



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA



Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño

SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA PARA UN ESTUDIO IN VITRO: EFECTO EN HEMÓLISIS DE ERITROCITOS HUMANOS DE DONANTES SANOS.

TESIS

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de:

Licenciado en Ingeniería en Nanotecnología

Presenta:

LUIS ANTONIO AYALA HERNANDEZ

Director:

DR. ULISES JESÚS TAMAYO PÉREZ
Facultad de Arquitectura, Ingeniería y Diseño

Codirector:

DR. ROBERTO LUNA VÁZQUEZ GÓMEZ
Ciencias de la Salud

Ensenada, Baja California, México, diciembre 2025



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO



“Síntesis de nanopartículas de plata para un estudio in vitro: efecto en hemolisis de eritrocitos humanos de donantes sanos”

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Licenciado en Ingeniería en Nanotecnología

PRESENTA

Luis Antonio Ayala Hernandez
352065

A quien el Comité de Tesis autoriza el trabajo terminal, después de haber efectuado una revisión minuciosa del mismo y de acuerdo con el Art. 19 del R.G.E.P.E.P, las y los señores profesores emiten los siguientes votos aprobatorios mediante rubrica:

Dr. Ulises Jesús Tamayo
Pérez
DIRECTOR

Dr. Roberto Luna Vázquez
Gómez
CODIRECTOR

Dr. Francisco Casillas
Figueroa
SINODAL

Dr. Belam Ruiz Ruiz
SINODAL

Dr. Enrique Efrén García
Guerrero
SINODAL

“Por la Realización Plena del Ser”

C.c.p.- Archivo

C.c.p.- Minutario

Resumen

En este trabajo de tesis se evaluó la interacción entre nanopartículas de plata (NPsAg), sintetizadas mediante reducción química, y eritrocitos humanos de un donador sano, con el objetivo de determinar su hemocompatibilidad y su potencial uso biomédico. Para ello, se empleó un ensayo de hemólisis a diferentes diluciones a partir de la concentración de síntesis de NPsAg (1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000), por triplicado, utilizando Tritón X-100 como control positivo y PBS (solución salina tamponada con fosfato) como control negativo. Además, se evaluó la actividad antibacteriana mediante un ensayo en caldo de cultivo con la bacteria *Staphylococcus aureus* y pruebas de antibiogramas.

La espectroscopía UV-Vis y AFM confirmaron la formación de las NPsAg, especialmente abundantes en las diluciones de 1:10 y 1:100 de una concentración original de 1445 µg/mL, debido a su estabilidad coloidal. Se analizaron dos muestras de NPsAg, la muestra 1 (NPsAg 1) presentó nanopartículas esféricas bien distribuidas de aproximadamente de 70-150 nm, con mejor dispersión; mientras que la muestra 2 (NPsAg 2) mostró mayor aglomeración y partículas más grandes, de aproximadamente 200 nm.

En los ensayos de hemólisis, ambas nanopartículas presentaron baja citotoxicidad, siendo NPsAg 1 la más compatible con los eritrocitos.

En la evaluación de cultivo bacteriano las nanopartículas de plata no inhibieron la formación de colonias bacterianas, lo que sugiere una aglomeración de las nanopartículas de plata en el medio de cultivo o el aumento del tamaño de la NPsAg.

Palabras Clave: nanopartículas de plata, hemólisis, hemocompatibilidad, antibiograma, actividad antibacteriana, *Staphylococcus aureus*.

Abstract

This thesis evaluated the interaction between silver nanoparticles (AgNPs), synthesized by chemical reduction, and human erythrocytes from a healthy donor, with the aim of determining their hemocompatibility and potential biomedical applications. A hemolysis assay was performed in triplicate at different dilutions of the AgNP synthesis concentration (1:1, 1:10, 1:100, and 1:1000), using Triton X-100 as a positive control and PBS (phosphate-buffered saline) as a negative control. Additionally, antibacterial activity was assessed using a broth culture assay with *Staphylococcus aureus* and antibiogram tests.

UV-Vis and AFM spectroscopy confirmed the formation of AgNPs, which were especially abundant in 1:10 and 1:100 dilutions of an original concentration of 1445 $\mu\text{g/mL}$, due to their colloidal stability. Two AgNPs samples were analyzed. Sample 1 (AgNP 1) exhibited well-distributed spherical nanoparticles approximately 70–150 nm in size, with better dispersion; while Sample 2 (AgNP 2) showed greater agglomeration and larger particles, approximately 200 nm in size.

In hemolysis assays, both nanoparticles showed low cytotoxicity, with AgNP 1 being the most compatible with erythrocytes.

In the bacterial culture evaluation, the silver nanoparticles did not inhibit the formation of bacterial colonies, suggesting an agglomeration of the silver nanoparticles in the culture medium or an increase in the size of the NPsAg.

Keywords: *silver nanoparticles, hemolysis, hemocompatibility, antibiogram, antibacterial activity, Staphylococcus aureus.*

Agradecimientos

Agradezco a mi familia y amigos quienes han sido parte de mi camino, mi madre Virginia Hernandez que sin ella y sus palabras no lo hubiera logrado, a mis hermanos; Israel, Mireya, Martin, Miguel y Edith que han sido un vínculo importante en mi crecimiento, gracias por cada consejo, a mi padre Lázaro Ayala que sigue estando presente.

A los miembros de mi comité de tesis; los Doctores Ulises Tamayo Pérez y Roberto Luna Vázquez Gómez, quienes tuvieron paciencia y tolerancia conmigo e hicieron posible este trabajo, al Doctor Francisco Casillas Figueroa por su apoyo en realizar este trabajo.

A la Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño de la UABC que fue mi casa durante todos estos años, a la Escuela de Ciencias de la Salud de la UABC, ya que hicieron posible este trabajo facilitando las instalaciones y el uso de equipo.

Gracias por guiarme en mi formación profesional y académica.

Tabla de contenido

Resumen	1
Abstract.....	3
Agradecimientos.....	4
Capítulo 1. Introducción.....	8
1.1 Nanopartículas de plata	8
1.2 Mecanismos de acción antibacteriana.....	10
1.3 La hemólisis.....	11
Capítulo 2. Justificación	14
Capítulo 3. Marco teórico.....	15
3.1 Hemocompatibilidad de las nanopartículas.....	15
3.2 Limitaciones y cambios biológicos.	154
3.3 Efecto del tamaño de las NPsAg en su interacción con las células. ¡Error! Marcador no definido.	
3.4 Principios básicos del ensayo de hemólisis y del antibiograma	17
3.4.1 Ensayo de Hemólisis.	17
3.4.2 El antibiograma: técnica de estudio de sensibilidad de un cultivo bacteriano	18
3.5 Principios teóricos de las técnicas de caracterización utilizadas.....	19
3.5.1 Espectroscopia UV-Visible (UV-vis).....	19
3.5.2 Microscopia de Fuerza Atómica (AFM).....	21
Capítulo 4. Antecedentes	232
Capítulo 5. Hipótesis y objetivos.....	265
5.1 Hipótesis	265
5.2 Objetivos.....	265
5.2.1 Objetivo general	265
5.2.2 Objetivos específicos.....	265
Capítulo 6. Metodología.....	276
6.1 Síntesis de Nanopartículas de Plata	276
6.1.1 Diseño Experimental para la síntesis de NPsAg.	276

6.1.2 Materiales y reactivos.....	287
6.1.3 Equipo.....	287
6.1.4 Síntesis de NPsAg usando el método de reducción química.....	298
6.2 Caracterización de las NPsAg	310
6.2.1 Espectroscopía UV-Visible.....	310
6.2.2 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).....	321
6.3 Pruebas Citotóxicas	343
6.3.1 Ensayo de hemólisis	343
6.3.2 Antibiograma con cultivo de bacteria de Staphylococcus aureus.....	376
Capítulo 7. Resultados y discusiones	39
7.1 Síntesis de NPsAg utilizando el método de reducción química.	39
7.2 Caracterización de las NPsAg mediante espectroscopía UV-Vis	410
7.3 Caracterización de las NPsAg mediante microscopía de fuerza atómica (AFM)	421
7.4 Evaluación de citotoxicidad.....	443
7.4.1 Ensayo de hemólisis: Cuantificación por espectroscopía UV-Vis y cálculo del porcentaje de hemólisis	443
7.4.2 Evaluación de la actividad antibacteriana mediante antibiogramas.	487
Capítulo 8. Conclusiones y trabajo futuro	49
Referencias	543

Lista de figuras

Figura 1. Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas de plata.....	8
Figura 2. Mecanismo básico de hemólisis.....	17
Figura 3. Antibiograma por método de difusión en discos en el que se observa la presencia de halos de inhibición	19
Figura 4. Espectro Electromagnético	20
Figura 5. Principio de funcionamiento de un espectrómetro UV-vis.	20
Figura 6. Esquema de detección por microscopia de fuerza atómica y micrografía del cantiléver.....	22
Figura 7. Metodología general del diseño experimental; síntesis de NPsAg, caracterización de las NPsAg, Ensayo de hemocompatibilidad y evaluación antimicrobiana Staphylococcus aureus.....	28
Figura 8. Diagrama del proceso de síntesis de NPsAg 1 y 2 propuesto.....	29

Figura 9. Espectrofotómetro.....	321
Figura 10. Microscopio AFM.....	332
Figura 11. Proceso de prueba de Hemólisis en paciente sano. Imagen creada por autor. .	365
Figura 12. Procedimiento de cultivo bacteriano Staphylococcus aureus en caldo de cultivo contra NPsAg.....	38
Figura 13. Color característico de NPsAg 1 (izquierda) y NPsAg 2 (derecha).....	40
Figura 14. Espectro de absorbancia de las NPsAg 1 y 2.	42
Figura 15. Imagen topográfica obtenida mediante AFM de las NPsAg (muestra 1).	432
Figura 16. Imagen topográfica obtenida mediante AFM de las NPsAg (Muestra 2).	443
Figura 17. Porcentaje de hemólisis inducido por NPsAg 1 a distintas concentraciones. .	454
Figura 18. Porcentaje de hemólisis inducido por NPsAg2 a distintas concentraciones....	476
Figura 19. Respuesta Antimicrobiana de las NPsAg 1 y 2.....	49
Figura 20. Ausencia de actividad antimicrobiana.....	49

Lista de tablas

Tabla I. Porcentaje de hemólisis inducida por NPsAg1 a diferentes concentraciones.	45
Tabla II. Porcentaje de hemólisis inducida por NPsAg2 a diferentes concentraciones	465

Capítulo 1. Introducción

1.1 Nanopartículas de plata

En la medicina actual, las nanopartículas de plata (NPsAg) desempeñan un papel relevante en una amplia gama de aplicaciones biomédicas (Figura 1), gracias a sus propiedades, efectos y biocompatibilidad. Se utilizan en el tratamiento y detección de enfermedades, terapias y transporte de fármacos (1, 2, 3, 4). Desde el punto de vista médico, para que un nanomaterial sea empleado en el organismo, debe cumplir con ciertos requisitos de biocompatibilidad, como baja o nula toxicidad, pH ajustable y características de inocuidad en los sistemas biológicos (5, 6, 7, 8).

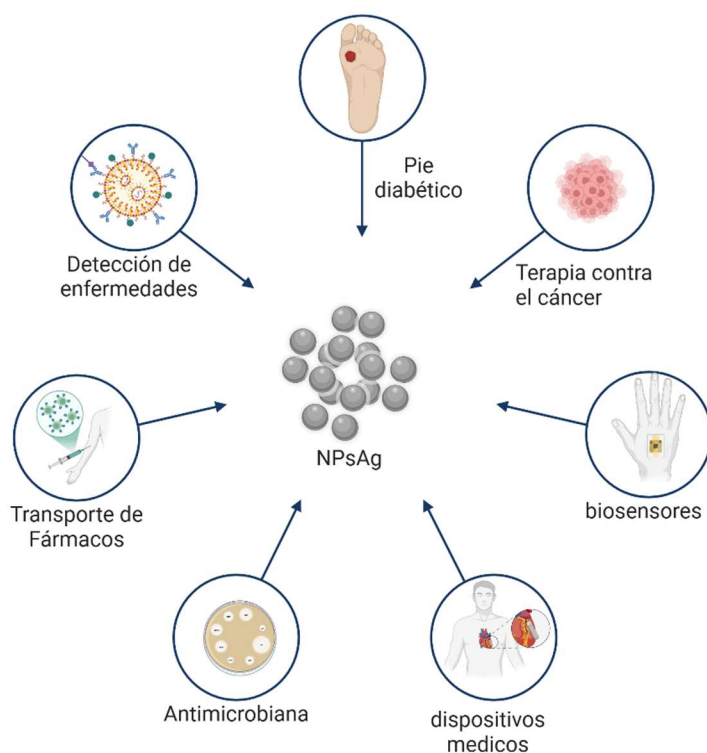


Figura 1. Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas de plata.

Las NPsAg pueden ser sintetizadas con características de: tamaño, morfología, relación superficie/volumen y otras propiedades, de acuerdo con el proceso de síntesis y otros parámetros óptimos para su crecimiento (9, 10, 11, 12), de tal forma que sean capaces de interactuar con los sistemas biológicos, mostrar buena biocompatibilidad, generar el efecto deseado y reducir el impacto tóxico, y que no presenten efectos adversos y complicaciones para la salud humana. Estudios revelan que las nanopartículas con tamaños entre 1 y 100 nm tienen una alta relación superficie/volumen y son más eficaces que otros agentes antimicrobianos debido a la liberación de iones de plata, mientras que aquellas de tamaños entre 100 y 500 nm, aunque presentan una menor relación superficie-volumen, son más adecuadas para la administración de fármacos (13, 14).

Las nanopartículas de plata han contribuido a resolver problemas relacionados con la salud humana, ya que, en concentraciones adecuadas, resultan efectivas. Se ha demostrado que a concentraciones igual o menores a 400 $\mu\text{g/mL}$, las nanopartículas no muestran un efecto hemolítico en eritrocitos sanos o diabéticos (15), y tienden a presentar buena estabilidad en sus interacciones con los sistemas biológicos, además de una baja toxicidad debido a su formulación, manteniendo la estabilidad de la nanopartícula con el agente de recubrimiento que se emplea (15, 16, 17). Esto se traduce en resultados notables sin provocar efectos citotóxicos ni genotóxicos, evitando daños o alteraciones celulares (18, 19, 20, 21).

Existen diferentes métodos de síntesis para obtener NPsAg, como los procesos químicos, fotoquímicos y electroquímicos, así como la síntesis verde, el método sol-gel, el método solvotermal, el método del poliol y el método por reducción química (21, 23, 24). Para que la síntesis de las nanopartículas sea exitosa, es decir que tengan el tamaño deseado, debe haber un control adecuado de variables como la temperatura, el tiempo de reacción y las

concentraciones de los reactivos, puesto que estas condiciones se reflejarán en las propiedades fisicoquímicas que a su vez influyen directamente en sus bioefectos.

El método de reducción química permite la reducción de iones de plata utilizando citrato trisódico, que actúa como agente reductor y agente de recubrimiento (25), permitiendo la síntesis de NPsAg a temperaturas superiores a 60 °C (26).

Estudios han demostrado que, mediante este método, es posible obtener nanopartículas con potencial uso terapéutico en protocolos biológicos y químicos (27, 28); asimismo, se han realizado evaluaciones antimicrobianas en bacterias como *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas spp.* y *E. coli*, evidenciando su capacidad de inhibir la formación de colonias (29), así como evaluaciones hematológicas que demuestran que activan los mecanismos celulares de defensa en el sistema inmune (30).

1.2 Mecanismos de acción antibacteriana

La actividad antibacteriana de las NPsAg se relaciona con diferentes mecanismos. Estudios han revelado que estas nanopartículas pueden interactuar con biomoléculas bacterianas, penetrar las células, generar especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres (31). Se han identificado al menos tres mecanismos de acción antimicrobiana: (1) la unión con la pared o la membrana celular de la bacteria, (2) la penetración de las NPsAg en las células bacterianas, lo que causa alteraciones en funciones proteicas y daño intracelular, y (3) la inducción de toxicidad mediante la generación de ROS, lo que desencadena estrés oxidativo e interrumpe las vías de transducción de señales celulares (31, 32).

La exposición de bacterias a las nanopartículas de plata favorece la adhesión de la nanopartícula de plata a la pared celular bacteriana, debido a la atracción electrostática entre la carga positiva de los iones de plata generados por la oxidación de las mismas y la membrana bacteriana, la cual posee carga negativa. Esta interacción provoca cambios morfológicos, incluyendo la contracción tanto del citoplasma como de la membrana, lo que finalmente conduce a su ruptura (32).

Las NPsAg, además de unirse a la superficie de la membrana, también pueden ingresar a las células y afectar su funcionamiento al desnaturalizar los ribosomas e inhibir la síntesis de proteínas. Mediante la liberación de iones Ag^+ , interactúan con los grupos funcionales de las proteínas, lo que provoca su desactivación. Asimismo, pueden interrumpir la producción de trifosfato de adenosina (ATP) al desactivar unas enzimas de la cadena respiratoria llamadas complejos (IV, I II); citocromo c oxidasa, NADH deshidrogenasa o succinato deshidrogenasa que están localizada en la membrana citoplasmática bacteriana (33).

La capacidad que tiene las NPsAg de producir especies reactivas de oxígeno (ROS) llevan al aumento del estrés oxidativo dentro de la célula, causado por los iones Ag^+ . Estos interactúan con las proteínas de la cadena respiratoria, interrumpiendo la reducción intracelular de O_2 e induciendo la producción de ROS, lo que provoca daño lipídico, fuga de biomoléculas celulares y, finalmente, apoptosis celular (34, 35).

1.3 La Hemólisis.

Una de las pruebas necesarias para evaluar las NPsAg antes de su aplicación en el sector salud es la de su efecto hemolítico, la cual consiste en analizar el impacto del nanomaterial sobre los eritrocitos humanos. El Comité Científico para la Seguridad del Consumidor

(SCCS) ha establecido criterios a considerar en el uso de nanomateriales, especialmente si tienen potencial de absorción; en estos casos, deben realizarse pruebas de hemólisis in vitro (36), y de acuerdo con la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM), para evaluar la biocompatibilidad de materiales que estén en contacto con la sangre en aplicaciones médicas; la prueba estándar para el análisis de las propiedades hemolíticas de las nanopartículas establece que un porcentaje de hemólisis menor al 5 % que se considera baja hemólisis o hemólisis clínicamente no significativa, mientras que un valor superior al 10 % se considera hemólisis marcada o clínicamente significativa (37). La hemólisis consiste en la ruptura y/o alteración de la membrana de los glóbulos rojos (eritrocitos), lo que provoca la liberación de hemoglobina y otros componentes intracelulares al plasma (16, 17, 38, 39).

Al ser la hemólisis un parámetro fundamental en las pruebas de hemocompatibilidad, debido a sus efectos adversos sobre la hemostasia y a que es un proceso rápido, este fenómeno puede ser inducido por factores físicos, químicos o biológicos. El contacto entre una nanopartícula y un glóbulo rojo ocurre en el plasma, donde puede afectar esta interacción con todos sus componentes. La interacción de los glóbulos rojos con las NPsAg puede producirse por la unión directa de la nanopartícula de plata a la membrana celular y generar un cambio estructural, en la mayoría de los casos alterando la integridad de la membrana y provocando una discontinuidad en la misma llevando a la hemólisis (40, 41). La razón por la cual se produce la hemólisis puede deberse a interacciones de las nanopartículas con la membrana del eritrocito y su internalización facilitada por un tamaño pequeño (42).

La química superficial de las NPsAg tiene una fuerte influencia en su hemocompatibilidad. Actualmente, existen evaluaciones para aplicaciones médicas y terapéuticas que consideran

tanto interacciones internas como externas en el cuerpo humano, como en la cicatrización de heridas o el tratamiento de enfermedades de la piel (43–50). Sin embargo, la bioseguridad y eficacia de las NPsAg continúan siendo ampliamente debatidos, haciéndose necesario su constante evaluación.

El presente trabajo evalúa la interacción entre NPsAg sintetizadas mediante el método de reducción química, con un tamaño promedio de 120–200 nm, sin recubrimiento, con eritrocitos humanos de un donador sano. Se analiza la hemocompatibilidad a diferentes diluciones por triplicado (1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000), utilizando Tritón X-100 como control positivo y PBS (solución salina tamponada con fosfato) como control negativo, asegurando un ambiente isotónico para las células.

Además, se evalúa la actividad antibacteriana mediante un ensayo en caldo de cultivo con la bacteria *Staphylococcus aureus*, complementando así el análisis de biocompatibilidad y seguridad con fines médicos, como el transporte de fármacos o aplicaciones terapéuticas.

Capítulo 2. Justificación

La justificación de este estudio radica en el potencial de las NPsAg sintetizadas por el método de reducción química para ser utilizadas en el transporte de fármacos o como recubrimiento de equipos médicos que interactúan con el sistema sanguíneo. Su biocompatibilidad permitiría su incorporación al sistema circulatorio sin representar un riesgo para la salud humana. Aunque existe una gran cantidad de estudios sobre las NPsAg, la hemocompatibilidad de nanopartículas con tamaños superiores a 100 nm no ha sido abordada en profundidad. El ensayo de hemólisis resulta crucial para evaluar si un material es hemocompatible o no, ya que permite determinar su interacción con los eritrocitos.

De acuerdo con el Instituto Valenciano de Microbiología (IVAMI), para determinar la hemocompatibilidad de materiales que entran en contacto con la sangre humana, deben realizarse diversas pruebas, como la activación del sistema del complemento, trombogenicidad, pirogenicidad, detección de endotoxinas y hemólisis. Esta última permite evaluar si las NPsAg son biocompatibles. El presente estudio busca aportar evidencia que contribuya a ampliar el conocimiento sobre la hemocompatibilidad de las NPsAg, brindando un valor agregado a las investigaciones en el ámbito de la biomedicina. La investigación en este campo es crucial ante la necesidad de nuevas soluciones para el tratamiento de enfermedades, como el transporte de medicamentos a través del torrente sanguíneo, la atención de heridas crónicas o diversas patologías. Estos avances no solo contribuyen a mejorar la salud humana, sino que también amplían el conocimiento sobre las propiedades y aplicaciones de las NPsAg.

Capítulo 3. Marco teórico

El uso de nanopartículas de plata en la nanomedicina se ha enfocado principalmente en su función como agentes antimicrobianos y en la administración de fármacos, mientras que su aplicación en otras áreas sigue siendo menos frecuente. Con el objetivo de mejorar el potencial de este material para aplicaciones clínicas y terapéuticas, es necesario analizar los efectos que produce al interactuar con diversos mecanismos biológicos. La comprensión de las interacciones entre las células y las nanopartículas es fundamental para desarrollar sistemas de administración eficaces que generen el efecto deseado. En este contexto, la evaluación de la hemocompatibilidad adquiere especial relevancia, particularmente cuando las nanopartículas interactúan con eritrocitos, ya que pueden inducir hemólisis. Por ello, se busca obtener NPsAg con propiedades fisicoquímicas ideales que favorezcan una mejor interacción entre las células y las nanopartículas, y minimicen posibles efectos adversos (40).

3.1 Hemocompatibilidad de las nanopartículas

La incorporación de las nanopartículas en las células depende de procesos activos que requieren energía. El contacto directo con la célula puede provocar cambios en el estado de su membrana, lo que en muchos casos altera su integridad y provoca hemólisis. En particular, la actividad hemolítica de los nanomateriales depende de factores como su concentración, tamaño y la cantidad de proteínas presentes en el medio (39).

3.2 Limitaciones y cambios biológicos.

A pesar de los grandes avances y la intensa investigación actual, la interacción de los nanomateriales con sistemas biológicos puede generar preocupaciones, ya que pueden inducir cambios en las actividades biológicas. El estrés oxidativo causado por las nanopartículas se atribuye principalmente a su superficie, tamaño y composición. La interacción de las nanopartículas dentro de la célula, al acceder a la mitocondria, puede estimular la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que desencadena una serie de eventos que incluyen el deterioro de la cadena de transporte de electrones, daño estructural a las membranas mitocondriales y despolarización de la membrana mitocondrial (51).

3.3 Efectos del tamaño de las nanopartículas en su interacción con células

Dada la importancia de las propiedades fisicoquímicas de las NPsAg en su diseño para aplicaciones biomédicas o de otro tipo, las interacciones de las nanopartículas con la membrana celular y los orgánulos pueden alterarse significativamente en la interfaz bio-nano por dichas propiedades, cambiando la absorción celular y la nanotoxicidad de las nanopartículas. Estudios demuestran que el tamaño de las NPsAg difiere de su tamaño hidrodinámico en medios biológicos, ya que hay una formación de una corona biomolecular y la agregación de las NPsAg, la agregación se puede evitar manipulando el equilibrio de fuerzas atractivas y repulsivas de acuerdo con el estabilizador que se utiliza en la síntesis, y así evitar su agregación que se debe a la repulsión electrostática. Sin embargo, se ha observado que el radio hidrodinámico tiende a disminuir de su tamaño original, debido a la corona proteica que se genera alrededor de las nanopartículas, Ling *et al* encuentran que las nanopartículas más pequeñas (en términos de tamaño primario, en lugar de tamaño

hidrodinámico) tienen una mayor citotoxicidad y una disminución mucho mayor en la actividad metabólica celular (52, 53).

3.4 Principios básicos del ensayo de hemólisis y del antibiograma

3.4.1 Hemólisis.

La prueba de hemólisis es un análisis necesario para la aprobación de productos destinados al consumo humano; esta prueba evalúa la ruptura o alteración de la integridad de la membrana de los glóbulos rojos, lo que provoca la liberación de hemoglobina (Figura 2).

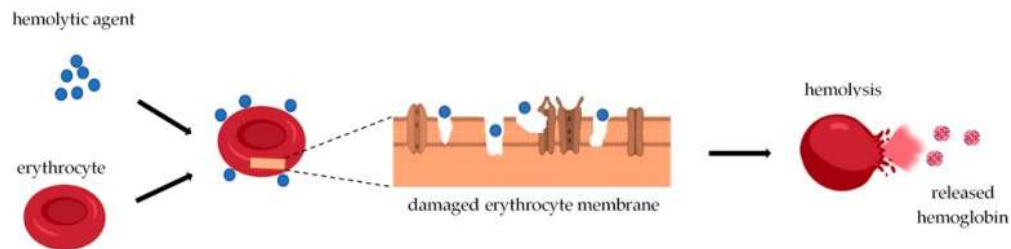


Figura 2. Mecanismo básico de hemólisis (Imagen obtenida Luna-Vázquez-Gómez R, 2021)

En términos funcionales, la ruptura de la membrana de los glóbulos rojos permite que el contenido de las células escape al plasma. El principal componente citosólico de los eritrocitos es la hemoglobina, que representa aproximadamente el 97 % de su contenido. Además, la hemoglobina está especializada en el transporte de gases en la sangre de los animales, por lo que una hemólisis compromete la funcionalidad del tejido (16).

3.4.2 El antibiograma

El estudio de la sensibilidad in vitro de las bacterias a los antimicrobianos se realiza mediante métodos fenotípicos (como las técnicas de dilución y difusión), bioquímicos y genéticos. Entre ellos, los métodos fenotípicos, como el antibiograma, son los más utilizados. La realización de un antibiograma se basa en la resistencia específica de cada bacteria. Estos estudios permiten diferenciar entre microorganismos patógenos y contaminantes, y ofrecen tanto resultados cualitativos —que indican si la bacteria es sensible o resistente a un antibiótico— como resultados cuantitativos, mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), que corresponde a la menor concentración del antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, expresada en $\mu\text{g/ml}$ o mg/l .

Las técnicas de difusión emplean discos de papel impregnados con una solución estandarizada de antibiótico (Figura 3), que se colocan sobre la superficie de un medio sólido previamente inoculado con una suspensión bacteriana. Tras un periodo de incubación de aproximadamente 18 horas, se forma un halo de inhibición alrededor de cada disco, cuyo diámetro se correlaciona con el grado de sensibilidad del microorganismo al antimicrobiano (71).

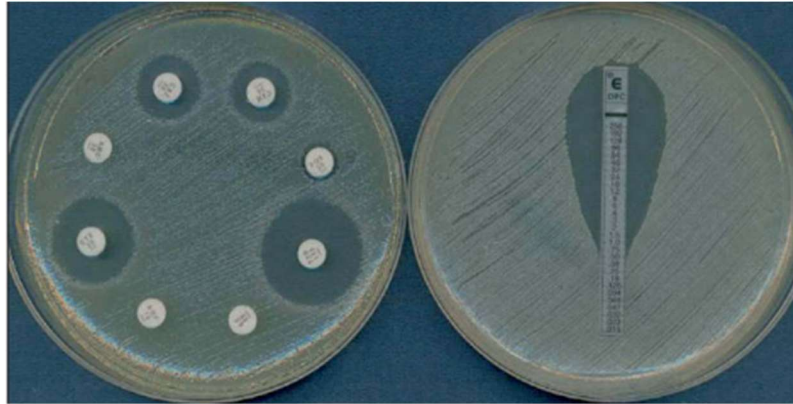


Figura 3. Antibiograma por método de difusión en discos en el que se observa la presencia de halos de inhibición (imagen obtenida Emilia Cercenado, 2009, el antibiograma)

3.5 Principios teóricos de las técnicas de caracterización utilizadas

3.5.1 Espectroscopia UV-Visible (UV-vis)

La espectroscopía UV-Visible es una técnica analítica utilizada para determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en la capacidad de la materia para absorber ciertas longitudes de onda dentro del espectro de radiación electromagnética (Figura 4), el cual está compuesto por campos eléctricos y magnéticos que oscilan en el tiempo y se propagan en el espacio en forma de ondas (69).

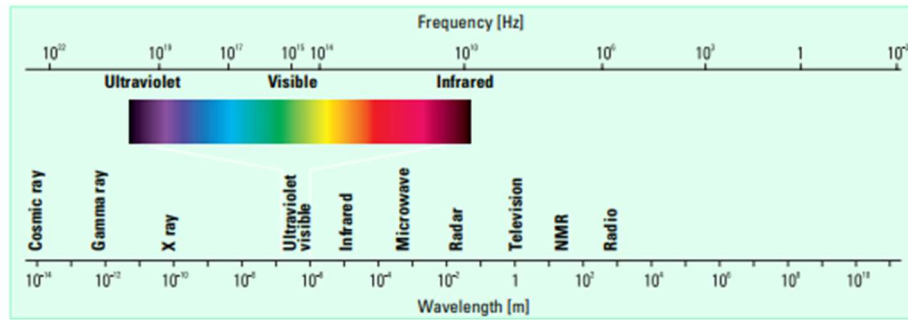


Figura 4. Espectro Electromagnético (Imagen obtenida de Owen T, 2000).

Además, la energía asociada con la radiación electromagnética es

$$E = h\nu = c \lambda \quad (1)$$

Donde c es la velocidad de la luz, ν la frecuencia de la radiación, λ la longitud de onda y h la constante de Planck.

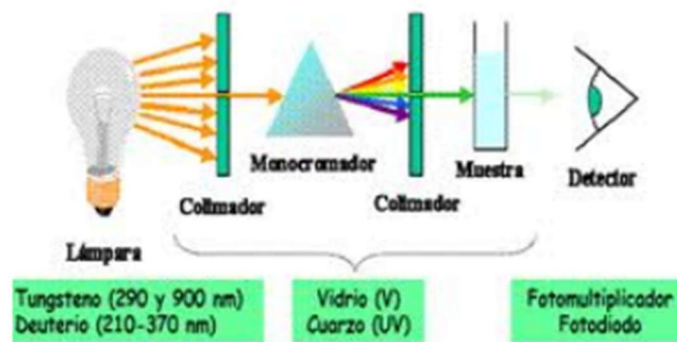


Figura 5. Principio de funcionamiento de un espectrómetro UV-vis (Imagen obtenida de Owen T, 2000).

En la espectroscopía UV-Vis, los resultados suelen expresarse en términos de absorbancia. Cuando la luz atraviesa la muestra, como se muestra en la Figura 5, la cantidad de luz absorbida se determina como la diferencia entre la intensidad de la radiación incidente (P_0) y la intensidad de la radiación transmitida (P). La transmitancia (T) se define como la razón entre la intensidad de la luz transmitida y la intensidad de la luz incidente, es decir:

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (2)$$

y la absorbancia como

$$A = -\log T \quad (3)$$

Con la ley de Lambert-Beer se puede determinar la concentración de una sustancia en función de su absorbancia

$$A = -\log T \left(\frac{P}{P_0} \right) = \epsilon bc \quad (4)$$

Donde ϵ es la absorptividad molar, b el tamaño de la celda y c la concentración. (69)

3.5.2 Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)

La Microscopia de Fuerza Atómica (AFM, por sus siglas en inglés) es una técnica utilizada para caracterizar superficies de materiales no biológicos. El proceso de preparación de las muestras para el AFM es sencillo y provoca mínima alteración en la muestra durante el análisis. El principio del AFM se basa en un diseño que consta de cuatro partes principales: un cantiléver con una punta afilada de silicio o nitruro de silicio, un escáner piezoeléctrico

ubicado debajo del cantiléver que impulsa su movimiento, un láser y un fotodetector sensible (Figura 6). El sistema realiza un barrido sobre la muestra y mide los cambios en el movimiento del cantiléver causados por la interacción con átomos u objetos puntuales en la superficie, los cuales ejercen fuerzas interatómicas que desplazan la punta.

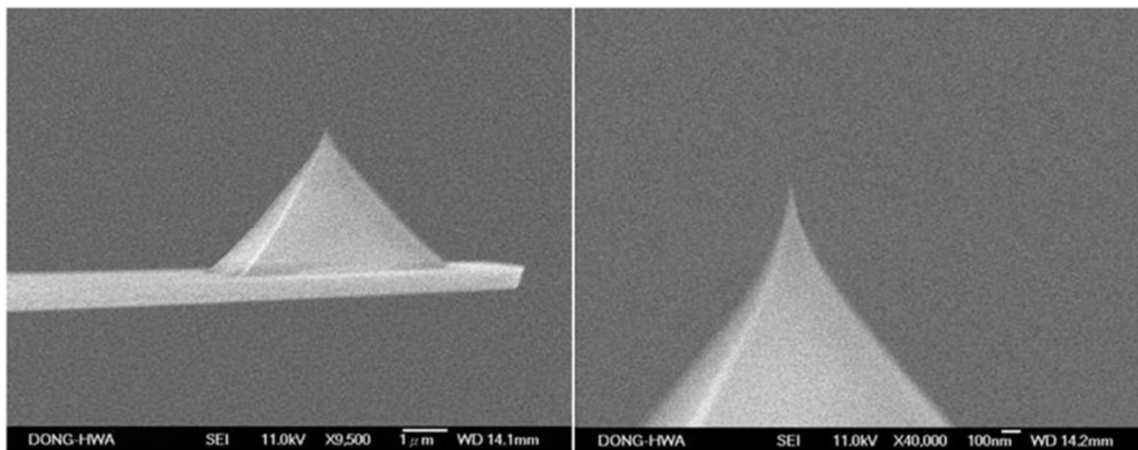
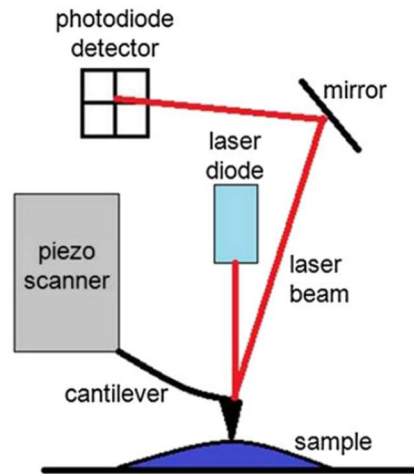


Figura 6. Esquema de detección por microscopía de fuerza atómica y micrografía del cantiléver (Imagen obtenida de Chang, K at el, 2000).

El AFM funciona en diferentes modos, el modo de contacto y el modo sin contacto. En el modo de contacto, al aplicar una fuerza sobre la muestra, la interacción entre la sonda del AFM y la muestra es repulsiva. A medida que se genera el barrido suavemente la fuerza hace que el cantiléver se flexione para adaptarse a los cambios en la topografía de la muestra.

En el modo sin contacto, el cantiléver oscila a una distancia de aproximadamente 5 a 15 nm por encima de la superficie de la muestra. En este modo, se establece una fuerza de atracción entre la punta y la muestra, influida por fuerzas como las de van der Waals, interacciones coulombicas y dipolo, dependiendo de la distancia. Los cambios en la frecuencia de oscilación, así como las variaciones en la fase o en la amplitud, pueden ser detectados y utilizados para generar imágenes detalladas de la superficie analizada (70).

Capítulo 4. Antecedentes

En los últimos años, el desarrollo de formulaciones de nanopartículas de plata para la administración de fármacos con aplicaciones terapéuticas y medicas han estado avanzando a grandes pasos. Sin embargo, aunque en algunos productos mejora el rendimiento, existen investigaciones que indican que pueden generarse daños adversos en los sistemas biológicos. Para lograr una mejor eficacia en la obtención de nanopartículas poco citotóxicas, se considera que las propiedades fisicoquímicas y el proceso de síntesis mejoran la biocompatibilidad.

Aunque las NPsAg son reconocidas como agentes antibacterianos eficaces, también pueden resultar tóxicas para algunas células eucariotas y algunos sistemas biológicos. Se ha descubierto que la toxicidad in vitro de las NPsAg está influenciada por el tipo celular, las propiedades fisicoquímicas y las condiciones de exposición (pH, concentración y tiempo) (54). A pesar de la gran cantidad de información, aún no se sabe con claridad qué desencadena la respuesta biológica. La mayoría de los informes sugieren que la liberación de iones de plata es el principal responsable de la respuesta biológica (55, 56, 57); sin embargo, otros estudios indican que son las nanopartículas completas las que originan dicha respuesta (58, 59).

Los efectos citotóxicos de las nanopartículas se generan en su mayoría dentro de la célula. Existen diferentes mecanismos de absorción de las nanopartículas, como la fagocitosis y la pinocitosis (60). Además, el tamaño juega un papel muy importante en la captación celular y en el efecto de citotoxicidad, debido a la formación de una corona biomolecular y a la agregación de las nanopartículas (61, 62).

En los estudios de citotoxicidad por hemólisis, diversas investigaciones mantienen protocolos y parámetros más exhaustos para un mejor entendimiento de la hemocompatibilidad y la actividad antimicrobiana. Por ejemplo, Liaqat N. *et al.* sintetizaron nanopartículas de plata mediante síntesis verde de tamaño aproximado de 80 nm, logrando una actividad antibacterial de mayor zona de inhibición contra *S. aureus* y mostrando la menor actividad hemolítica (63). Por otro lado, Laloy J. *et al.* demostraron que las NPsAg recubiertas con polivinilpirrolidona presentan mejor hemocompatibilidad; nanopartículas de 16 nm a concentraciones de 1 µg/mL, 10 µg/mL y 100 µg/mL no indujeron hemólisis en sangre total después de 1 h, 4 h y 24 h (64). Las nanopartículas sintetizadas químicamente

pueden presentar una mayor actividad hemolítica, la cual podría atribuirse a su tamaño, química superficial y propiedades fisicoquímicas. Además, esta hemólisis también podría deberse a las interacciones de las especies reactivas de oxígeno (ROS) con la superficie celular o a cambios en el pH (65).

En los últimos años, los estudios sistematizados han contribuido a una mejor comprensión de la biocompatibilidad de las nanopartículas. Ante la falta de controles ideales en este aspecto, se ha optado por realizar evaluaciones complementarias, como el análisis de la agregación plaquetaria, la coagulación, la proliferación de linfocitos y la activación del sistema del complemento después del tratamiento con nanopartículas (66). Aunque el estudio de la hemocompatibilidad ha avanzado, aún persisten lagunas debido a la complejidad de los sistemas biológicos que regulan la interacción con estos nanomateriales (39). La formación de una corona proteica o la aparición de equinocitos —aunque este último sea un proceso reversible— aparecen por la toxicidad de las nanopartículas (54). A pesar de su gran potencial, las nanopartículas continúan generando complicaciones al interactuar con células, ya que su toxicidad puede modificarse en función de las características de las nanopartículas de plata como el tamaño y la composición. Por ello, el desarrollo y la optimización de rutas de síntesis resultan fundamentales para reducir o eliminar estos efectos tóxicos (67, 68). Este proyecto busca lograr un porcentaje hemolítico bajo, sin recurrir a procesos complejos ni provocar inestabilidades antes o después de la interacción celular.

Capítulo 5. Hipótesis y objetivos

5.1 Hipótesis

La síntesis de nanopartículas de plata por el método de reducción química genera biocompatibilidad estable con los glóbulos rojos permitiendo su uso seguro en futuras aplicaciones médicas.

5.2 Objetivos

5.2.1 Objetivo general

Obtener nanopartículas de plata mediante el proceso de reducción química y comparar la hemocompatibilidad en un intervalo de concentraciones que produzcan baja y alta hemólisis en eritrocitos de donador sano para valorar el nivel de citotoxicidad.

5.2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar NPsAg utilizando el método de reducción química.
- Caracterizar las NPsAg mediante espectroscopía UV-Vis para determinar su formación y estabilidad.

- Caracterizar las NPsAg mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) para determinar su tamaño y forma.
- Realizar el ensayo de hemólisis incorporando las NPsAg en una suspensión de eritrocitos a diferentes concentraciones.
- Evaluar la hemólisis mediante lectura de absorbancia utilizando espectroscopía UV-Vis.
- Calcular el porcentaje de hemólisis.
- Realizar el cultivo de *Staphylococcus aureus* y evaluar su actividad antibacteriana mediante antibiogramas.

Capítulo 6. Metodología

6.1 Síntesis de Nanopartículas de Plata

6.1.1 Diseño Experimental para la síntesis de NPsAg.

Se empleó un diseño experimental para sintetizar las nanopartículas más adecuadas, con el objetivo de generar un efecto hemolítico nulo sobre los eritrocitos humanos. Los experimentos de síntesis se llevaron a cabo en el laboratorio de nanotecnología de la UABC, mientras que los experimentos cuantitativos *in vitro* se realizaron en el laboratorio de citotoxicidad de la Escuela de Ciencias de la Salud de la misma universidad. Posteriormente, se recopilaron los datos para su análisis (Figura 7).

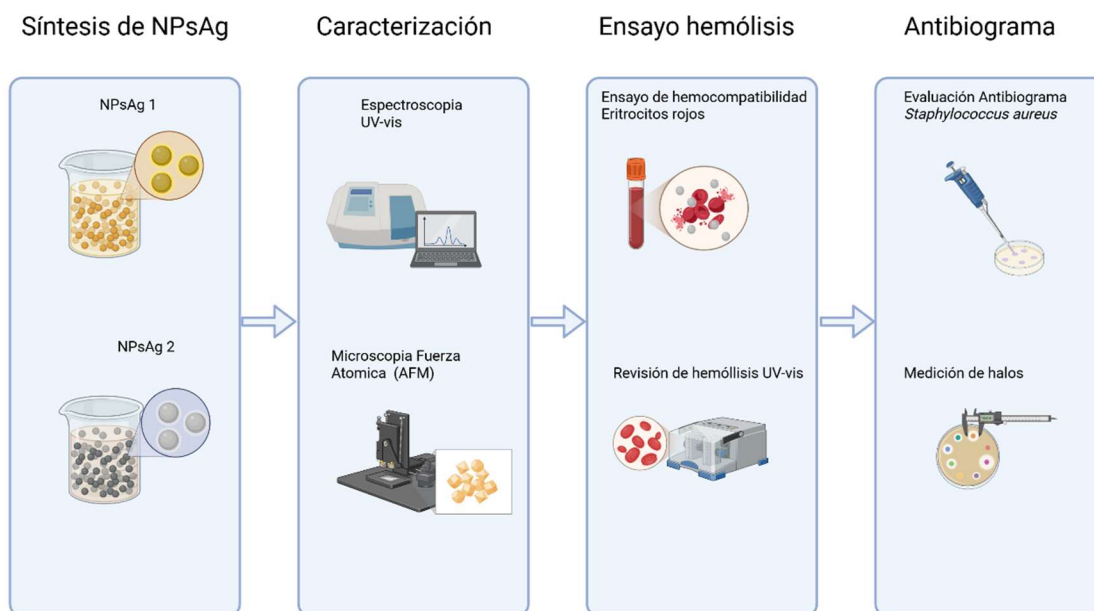


Figura 7. Metodología general del diseño experimental; síntesis de NPsAg, caracterización de las NPsAg, Ensayo de hemocompatibilidad y evaluación antimicrobiana *Staphylococcus aureus*.

6.1.2 Materiales y reactivos.

Se utilizó nitrato de plata (AgNO_3) 99.0% como precursor del metal, así como citrato trisódico dihidratado ($\text{C}_6\text{H}_9\text{Na}_3\text{O}_9 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 99.0% como agente reductor y estabilizador para la síntesis de NPsAg y agua destilada. Ambos reactivos fueron adquiridos de Sigma Aldrich.

6.1.3 Equipo

La síntesis de NPsAg1 se llevó a cabo en un matraz de fondo redondo de 100 mL, utilizando el método convencional y un procesador ultrasónico (Hielscher Ultrasound Technology) para sonicar la solución obtenida. Para la segunda síntesis de NPsAg2, se empleó el método convencional, acoplado a un destilador de vidrio en modo reflujo, colocado sobre un agitador

magnético con calentamiento (Thermo Scientific Cimarec+), con el fin de prevenir la pérdida del solvente durante la reacción.

6.1.4 Síntesis de NPsAg usando el método de reducción química

Se seleccionó el método de reducción química para sintetizar NPsAg, ya que permite ajustar el tamaño de las nanopartículas variando la relación molar entre las sales de plata y el citrato utilizados en la reacción, además de ser manejable sin requerir condiciones extremas de temperatura y presión. El proceso de síntesis sigue el método de reducción química en su síntesis convencional y modificado, de acuerdo con el procedimiento descrito y publicado por Velescu, B. Ş. *et al.* (30) (Figura 8).

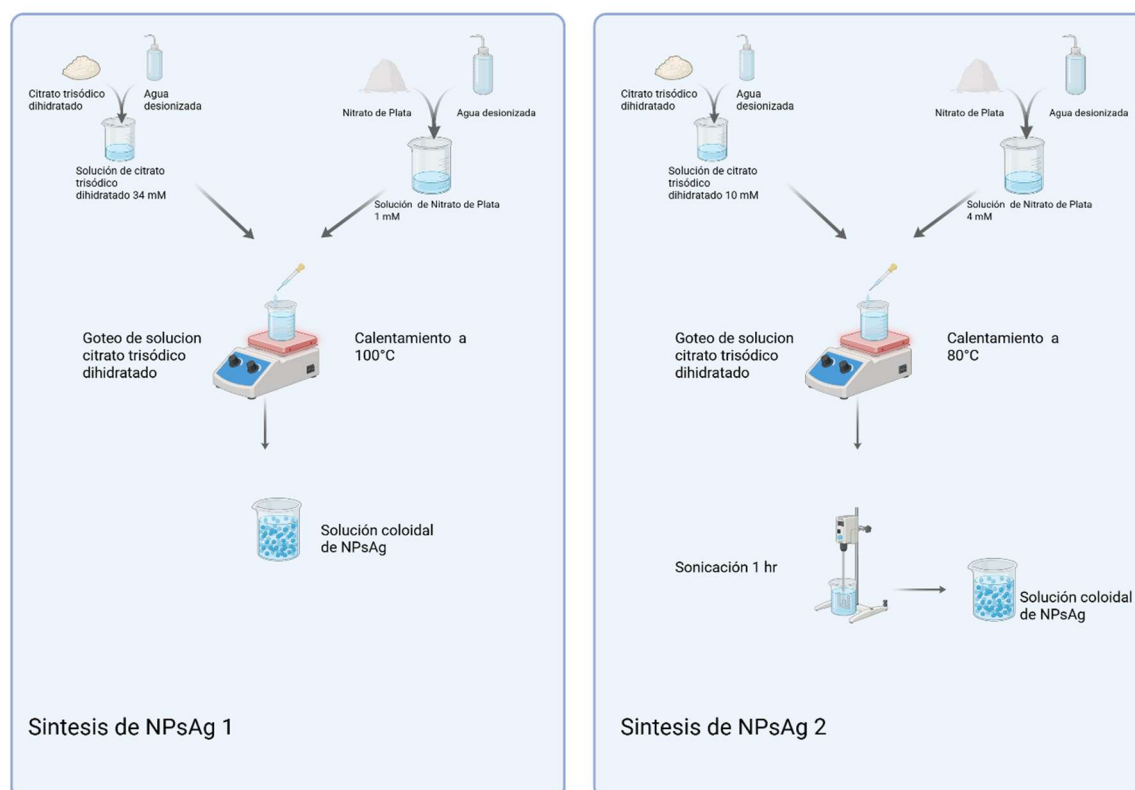


Figura 8. Diagrama del proceso de síntesis de NPsAg 1 y 2 propuesto.

Inicialmente, para la primera síntesis de NPsAg 1, se prepararon dos soluciones precursoras. La primera consistió en una solución de nitrato de plata (AgNO_3) a una concentración de 1 mM disolviendo 8.49 mg del reactivo en 50 mL de agua destilada. La segunda correspondió a una solución de citrato trisódico dihidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 34 mM, preparada disolviendo 100 mg del compuesto en 10 mL de agua destilada. Ambas soluciones fueron agitadas manualmente hasta lograr su completa disolución.

Se vertió la solución de AgNO_3 en un vaso de precipitación y se sometió a calentamiento con agitación constante. El sistema se llevó a ebullición, estableciendo una temperatura de 100 °C. Una vez alcanzada la temperatura, se adicionó la solución de citrato trisódico, lo que provocó la formación de nanopartículas de plata. El cambio de color de la solución, de un tono gris-azulado transparente a un color amarillo-marrón dorado, confirmó la formación de las NPsAg. Finalmente, la solución se dejó enfriar a temperatura ambiente y se transfirió a tubos Falcon de 50 mL para su almacenamiento y uso posterior.

Posteriormente, para la segunda síntesis de NPsAg 2, se prepararon dos soluciones precursoras. La primera consistió en una solución de nitrato de plata (AgNO_3) a una concentración de 4 mM disolviendo 34 mg del reactivo en 50 mL de agua destilada, La segunda correspondió a una solución de citrato trisódico dihidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 10 mM, preparada disolviendo 29 mg del compuesto en 10 mL de agua destilada. Ambas soluciones fueron agitadas manualmente hasta lograr su completa disolución.

Se vertió la solución de AgNO_3 en un vaso de precipitación y se sometió a calentamiento con agitación constante. El sistema se llevó a ebullición, estableciendo una temperatura de $80\text{ }^\circ\text{C}$. Una vez alcanzada la temperatura, se adicionó la solución de citrato trisódico utilizando una pipeta, lo que provocó la formación de nanopartículas de plata. El cambio de color de la solución, de un tono gris-azulado transparente a un color amarillo-marrón lechoso, confirmó la formación de las NPsAg. El calentamiento y la agitación se mantuvieron durante 15 minutos para asegurar la completa reducción del AgNO_3 y la estabilización de las nanopartículas. Posteriormente, se sonicó la solución durante 1 hora. Finalmente, la solución se dejó enfriar a temperatura ambiente y se transfirió a tubos Falcon de 50 mL para su almacenamiento y uso posterior.

6.2 Caracterización de las NPsAg

6.2.1 Espectroscopía UV-Visible

Se utilizó espectroscopía UV-Visible para obtener el espectro de absorbancia de las NPsAg, con el objetivo de identificar su pico característico, confirmar su formación y evaluar su concentración y estabilidad. Las mediciones se realizaron utilizando un espectrofotómetro UV-Vis *Genesys 30 visible spectrophotometer* de la marca *Thermo Scientific* (Figura 9), operando en un rango espectral de 325 a 1081 nm.

Para la medición, se prepararon disoluciones de NPsAg a diferentes concentraciones (1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000) utilizando agua destilada como medio de dilución, sin necesidad de pretratamientos adicionales. Cada muestra se colocó en una celda de cuarzo estándar, empleando agua destilada como blanco en el espectrofotómetro.



Figura 9. Espectrofotómetro.

6.2.2 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Las muestras fueron analizadas mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), lo que permitió examinar características superficiales clave como la morfología, distribución, tamaño y grado de aglomeración de las NPsAg. Para ello, las nanopartículas se depositaron sobre un sustrato de vidrio limpio y se dejaron secar a 50 °C. Las mediciones se realizaron

utilizando un microscopio AFM modelo NANOSURF EASY SCAN 2, de la marca *Nanosurf* (Figura 10), operando en modo de fuerza estática (*static force mode*). Se empleó una punta de con una constante de fuerza de 20 nN. Las imágenes topográficas se adquirieron en un área de escaneo de $5.08 \times 5.08 \mu\text{m}$, $2.42 \times 2.42 \mu\text{m}$, $7.93 \times 7.93 \mu\text{m}$ y $3.65 \times 3.65 \mu\text{m}$, con una resolución de 512×512 píxeles y una resolución lateral estimada de 10 nm.



Figura 10. Microscopio AFM.

6.3 Pruebas Citotóxicas

6.3.1 Ensayo de hemólisis

Para evaluar la hemocompatibilidad de las NPsAg, se llevó a cabo un ensayo de hemólisis in vitro. A continuación, se describe el procedimiento experimental, que incluyó la preparación de una suspensión de eritrocitos humanos, la mezcla con diferentes concentraciones de NPsAg, y el análisis de la liberación de hemoglobina mediante espectroscopía UV-Vis.

a) Preparación de suspensión de eritrocitos

Se extrajeron 25 mL de sangre venosa de un donante sano mediante flebotomía al vacío, utilizando heparina dipotásica para evitar la coagulación. Después de la extracción, la sangre fue centrifugada durante 15 minutos a 2500 rpm; se marcaron los niveles de hematocrito y plasma, eliminando este último mediante aspiración suave con pipeta y sustituyéndolo por solución tampón PBS.

Después de tres lavados con PBS, con centrifugación a 2500 rpm durante 15 minutos en cada uno, se obtuvo un paquete de eritrocitos. Para la preparación de los experimentos, se diluyó 0.5 mL del paquete de eritrocitos en 24.5 mL de PBS en un tubo de fondo cónico, obteniendo así una suspensión madre de eritrocitos en proporción 1:50 (25 mL).

b) Preparación de Soluciones para la evaluación de hemocompatibilidad.

Se prepararon las soluciones a partir de la solución madre obtenida de la síntesis de nanopartículas, mezclando 50 µl de NPsAg con 950 µl de una suspensión de eritrocitos al 2 %.

Se preparó una solución tampón de PBS con agua nano pura (Milli-Q), ajustada a un pH de 7.2. También se preparó una solución de Tritón X-100 al 20 % como control positivo, mezclando 20 mL de Tritón X-100 en 80 mL de agua nano pura, agitando de manera controlada para evitar la formación de burbujas.

c) Incorporar las NPsAg en una suspensión de eritrocitos a diferentes concentraciones

Para el montaje de los tubos experimentales para evaluar la hemólisis de las NPsAg, se añadieron 950 μ L de la suspensión de eritrocitos a 50 μ L de las soluciones de NPsAg en diferentes concentraciones (1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000), por triplicado. Para el control negativo c (-), se añadió PBS a la suspensión de eritrocitos, mientras que para el control positivo c (+), se añadió Tritón X-100 al 20 %.

Posteriormente a la preparación de las suspensiones, los tubos se incubaron simultáneamente a 37 °C durante 2 horas, agitándolos cada 30 minutos mediante inversión suave. Finalizada la incubación, los tubos se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 minutos. y el sobrenadante fue transferido a nuevos tubos para su posterior lectura de absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Figura 11).

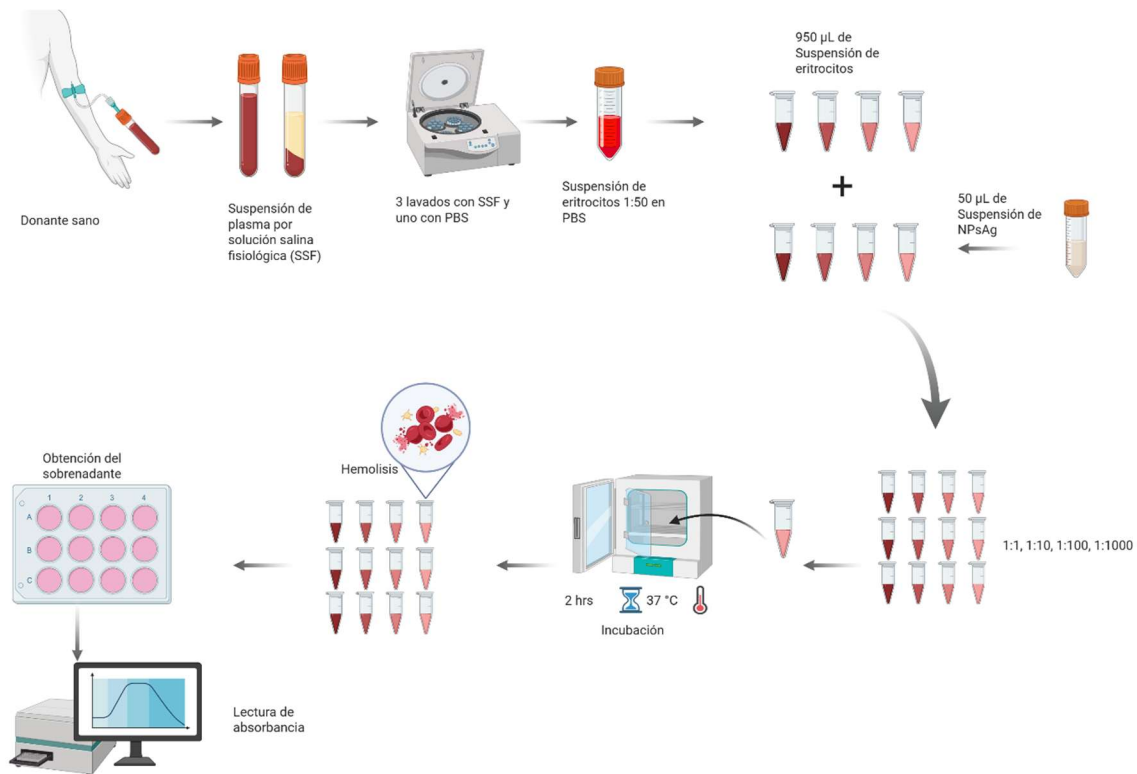


Figura 11. Prueba de Hemólisis en donador sano. (imagen: Autoría propia).

d) Cálculo del porcentaje de hemólisis.

Después de realizar el ensayo de hemólisis, se utilizó espectroscopía UV-Visible para cuantificar la liberación de hemoglobina, la cual se empleó para calcular el porcentaje de hemólisis inducido por las NPsAg. Esta medición permitió evaluar el grado de hemólisis en función de la concentración de nanopartículas.

El porcentaje de hemólisis se determinó a partir de los valores de absorbancia obtenidos mediante un espectrofotómetro *Genesys 30 visible spectrophotometer* de la marca *Thermo Scientific*. Para ello, se midió la absorbancia de los sobrenadantes de eritrocitos tratados con diferentes diluciones de NPsAg (1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000), así como de los controles positivo y negativo, y de los controles negativos individuales asociados a cada concentración.

En total, se registraron 38 valores de absorbancia, uno por cada tratamiento y la absorbancia utilizada para el cálculo se registró específicamente a una longitud de onda de 450 nm, correspondiente al pico *de Soret*, característico de la hemoglobina liberada durante la hemólisis, este pico es el más comúnmente usado en ensayos espectrofotométricos, ya que es sensible a la concentración de hemoglobina libre en solución.

El cálculo del porcentaje de hemólisis para cada tratamiento se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Hemolisis} = 100 * \left(\frac{Ap - Ac (-)ind}{Ac(+) - Ac(-)} \right) \quad (5)$$

Donde

Ap= absorbancia de cada muestra (NPsAg + eritrocitos)

Ac (-) ind= absorbancia del control negativo individual para cada muestra (eritrocitos sin NPsAg)

Ac (+) = absorbancia del control positivo (eritrocitos + Tritón X-100 al 20 %)

Ac (-) = absorbancia del control negativo (eritrocitos + PBS)

Los datos obtenidos fueron registrados en una tabla que muestra los valores de absorbancia y los porcentajes de hemólisis para cada concentración de NPsAg, y posteriormente fueron representados gráficamente para facilitar la comparación y análisis de los resultados.

6.3.2 Antibiograma con cultivo de bacteria de *Staphylococcus aureus*.

Para evaluar la actividad antibacteriana de las NPsAg frente a *Staphylococcus aureus*, se empleó la técnica de antibiograma por difusión en disco. Esta metodología permite observar la capacidad de las nanopartículas para inhibir el crecimiento bacteriano mediante la formación de halos de inhibición alrededor de discos impregnados con las muestras. A continuación, se describe detalladamente el procedimiento realizado

Para la realización del antibiograma con la bacteria *Staphylococcus aureus*, primero se llevó a cabo la *preparación del medio de cultivo*. Para ello se suspendieron 19 g de Agar Mueller-Hinton en 500 mL de agua purificada. La mezcla se llevó a ebullición y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Una vez esterilizado, el medio se vertió en placas (cajas) Petri estériles, llenando aproximadamente 25 mL por placa. Las placas se dejaron solidificar durante 24 horas a temperatura ambiente (Figura 12).

A continuación, se procedió con la *inoculación de las bacterias*. Se preparó el cultivo de *Staphylococcus aureus* en caldo de cultivo. Con un hisopo estéril, se inoculó la superficie de las placas con el cultivo bacteriano mediante un extendido uniforme, utilizando la técnica de estriado en superficie.

Seguidamente, se llevó a cabo la *preparación de los discos impregnados*, los cuales fueron replicados por triplicado. Para ello, se impregnaron discos de papel filtro estériles con 10 µL de cada solución por disco, en concentraciones 1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000, además de un control positivo (+).

Después de esto, se realizó la *colocación de los discos* sobre las placas ya inoculadas. Los discos se colocaron cuidadosamente sobre la superficie del agar, inoculado manteniendo una distancia adecuada entre ellos para evitar la superposición de los halos de inhibición.

Posteriormente, se procedió con la *incubación* de las placas, colocándolas boca abajo a una temperatura de 37 °C durante un periodo de 24 horas. Finalmente, se llevó a cabo la *evaluación de los resultados*, midiendo los diámetros de los halos de inhibición formados alrededor de cada disco. Las mediciones se realizaron en milímetros utilizando una regla o calibrador. Los valores registrados se organizaron en una tabla para facilitar su análisis y comparación, y los resultados obtenidos permitieron comparar la efectividad de las nanopartículas con respecto al control positivo.

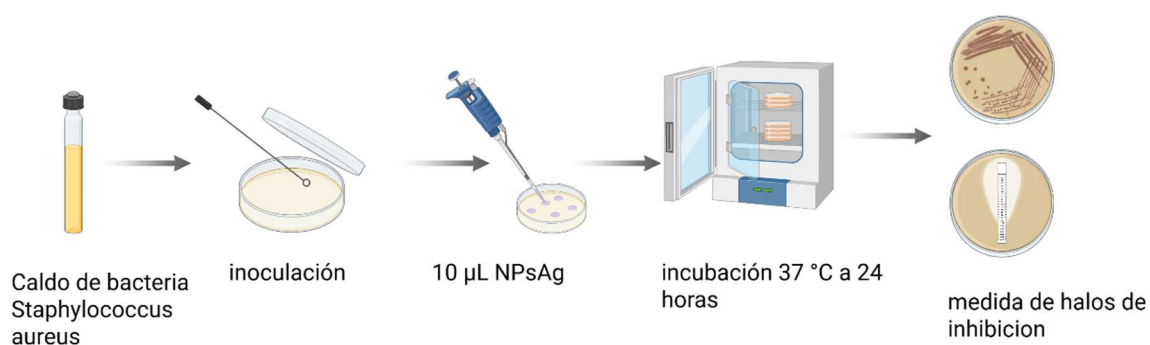


Figura 12. Procedimiento de cultivo bacteriano *Staphylococcus aureus* en caldo de cultivo contra NP sAg. (Diseño por autor propio)

Capítulo 7. Resultados y discusiones

7.1 Síntesis de NPsAg utilizando el método de reducción química.

La síntesis de NPsAg se evidenció por el cambio de color en la solución, una característica visual indicativa de su formación. Este fenómeno se debe a la resonancia de plasmones superficiales localizados (LSPR), que ocurre cuando los electrones libres en la superficie de las nanopartículas de plata oscilan colectivamente al interactuar con la luz. Esta oscilación genera una absorción y dispersión específicas, lo que produce una coloración visible que varía entre tonos rojo, verde o marrón, dependiendo del tamaño y la forma de las nanopartículas. Durante el proceso, la solución de las NPsAg 1 adquirió una tonalidad color amarillo-marrón dorado, lo cual sugiere la presencia de NPsAg, y la solución de las NPsAg 2 adquirió una tonalidad color marrón grisáceo. Este cambio de color se puede observar claramente en la figura 13.



Figura 13. Color característico de NPsAg 1 (izquierda) y NPsAg 2 (derecha).

7.2 Caracterización de las NPsAg mediante espectroscopía UV-Vis

En la Figura 14 se presenta el espectro UV-Vis correspondiente a las muestras NPsAg 1 y NPsAg 2. La muestra NPsAg 1 presenta un pico de absorbancia máximo a 436 nm, mientras que NPsAg 2 muestra su máximo a 440 nm, ambos picos característicos de la resonancia de plasmones superficiales de las nanopartículas de plata, generalmente localizada entre 400 y 450 nm. La presencia de ambos picos confirma la formación de nanopartículas de plata.

Al comparar la intensidad de las curvas, se observa que la muestra NPsAg 1 presenta mayor absorbancia que NPsAg 2. Esta diferencia sugiere que NPsAg 1 contiene una mayor concentración relativa de nanopartículas, lo que podría estar asociado a una mejor estabilidad coloidal y menor tendencia a la aglomeración. Asimismo, una mayor absorbancia puede reflejar una síntesis más eficiente, posiblemente favorecida por condiciones de reacción más controladas o una relación más adecuada entre los reactivos utilizados.

En cuanto a la forma del pico, en ambas muestras, los picos plasmónicos son anchos y presentan una cola de dispersión que decae gradualmente, lo que indica que las muestras son polidispersas, es decir, contienen partículas con diferentes tamaños. El pico de NPsAg 2 está desplazado ligeramente hacia el rojo con respecto al de NPsAg 1, lo que sugiere que las partículas de NPsAg 2 son relativamente más grandes que las de NPsAg 1. Al comparar los picos, se observa que el perfil de NPsAg 2 es ligeramente más ancho que el de NPsAg 1, lo que indica que NPsAg 1 posee una distribución de tamaños más uniforme y mejor dispersión de partículas.

Finalmente, en la región del espectro correspondiente a longitudes de onda superiores a 500 nm, ambas curvas muestran una disminución progresiva de la absorbancia, lo cual es característico de las nanopartículas de plata. La ausencia de picos secundarios relevantes sugiere que no se generaron subproductos o impurezas ópticamente activas, lo que refuerza la idea de una síntesis limpia y bien dirigida.

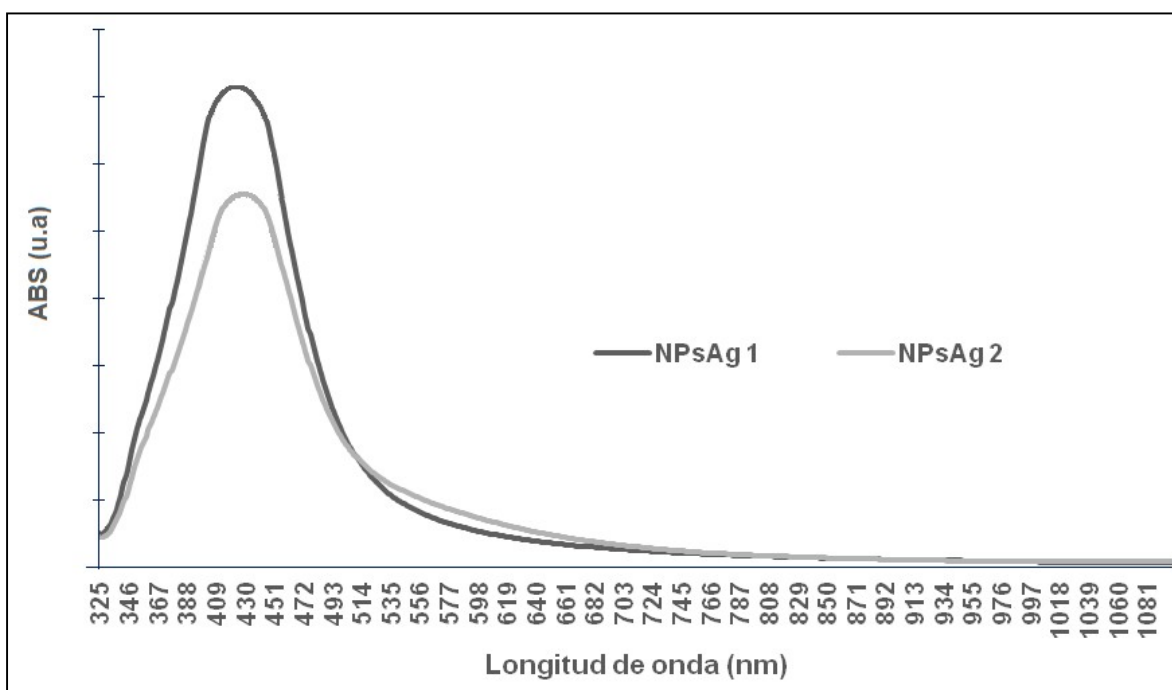


Figura 14. Espectro de absorción de las NPsAg 1 y 2.

7.3 Caracterización de las NPsAg mediante microscopía de fuerza atómica (AFM)

Se analizaron dos muestras de NPsAg mediante microscopía de fuerza atómica (AFM), muestra 1 y muestra 2.

En la muestra 1 (Figura 15), se observa una distribución homogénea de las nanopartículas de plata, con una morfología predominantemente esférica y un tamaño promedio de 120 nm (tamaños entre 70-150 nm). Las partículas presentan una dispersión uniforme sobre la superficie, con mínima aglomeración, lo que sugiere una síntesis controlada y condiciones favorables durante el proceso de obtención.

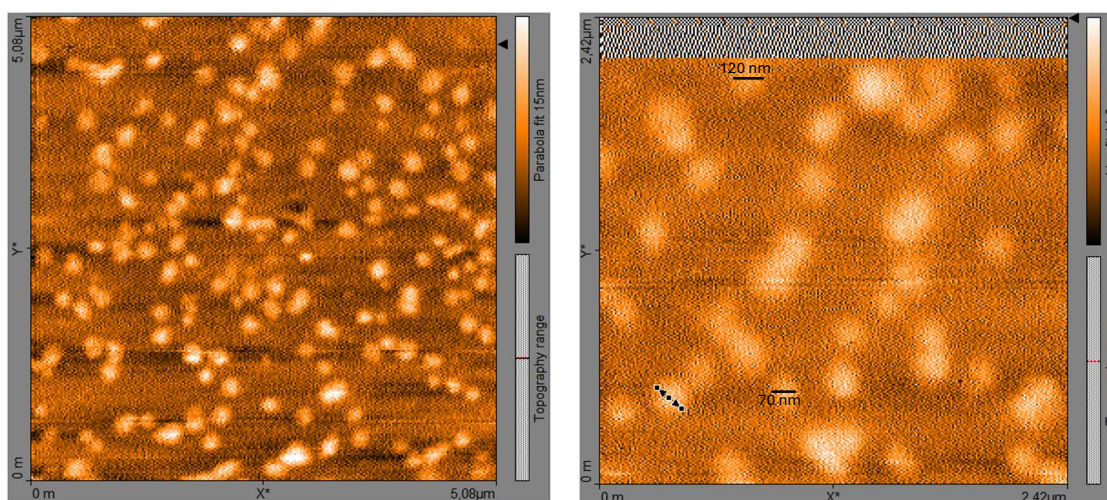


Figura 15. Imagen topográfica obtenida mediante AFM de las NP_sAg (muestra 1).

En contraste, la muestra 2 (Figura 16) muestra una mayor densidad y una evidente aglomeración de nanopartículas en varias zonas. Aunque se mantiene mayoritariamente la forma esférica, el tamaño promedio es mayor, alcanzando los 200 nm, y se identifican áreas con sobrecarga de partículas, lo que podría deberse a diferencias en las condiciones de síntesis o a una menor estabilidad coloidal. Estos resultados concuerdan con los resultados del análisis UV-Vis de cada solución, lo que confirma el crecimiento de las nanopartículas, y una mayor tendencia a la aglomeración en las NP_sAg 2.

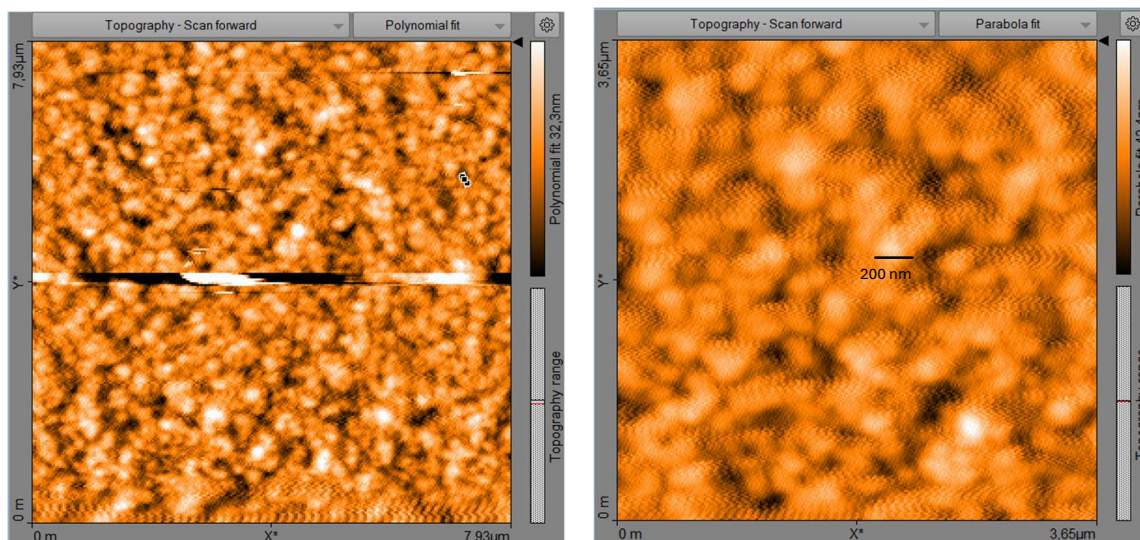


Figura 16. Imagen topográfica obtenida mediante AFM de las NPsAg (Muestra 2).

7.4 Evaluación de citotoxicidad

7.4.1 Ensayo de hemólisis: Cuantificación por espectroscopía UV-Vis y cálculo del porcentaje de hemólisis

El porcentaje de hemólisis, cuantificado a partir de la liberación de hemoglobina, se utilizó como indicador de la biocompatibilidad hemática de las nanopartículas evaluadas. A continuación, se presentan los resultados obtenidos para dos muestras de nanopartículas de plata (NPsAg1 y NPsAg2) en eritrocitos humanos expuestos a distintas diluciones (1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000). Las Figuras 17 y 18 muestran las gráficas de los porcentajes de hemólisis obtenidos para cada muestra. En las Tablas I y II se presenta el porcentaje de hemólisis inducido por NPsAg1 y NPsAg2 a distintas concentraciones, respectivamente. En el eje X se

representan las concentraciones evaluadas para cada muestra, y en el eje Y, el porcentaje de hemólisis calculado a partir de la liberación de hemoglobina.

Tabla I. Porcentaje de hemólisis inducida por NPsAg1 a diferentes concentraciones.

Tratamiento	Ap (muestra)	Ac(-) ind	Ac(+)	Ac(-)	% Hemólisis
NPsAg 1:1	0.266	0.13866	2.74	0.13866	4.92055356
NPsAg 1:10	0.271	0.13866	2.74	0.13866	5.0871348
NPsAg 1:100	0.17366667	0.13866	2.74	0.13866	2.01178883
NPsAg 1:1000	0.13866667	0.13866	2.74	0.13866	1.34546386
Control negativo (PBS)	-	-	-	-	0%
Control positivo (Tritón X)	-	-	-	-	100%

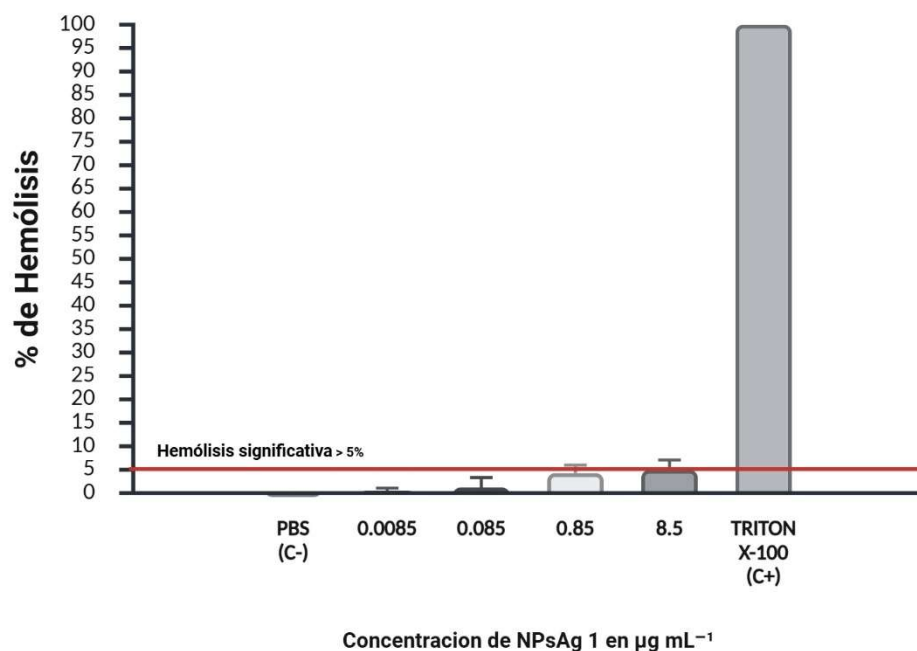


Figura 17. Porcentaje de hemólisis inducido por NPsAg 1 a distintas concentraciones.

En el caso de NPsAg1 (Figura 17), se observó que el porcentaje de hemólisis se mantuvo muy bajo en todas las concentraciones evaluadas, con valores que no superaron el 10%, incluso en las concentraciones más altas 1:1 ($8.4935 \mu\text{g mL}^{-1}$) y 1:10 ($0.8493 \mu\text{g mL}^{-1}$) y en concentraciones más diluidas 1:100 ($0.0849 \mu\text{g mL}^{-1}$) y 1:1000 ($0.00849 \mu\text{g mL}^{-1}$) el efecto hemolítico es menor, acercándose al valor del control negativo (PB). Esta baja respuesta hemolítica indica que NPsAg1 presenta una excelente biocompatibilidad con eritrocitos o baja citotoxicidad hemolítica, sin inducir daño significativo a la membrana de los eritrocitos. Además, se observa un comportamiento decreciente de la hemólisis con la dilución, mostrando una curva estable, lo cual refuerza su consistencia y seguridad.

Tabla II. Porcentaje de hemólisis inducida por NPsAg2 a diferentes concentraciones

Tratamiento	Ap (muestra)	Ac(-) ind	Ac(+)	Ac(-)	% Hemólisis
NPsAg 1:1	0.39333	0.214666	2.74	0.214666	7.0749736
NPsAg 1:10	0.302	0.214666	2.74	0.214666	3.45828933
NPsAg 1:100	0.4723	0.214666	2.74	0.214666	10.2032735
NPsAg 1:1000	0.304	0.214666	2.74	0.214666	3.537486
Control negativo (PBS)	-	-	-	-	0%
Control positivo (Tritón X)	-	-	-	-	100%

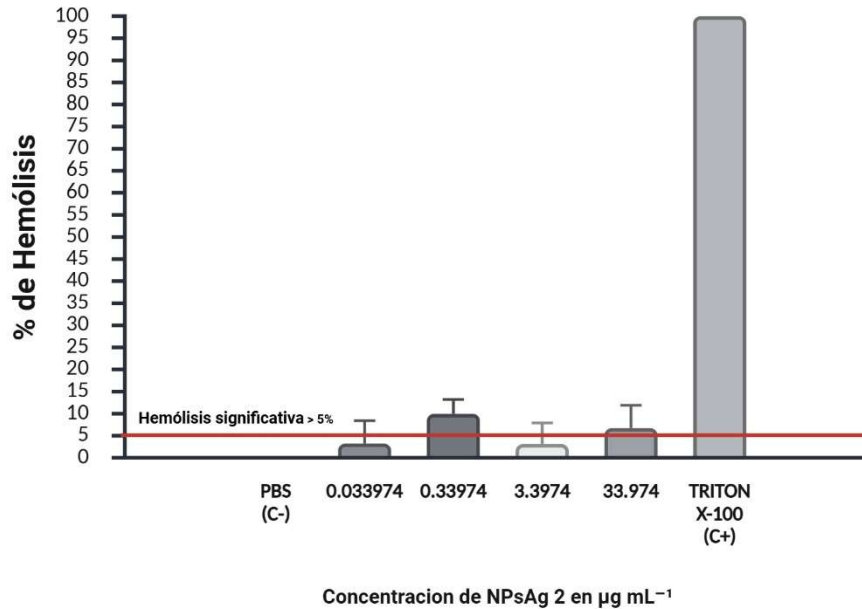


Figura 18. Porcentaje de hemólisis inducido por NPsAg2 a distintas concentraciones.

En contraste, en la Figura 18 se observa que las NPsAg 2 mostraron un comportamiento diferente, teniendo una respuesta más variable y menos compatible. La concentración 1:100 ($0.33974 \mu\text{g mL}^{-1}$) supero el umbral del 5% y alcanzó 10.2 %, lo que indica potencial citotoxicidad hemolítica. Aunque las concentraciones 1:1 ($33.974 \mu\text{g mL}^{-1}$), 1:10 ($3.3974 \mu\text{g mL}^{-1}$) y 1:1000 ($0.033974 \mu\text{g mL}^{-1}$) se mantuvieron por debajo del 10%, se observó un perfil de hemólisis irregular, con un comportamiento hormético, caracterizado por una curva en forma de U, donde se evidencia un aumento de toxicidad en concentraciones intermedias, mientras que en concentraciones altas y más diluidas presentan una menor actividad

hemolítica. Este aumento podría deberse a una mayor interacción con la membrana celular, posiblemente atribuible a diferencias en la composición, el tamaño, la morfología o la carga superficial de las nanopartículas, influenciadas por el agente estabilizante de las NPsAg2.

Ambas muestras presentan compatibilidad con sangre a nivel *in vitro*; sin embargo, las NPsAg1 presentan un perfil más uniforme y seguro, con una disminución del porcentaje de hemólisis de forma casi logarítmica, como se espera en este tipo de ensayos: a menor concentración, menor interacción con la membrana celular. En contraste, las NPsAg2 no siguen este patrón, ya que no muestran una caída logarítmica, lo que podría indicar cambios en la superficie de las nanopartículas al diluirse. No obstante, ninguna de las dos formulaciones provocó una hemólisis significativa o comparable con la lisis total inducida por el control positivo, lo que indica que ambas mantienen un perfil hemocompatible aceptable. Sin embargo, los resultados sugieren que NPsAg1 ofrece una mayor seguridad para aplicaciones biomédicas en las que se prevea contacto con la sangre, debido a su menor potencial hemolítico.

7.4.2 Evaluación de la actividad antibacteriana mediante antibiogramas.

Se presentan los antibiogramas obtenidos tras la evaluación de la actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata mediante el método de difusión en disco. Las Figuras 19 y 20 muestran los halos de inhibición formados alrededor de los discos impregnados con diferentes concentraciones de nanopartículas y con el control positivo (halos marcados). Sin embargo, ninguna de las dos muestras mostró actividad antimicrobiana. Esto puede deberse

al tamaño de las nanopartículas: al tener radios grandes, disminuye la relación superficie/volumen, lo que reduce la liberación de iones Ag^+ .

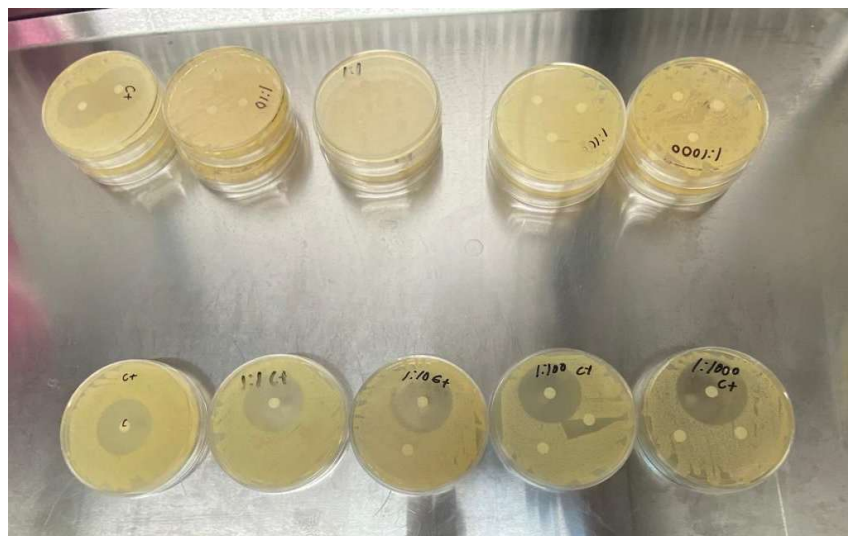


Figura 19. Respuesta Antimicrobiana de las NPsAg 1 y 2.

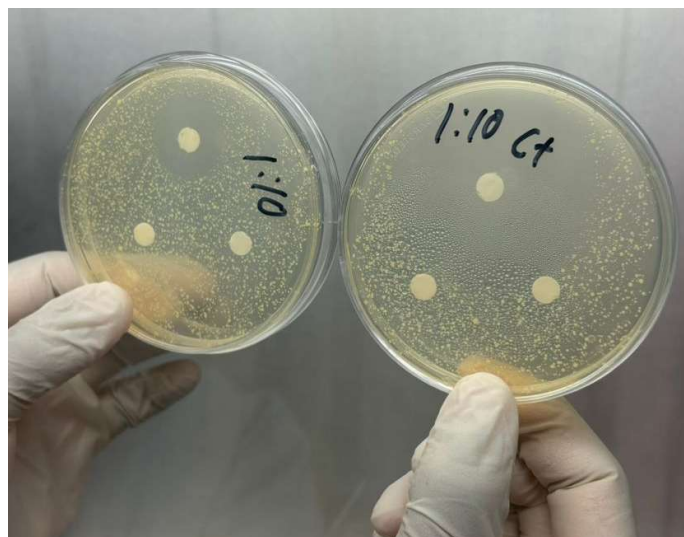


Figura 20. Ausencia de actividad antimicrobiana.

Capítulo 8. Conclusiones y trabajo futuro

Conclusiones

La presente investigación permitió sintetizar y caracterizar nanopartículas de plata (NPsAg) mediante el método de reducción química, con el propósito de evaluar su hemocompatibilidad y su potencial aplicación biomédica. Los resultados obtenidos permiten extraer las siguientes conclusiones principales:

1. Síntesis y caracterización:

- La espectroscopía UV-Vis confirmó la formación de nanopartículas de plata con picos de absorbancia característicos en 436 y 440 nm.
- El análisis morfológico por AFM mostró que las NPsAg 1 presentaron partículas esféricas, homogéneas y con tamaños promedio entre 70–150 nm, mientras que las NPsAg 2 alcanzaron diámetros cercanos a 200 nm, con mayor aglomeración y menor estabilidad coloidal.
- Los resultados sugieren que es necesario ajustar la relación citrato-Ag y la temperatura durante la síntesis, ya que estos factores probablemente influyeron en el tamaño y la estabilidad de las nanopartículas.

2. Hemocompatibilidad:

- Los ensayos de hemólisis demostraron que las NPsAg 1 y NPsAg 2 presentan baja citotoxicidad, con porcentajes de hemólisis inferiores al 5% y 10%

respectivamente, lo que las clasifica como no hemolíticas o ligeramente hemolíticas según la norma ASTM F756.

- Las dos muestras mostraron buena hemocompatibilidad, pero NPsAg 1 demostró una alta biocompatibilidad, ya que presentó un menor porcentaje de hemólisis por debajo del umbral de 5%, indicando una interacción más segura con los eritrocitos y, por tanto, mayor biocompatibilidad en aplicaciones hemáticas, la dosis más alta probada, 8.49 ppm, resultó en solo 4.92% de hemólisis.

3. Actividad antimicrobiana:

- Las pruebas de antibiograma frente a *Staphylococcus aureus* no mostraron actividad antibacteriana detectable. Este resultado sugiere que factores como el tamaño de partícula, la estabilidad coloidal y la limitada liberación de iones Ag^+ pudieron reducir la eficacia antimicrobiana bajo las condiciones experimentales empleadas.

4. Aplicaciones potenciales:

- Aunque las NPsAg sintetizadas no mostraron efecto bactericida, presentan biocompatibilidad sanguínea, lo que las convierte en candidatas para aplicaciones tópicas y para sistemas de liberación de fármacos.

En conjunto, los hallazgos confirman la hipótesis planteada y cumplen con los objetivos del estudio, ya que fue posible obtener nanopartículas de plata estables, con bajo efecto hemolítico y potencial aplicabilidad biomédica.

Recomendaciones

A partir de los resultados obtenidos, se identifican diversas líneas de investigación que permitirán ampliar y optimizar el uso de nanopartículas de plata en el ámbito biomédico:

1. Optimización de la síntesis:

- Con base en los resultados obtenidos, se propone optimizar las condiciones de síntesis mediante el aumento de la relación citrato–plata, la variación de la temperatura de reacción y el ajuste del tiempo de sonicación. Asimismo, la aplicación de sonicación en frío podría contribuir a prevenir la coalescencia de las partículas. Estas modificaciones permitirían obtener nanopartículas de menor tamaño (10–30 nm), lo que favorecería una mayor superficie activa y, en consecuencia, una mejor capacidad antimicrobiana.
- Actualmente, las investigaciones en nanopartículas priorizan su actividad antimicrobiana, con el objetivo de obtener partículas con alto potencial antimicrobiano sin comprometer su biocompatibilidad. En este sentido, se sugiere continuar optimizando su diseño para conservar este equilibrio.

2. Uso de recubrimientos y estabilizantes:

- Incorporar un polímero estabilizante o agentes de recubrimiento que prevengan la aglomeración de las nanopartículas y favorezcan una mayor estabilidad coloidal

3. Ensayos complementarios de biocompatibilidad:

- Realizar los ensayos de hemólisis en un intervalo lineal a concentraciones mayores de 8.5 $\mu\text{g/mL}$ para NPsAg 1 y entre 0.033974 y 3.3974 $\mu\text{g/mL}$ para NPsAg 2 con el fin de evaluar con mayor precisión su hemocompatibilidad.

Referencias

1. Taha, R. H. (2022). Green synthesis of silver and gold nanoparticles and their potential applications as therapeutics in cancer therapy: A review. *Inorganic Chemistry Communications*, 143, 109610. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2022.109610>
2. Danquah, M. K., & Jeevanandam, J. (2022). Metal and metal oxide nanoparticles: Synthesis, properties, and applications as nanomedicines for diabetes treatment. En *Elsevier eBooks* (pp. 111–142). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85396-5.00001-4>
3. Ramírez, J. P. G., & Orozco, C. P. O. (2022). Fabricación y caracterización de nanopartículas de plata con potencial uso en el tratamiento del cáncer de piel. *Ingeniería y Desarrollo*, 37(1), 88–104. <https://doi.org/10.14482/inde.37.1.6201>
4. Talapko, J., Matijević, T., Juzbašić, M., Antolović-Požgain, A., & Škrlec, I. (2020). Antibacterial activity of silver and its application in dentistry, cardiology and dermatology. *Microorganisms*, 8(9), 1400. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091400>
5. Sehgal, S., Kumar, J., & Nishtha. (2022). Involvement of gold and silver nanoparticles in lung cancer nanomedicines: A review. *Materials Today: Proceedings*, 62, 6468–6476. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.04.199>
6. Jiang, K., & Pinchuk, A. O. (2015). Noble metal nanomaterials. En *Solid State Physics* (Vol. 66, pp. 131–211). <https://doi.org/10.1016/bs.ssp.2015.02.001>

7. Khan, S. A. (2020). Metal nanoparticles toxicity: Role of physicochemical aspects. *En Elsevier eBooks* (pp. 1–11). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816960-5.00001-X>
8. Lee, S. H., & Jun, B. (2019). Silver nanoparticles: Synthesis and application for nanomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 865. <https://doi.org/10.3390/ijms20040865>
9. Almatroudi, A. (2020). Silver nanoparticles: Synthesis, characterisation and biomedical applications. *Open Life Sciences*, 15(1), 819–839. <https://doi.org/10.1515/biol-2020-0094>
10. Xu, J., Yıldıztekin, M., Han, D., et al. (2023). Biosynthesis, characterization, and investigation of antimicrobial and cytotoxic activities of silver nanoparticles using *Solanum tuberosum* peel aqueous extract. *Heliyon*, 9(8), e19061. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19061>
11. Wang, H., Qiao, X., Chen, J., & Ding, S. (2005). Preparation of silver nanoparticles by chemical reduction method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 256(2–3), 111–115. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2004.12.058>
12. Khare, S., Singh, R. M., & Prakash, O. (2022). Green synthesis, characterization and biocompatibility evaluation of silver nanoparticles using radish seeds. *Results in Chemistry*, 4, 100447. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100447>
13. Naganthran, A., Verasoundarapandian, G., Khalid, F. E., Masarudin, M. J., Zulkharnain, A., Nawawi, N. M., Karim, M., Abdullah, C. A. C., & Ahmad, S. A. (2022). Synthesis, characterization and biomedical application of silver nanoparticles. *Materials*, 15(2), 427. <https://doi.org/10.3390/ma15020427>

14. Mejía-Méndez, J. L., López-Mena, E. R., & Sánchez-Arreola, E. (2023). Activities against lung cancer of biosynthesized silver nanoparticles: A review. *Biomedicines*, *11*(2), 389. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020389>
15. Ratan, Z. A., Haidere, M. F., Nurunnabi, M., et al. (2020). Green chemistry synthesis of silver nanoparticles and their potential anticancer effects. *Cancers*, *12*(4), 855. <https://doi.org/10.3390/cancers12040855>
16. Luna-Vázquez-Gómez, R., Arellano-García, M. E., García-Ramos, J. C., et al. (2021). Hemolysis of human erythrocytes by Argovit™ AGNPs from healthy and diabetic donors: An in vitro study. *Materials*, *14*(11), 2792. <https://doi.org/10.3390/ma14112792>
17. Luna-Vázquez-Gómez, R., Arellano-García, M. E., Toledano-Magaña, Y., García-Ramos, J. C., Radilla-Chávez, P., Salas-Vargas, D. S., Casillas-Figueroa, F., Ruiz-Ruiz, B., Pestryakov, A., & Bogdanchikova, N. (2022). Bell shape curves of hemolysis induced by silver nanoparticles: Review and experimental assay. *Nanomaterials*, *12*(7), 1066. <https://doi.org/10.3390/nano12071066>
18. Casillas-Figueroa, F., Arellano-García, M. E., Leyva, C., et al. (2020). Argovit™ silver nanoparticles effects on *Allium cepa*: Plant growth promotion without cytogenotoxic damage. *Nanomaterials*, *10*(7), 1386. <https://doi.org/10.3390/nano10071386>
19. Hosseini, R. S., Hasanpour, K., Khoshnevis, M., Fakhri, M. S., Derin, E., Ghaffarian, A., & Kement, C. (2024). Therapeutic effect of silver nanoparticles in the management of diabetic ulcers: A systematic review and meta-analysis on RCTs. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*. <https://doi.org/10.1177/15347346241241836>

20. Siakavella, I. K., Lamari, F., Papoulis, D., Orkoula, M., Gkolfi, P., Lykouras, M., Avgoustakis, K., & Hatziantoniou, S. (2020). Effect of plant extracts on the characteristics of silver nanoparticles for topical application. *Pharmaceutics*, *12*(12), 1244. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121244>
21. Ontong, J. C., Singh, S., Nwabor, O. F., Chusri, S., & Voravuthikunchai, S. P. (2020). Potential of antimicrobial topical gel with synthesized biogenic silver nanoparticle using *Rhodomyrtus tomentosa* leaf extract and silk sericin. *Biotechnology Letters*, *42*(12), 2653–2664. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02971-5>
22. Das, P., Dutta, T., Manna, S., Loganathan, S., & Basak, P. (2022). Facile green synthesis of non-genotoxic, non-hemolytic organometallic silver nanoparticles using extract of crushed, wasted, and spent *Humulus lupulus* (HOPS): Characterization, anti-bacterial, and anti-cancer studies. *Environmental Research*, *204*, 111962. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111962>
23. Liang, H., Wang, W., Huang, Y., Zhang, S., Wei, H., & Xu, H. (2010). Controlled synthesis of uniform silver nanospheres. *The Journal of Physical Chemistry C*, *114*(16), 7427–7431. <https://doi.org/10.1021/jp9105713>
24. Wolf, J., Stawski, T. M., Smales, G. J., Thuenemann, A. F., & Emmerling, F. (2022). Towards automation of the polyol process for the synthesis of silver nanoparticles. *Scientific Reports*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09774-w>
25. Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, *11*, 55–75.
26. Ratyakshi, & Chauhan, R. P. (2009). Colloidal synthesis of silver nanoparticles. *Asian Journal of Chemistry*, *21*(10), 113–116.

27. Halder, S., Ahmed, A. N., Gafur, M. A., Seong, G., & Hossain, M. Z. (2021). Size-controlled facile synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and analysis of their antibacterial performance. *ChemistrySelect*, 6(36), 9714–9720. <https://doi.org/10.1002/slct.202101362>
28. Dara, P. K., Mahadevan, R., Digita, P. A., Visnuvinayagam, S., Kumar, L. R. G., Mathew, S., Ravishankar, C. N., & Anandan, R. (2020). Synthesis and biochemical characterization of silver nanoparticles grafted chitosan (Chi-Ag-NPs): In vitro studies on antioxidant and antibacterial applications. *SN Applied Sciences*, 2(4). <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2261-y>
29. Iwuji, C., Saha, H., Ghann, W., Dotson, D., Bhuiya, M. A. K., Parvez, M. S., Jahangir, Z. S., Rahman, M. M., Chowdhury, F. I., & Uddin, J. (2024). Synthesis and characterization of silver nanoparticles and their promising antimicrobial effects. *Chemical Physics Impact*, 100758. <https://doi.org/10.1016/j.chphi.2024.100758>
30. Velescu, B. Ș., Ilie, M. I., Amzăr, A. I., Lupașcu, R. E., Marandiuc, I. M., Apetroaei, M., Arsene, A. L., Blejan, E. I., Nedeia, O. A., Fistos, T., Fierăscu, R. C., Bărbuceanu, F., Țoca, C., Fierăscu, I., Udeanu, D. I., Ghica, M., Drăgănescu, D., & Cobelschi, P. C. (2023). Development and experimental evaluation of some silver nanoparticles with antimicrobial potential. *Processes*, 11(4), 1212. <https://doi.org/10.3390/pr11041212>
31. Salleh, A., Naomi, R., Utami, N. D., Mohammad, A. W., Mahmoudi, E., Mustafa, N., & Fauzi, M. B. (2020). The potential of silver nanoparticles for antiviral and antibacterial applications: A mechanism of action. *Nanomaterials*, 10(8), 1566. <https://doi.org/10.3390/nano10081566>

32. Dakal, T. C., Kumar, A., Majumdar, R. S., & Yadav, V. (2016). Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1831. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01831>
33. Yin, I. X., Zhang, J., Zhao, I. S., Mei, M. L., Li, Q., & Chu, C. H. (2020). The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 2555–2562. <https://doi.org/10.2147/ijn.s246764>
34. Qing, Y., Cheng, L., Li, R., Liu, G., Zhang, Y., Tang, X., Wang, J., Liu, H., & Qin, Y. (2018). Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 3311–3327. <https://doi.org/10.2147/ijn.s165125>
35. Jaswal, T., & Gupta, J. (2021). A review on the toxicity of silver nanoparticles on human health. *Materials Today Proceedings*, 81, 859–863. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.04.266>
36. Bernauer, U., Bodin, L., Chaudhry, Q., Coenraads, P. J., Dusinska, M., Gaffet, E., Panteri, E., Rogiers, V., Rousselle, C., Stepnik, M., Vanhaecke, T., Wijnhoven, S., Von Goetz, N., De Jong, W., & Simonnard, A. (2020). The SCCS guidance on the safety assessment of nanomaterials in cosmetics. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 112, 104611. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104611>
37. Standard Test method for analysis of hemolytic properties of nanoparticles. (2022, 4 octubre). Recuperado 29 de junio de 2024, de <https://www.astm.org/e2524-22.html>
38. Upadhyay, J., Kumar, A., Gogoi, B., & Buragohain, A. K. (2015). Antibacterial and hemolysis activity of polypyrrole nanotubes decorated with silver nanoparticles by

- an in-situ reduction process. *Materials Science and Engineering: C*, 54, 8-13.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.04.027>
39. Yedgar, S., Barshtein, G., & Gural, A. (2022). Hemolytic activity of nanoparticles as a marker of their hemocompatibility. *Micromachines*, 13(12), 2091.
<https://doi.org/10.3390/mi13122091>
40. De la Harpe, K. M., Kondiah, P. P. D., Choonara, Y. E., Marimuthu, T., Du Toit, L. C., & Pillay, V. (2019). The hemocompatibility of nanoparticles: A review of cell–nanoparticle interactions and hemostasis. *Cells*, 8(10), 1209.
<https://doi.org/10.3390/cells8101209>
41. Chen, L. Q., Fang, L., Ling, J., Ding, C. Z., Kang, B., & Huang, C. Z. (2015). Nanotoxicity of silver nanoparticles to red blood cells: Size dependent adsorption, uptake, and hemolytic activity. *Chemical Research in Toxicology*, 28(3), 501–509.
<https://doi.org/10.1021/tx500479m>
42. Tkachenko, A. (2024). Hemocompatibility studies in nanotoxicology: Hemolysis or eryptosis? (A review). *Toxicology In Vitro*, 98, 105814.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2024.105814>
43. Choudhury, H., Pandey, M., Lim, Y. Q., Low, C. Y., Lee, C. T., Marilyn, T. C. L., Loh, H. S., Lim, Y. P., Lee, C. F., Bhattamishra, S. K., Kesharwani, P., & Gorain, B. (2020). Silver nanoparticles: Advanced and promising technology in diabetic wound therapy. *Materials Science and Engineering C*, 112, 110925.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110925>
44. Singh, M., Thakur, V., Kumar, V., Raj, M., Gupta, S., Devi, N., Upadhyay, S. K., Macho, M., Banerjee, A., Ewe, D., & Saurav, K. (2022). Silver nanoparticles and its

- mechanistic insight for chronic wound healing: Review on recent progress. *Molecules*, 27(17), 5587. <https://doi.org/10.3390/molecules27175587>
45. Talapko, J., Matijević, T., Juzbašić, M., Antolović-Požgain, A., & Škrlec, I. (2020). Antibacterial activity of silver and its application in dentistry, cardiology and dermatology. *Microorganisms*, 8(9), 1400. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091400>
46. Ontong, J. C., Singh, S., Nwabor, O. F., Chusri, S., & Voravuthikunchai, S. P. (2020). Potential of antimicrobial topical gel with synthesized biogenic silver nanoparticle using *Rhodomyrtus tomentosa* leaf extract and silk sericin. *Biotechnology Letters*, 42(12), 2653–2664. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02971-5>
47. Hosseini, R. S., Hasanpour, K., Khoshnevis, M., Fakhr, M. S., Derin, E., Ghaffarian, A., & Kement, C. (2024). Therapeutic effect of silver nanoparticles in the management of diabetic ulcers: A systematic review and meta-analysis on RCTs. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*. <https://doi.org/10.1177/15347346241241836>
48. Dias, A. C. P., Marslin, G., Selvakesavan, N., Gregory, F., & Sarmiento, B. (2015). Antimicrobial activity of cream incorporated with silver nanoparticles biosynthesized from *Withania somnifera*. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 5955–5964. <https://doi.org/10.2147/ijn.s81271>
49. Parveen, A., Kulkarni, N., Yalagatti, M., Abbaraju, V., & Deshpande, R. (2018). In vivo efficacy of biocompatible silver nanoparticles cream for empirical wound healing. *Journal of Tissue Viability*, 27(4), 257–261. <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2018.08.007>

50. Guido, C., Maiorano, G., Gutiérrez-Millán, C., Cortese, B., Trapani, A., D'Amone, S., Gigli, G., & Palamà, I. E. (2021). Erythrocytes and nanoparticles: New therapeutic systems. *Applied Sciences*, *11*(5), 2173. <https://doi.org/10.3390/app11052173>
51. Manke, A., Wang, L., & Rojanasakul, Y. (2013). Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed Research International*, *2013*, 942916. <https://doi.org/10.1155/2013/942916>
52. Li, L., Xi, W., Su, Q., Yang, L., Yan, G., Liu, Y., Wang, H., & Cao, A. (2019). Unexpected size effect: The interplay between different-sized nanoparticles in their cellular uptake. *Small*, *15*(38), 1901687. <https://doi.org/10.1002/sml.201901687>
53. Shrestha, S., Wang, B., & Dutta, P. K. (2020). Nanoparticle processing: Understanding and controlling aggregation. *Advances in Colloid and Interface Science*, *279*, 102162. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102162>
54. Nikolopoulou, S. G., Boukos, N., Sakellis, E., & Efthimiadou, E. K. (2020). Synthesis of biocompatible silver nanoparticles by a modified polyol method for theranostic applications: Studies on red blood cells, internalization ability and antibacterial activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *211*, 111177. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111177>
55. Zhang, J., Wang, F., Yalamarty, S. S. K., Filipczak, N., Jin, Y., & Li, X. (2023). Toxicidad inducida por nanoplasta y mecanismos asociados. *Revista Internacional de Nanomedicina*, *17*, 1851–1864. <https://doi.org/10.2147/IJN.S355131>
56. Pareek, V., Gupta, R., & Panwar, J. (2018). Do physico-chemical properties of silver nanoparticles decide their interaction with biological media and bactericidal action? A review. *Materials Science and Engineering: C*, *90*, 739–749. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.026>

57. Akter, M., Sikder, T., Rahman, M., Ullah, A. A., Hossain, K. F. B., Banik, S., Hosokawa, T., Saito, T., & Kurasaki, M. (2018). A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *Journal of Advanced Research*, 9, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.10.008>
58. Li, Y., Qin, T., Ingle, T., Yan, J., He, W., Yin, J.-J., & Chen, T. (2016). Differential genotoxicity mechanisms of silver nanoparticles and silver ions. *Archives of Toxicology*, 91(2), 509–519. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1730-0>
59. Vecchio, G., Fenech, M., Pompa, P. P., & Voelcker, N. H. (2014). Lab-on-a-chip-based high-throughput screening of the genotoxicity of engineered nanomaterials. *Small*, 10(14), 2721–2734. <https://doi.org/10.1002/sml.201303674>
60. Ivask, A., Voelcker, N. H., Seabrook, S. A., Hor, M., Kirby, J. K., Fenech, M., Davis, T. P., & Ke, P. C. (2015). DNA melting and genotoxicity induced by silver nanoparticles and graphene. *Chemical Research in Toxicology*, 28(6), 1023–1035. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00024>
61. Zhu, M., Nie, G., Meng, H., Xia, T., Nel, A., & Zhao, Y. (2012). Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport, and fate. *Accounts of Chemical Research*, 46(3), 622–631. <https://doi.org/10.1021/ar300031y>
62. Awashra, M., & Młynarz, P. (2023). The toxicity of nanoparticles and their interaction with cells: An in vitro metabolomic perspective. *Nanoscale Advances*, 5(10), 2674–2723. <https://doi.org/10.1039/d2na00534d>
63. Liaqat, N., Jahan, N., Khalil-Ur-Rahman, N., Anwar, T., & Qureshi, H. (2022). Green synthesized silver nanoparticles: Optimization, characterization, antimicrobial activity, and cytotoxicity study by hemolysis assay. *Frontiers in Chemistry*, 10. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.952006>

64. Laloy, J., Minet, V., Alpan, L., et al. (2014). Impact of silver nanoparticles on haemolysis, platelet function and coagulation. *Nanobiomedicine*, 1, 4. <https://doi.org/10.5772/59346>
65. Ashokraja, C., Sakar, M., & Balakumar, S. (2017). A perspective on the hemolytic activity of chemical and green-synthesized silver and silver oxide nanoparticles. *Materials Research Express*, 4(10), 105406. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/aa90f2>
66. Huang, H., Lai, W., Cui, M., et al. (2016). Una evaluación de la compatibilidad sanguínea de nanopartículas de plata. *Scientific Reports*, 6, 25518. <https://doi.org/10.1038/srep25518>
67. García-Torra, V., Cano, A., Espina, M., et al. (2021). State of the art on toxicological mechanisms of metal and metal oxide nanoparticles and strategies to reduce toxicological risks. *Toxics*, 9(8), 195. <https://doi.org/10.3390/toxics9080195>
68. Mazzonello, A., Valdramidis, V., Farrugia, C., Grima, J., & Gatt, R. (2017). Synthesis and characterization of silver nanoparticles. *International Journal of Engineering Research*, 7(41).
69. Owen, T. (2000). *Fundamentals of modern UV-visible spectroscopy: A primer*. Agilent Technologies. https://www.agilent.com/Library/primers/Public/59801397_016907.pdf
70. Chang, K., Chiang, Y., Yang, C., & Liou, J. (2012). Atomic force microscopy in biology and biomedicine. *Tzu Chi Medical Journal*, 24(4), 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.tcmj.2012.08.002>

71. Cercenado, E., & Saavedra-Lozano, J. (2009). El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I). *Anales de Pediatría Continuada*, 7(4), 214–217. [https://doi.org/10.1016/s1696-2818\(09\)71927-4](https://doi.org/10.1016/s1696-2818(09)71927-4)
72. Sönnichsen, C., Franzl, T., Wilk, T., Von Plessen, G., & Feldmann, J. (2002). Plasmon resonances in large noble-metal clusters. *New Journal of Physics*, 4, 93. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/4/1/393>
73. Cao, X. L., Cheng, C., Li, Y., Ma, L., & Zhao, C. S. (2010). Preparation of silver nanoparticles with antimicrobial activities and the researches of their biocompatibilities. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(10), 2861–2868. <https://doi.org/10.1007/s10856-010-4133-2>