un promedio de 32 exploraciones con una resolución de 4 cm⁻¹.

6.2.5- Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM)

El análisis microscópico electrónico de barrido fue realizado en el Departamento de Biología, Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago de Chile, en el cual las muestras de hidrogel fueron cortadas y cargadas en un trozo de cobre, siendo teñidas con ácido fosfotúngstico al 0,7% p/v, se lavó y secó a temperatura ambiente. Las muestras fueron examinadas en un microscopio electrónico de bajo voltaje (5kV) LVEM5 (Delong Instruments, s.r.o., Brno, República Checa).

6.2.6- Análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM)

El análisis microscópico electrónico de transmisión fue realizado en el Centro para el Desarrollo de Nanociencia y Nanotecnología – CEDENNA, Universidad de Santiago de Chile. En este procedimiento se observaron las nanopartículas de plata generadas in vitro en el hidrogel, utilizando un Microscopio electrónico de transmisión Hitachi HT7700. Previamente las nanopartículas de plata fueron liberadas por hidratación con tres volúmenes de agua destilada mediante sonicación con una frecuencia de 20 kHz por 5 minutos. Luego se colocó una gota de la solución con las nanoestructuras de cada muestra en una cuadrícula de carbono TEM para observar sus características.

6.2.7- Determinación de la actividad antibacteriana de los nanohíbridos sintetizados contra *Staphylococcus aureus* mediante difusión en agar

Se realizó la detección de la actividad antibacteriana mediante la difusión en placa de agar utilizando el medio BHI. Para la realización de este procedimiento se ocupó la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, la cual previamente fue llevada a una suspensión de 100 µL que contenía *Staphylococcus aureus* en el rango de 1.0×10^6 UFC mL⁻¹ siendo este el inóculo. Posteriormente se extendió sobre la superficie del agar, y se incorporaron 3 discos del hidrogel PVA-AML con nanopartículas de plata en diferentes concentraciones con un

diámetro de 6mm, siendo incubada durante 24 horas a 37°C. Luego de la incubación se observó la presencia de los halos de inhibición correspondientes.

6.2.8- Ensayo cuantitativo de la actividad antimicrobiana de los nanohíbridos sintetizados contra *Staphylococcus aureus*

Por otro lado, se realizó un ensayo cuantitativo de la actividad antimicrobiana de los hidrogeles PVA-AML con nanopartículas de plata. Para realizar este ensayo se incubó *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 en 1 mL de caldo Luria-Bertani (LB) a 37°C hasta lograr un equivalente estándar 0,5 McFarland. Posteriormente se le agregó 100 y 200 mg de cada uno de los tres hidrogeles respectivos poniéndose en contacto con la bacteria e incubándose durante 24 horas a 37°C. Finalmente se realizaron diluciones seriadas en agua de peptona estéril al 0,1%, donde de cada una de ellas se obtuvieron 100 µL que fueron dispuestos en una placa de agar incubándose durante 24 horas a 37°C realizando un recuento de células viables para terminar el procedimiento.

7. RESULTADOS

7.1- Síntesis de hidrogeles

La síntesis de hidrogeles bajo el protocolo ejecutado permitió la generación de polímeros con características deseables, debido a la estandarización de los procesos. Estos hidrogeles sintetizados con polivinilalcohol (PVA) y diferentes concentraciones del agente entrecruzante ácido maleico (AML) al 10, 20 y 30%, mantuvieron una correcta polimerización confirmada por estudios de espectroscopía y SEM logrando además una estructura adecuada a 25°C para la generación de discos utilizados en estudios posteriores.

7.2- Síntesis de nanohíbridos de hidrogel con nanopartículas de plata

La síntesis de estos nanohíbridos se realizó mediante el uso de la matriz de los hidrogeles de polivinilalcohol y ácido maleico a diferentes concentraciones, utilizando borohidruro de sodio como agente reductor y formador de las nanopartículas de plata. Se corroboró la formación mediante el cambio de color del hidrogel a marrón oscuro debido al proceso de reducción de la plata junto con posteriores microscopías electrónicas de barrido y transmisión respectivamente.



Figura 4. Comparativa discos hidrogel PVA-AML en ausencia y presencia de nanopartículas de plata. (A) Disco previamente hidratado de hidrogel PVA-AML al 20% sin nanopartículas de plata, (B) Disco previamente hidratado de hidrogel PVA-AML al 20% con nanopartículas de plata.

7.3- Estudios de hinchazón

El ensayo de hinchazón evaluó el comportamiento de los hidrogeles de PVA-AML en el proceso de hidratación mediante el uso de buffers pH 3,0 y 7,4. Se observa que existen diferencias notorias mediante el %ESR o porcentaje del ratio de equilibrio de hinchazón entre los hidrogeles dependiendo de su grado de reticulación al 10, 20 y 30%, así mismo como del pH del buffer utilizado. Además, se realiza una comparación de la hidratación de estos polímeros con el tiempo dentro de las 21 horas del ensayo, pudiendo apreciar que, en todos los casos entre las 6 y 7 horas de tiempo transcurrido, logran hidratarse e hincharse completamente.

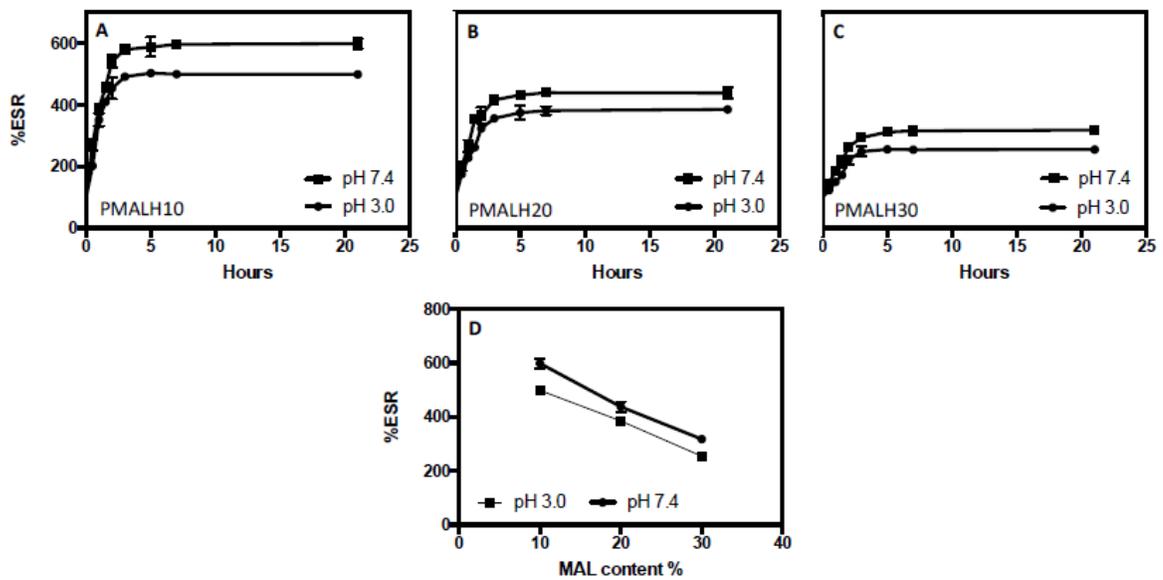


Figura 5: Ensayo de índice de hinchazón. %ESR PVA-AML para (A) Hidrogel PVA-AML 10%, (B) Hidrogel PVA-AML al 20%, (C) Hidrogel PVA-AML al 30% bajo dos buffer con pH 3,0 y 7,4 respecto al tiempo. (D) %ESR de hidrogel PVA-AML 10%, hidrogel PVA-AML al 20% e hidrogel PVA-AML al 30% a pH 3,0 y 7,4.

7.4- Espectroscopía infrarroja

El análisis de espectroscopía infrarroja logró determinar algunas señales características de la formación del hidrogel de polivinilalcohol reticulado con ácido maleico. Se puede observar en la figura 5 que entre 3050 y 3700 cm^{-1} hay una señal intensa llegando a su pic en 3300 cm^{-1} , mientras que hay otras de menor intensidad a 2920 y 2840 cm^{-1} . Por otro lado, entre el rango de los 1800 y 1000 cm^{-1} hay varias señales destacando la formada en 1640 cm^{-1} .

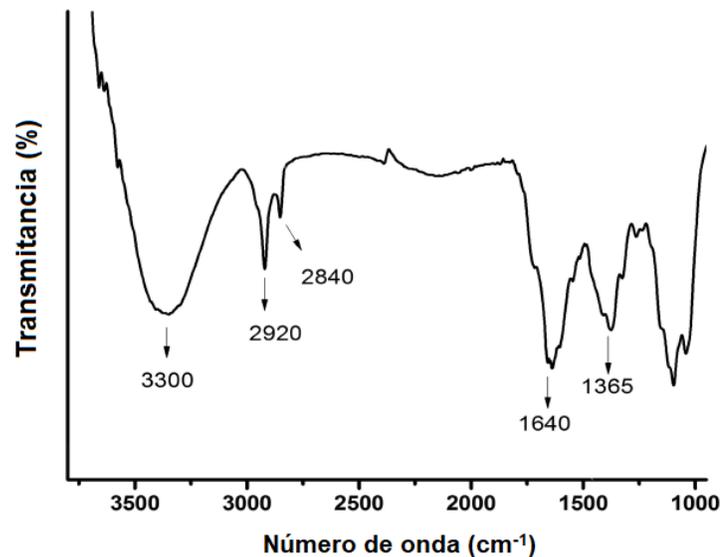


Figura 6. Espectro típico de espectroscopía infrarroja del hidrogel de polivinilalcohol con agente entrecruzante ácido maleico.

7.5- Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido realizada en la Universidad de Santiago de Chile - USACH, permite evidenciar las diferencias morfológicas según concentraciones del entrecruzante y la presencia o no de nanopartículas de plata. La figura 7 A, B y C muestra imágenes de los hidrogeles PVA-AML sin nanopartículas de plata, de menor a mayor proporción de ácido maleico (10, 20 y 30% p/p respectivamente) lográndose observar en A y B paredes lisas y porosas, pero en C superficies saturadas. Por otro lado, las imágenes D,

E y F exponen hidrogeles PVA-AML con nanopartículas de plata bajo las diferentes concentraciones del entrecruzante (10, 20 y 30% p/p) de forma respectiva, observando un cambio en la morfología y aumentado la porosidad.

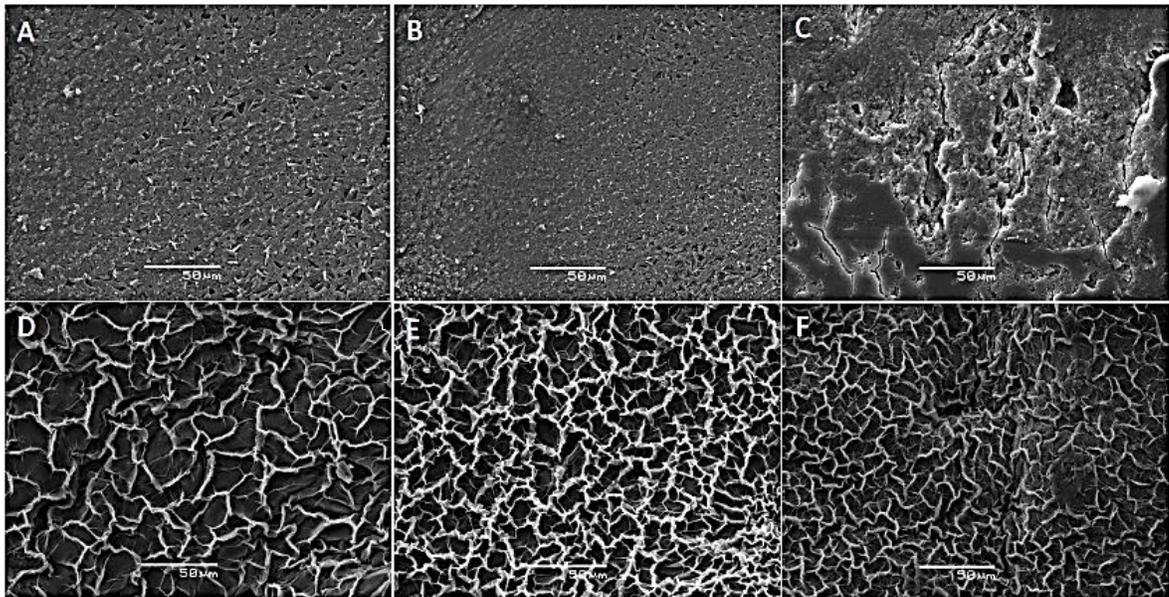


Figura 7. Imágenes de microscopía electrónica de barrido. (A) Hidrogel PVA-AML 10%, (B) Hidrogel PVA-AML 20%, (C) Hidrogel PVA-AML 30%, (D) Hidrogel PVA-AML 10% con Ag Np's, (E) Hidrogel PVA-AML 20% con Ag Np's y (F) Hidrogel PVA-AML 30% con Ag Np's.

7.6- Análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión realizada en el Centro para el Desarrollo de Nanociencia y Nanotecnología, Universidad de Santiago de Chile, muestran imágenes de las nanopartículas de plata formadas en el hidrogel PVA-AML con diferente grado de reticulación (10, 20 y 30% p/p respectivamente). Se analizaron 170 nanopartículas calculando la distribución del tamaño, siendo ilustrado en los histogramas presentes donde la curva central representa el diámetro promedio de las nanopartículas siendo estas de 6.48 ± 0.07 nm en hidrogeles PVA-AML 10%, $4,80 \pm 0,20$ nm en hidrogeles PVA-AML 20% y $3,07 \pm 0,07$ nm en hidrogeles PVA-AML 30%, todos con formas esféricas.

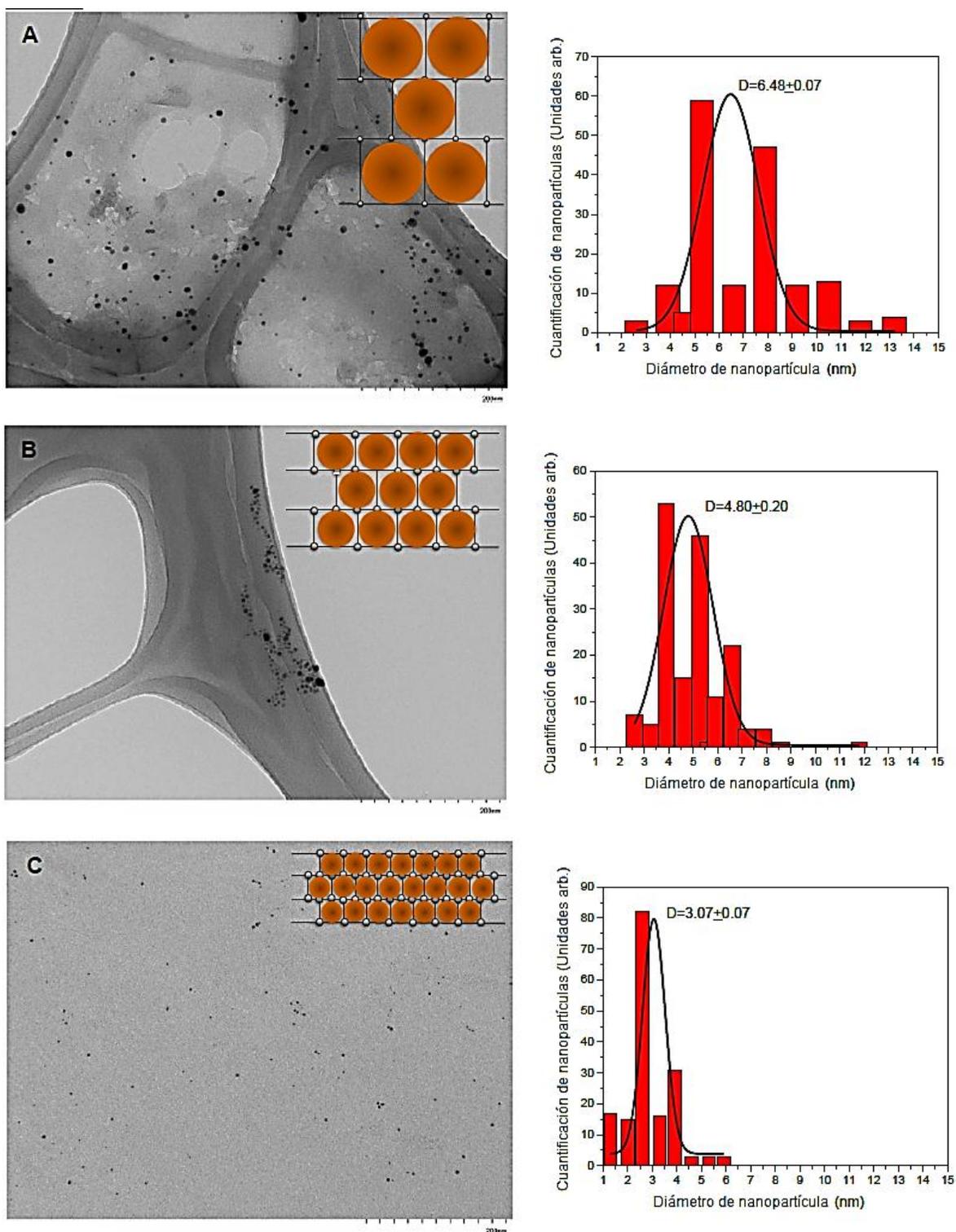


Figura 8. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión. (A) Nanopartículas de plata de hidrogel PVA-AML 10%, (B) Nanopartículas de plata de hidrogel PVA-AML 20%, (C) Nanopartículas de plata de hidrogel PVA-AML 30%. Todos con sus histogramas de diámetros respectivos.

7.7- Determinación de la actividad antibacteriana de los nanohíbridos sintetizados contra *Staphylococcus aureus* mediante difusión en agar

En cuanto a la determinación de la actividad antibacteriana dada por los hidrogeles PVA-AML con nanopartículas de plata se obtuvieron resultados favorables, observando la difusión en agar de los discos expuestos al microorganismo. El halo de inhibición de los hidrogeles PVA-AML al 10% con Ag Np's generaron un halo de inhibición promedio de 8 mm, los hidrogeles PVA-AML al 20% con Ag Np's halos de 10 mm y los hidrogeles PVA-AML al 30% con Ag Np's generó halos de inhibición de 15 mm.

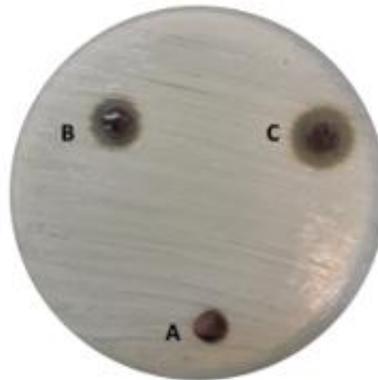


Figura 9. Imagen de halos de inhibición de hidrogeles PVA-AML con nanopartículas de plata. (A) Hidrogel PVA-AML 10% con Ag Np's, (B) Hidrogel PVA-AML 20% con Ag Np's, (C) Hidrogel PVA-AML 30% con Ag Np's.

Hidrogel	Ensayo I	Ensayo II	Ensayo III	\bar{x}
(A) PVA-AML 10% con Np's Ag	8 mm	8 mm	8 mm	8 mm
(B) PVA-AML 20% con Np's Ag	10 mm	9 mm	11 mm	10 mm
(C) PVA-AML 30% con Np's Ag	16 mm	16 mm	13 mm	15 mm

Tabla 1. Medidas y promedio de halos de inhibición de Hidrogeles PVA-AML con nanopartículas de plata. (A) Hidrogel PVA-AML 10% con Ag Np's 8 mm, (B) Hidrogel PVA-AML 20% con Ag Np's 10 mm, (C) Hidrogel PVA-AML 30% con Ag Np's 15 mm.

7.8- Ensayo cuantitativo de la actividad antimicrobiana de los nanohíbridos sintetizados contra *Staphylococcus aureus*

Los resultados obtenidos mediante el ensayo cuantitativo de la actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* demuestran una relación entre el porcentaje de reticulación creciente de los hidrogeles con nanopartículas de plata y la disminución de las unidades formadoras de colonias (UFC mL⁻¹). Así mismo se asocia un menor valor de estas (UFC mL⁻¹) al incorporar una mayor cantidad de hidrogel PVA-AML con Ag Np's en miligramos. Presentando más efecto con 200 mg que con 100mg en todos los ensayos.

Ensayo	Dosis de hidrogel (mg)	<i>S. aureus</i> (UFC mL ⁻¹)
(A) <i>S. aureus</i> control positivo	-	23 x 10 ⁸
(B) Hidrogel PVA-AML 10% con Np'sAg	100	13 x 10 ⁵
	200	11 x 10 ⁵
(C) Hidrogel PVA-AML 20% con Np'sAg	100	12 x 10 ⁵
	200	93 x 10 ⁴
(D) Hidrogel PVA-AML 30% con Np'sAg	100	76 x 10 ⁴
	200	30 x 10 ⁴
(E) Control negativo (Solo medio)	-	-

Tabla 2. Ensayo cuantitativo de actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*. (A) Control positivo con cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, (B) Hidrogel PVA-AML 10% con Ag Np's, (C) Hidrogel PVA-AML 20% con Ag Np's, (D) Hidrogel PVA-AML 30% con Ag Np's. (E) Control negativo solo con medio.

8. DISCUSIÓN

8.1- Síntesis del hidrogel de polivinilalcohol con ácido maleico

La síntesis de los hidrogeles propuestos se realizó mediante reacciones de esterificación entre los grupos hidroxilos del polivinilalcohol y los grupos carboxilos del entrecruzante ácido maleico, utilizando como catalizador HCl, permitiendo generar un polímero con las características fisicoquímicas deseadas. Ambos componentes son utilizados debido a que se ocupan comúnmente como biomateriales, presentando una alta biocompatibilidad y han sido aprobados por la FDA (Agencia de administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos), considerando la reacción de esterificación como un proceso en el cual ambos reactantes generan ésteres monoalquílicos de forma simple a temperaturas moderadas entre 80 y 90 °C (60), razón por la cual se trabajó en ese rango de temperaturas. Por otro lado, la concentración utilizada de polivinilalcohol es un aspecto clave para la formación del hidrogel por lo cual esta se mantuvo constante debido a que aquellas soluciones que contienen más de un 20% de PVA resultan excesivamente viscosas, por lo tanto, se utiliza generalmente concentraciones del 7 al 15%(61), tal como fue realizado en este ensayo aproximadamente entre un 7 y 8 %. Por otro lado, se constató que los hidrogeles formados bajo diferentes concentraciones del agente reticulador fueron estables a 25 °C posterior a la eliminación del ácido clorhídrico remanente ocupando una solución saturada de bicarbonato de sodio y el secado en estufa, siendo relevante su control, debido a que la exposición de los hidrogeles a altas temperaturas durante largos periodos de tiempo puede resultar en la carbonización.

Punto importante corresponde al uso de diferentes concentraciones del reticulador ácido maleico, con el fin de controlar el entrecruzamiento y así la porosidad de la matriz del hidrogel. Esto permite poseer un soporte en el cual moléculas puedan ingresar dentro de la formulación dependiendo del diámetro que presenten. Según Hoffman et. al, la distribución del tamaño y las interconexiones de los poros son factores importantes en una matriz de

hidrogel donde estos factores están directamente influenciados por la composición y la densidad de reticulación de la red de polímero del hidrogel(62).

Un símil a esta formulación es la realizada mediante polivinilalcohol y ácido málico conservando la misma reacción de esterificación, logrando generar un hidrogel viable y estable, con la capacidad de absorber una gran cantidad de agua debido a sus niveles de porosidad, presentando una estructura de mayor área para interactuar con moléculas(27).

8.2- Síntesis de nanohíbridos basados en hidrogel y nanopartículas de plata

Los polímeros de hidrogel ya sintetizados son ocupados para la formación de nanohíbridos con nanopartículas de plata en sus matrices con diferente grado de reticulación. Para este procedimiento fue sumergido el hidrogel PVA/AML en una solución de nitrato de plata 50 mM siendo reducida con una solución de borohidruro de sodio la cual es una técnica estándar para la generación de nanopartículas al utilizar sales metálicas(42). Se puede observar por ejemplo que, utilizando soluciones de esta sal, en conjunto con un proceso de reducción a base de borohidruro de sodio, se pueden generar nanoestructuras como nanoplacas o nanopartículas de plata, generando un cambio de coloración en el hidrogel utilizado, pasando de transparente a tonalidades marrones(43). En el ensayo realizado se pudo observar este cambio de tonalidades corroborando visualmente la reducción y posible formación de las nanopartículas, siendo necesarios aun así otros estudios para su confirmación.

Para esta síntesis de nanopartícula de plata se ocupó un protocolo similar al de la técnica de formación de nanopartículas reactivas dentro de un gel preformado debido a que corresponde a un proceso utilizado para la generación de nanohíbridos de hidrogel con partículas metálicas, ocupando al hidrogel como un micro reactor en el cual precursores metálicos como lo es el nitrato de plata conduce a la formación de nanopartículas al ser tratado posteriormente con agentes reductores(63).

8.3- Estudio de hinchazón de hidrogeles

Los resultados obtenidos en el estudio de hinchazón fueron determinados mediante el %ESR o porcentaje del ratio de equilibrio de hinchazón con el objetivo de evaluar la capacidad de los hidrogeles para absorber soluciones e hincharse, desempeñando así, un papel significativo al momento de la síntesis de las nanopartículas de plata. El índice de hinchazón se calculó en base a la ecuación $\%W = \frac{M_s - M_d}{M_d} \times 100$ siendo de utilidad para confirmar que todos los hidrogeles fueron aumentando el índice de hinchazón a lo largo del tiempo, comenzando a hincharse rápidamente y de manera completa luego de 5 horas desde el momento en que fueron sumergidos en los buffers. Posteriormente mantuvieron un índice de hinchazón constante hasta la finalización del estudio. Este procedimiento y resultados son utilizados para la caracterización de las propiedades de los hidrogeles, existiendo similitudes en estudios recientes al utilizar agentes reticulantes como el ácido succínico y ácido málico con tiempos de índices de hinchazón semejantes a las propuestas en este ensayo, logrando una hidratación completa pasadas las 5 horas y siendo dependiente de los reactantes utilizados(27, 64).

También se puede observar en la figura 5 que la hidratación de los hidrogeles es dependiente de condiciones externas como el pH de los buffer utilizados, siendo una característica propia de los polímeros(65). En los diferentes casos, (figura 5 A, B, C y D) se puede apreciar que existe un mayor índice de hinchazón al utilizar buffers pH 7,4 en comparación con las soluciones pH 3,0, siendo esto provocado por el comportamiento de las redes iónicas de la matriz de los hidrogeles, las cuales son proporcionadas por el entrecruzante ácido maleico que presenta 2 tipos de pKa (pKa1 = 1.93 y pKa2 = 6.59)(66). Esto genera un mayor grado de ionización a nivel de matriz causando un aumento de la repulsión electrostática entre cadenas de las redes, provocando de esta forma una mayor absorción de solventes y aumentando su volumen(67, 68). Otro punto relevante observado corresponde a las diferencias de hinchazón provocadas por la concentración del reticulante en las formulaciones de hidrogel, viéndose que en todos los casos y de forma independiente del pH, los hidrogeles con menor cantidad de ácido maleico (10%) presentaron un mayor índice de hinchazón con valores entre el 500 y 600% en comparación con los de mayor concentración que bordeaban un índice de hinchazón entre 400 y 250% para aquellos

hidrogeles con un 20 o 30% de reticulante. Esto permite confirmar que los diferentes grados de reticulación pueden afectar a la propiedad de absorción de los hidrogeles tal como se menciona en los estudios de Li. *et al.* y Echeverri. *et al.* donde una menor densidad de reticulación da como resultado un mayor grado de hinchazón(69, 70),

8.4- Espectroscopía infrarroja

La espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR) es una técnica bien conocida y ampliamente utilizada que prueba los modos de vibración de las moléculas, permitiendo identificar materiales biológicos, tales como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos que tienen estructuras químicas únicas y, por lo tanto, espectros de infrarrojos distintivos(71). Gracias a esta técnica se pudo observar un espectro que se relaciona con la formación del polímero de PVA-AML mediante las señales emitidas como se muestra en la figura 6. En este se observa una señal intensa entre 3000 y 3700 cm^{-1} con un pic en los 3300 cm^{-1} el cual es atribuido al grupo hidroxilo de la cadena de polivinilalcohol junto con su grado de hidratación, mostrando además un pic en 2920 cm^{-1} que se debe a la banda de extensión del alquilo (R-CH_2) y un pic en 2840 cm^{-1} causado por las bandas típicas de estiramiento de la cadena de PVA. De forma similar, otra señal significativa corresponde a la formada en 1640 cm^{-1} que corresponde a los enlaces éster covalentes formados entre el alcohol de las cadenas de PVA y ácido carboxílico del entrecruzante ácido maleico.(67, 72). Permitiendo comprobar la formación del hidrogel y sus estructuras determinantes para la formación de la matriz porosa con su respectivo entrecruzamiento.

8.5- Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La microscopía electrónica de barrido es una técnica utilizada habitualmente para determinar la morfología variable en las diferentes formulaciones de hidrogel, siendo útil para identificar el entrecruzamiento, la formación de poros y la matriz del polímero

sintetizado(73). A partir de los resultados observados se puede establecer una relación entre los hidrogeles PVA-AML con diferentes concentraciones de agente reticulante y las características atribuibles a la presencia de nanopartículas de plata en su estructura.

Las imágenes generadas mediante SEM (Figura 7 A, B y C) permitieron la observación de características comunes en la serie de hidrogeles sintetizados sin nanopartículas de plata, logrando visualizar la presencia de bordes irregulares a nivel de la superficie, en conjunto con la aparición de valles entre relieves y conjuntos de redes. En correlación a lo anterior, se pudo constatar que los hidrogeles formados al 10% y 20% del agente entrecruzante sin presencia de nanopartículas, presentan en sus superficies conjuntos de redes de fibras, siendo posible observar las estructuras porosas tridimensionales asociadas a la reticulación de la matriz, semejante a lo ocurrido en las imágenes SEM en el trabajo del Marican, *et al.* al utilizar una formulación de polivinilalcohol con ácido succínico al 20%(64), mientras que aquellos hidrogeles con un 30% del reticulante ácido maleico muestran una superficie más bien saturada, que implica dificultades para identificar las fibras de red. Aún con estos inconvenientes se logra correlacionar que mientras mayor es el porcentaje de reticulación, más pequeñas son las porosidades de la matriz como se menciona en trabajos similares confirmando que el diámetro de los poros depende de la concentración inicial en la solución del polímero(74).

Se pudo observar un cambio en la morfología de sus redes luego de la estabilización de las nanoestructuras (Figura 6 D, E y F). Las imágenes muestran un aumento de la distribución porosa dentro de la red de hidrogel, en la cual se aprecian de una manera más clara las diferencias en los diámetros de los poros generados, correlacionándolo con las concentraciones del agente reticulante al disminuir el tamaño de forma respectiva desde menor a mayor concentración (10%, 20% y 30%).

Por otro lado, la microscopía electrónica de transmisión brindó la posibilidad de determinar la presencia y diámetros de las nanopartículas de plata estabilizadas dentro de las matrices de hidrogel con diferente grado de entrecruzamiento. Fueron analizadas 170

partículas mediante micrografías obteniendo tamaños promedios para cada caso como se observa en la figura 8. Estas nanopartículas de plata con forma esférica observadas por TEM confirmaron que los espacios o poros de la matriz del hidrogel permiten el correcto desarrollo y la estabilización de las nanopartículas, pudiendo utilizar la red del hidrogel PVA-AML como plantilla para la síntesis de nanopartículas de plata y así la formación de estos nanohíbridos, comprobando la viabilidad de los hidrogeles para ser utilizados como soporte y formar nanopartículas tal como se ve en otras investigaciones relacionadas en donde los polímeros formados tienen la capacidad de ser mediadores para la síntesis de nanoestructuras inclusive con otros metales (30, 75).

Un punto importante y también observado mediante las micrografías, corresponde al tamaño de las nanopartículas de plata formadas, debido a que mientras más agentes reticulante presentan los hidrogeles PVA-AML, las nanopartículas de plata generadas son de menor diámetro. Lo cual correlaciona la concentración del entrecruzante, el tamaño de los poros formados en la matriz del hidrogel y el diámetro promedio de las nanopartículas de plata formadas, presentando similitud a lo logrado por Murali et. al. que al utilizar formulaciones de hidrogel basado en Poli (acrilamida-co-ácido acrílico) logró determinar que el tamaño y forma de las nanopartículas de plata son efectivamente modificables en estos soportes(76). Al igual que utilizar el soporte de hidrogel PVA-AML a concentraciones adecuadas como se da en este caso.

8.6- Determinación de la actividad antibacteriana de los nanohíbridos sintetizados frente a *Staphylococcus aureus*

Según lo observado en la difusión en placa de agar, se logra determinar que los discos efectivamente presentan actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 dependiente de las formulaciones de los nanohíbridos trabajados. Así mismo ocurre en el análisis cuantitativo, existiendo una relación inversamente proporcional en donde a mayor concentración del entrecruzante o a mayor cantidad de miligramos del hidrogel con nanopartículas de plata utilizado, se observa un menor valor de las unidades formadoras de

colonias (UFC). Lo anterior implica un efecto aumentado que está asociado al tamaño de las nanopartículas sintetizadas donde con un menor diámetro estas presentan una mayor actividad antibacteriana como se ve representado en ambos estudios de susceptibilidad realizados. Lo cual presenta analogía con ensayos que mencionan que los agentes antimicrobianos inorgánicos como los metales u óxidos de metal tienen una relación directa con su tamaño y superficie de volumen pues son características determinantes para la interacción con las membranas celulares de los microorganismos y mientras más pequeñas sean, la actividad antibacteriana inherente y su efecto se verán aumentada(53, 77).

Como se mencionó la actividad antibacteriana de los nanohíbridos formados, se debe a la síntesis de las nanopartículas de plata en la matriz de los hidrogeles las cuales presentan efectos antibacterianos conocidos, siendo principalmente la destrucción por contacto el mecanismo bactericida predominante, logrando ser corroborado por estudios que asocian su actividad frente a cepas de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*(78). Aun así, otros mecanismos están implicados en su efectividad, tales como la unión a la superficie bacteriana perturbando sus funciones adecuadas como la permeabilidad y la respiración, la penetración al interior de los microorganismos afectando sus estructuras internas además de la liberación de iones de plata con acción bactericida(79).

Realizando un enfoque en *Staphylococcus aureus*, los nanohíbridos con nanopartículas de plata generadas en este ensayo presentan buenos efectos antimicrobianos similares a estudios anteriores, en los cuales sus propiedades bactericidas se basan en el anclaje y penetración al microorganismo(80, 81). Inclusive se ha notificado que estas nanopartículas presentan efecto en cepas resistentes a meticilina (MRSA), pudiendo observar que estos “nanometalo-antibióticos” pueden superar mecanismos de resistencia implicados en cepas bacterianas(82, 83).

9. CONCLUSIONES

Es factible la síntesis del hidrogel basado en polivinilalcohol (PVA) utilizando como agente entrecruzante ácido maleico (AML) al cumplir con las características y propiedades asociadas a estos sistemas.

El tamaño de los poros formados en la matriz de los hidrogeles es dependiente de las concentraciones de ácido maleico (AML) utilizados, presentando un diámetro mayor cuando se ocupa un menor porcentaje del entrecruzante.

La matriz porosa de los hidrogeles PVA-AML es un soporte viable para la síntesis de nanopartículas de plata bajo el protocolo establecido.

El diámetro de las nanopartículas de plata sintetizadas es dependiente de la reticulación de la matriz de los hidrogeles y sus poros, siendo estas de menor tamaño en soportes con mayor concentración de ácido maleico (AML) como entrecruzante.

Los nanohíbridos formados presentan actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 dependiente del tamaño de las nanopartículas de plata, permitiendo determinar que mientras menor diámetro presenten estas, el efecto antimicrobiano tiende a aumentar.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wang L, Hu C, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:1227-49.
2. Baquero F, Lanza VF, Cantón R, Coque TM. Public health evolutionary biology of antimicrobial resistance: priorities for intervention. *Evol Appl*. 2015;8(3):223-39.
3. Wertheim H, Melles D, Vos M, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh H, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(12):751-62.
4. Brooks G, Carroll K, Morse S, Mietzner T, Butel J. *Microbiología médica*. 2 ed 2013. 832 p.
5. Balasubramanian D, Harper L, Shopsin B, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments. *Pathog Dis*. 2017;75(1).
6. Tong S, Davis J, Eichenberger E, Holland T, Fowler V. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(3):603-61.
7. Murray P, Rosenthal K, Kobayashi G. *Microbiología médica*. Cuarta edición ed. Madrid 2002. 810 p.
8. Kobayashi S, DeLeo F. *Staphylococcus aureus* protein A promotes immune suppression. *MBio*. 2013;4(5):e00764-13.
9. Paharik A, Horswill AR. The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. *Microbiol Spectr*. 2016;4(2).
10. Oliveira D, Borges A, Simões M. Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. *Toxins (Basel)*. 2018;10(6).

11. Bukowski M, Wladyka B, Dubin G. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins (Basel)*. 2010;2(5):1148-65.
12. Foster T. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(12):948-58.
13. Ray G, Suaya J, Baxter R. Incidence, microbiology, and patient characteristics of skin and soft-tissue infections in a U.S. population: a retrospective population-based study. *BMC Infect Dis*. 2013;13:252.
14. Stevens D, Bisno AL, Chambers HF, Dellinger EP, Goldstein EJ, Gorbach SL, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft tissue infections: 2014 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2014;59(2):e10-52.
15. Zhou K, Li C, Chen D, Pan Y, Tao Y, Qu W, et al. A review on nanosystems as an effective approach against infections of. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:7333-47.
16. Lam P, Lee K, Wong R, Cheng G, Bian Z, Chui C, et al. Recent advances on topical antimicrobials for skin and soft tissue infections and their safety concerns. *Crit Rev Microbiol*. 2018;44(1):40-78.
17. Xinming L, Tsibouklis J, Weng T, Zhang B, Yin G, Feng G, et al. Nano carriers for drug transport across the blood-brain barrier. *Journal of Drug Targeting*. 2017;25(1):17-28.
18. Peppas N, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm*. 2000;50(1):27-46.
19. Hunt J, Chen R, Veen T, Bryan N. Hydrogels for tissue engineering and regenerative medicine. 2014.
20. Chirani N, Yahia LH, Gritsch L, Motta F, Chirani S, Faré S. History and applications of hydrogels. *Journal of Biomedical Sciences*. 2015;4.
21. Jianyu L, Mooney D. Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nat Rev Mater*. 2016;1(12).

22. Zhao X, Wu H, Guo B, Dong R, Qiu Y, Ma P. Antibacterial anti-oxidant electroactive injectable hydrogel as self-healing wound dressing with hemostasis and adhesiveness for cutaneous wound healing. *Biomaterials*. 2017;122:34-47.
23. Caló E, Khutoryanskiy V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*. 2015;65:252-67.
24. Hoque J, Bhattacharjee B, Prakash RG, Paramanandham K, Haldar J. Dual Function Injectable Hydrogel for Controlled Release of Antibiotic and Local Antibacterial Therapy. *Biomacromolecules*. 2018;19(2):267-78.
25. Vishnubhaktula S, Elupula R, Durán-Lara E. Recent Advances in Hydrogel-Based Drug Delivery for Melanoma Cancer Therapy: A Mini Review. *Journal of Drug Delivery*. 2017;2017:7275985.
26. Arredondo A, Londoño M. Hidrogeles: potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos. *Revista ingeniería biomédica*. 2009;3(5) 83-94.
27. Valdés O, Ávila F, Marican A, Fuentealba N, Villaseñor J, Arenas M, et al. Methamidophos removal from aqueous solutions using a super adsorbent based on crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogel - Valdés - 2018 - *Journal of Applied Polymer Science - Wiley Online Library*. *Journal of Applied Polymer Science*. 2018;135 (12).
28. Kamoun E, Kenawy E-RS, Chen X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *Journal of Advanced Research*. 2017;8(3):217-33.
29. Lakes A, Peyyala R, Ebersole J, Puleo D, Hilt J, Dziubla T. Synthesis and characterization of an antibacterial hydrogel containing covalently bound vancomycin. *Biomacromolecules*. 2014;15(8):3009-18.
30. Janovák L, Dékány I. Optical properties and electric conductivity of gold nanoparticle-containing, hydrogel-based thin layer composite films obtained by photopolymerization. *Applied Surface Science*. 2010;256(9):2809-17.

31. Parra A, Toro M, Jacob R, Navarrete P, Troncoso M, Figueroa G, et al. Antimicrobial effect of copper surfaces on bacteria isolated from poultry meat. *Braz J Microbiol.* 2018;49 Suppl 1:113-8.
32. Norambuena G, Patel R, Karau M, Wyles C, Jannetto P, Bennet K, et al. Antibacterial and Biocompatible Titanium-Copper Oxide Coating May Be a Potential Strategy to Reduce Periprosthetic Infection: An In Vitro Study. *Clin Orthop Relat Res.* 2017;475(3):722-32.
33. Joost U, Juganson K, Visnapuu M, Mortimer M, Kahru A, Nõmmiste E, et al. Photocatalytic antibacterial activity of nano-TiO₂ (anatase)-based thin films: effects on *Escherichia coli* cells and fatty acids. *J Photochem Photobiol B.* 2015;142:178-85.
34. Regiel-Futyra A, Kus-Liśkiewicz M, Sebastian V, Irusta S, Arruebo M, Stochel G, et al. Development of noncytotoxic chitosan-gold nanocomposites as efficient antibacterial materials. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7(2):1087-99.
35. Mody V, Nounou M, Bikram M. Novel nanomedicine-based MRI contrast agents for gynecological malignancies. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2009;61(10):795-807.
36. B. L. Propiedades químicas de la Plata, Efectos de la Plata sobre la salud y Efectos de la Plata *Lenntech2019* [Available from: <https://www.lenntech.es/periodica/elementos/ag.htm>].
37. Sanz S. Comparative study on the effectiveness of a dressing of nanocrystalline silver opposite to the use of silver sulfadiazine in burned patients treatment. *Cirugía plástica Ibero-Latnoamericana.* 2011;37.
38. Zheng K, Setyawati M, Leong D, Xie J. Antimicrobial silver nanomaterials. *Coordination Chemistry Reviews.* 2018;357:1-17.
39. Palza H. Antimicrobial polymers with metal nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 2015;16(1):2099-116.
40. Gurav A, Kodas TT, Wang L-M, Kauppinen EI, Joutsensaari J. Generation of nanometer-size fullerene particles via vapor condensation. *Chemical Physics Letters.* 1994;218(4):304-8.

41. Tien D, Liao C. Novel technique for preparing a nano-silver water suspension by the arc-discharge method. *RevAdvMaterSci*. 2008;18:750 - 6.
42. Vimbela V, Ngo M, Frazee C, Yang L, Stout DA. Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:3941-65.
43. Zhang Q, Li N, Goebel J, Lu Z, Yin Y. A systematic study of the synthesis of silver nanoplates: is citrate a "magic" reagent? *J Am Chem Soc*. 2011;133(46):18931-9.
44. Thoniyot P, Tan MJ, Karim AA, Young DJ, Loh XJ. Nanoparticle-Hydrogel Composites: Concept, Design, and Applications of These Promising, Multi-Functional Materials. *Adv Sci (Weinh)*. 2015;2(1-2):1400010.
45. Pardo V, Gabai R, Shipway, A. Gold Nanoparticle/Hydrogel Composites with Solvent-Switchable Electronic Properties. *Advanced Materials*. 2001;13(17):1320-3.
46. Guo Y, Hu J, Liang H, Wan L. Highly Dispersed Metal Nanoparticles in Porous Anodic Alumina Films Prepared by a Breathing Process of Polyacrylamide Hydrogel. *Chemistry of Materials*. 2003;15(22):4332-6.
47. Wang C, Flynn N, Langer R. Controlled Structure and Properties of Thermoresponsive Nanoparticle-Hydrogel Composites. *Advanced materials*. 2004;16(13):1074-9.
48. Castaneda L, Valle J, Yang N, Pluskat S, Slowinska K. Collagen cross-linking with Au nanoparticles. *Biomacromolecules*. 2008;9(12):3383-8.
49. Wu H, Yu G, Pan L, Liu N, McDowell MT, Bao Z, et al. Stable Li-ion battery anodes by in-situ polymerization of conducting hydrogel to conformally coat silicon nanoparticles. *Nat Commun*. 2013;4:1943.
50. Muthukrishnan S, Bhakya S, Senthil Kumar T, Rao MV. Biosynthesis, characterization and antibacterial effect of plant-mediated silver nanoparticles using *Ceropegia thwaitesii* – An endemic species. *Industrial Crops and Products*. 2015;63:119-24.

51. Mirzajani F, Ghassempour A, Aliahmadi A, Esmaeili MA. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Research in Microbiology*. 2011;162(5):542-9.
52. Zhang X, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*. 2016;17(9).
53. Agnihotri S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *Royal society of chemistry*. 2014;4:3974-83.
54. Sadeghi B, Garmaroudi FS, Hashemi M, Nezhad H, Nasrollahi A, Ardalan S, et al. Comparison of the anti-bacterial activity on the nanosilver shapes: Nanoparticles, nanorods and nanoplates. *Advanced Powder Technology*. 2012;23(1):22-6.
55. Suresh A, Pelletier DA, Wang W, Morrell-Falvey JL, Gu B, Doktycz MJ. Cytotoxicity induced by engineered silver nanocrystallites is dependent on surface coatings and cell types. *Langmuir*. 2012;28(5):2727-35.
56. Hwan S, Lee H-S, Ryu D-S, Choi S-J, Lee D-S. Antibacterial Activity of Silver-Nanoparticles Against *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia Coli*. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010;39(1).
57. Siddiqi K, Husen A, Rao R. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *Journal of Nanobiotechnology*. 2018;16:28.
58. Bovenkamp G, Zanzen U, Krishna K, Hormes J, Prange A. X-ray absorption near-edge structure (XANES) spectroscopy study of the interaction of silver ions with *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(20):6385-90.
59. Pelgrift R, Friedman A. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(13-14):1803-15.

60. Musa O. Handbook of Maleic Anhydride Based Materials. Springer International Publishing. 2016:83 - 585.
61. Lozinsky V, Plieva F. Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments. Enzyme and Microbial Technology. 1998;23(3):227-42.
62. Hoffman A. Hydrogels for biomedical applications. Advanced Drug Delivery Reviews. 2012;64:18-23.
63. Wahid F, Zhong C, Wang HS, Hu XH, Chu LQ. Recent Advances in Antimicrobial Hydrogels Containing Metal Ions and Metals/Metal Oxide Nanoparticles. Polymers (Basel). 2017;9(12).
64. Marican A, Ávila F, Valdés O. Rational Design, Synthesis and Evaluation of γ -CD-Containing Cross-Linked Polyvinyl Alcohol Hydrogel as a Prednisone Delivery Platform. *Pharmaceutics* 2018;10(1).
65. Bittrich E, Kuntzsch M, Eichhorn K, Uhlmann P. Complex pH- and temperature-sensitive swelling behavior of mixed polymer brushes. Journal of polymer science. 2010;48(14):1606-15.
66. Kuwabata S, Nakamura J, Yoneyama H. The Effect of Basicity of Dopant Anions on the Conductivity of Polypyrrole Films. Revista de la sociedad química, comunicaciones químicas. 1988;12:779-80.
67. Avila F, Rodriguez Nuñez YA, Marican A, Castro RI, Villaseñor J, Santos LS, et al. Rational Development of a Novel Hydrogel as a pH-Sensitive Controlled Release System for Nifedipine. Polymers (Basel). 2018;10(7).
68. Nesrinne S, Djamel A. Synthesis, characterization and rheological behavior of pH sensitive poly(acrylamide-co-acrylic acid) hydrogels. Arabian Journal of Chemistry. 2017;10(4):539-47.
69. Li J, Wang N, Wu X. Poly(vinyl alcohol) nanoparticles prepared by freezing–thawing process for protein/peptide drug delivery. Journal of Controlled Release. 1998;56(1):117-26.

70. Echeverri C, Vallejo C, Londoño M. Synthesis and characterization of polyvinyl alcohol hydrogels by freezing/thawing technique for medical applications. *Revista EIAEscIngAntioq.* 2009;12:1794-237.
71. Miller L, Dumas P. From structure to cellular mechanism with infrared microspectroscopy. *Current Opinion in Structural Biology.* 2010;20(5):649-56.
72. Lafont J, Páez M. Chemical analysis of mixtures of biodiesel from used cooking oil and diesel by infrared spectroscopy. *Información tecnológica* 2011;22:35 - 42.
73. Urbina C, Ramírez M, Bolívar G. Comparative morphological analysis of copolymers hydrogels by scanning electron microscopy. *Acta Microscópica.* 2016;25(2):111-20.
74. Matsuyama H, Teramoto M, Urano H. Analysis of solute diffusion in poly(vinyl alcohol) hydrogel membrane. *Journal of Membrane Science.* 1997;126(1):151-60.
75. Gogoi N, Chowdhury D. In-situ and ex-situ chitosan-silver nanoparticle composite: comparison of storage/release and catalytic properties. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology.* 2014;14:4147–55.
76. Murali Y, Vimala K, Thomas V, Varaprasad K, Sreedhar B, Bajpai SK, et al. Controlling of silver nanoparticles structure by hydrogel networks. *J Colloid Interface Sci.* 2010;342(1):73-82.
77. Betancur C, Hernández V, Sierra R. Nanoparticles for antibacterial materials and titanium dioxide applications. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas.* 2016;35:1561-3011.
78. Agnihotri S, Mukherji S. Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficacy: elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver. *Nanoscale.* 2013;5(16):7328-40.
79. Morones J, Elechiguerra J, Camacho A. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 2005;16:2346–53.
80. Shrivastava S, Bera T, Roy A, Singh G. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 2007;18(22).

81. Choi O, Deng KK, Kim NJ, Ross L, Surampalli RY, Hu Z. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Res.* 2008;42(12):3066-74.
82. Nanda A, Saravanan M. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* 2009;5(4):452-6.
83. Ayala N, Lara H, Ixtapan L, Rodríguez C. Silver Nanoparticles Toxicity and Bactericidal Effect Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Nanoscale Does Matter. *Nanobiotechnology.* 2009;5(2):1551-294.