

Desarrollo De Hidrogeles De Poloxámero Cargadas Con Nanopartículas De Plata Para La  
Prevención De Infecciones Con *Staphylococcus Aureus* 43300.

Mayra Alejandra Delgado Estupiñán

Trabajo de Grado para Optar al Título de Ingeniera Metalúrgica

Director

Sergio Ismael Blanco Vásquez

Doctor en Ingeniería de Materiales

Codirector

Lady Marcela Quintero Peña

Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingeniería Físicoquímicas

Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia De Materiales

Ingeniería Metalúrgica

Bucaramanga

2025

### **Dedicatoria**

Solo podría dedicar todo este trabajo y esta carrera por completo a Dios, mi Señor. Porque todo en mi vida se trata de Él y es por Él. En los momentos más difíciles, cuando sentía que no podía más, Él me sostuvo y no me dejó caer. Toda la gloria sea para Él.

A mis padres, Madilen y César, a quienes debo todo lo que soy. Gracias por su lucha incansable, por los sacrificios silenciosos, por su amor constante y su ejemplo de esfuerzo. Ustedes han sido y seguirán siendo mi mayor motor, mi fuerza y mi razón para seguir creciendo como persona y como profesional.

A mi abuela Sara, porque no solo soy su nieta consentida, sino también una mujer forjada con su cariño, sus palabras sabias y su fe. Gracias por estar siempre con los brazos y el corazón abiertos.

A la Ingeniera Laura Arenas, quien creyó en mí cuando más lo necesitaba, quien vio un potencial que ni yo misma veía en ese momento. Esa confianza marcó un antes y un después en mi camino académico.

A mis amigas incondicionales: Karol, Silvia, Gabriela y Zaira. Gracias por ser mi refugio emocional, por estar siempre en los días buenos y en los no tan buenos. Por cada palabra de aliento, por cada mensaje cuando más los necesitaba, por escucharme sin juzgar, por hacerme reír cuando solo quería llorar, y por recordarme mi valor. Son parte fundamental de este logro.

### Agradecimientos

A Dios Padre todopoderoso, por iluminar mi camino cada día, fortalecerme en los momentos difíciles y permitirme alcanzar este logro tan significativo en mi vida profesional y personal.

A la **Universidad Industrial de Santander** y a la **Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de los Materiales**, por brindarme una formación de calidad, sus espacios de aprendizaje, sus laboratorios, y por contar con profesionales íntegros.

Al **docente Sergio Ismael Blanco Vásquez**, mi director de tesis, por su confianza, paciencia, aliento constante y por creer en mi capacidad incluso cuando yo misma dudaba. Gracias por sus consejos, orientación y apoyo incondicional en cada etapa de este proyecto.

A mi codirectora, la **química Lady Marcela Quintero Peña**, por enseñarme nuevas herramientas, compartirme su experiencia. Su guía fue fundamental para el desarrollo de esta investigación y para mi crecimiento como investigadora.

Al **Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM)**, por acogerme con los brazos abiertos, y a todos los docentes e integrantes del grupo que, con sus aportes, sugerencias y conocimientos, contribuyeron a la solución de los diversos desafíos que surgieron en el camino.

**Tabla de Contenido**

	<b>Pág</b>
Introducción .....	14
1. Objetivos.....	16
1.1 Objetivo General.....	16
1.2 Objetivos Específicos.....	16
2. Marco Teórico.....	17
2.1 Plata.....	17
2.2 Nanomateriales .....	17
2.2.2 Clasificación de los nanomateriales.....	18
2.3 Métodos de síntesis de nanopartículas.....	19
2.3.1 Síntesis química de nanopartículas de plata.....	20
2.3.1.1 Agentes reductores.....	21
2.4 Caracterización de las nanopartículas.....	22
3. Metodología .....	23
3.1 Obtención de las nanopartículas de plata (AgNPs) por reducción química.....	24
3.2 Caracterización de las nanopartículas de plata .....	25
3.2.1 Espectrofotometría UV-Visible .....	25
3.2.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) .....	25
3.3 Determinación de la actividad microbiológica .....	25
3.3.1 Determinación de Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	25
3.3.2 Halos de inhibición .....	26
3.4 Evaluación De Concentración Mínima Hemolítica (CMH) .....	27

3.5 Desarrollo de hidrogeles con nanoparticulas de plata (AgNPs) .....	28
3.5.1 Preparación del hidrogel .....	28
3.5.2 Incorporacion de las AgNPs .....	28
3.6 Ensayo biológico de inhibición bacteriana del hidrogel .....	28
4. Resultados y discusión .....	29
4.1 Síntesis y caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de plata (AgNPs).....	29
4.1.1 Reducción con borohidruro de sodio .....	29
4.1.2 Reducción con ácido ascórbico.....	33
4.1.3 Reducción con citrato de sodio .....	37
4.2.1 Concentración mínima inhibitoria .....	41
4.2.2 Halos de inhibición .....	44
4.3 Evaluación hemolítica.....	47
4.4 Desarrollo y evaluación del hidrogel con AgNPs.....	50
4.4.1. Análisis espectrofotométrico (UV-Vis) de los hidrogeles con diferentes concentraciones de poloxámero 407 .....	50
4.4.1.1 Comparación espectroscópica entre el hidrogel base y el sistema cargado con AgNPs (Método 2). .....	52
4.4.1.2 Comparación espectroscópica entre el hidrogel base y el sistema cargado con AgNPs (Método 3). .....	54
4.4.2. Ensayo de actividad antibacteriana del hidrogel con AgNPs .....	55
5. Conclusiones.....	58
6. Recomendaciones .....	59
Referencias Bibliográficas .....	60

Apéndices..... 66

**Lista de Tablas**

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. <i>Parámetros experimentales evaluados en la síntesis química de nanopartículas de plata.</i> .....	24
Tabla 2. <i>Volúmenes utilizados (<math>\mu\text{L}</math>) de coloide de plata, suspensión bacteriana y PBS para las diluciones en el ensayo de CMI.</i> .....	26
Tabla 3. <i>Concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas para las nanopartículas sintetizadas.</i> .....	44
Tabla 4. <i>Diámetros de inhibición de S. aureus ATCC 43300 en presencia de las AgNPs sintetizadas por el método de difusión de disco.</i> .....	46
Tabla 5. <i>Diámetros de inhibición de S. aureus ATCC 43300 en presencia de los hidrogeles cargados de AgNPs sintetizadas por el método de difusión de disco.</i> .....	57

**Lista de Figuras**

Figura 1. <i>Rango dimensional para partículas microscópicas, nanoscópicas y mesoscópicas.</i> ....	18
Figura 2. <i>Clasificación de los nanomateriales según sus dimensiones y naturaleza.</i> .....	19
Figura 3. <i>Representación esquemática de los métodos físico y químico para la obtención de nanopartículas.</i> .....	20
Figura 4. <i>Fuerzas repulsivas que separan a las nanopartículas de plata, con los aniones adsorbidos de borohidruro (Solomon &amp; Bahadory, 2007).</i> .....	21
Figura 5. <i>Etapas del procedimiento experimental.</i> .....	23
Figura 6. <i>Montaje experimental para la realización de la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) por reducción química</i> .....	24
Figura 7. <i>Imágenes TEM de las nanopartículas sintetizadas utilizando NaBH<sub>4</sub> como agente reductor. A) obtenidas a 20°C, B) a 5°C.</i> .....	30
Figura 8. <i>Espectro de absorbancia de UV- Vis de una solución coloidal sintetizada de acuerdo a condiciones estándares 15mL AgNO<sub>3</sub> 1mM, 45 mL NaBH<sub>4</sub> 2mM, T = 20 °C</i> .....	31
Figura 9. <i>Espectro de absorbancia de UV- Vis de una solución coloidal sintetizada de acuerdo a condiciones estándares 15mL AgNO<sub>3</sub> 1mM, 45 mL NaBH<sub>4</sub> 2mM, T = 5 °C</i> .....	32
Figura 10. <i>Imágenes TEM de las nanopartículas sintetizadas utilizando ácido ascórbico como agente reductor. A) obtenidas a 50°C, B) a 20°C.</i> .....	34
Figura 11. <i>Espectro de absorbancia de UV- Vis de una solución coloidal sintetizada de acuerdo a condiciones estándares 3.2 mL AgNO<sub>3</sub> 10mM, 16 mL ácido ascórbico 0,5mM, T = 50 °C</i> .....	35
Figura 12. <i>Espectro de absorbancia de UV- Vis de una solución coloidal sintetizada de acuerdo a condiciones estándares 3.2 mL AgNO<sub>3</sub> 10mM, 16 mL ácido ascórbico 0,5mM, T = 30 °C</i> .....	36

- Figura 13. *Imágenes TEM de las nanopartículas sintetizadas utilizando citrato de sodio como agente reductor. A) se mantuvieron a 85 °C durante 11 minutos, y b) se mantuvieron a 85 °C durante 30 minutos. .... 37*
- Figura 14. *Espectro de absorbanza de UV- Vis de una solución coloidal sintetizada de acuerdo a condiciones estándares 50 mL AgNO<sub>3</sub> 1mM, 5 mL citrato de sodio 3,4x10<sup>-2</sup>mM, T = 85 °C durante 11 minutos. .... 38*
- Figura 15. *Espectro de absorbanza de UV- Vis de una solución coloidal sintetizada de acuerdo a condiciones estándares 50 mL AgNO<sub>3</sub> 1mM, 5 mL citrato de sodio 3,4x10<sup>-2</sup>mM, T = 85 °C durante 30 minutos..... 40*
- Figura 16. *Cinética de crecimiento de S. aureus en presencia de AgNPs sintetizadas utilizando NaBH<sub>4</sub> como agente reductor. A) obtenida a 20°C, B) obtenida a 5°C. .... 42*
- Figura 17. *Cinética de crecimiento de S. aureus en presencia de AgNPs sintetizadas utilizando ácido ascórbico como agente reductor. A) obtenida a 50°C, B) obtenida a 30°C..... 43*
- Figura 18. *Efecto de inhibición de Staphylococcus aureus (ATCC 43300) cultivada en medio Muller-Hilton (MH), utilizando AgNPs sintetizadas con diferentes agentes reductores. .... 45*
- Figura 19. *Actividad hemolítica en presencia de AgNPs sintetizadas utilizando NaBH<sub>4</sub> como agente reductor. Método 1) a 20 °C; Método 2) a 5 °C. .... 48*
- Figura 20. *Actividad hemolítica de las AgNPs sintetizadas utilizando ácido ascórbico como agente reductor. Método 3) a 50 °C; Método 4) a 30 °C..... 49*
- Figura 21. *Actividad hemolítica de las AgNPs sintetizadas utilizando citrato de sodio como agente reductor. Método 5) a 85 °C durante 11 minutos; Método 6) a 85 °C durante 30 minutos..... 49*
- Figura 22. *Espectros UV-Vis de hidrogeles de poloxámero 407 a diferentes concentraciones. .. 51*

Figura 23. <i>Comparación de espectros UV-Vis entre hidrogel de poloxámero 407 al 20% y el mismo sistema cargado con nanopartículas de plata (Método 2).</i> .....	53
Figura 24. <i>Comparación de espectros UV-Vis entre hidrogel de poloxámero 407 al 20% y el mismo sistema cargado con nanopartículas de plata (Método 3).</i> .....	55
Figura 25. <i>Evaluación de la actividad antibacteriana mediante halos de inhibición frente a Staphylococcus aureus (ATCC 43300).</i> .....	56

**Lista de Apéndices**

	<b>pág.</b>
Apéndice A. Porcentajes de inhibición bacteriana de las AgNPs en suspensión frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .....	66
Apéndice B. Valores de pH de las soluciones de AgNPs y de los hidrogeles cargados.....	67
Apéndice C. Espectros UV-Vis de AgNPs resuspendidas en PBS.....	68
Apéndice D. Imágenes de halos de inhibición obtenidos tras la modificación de las condiciones de sonicación durante la encapsulación de AgNPs, amplitud del 60 %, en ciclos de 10 segundos de activación (ON) y 50 segundos de desactivación (OFF), repitiendo este proceso durante 12 ciclos. ....	68
Apéndice E. Imágenes de las formulaciones de hidrogel almacenado en un vial, a) agente reductor borohidruro de sodio a 5°C y b) agente reductor ácido ascórbico a 50°C.....	69
Apéndice G. Imágen del repique de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	69

## Resumen

**Título:** Desarrollo De Hidrogeles De Poloxámero Cargadas Con Nanopartículas De Plata Para La Prevención De Infecciones Con *Staphylococcus Aureus 43300*\*

**Autor:** Mayra Alejandra Delgado Estupiñan\*\*

**Palabras Clave:** hidrogeles, nanopartículas de plata, poloxámero 407, actividad antimicrobiana, encapsulación, *Staphylococcus aureus*, espectroscopía UV-Vis, Concentración Mínima Inhibitoria.

**Descripción:** Las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*, en particular por cepas resistentes a meticilina como la ATCC 43300, suponen un desafío clínico significativo. En este contexto, se han desarrollado hidrogeles a base de poloxámero 407 cargados con nanopartículas de plata (AgNPs) como estrategia para prevenir infecciones en aplicaciones biomédicas. Inicialmente, se sintetizaron nanopartículas de plata (AgNPs) por reducción química empleando tres tipos de agentes reductores (borohidruro de sodio, ácido ascórbico y citrato de sodio) y condiciones de temperatura, obteniendo una variedad de tamaños y morfologías. Posteriormente, las nanopartículas fueron encapsuladas en hidrogeles de poloxámero 407 al 20 % en peso y se evaluó su estabilidad mediante espectroscopía UV-Vis y su funcionalidad antimicrobiana frente a *S. aureus* mediante ensayos de halos de inhibición. Los resultados demostraron que las nanopartículas de plata pequeñas y cuasi esféricas, sintetizadas con borohidruro de sodio a bajas temperaturas, fueron más efectivas en solución. Sin embargo, al ser encapsuladas, su desempeño se vio afectado, lo que sugiere limitaciones en su integración en el hidrogel en ciertas condiciones. Se evidenció que la formulación del hidrogel influye en la estabilidad, liberación y actividad de las nanopartículas, por lo que es crucial considerar parámetros como el envejecimiento del sistema y el pH del medio. Estos hallazgos resaltan el potencial de los hidrogeles con nanopartículas de plata (AgNPs) como apósitos antimicrobianos, así como la importancia de optimizar sus condiciones de síntesis y encapsulación para futuras aplicaciones biomédicas.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de los Materiales. Programa académico. Director: Sergio Ismael Blanco Vásquez. Doctor en Ingeniería de Materiales. Codirector: Lady Marcela Quintero Peña. Química

### Abstract

**Title:** Development of Poloxamer-Based Hydrogels Loaded with Silver Nanoparticles for the Prevention of Infections Caused by *Staphylococcus aureus* 43300\*

**Author(s):** Mayra Alejandra Delgado Estupiñan\*\*

**Key Words:** hydrogels, silver nanoparticles, poloxamer 407, antimicrobial activity, encapsulation, *Staphylococcus aureus*, UV-Vis spectroscopy, Minimum Inhibitory concentration.

**Description:** Infections caused by *Staphylococcus aureus*, particularly methicillin-resistant strains such as ATCC 43300, represent a significant clinical challenge. In this context, poloxamer 407-based hydrogels loaded with silver nanoparticles (AgNPs) were developed as a strategy to prevent infections in biomedical applications. Initially, AgNPs were synthesized via chemical reduction using three different reducing agents (sodium borohydride, ascorbic acid, and sodium citrate) and under varying temperature conditions, resulting in nanoparticles of diverse sizes and morphologies. These nanoparticles were then encapsulated into 20 wt% poloxamer 407 hydrogels, and their stability was evaluated by UV-Vis spectroscopy, while their antimicrobial performance was assessed against *S. aureus* through inhibition zone assays. The results showed that small, quasi-spherical AgNPs synthesized with sodium borohydride at low temperatures were the most effective in solution. However, their performance decreased after encapsulation, suggesting limitations in integration into the hydrogel under certain conditions. It was observed that the hydrogel formulation significantly affects the stability, release, and activity of the nanoparticles, making it essential to consider parameters such as aging of the system and medium pH. These findings highlight the potential of AgNP-loaded hydrogels as antimicrobial wound dressings, as well as the importance of optimizing synthesis and encapsulation conditions for future biomedical applications.

---

\* Degree Work

\*\* Faculty of Physical-Chemical Engineering School of Metallurgical Engineering and Materials Science. Academic Program. Director: Sergio Ismael Blanco Vásquez. PhD in Materials Engineering. Co-director: Lady Marcela Quintero Peña. Chemistry

## Introducción

Las entidades médicas, como los hospitales y las clínicas, están destinadas a proporcionar atención y tratamiento a personas con diversas enfermedades. Sin embargo, también pueden convertirse en focos de nuevas infecciones debido a la presencia de bacterias y otros patógenos. Estas infecciones, conocidas como infecciones intrahospitalarias, suponen un desafío crítico para la salud pública mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), al menos 1 de cada 10 pacientes adquiere una infección durante su estancia hospitalaria. Las más comunes son las del tracto respiratorio, urinario y las heridas quirúrgicas. Estas infecciones no solo alargan el tiempo de hospitalización y aumentan los costos, sino que también pueden causar complicaciones graves o incluso la muerte (Althiyabi et al., 2024).

Un factor agravante es la resistencia antimicrobiana, que hace que bacterias y otros microorganismos desarrollen mecanismos para resistir los efectos de los medicamentos. La OMS ha publicado una lista priorizada de bacterias multirresistentes que requieren nuevos antibióticos. En la categoría de prioridad elevada se encuentra la *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, que además puede mostrar sensibilidad intermedia o resistencia a la vancomicina.

La resistencia a los antibióticos es una amenaza creciente. La OMS ha advertido que, si no se toman medidas urgentes, muchas infecciones comunes podrían volverse intratables y poner en riesgo los avances médicos alcanzados. En particular, la *Staphylococcus aureus* es una de las principales causas de infecciones de la piel y tejidos blandos. Aunque puede habitar la piel y las mucosas sin causar daño, cuando penetra a través de heridas o quemaduras, puede causar infecciones locales e incluso diseminarse a órganos internos, lo que representa un riesgo significativo para la salud (Saadoun et al., 2014b).

Por ello, es fundamental manejar adecuadamente las heridas abiertas y las quemaduras, junto con prácticas estrictas de higiene y esterilización, para prevenir la propagación de *Staphylococcus aureus* y otras bacterias patógenas tanto en hospitales como en comunidades.

En este contexto, las nanopartículas de plata han surgido como una alternativa prometedora para combatir las infecciones. Estas poseen una amplia actividad antimicrobiana, incluida la capacidad de actuar contra cepas resistentes a los antibióticos. Su capacidad para penetrar en biopelículas bacterianas las convierte en un tratamiento eficaz para heridas infectadas. Sin embargo, para maximizar sus beneficios y minimizar los riesgos, es esencial controlar su síntesis y estabilidad, así como integrarlas adecuadamente en matrices terapéuticas.

Una forma efectiva de aplicar estas nanopartículas es incorporándolas en hidrogeles, materiales poliméricos que retienen agua y favorecen un entorno húmedo que favorece la cicatrización. Al incorporar nanopartículas de plata, estos hidrogeles pueden liberar el agente antimicrobiano de manera sostenida, lo que aumenta la eficacia del tratamiento y reduce la frecuencia de cambios de vendajes.

Entre los materiales más utilizados para estos hidrogeles se encuentra el poloxámero, un copolímero no iónico con buena biocompatibilidad, capaz de formar geles sensibles a la temperatura. La combinación de poloxámero con nanopartículas de plata ofrece una nueva forma de tratar heridas.

El desarrollo de estos hidrogeles tiene el potencial de mejorar significativamente el tratamiento de las infecciones. Proporcionan un entorno óptimo para la curación, ofrecen protección antimicrobiana prolongada y reducen la necesidad de intervenciones frecuentes. En consecuencia, pueden acelerar la recuperación, disminuir las complicaciones y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

## 1. Objetivos

### 1.1 Objetivo General

Desarrollar hidrogeles de poloxámero cargados con nanopartículas de plata para su potencial aplicación como apósitos con propiedades antimicrobianas.

### 1.2 Objetivos Específicos

Sintetizar nanopartículas de plata de diferentes tamaños y morfologías.

Desarrollar hidrogeles de poloxámero con propiedades óptimas para la retención de humedad y la liberación controlada de nanopartículas de plata.

Evaluar la actividad antimicrobiana de los hidrogeles de poloxámero cargados con nanopartículas de plata frente a *Staphylococcus aureus* 43300.

## 2. Marco Teórico

### 2.1 Plata

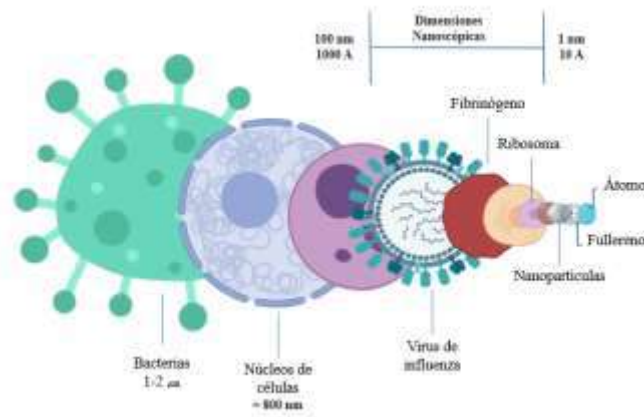
La plata (Ag) es un elemento químico de aspecto brillante y color plateado, perteneciente a los metales de transición. Con número atómico 47, se presenta en estado sólido y posee altos puntos de fusión (962,78 °C) y ebullición (2162,85 °C). (Callón, 2002). Las propiedades macroscópicas de la plata están ampliamente documentadas. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que estas propiedades mejoran cuando el metal se encuentra en dimensiones nanométricas. En particular, sus propiedades mecánicas, químicas y ópticas mejoran notablemente, lo que ha impulsado un creciente interés por su uso en el ámbito de la nanotecnología (Martínez, Zúñiga y Sánchez, 2013). La plata es reconocida por sus propiedades antimicrobianas. En su forma iónica (Ag<sup>+</sup>), la plata puede interferir con enzimas bacterianas, dañar las membranas celulares y alterar la replicación del ADN. Este efecto se potencia en las nanopartículas de plata (AgNPs), cuya alta relación superficie-volumen y capacidad para penetrar en estructuras microbianas, como las biopelículas, las convierte en agentes antimicrobianos altamente eficaces (Lemire et al., 2013).

### 2.2 Nanomateriales

La materia puede ser clasificada en categorías dependiendo de sus dimensiones de tamaño como se ilustra en la **Figura 1**. Se considera nanomaterial aquel que presenta una o más dimensiones entre 1 y 100nm. La nanotecnología se basa en la manipulación de la materia a esta escala, donde los materiales pueden adquirir propiedades distintas y únicas. (Silvestri et al., 2014). Los nanomateriales pueden diseñarse para cumplir funciones específicas, como actuar como agentes antimicrobianos, portadores de fármacos o sensores. En el ámbito biomédico, uno de los

nanomateriales más estudiados son las nanopartículas metálicas, como las de plata, debido a su reconocida eficacia frente a una amplia gama de microorganismos (López-Serrano et al., 2014).

**Figura 1.** Rango dimensional para partículas microscópicas, nanoscópicas y mesoscópicas.



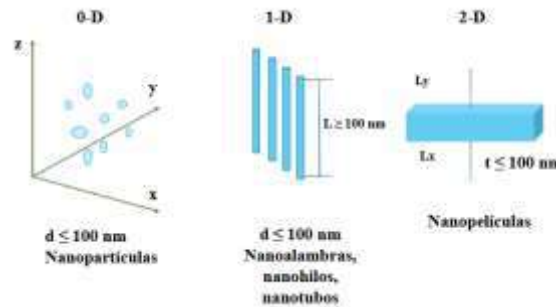
### 2.2.2 Clasificación de los nanomateriales

La clasificación de los nanomateriales puede realizarse de acuerdo con diferentes criterios, como su forma, origen, composición química, naturaleza dimensional o al número de dimensiones que no se encuentran en el rango nanométrico (1 – 100 nm). Según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE, 2010), los nanomateriales se dividen en materiales 0-D (nanopartículas), que tienen las tres dimensiones en la escala nanométrica (1-100 nm); materiales 1-D, donde una de sus dimensiones está fuera de la nanoescala, como los nanotubos y nanohilos; materiales 2-D, donde dos dimensiones están fuera de la nanoescala, como las nanopelículas y nanocapas; y materiales 3-D, cuyos tres dimensiones son mayores a 100 nm, como las dispersiones de nanopartículas o conjuntos de nanotubos. Estos grupos permiten entender mejor su comportamiento en distintos sistemas y facilitan su estudio en aplicaciones específicas,

como la liberación controlada de compuestos activos o la inhibición de microorganismos patógenos. En la **Figura 2** se ejemplifica la clasificación de los nanomateriales (Klabunde, 2001).

**Figura 2.**

*Clasificación de los nanomateriales según sus dimensiones y naturaleza.*



*Fuente:* Adaptado de Klabunde (2001).

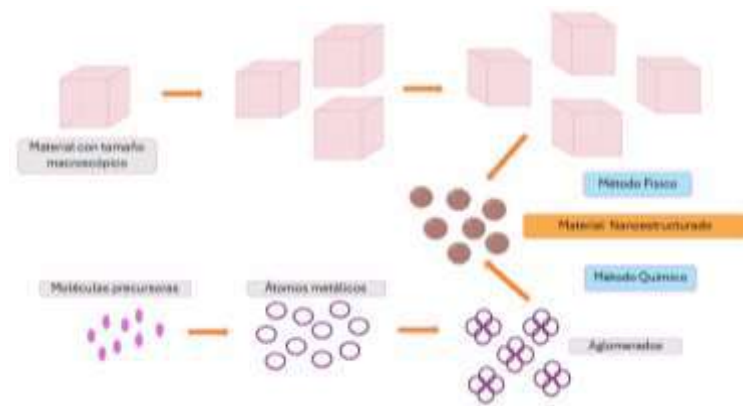
### 2.3 Métodos de síntesis de nanopartículas

Las nanopartículas metálicas pueden sintetizarse mediante dos enfoques principales: el enfoque Top-Down, que implica la reducción física de materiales masivos hasta alcanzar dimensiones nanométricas, y el enfoque Bottom-Up, basado en la construcción de nanopartículas a partir de átomos o moléculas mediante procesos químicos controlados (ver **Figura 3**) (Zanella, 2012; Sharma et al., 2009). En el caso de las nanopartículas de plata (AgNPs), la síntesis química es ampliamente utilizada por su eficiencia, bajo coste y capacidad para producir partículas con características bien definidas, como un tamaño uniforme y buena estabilidad coloidal (Sharma et al., 2009). Los métodos físicos incluyen técnicas como la molienda mecánica y la ablación láser, que parten de materiales masivos para obtener nanopartículas (Zanella, 2012). En cambio, los métodos ascendentes permiten un mayor control sobre las propiedades finales de las nanopartículas, siendo comunes el método electroquímico, la técnica sol-gel y la deposición

química en fase vapor (CVD), todos ellos efectivos en la producción de nanomateriales con morfologías y estructuras específicas (Zanella, 2012).

**Figura 3.**

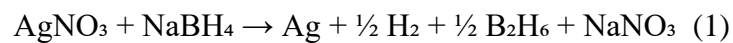
*Representación esquemática de los métodos físico y químico para la obtención de nanopartículas.*



### 2.3.1 Síntesis química de nanopartículas de plata

La síntesis química de nanopartículas de plata (AgNPs) es uno de los métodos más utilizados para obtener estas partículas debido a su facilidad de implementación, su bajo coste y la posibilidad de controlar parámetros fundamentales como el tamaño, la forma, la distribución y la estabilidad coloidal de las partículas obtenidas. Este proceso comienza con la reducción de iones de plata ( $\text{Ag}^+$ ) mediante una sal precursora como el nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ). Cada catión ( $\text{Ag}^+$ ) debería ganar un electrón para dar lugar al átomo cerovalente ( $\text{Ag}^0$ ). Para llevar a cabo esta reducción, se emplea un agente reductor que dona electrones a los cationes de plata, generando átomos metálicos que posteriormente se agrupan para formar núcleos o cúmulos estables. (Martínez, Zuñiga & Sánchez, 2013).

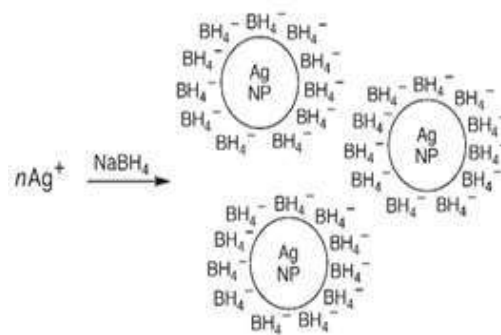
**2.3.1.1 Agentes reductores.** El borohidruro de sodio, con su fórmula química ( $\text{NaBH}_4$ ), es un agente reductor muy fuerte que se utiliza ampliamente en la síntesis de nanopartículas metálicas, especialmente cuando se busca obtener partículas pequeñas y monodispersas, también conocidas como nanosemillas (Kamyshny & Magdassi, 2010). Sin embargo, uno de sus principales desafíos es el difícil control del crecimiento de partículas grandes (Lee & Meisel, 1982). Según el precursor mencionado de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), la reacción química relacionada con la síntesis con este agente reductor es la siguiente:



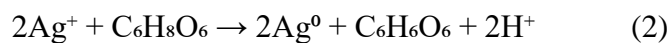
Además, el borohidruro de sodio también puede actuar como estabilizante (Abou El-Nour et al., 2009). Este mecanismo se representa en la **Figura 4**.

**Figura 4.**

*Fuerzas repulsivas que separan a las nanopartículas de plata, con los aniones adsorbidos de borohidruro (Solomon & Bahadory, 2007).*



El ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ), es biocompatible y soluble en agua, y se utiliza como agente reductor debido a que su mecanismo de acción consiste en donar electrones a especies oxidantes, incluidos iones metálicos, lo que permite reducir  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$  (Fouad, 2001) (Kamyshny & Magdassi, 2010; Qin et al., 2010). La ecuación química que representa la síntesis química de nanopartículas de plata teniendo como agente reductor al Ácido ascórbico:



El citrato de sodio es una sal del ácido cítrico que se utiliza ampliamente como agente reductor moderado y estabilizante. Su uso en la síntesis de nanopartículas de plata se remonta al método clásico de Turkevich (Turkevich et al., 1951) y es especialmente efectivo cuando se trabaja a temperaturas elevadas (a la temperatura de ebullición de la solución de nitrato de plata, 85 °C) (Pillai y Kamat, 2003). Así es como ocurre la reacción química que tiene lugar durante la síntesis de nanopartículas de plata, en la que el  $\text{AgNO}_3$  actúa como agente reductor:



## 2.4 Caracterización de las nanopartículas

La presencia de nanopartículas en una solución coloidal, el conocimiento detallado de su tamaño y morfología, son aspectos fundamentales para comprender su comportamiento a escala nanométrica y conlleva a atribuirles posibles aplicaciones en campos como la medicina, la electrónica o los materiales avanzados. Existen diversas técnicas de caracterización que permiten analizar en profundidad sus propiedades estructurales, ópticas y biológicas, entre estas se encuentran: Espectrofotometría UV-visible (Dementeva et al., 2008) (Solomon et al., 2007), Microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Servicios Técnicos de Investigación, 2015) y medición de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) que se define como la mínima concentración del agente microbiano que inhibe visiblemente el crecimiento microbiano tras un tiempo de incubación estandarizado.

### 3. Metodología

Inicialmente, se sintetizaron nanopartículas de plata (AgNPs) mediante reducción química, empleando como agentes reductores borohidruro de sodio, ácido ascórbico y citrato de sodio. Las nanopartículas obtenidas fueron caracterizadas en cuanto a su tamaño y morfología, y se determinaron tanto la concentración mínima inhibitoria (CMI) como la concentración mínima hemolítica (CMH). Posteriormente, se prepararon soluciones de poloxámero 407 a concentraciones específicas, en las cuales se incorporaron las AgNPs previamente sintetizadas para la formación de hidrogeles cargados. Para evaluar el desempeño antimicrobiano de estos sistemas, se realizaron ensayos de difusión en agar frente a la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Finalmente, se analizaron las propiedades fisicoquímicas y la eficacia de los hidrogeles, con el objetivo de determinar su potencial aplicación como apósitos para la prevención de infecciones bacterianas (ver **Figura 5**).

**Figura 5.**

*Etapas del procedimiento experimental.*



### 3.1 Obtención de las nanopartículas de plata (AgNPs) por reducción química

La síntesis de las nanopartículas de plata se realizó mediante el método de reducción química del nitrato de plata como sal precursora y tres agentes reductores: borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ), ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ) y citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ). Solo en el caso del se utilizó un agente estabilizante. El montaje experimental general se muestra en la **Figura 6**, el intervalo en el que se variaron cada uno de los parámetros experimentales depende de la síntesis con cada uno de los agentes reductores mencionados y se especifican en la **Tabla 1**.

#### Figura 6.

*Montaje experimental para la realización de la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) por reducción química*



**Tabla 1.**

*Parámetros experimentales evaluados en la síntesis química de nanopartículas de plata.*

Método	$\text{AgNO}_3$	Agente reductor	Agente reductor (mM)	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo de reacción (min)
1	1	$\text{NaBH}_4$	2.0	20	30
2	1	$\text{NaBH}_4$	2.0	5	30

3	10	$C_6H_8C_6$	2.5	50	7
4	10	$C_6H_8C_6$	2.5	30	60
5	1	$Na_3C_6H_5O_7$	$3.4 \times 10^{-2}$	85	11
6	1	$Na_3C_6H_5O_7$	$3.4 \times 10^{-2}$	85	30

### 3.2 Caracterización de las nanopartículas de plata

Se utilizaron varias técnicas para caracterizar los sistemas coloidales sintetizados mediante reducción química. Entre ellas, se encuentran la espectrofotometría UV-visible, y la microscopía electrónica de transmisión (TEM). El objetivo de estas técnicas fue revelar el tamaño y la morfología de los sistemas.

#### 3.2.1 Espectrofotometría UV-Visible

Para caracterizar las suspensiones coloidales se empleó la técnica de espectrofotometría UV-visible con un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. Se dispusieron alícuotas de aproximadamente 3 mL de la solución resultante de la síntesis para añadir las a una celda de cuarzo y realizar un barrido desde 240 nm hasta 600 nm después de la reacción de formación.

#### 3.2.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Para determinar el tamaño, la forma y el estado de agregación de las nanopartículas de plata (AgNPs) en suspensión coloidal, se empleó la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de alta resolución. Las observaciones se realizaron utilizando un microscopio electrónico JEOL, modelo JEM 2100, equipado con un filamento de hexaboruro de lantano (LaB<sub>6</sub>) y operando a un voltaje de aceleración de 200 kV.

### 3.3 Determinación de la actividad microbiológica

#### 3.3.1 Determinación de Concentración mínima inhibitoria (CMI)

El método de microdilución en caldo para la estimación de los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) incubando las bacterias *Staphylococcus aureus*

(ATCC 43300) según las directrices del protocolo CLSI (M07-A10, 2012), Inicialmente se preparó un preinóculo de *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300) resistente a Meticilina (SARM), una colonia depositada en 3mL de caldo Muller-Hilton (MH), se deja en el Shaker (marca) durante 12h a 37°C y 200rpm. Luego se prepara el inóculo donde se tiene 9 ml de caldo Muller-Hilton (MH) y se agrega 1 mL del preinóculo de *S. aureus*. Posteriormente, se realiza el montaje por triplicado de 100 µL de este inóculo bacteriano en microplacas de fondo en U que previamente contenían AgNPs a diferentes concentraciones (2, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 75 y 100 µl) a 37°C con una agitación de 200rpm, las diluciones que se prepararon para CMI se encuentran en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.**

*Volúmenes utilizados (µL) de coloide de plata, suspensión bacteriana y PBS para las diluciones en el ensayo de CMI.*

	Coloide de plata µ	Bacteria(B)	PBS
1	100 µl	100 µl	0 µl
2	75 µl	100 µl	25 µl
3	50 µl	100 µl	50 µl
4	25 µl	100 µl	75 µl
5	12.5 µl	100 µl	87.5 µl
6	6.25 µl	100 µl	93.7 µl
7	3.12 µl	100 µl	90.8 µl
8	2 µl	100 µl	98 µl

### 3.3.2 Halos de inhibición

Se realizó el ensayo de actividad antibacteriana en medio sólido como se describe en el método de difusión de disco para antibióticos (Bauer et al., 1966). Inicialmente, se preparó un inóculo del microorganismo a una concentración corresponde a  $\sim 1 \times 10^6$  unidades formadoras de

colonias (UFC)/mL (McFarland, 1907), el cual fue usado para sembrar en 6 superficie de placas petri que contenían agar Muller-Hilton (MH). Posteriormente, se adicionaron pocillos hechos manualmente (para los sistemas con soluciones de nanopartículas) de diámetro 2 mm agregando 10 $\mu$ L de las diferentes síntesis de AgNPs.

### 3.4 Evaluación De Concentración Mínima Hemolítica (CMH)

Se utilizó una solución salina isotónica PBS (1X: 130mM NaCl, 3mM KCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 1,5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) como diluyente y medio de suspensión para el lavado de los eritrocitos y se empleó Triton X-100 al 0,5 % como agente lítico positivo. La sangre de caballo (Thermo Scientific, REF: SR0048C), y se obtuvo conforme a las normas éticas internacionales. Para la preparación de los eritrocitos, la sangre se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y el sedimento celular se lavó tres veces con PBS a pH 7,4 para obtener los glóbulos rojos. Se añadieron AgNPs (100, 75, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 y 2  $\mu$ L). Las cantidades escogidas se muestran en la **Tabla 2**. A estos posos se les agrega 100  $\mu$ L de sangre y el volumen se completa hasta 200  $\mu$ L con tampón PBS a pH 7,4. Luego las muestras se incubaron a 37 °C durante una hora. Al finalizar el período de incubación, se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos para separar los eritrocitos intactos del sobrenadante. La absorbancia del sobrenadante de cada pozo se midió espectrofotométricamente a una longitud de onda de 430 nm. La actividad hemolítica se calculó como porcentaje de hemólisis (en % Hem.), utilizando la siguiente ecuación:

$$\%Hem = \frac{A_s - A_o}{A_{100} - A_o} \times 100 \quad (7)$$

A<sub>s</sub> es la absorbancia de la muestra, A<sub>100</sub> es la absorbancia del control positivo y A<sub>0</sub> es la absorbancia del control negativo.

### **3.5 Desarrollo de hidrogeles con nanopartículas de plata (AgNPs)**

#### ***3.5.1 Preparación del hidrogel***

Para la preparación de los hidrogeles se emplearon cinco concentraciones distintas de poloxámero 407 (5 %, 10 %, 15 %, 20 % y 25 % en peso). Cada una de las preparaciones se realizó con un volumen final de 50 mL y agua tipo I como medio dispersante. La cantidad correspondiente de poloxámero 407 se añadió gradualmente a un frasco Schott que contenía agua tipo I a una temperatura de 4 °C, manteniéndose bajo agitación constante a 350 rpm y en baño de hielo. Posteriormente, se evaluó el comportamiento termo-sensible de cada una de las soluciones, a las que se sometió a distintas temperaturas: 24 °C, correspondiente a la temperatura ambiente promedio; 37 °C, correspondiente a la temperatura corporal, y temperaturas inferiores a 10 °C.

#### ***3.5.2 Incorporación de las AgNPs***

Una vez obtenidos los hidrogeles de poloxámero 407 a concentraciones del 20 % y del 25 %, seleccionados previamente por su adecuado comportamiento termo-reversible, se procedió a la incorporación de nanopartículas de plata (AgNPs). Con base en los ensayos preliminares de caracterización físico-química y biológica, se seleccionaron dos tipos de AgNPs para su encapsulación.

### **3.6 Ensayo biológico de inhibición bacteriana del hidrogel**

La actividad antibacteriana de los hidrogeles cargados con nanopartículas de plata (AgNPs) se evaluó mediante el método de difusión en agar, específicamente mediante el ensayo de halos de inhibición frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Se preparó un inóculo de la bacteria ajustado a  $\sim 1 \times 10^6$  UFC/mL, el cual se usó para sembrar en la superficie de placas petri que contenían agar Müller-Hilton (MH). Posteriormente, se añadieron sensidiscos de papel filtro Whatman de 6 mm de diámetro impregnados de 10  $\mu$ l de hidrogel de poloxámero cargada con

AgNPs. Tras la incubación a 37 °C durante 12 horas, se determinó la inhibición midiendo el diámetro del halo de inhibición que se formó alrededor del disco. Se emplearon controles positivos de antibiótico oxacilina (10 µL/disco), a una concentración final de 3 mg/mL, y un control negativo, que corresponde al hidrogel sin incorporación de AgNPs.

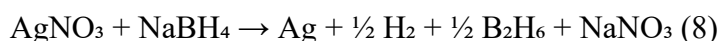
## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Síntesis y caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de plata (AgNPs)

Se obtuvo AgNPs en soluciones coloidales variando el agente reductor y la velocidad de agitación después de la reacción bajo las condiciones descritas en la **Figura 2**. La caracterización de las AgNPs mostró que las nanopartículas mostraban diferentes morfologías y tamaños.

#### 4.1.1 Reducción con borohidruro de sodio

Se sintetizaron dos tipos de nanopartículas de plata (AgNPs) empleando como agente reductor borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>), variando la temperatura de reacción y el tiempo de agitación. Las **Figuras 7A-B** muestran micrografías TEM y la **Figuras 8 y 9** muestran la espectroscopia UV-vis de nanopartículas de plata (AgNPs) sintetizadas usando NaBH<sub>4</sub> como agente reductor. A) fueron obtenidas a 20°C, B) a 5°C. La reacción entre el nitrato de plata y el borohidruro de sodio ha sido previamente descrita (Piñero et al., 2017; Solomon et al., 2007):

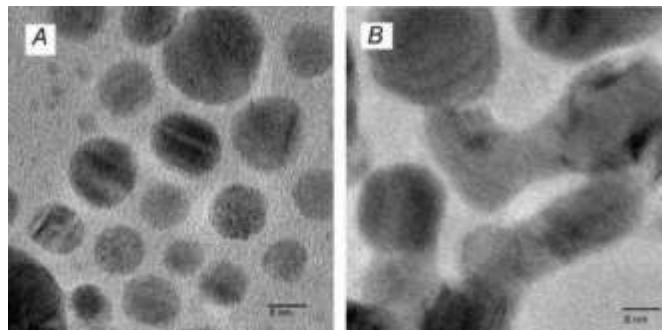


Además, los iones BH<sub>4</sub><sup>-</sup> pueden adsorberse en la superficie de las nanopartículas, actuando como estabilizantes que evitan la agregación. Esta doble función favorece la nucleación y crecimiento de múltiples cúmulos, ya que la adsorción de BH<sub>4</sub><sup>-</sup> limita la aglomeración, permitiendo la formación de nanopartículas de tamaño reducido. Las nanopartículas obtenidas a 20 °C (**Figuras 7A**) presentan una morfología cuasi-esférica con bordes suaves y escasa

agregación. La alta dispersión individual observada confirma la capacidad reductora del  $\text{NaBH}_4$  y su eficacia para controlar el tamaño mediante la adsorción superficial del anión  $\text{BH}_4^-$ .

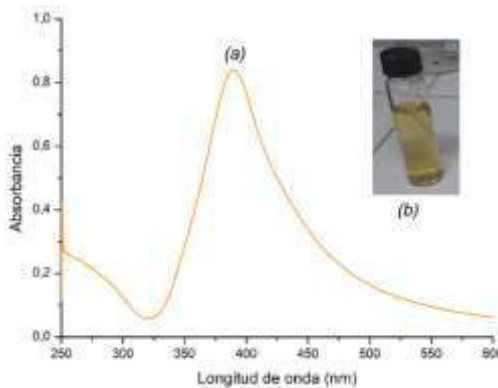
**Figura 7.**

*Imágenes TEM de las nanopartículas sintetizadas utilizando  $\text{NaBH}_4$  como agente reductor. A) obtenidas a  $20^\circ\text{C}$ , B) a  $5^\circ\text{C}$ .*



**Figura 8.**

*Espectro de absorbanca de UV- Vis de una solución coloidal sintetizada de acuerdo a condiciones estándares 15mL AgNO<sub>3</sub> 1mM, 45 mL NaBH<sub>4</sub> 2mM, T = 20 °C*



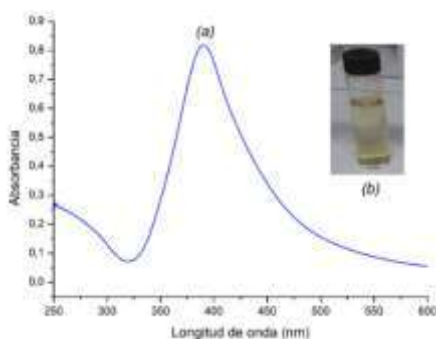
*Nota: (a) Gráfica de espectroscopía UV-Vis. Absorbanca máxima a  $\lambda = 389,5$  nm y (b) Imagen de la muestra obtenida del coloide característico.*

El espectro UV-Vis correspondiente (**Figura 8**) muestra un pico de absorción centrado alrededor de los 389,5 nm, característico de la resonancia de plasmones superficiales localizada (LSPR) de nanopartículas esféricas de plata las cuales están bien dispersas. La forma simétrica y definida del pico, sin presencia de picos secundarios ni hombros, indica la ausencia de agregados o geometrías anisotrópicas. Estos resultados sugieren un sistema coloidal estable con interacción óptica homogénea. Por tanto, la síntesis a 20 °C permitió obtener AgNPs pequeñas, esféricas y altamente estables, adecuadas para aplicaciones que requieren control de tamaño y buena estabilidad coloidal. **Las Figuras 7B** muestran la morfología de las nanopartículas sintetizadas a 5 °C. La reducción de la temperatura provocó un aumento en el tamaño promedio de las partículas, lo cual puede explicarse por una menor energía disponible para la formación de nuevos núcleos.

Dado que la energía de nucleación es mayor que la de crecimiento, a bajas temperaturas se reduce la formación de nuevos núcleos y se favorece el crecimiento de los ya existentes. Además, una menor adsorción de  $\text{BH}_4^-$  a la superficie cristalina de las nanopartículas podría dejar mayor cantidad de este anión en solución, disminuyendo el efecto estabilizante y permitiendo un crecimiento más descontrolado.

### Figura 9.

*Espectro de absorbanza de UV- Vis de una solución coloidal sintetizada de acuerdo a condiciones estándares 15mL  $\text{AgNO}_3$  1mM, 45 mL  $\text{NaBH}_4$  2mM,  $T = 5^\circ\text{C}$*



*Nota: (a) Gráfica de espectroscopía UV-Vis. Absorbancia máxima a  $\lambda = 390,5 \text{ nm}$  y (b) Imagen de la muestra obtenida del coloide característico.*

El espectro UV-Vis correspondiente (**Figura 9**) presenta un pico centrado en torno a los 390,5 nm, sin picos secundarios ni hombros, lo que indica una distribución de tamaño y forma relativamente homogénea. Sin embargo, la intensidad del pico es ligeramente menor respecto a la muestra sintetizada a  $20^\circ\text{C}$ , lo cual podría deberse a una menor tasa de nucleación y, por tanto, a una menor concentración de nanopartículas formadas. La menor energía cinética de los reactivos

a bajas temperaturas reduce tanto la velocidad de reducción del  $\text{Ag}^+$  como la coalescencia de los núcleos metálicos.

#### **4.1.2 Reducción con ácido ascórbico**

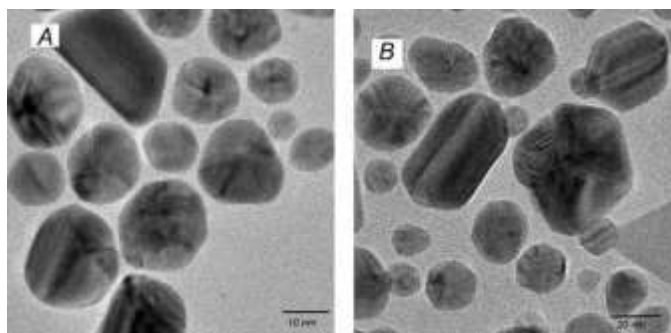
Se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) utilizando ácido ascórbico como agente reductor bajo condiciones controladas de temperatura: 50 °C y 30 °C. **Las Figuras 10 A-B** muestran la morfología de las nanopartículas obtenidas, donde se evidencian cambios en la forma y tamaño de las partículas en función de la temperatura de síntesis. La reducción de los iones  $\text{Ag}^+$  ocurre conforme a la reacción química de acuerdo con la reacción propuesta por Sondi et al. (2003):



Debido a que el poder reductor del ácido ascórbico es menor al del  $\text{NaBH}_4$ , fue necesario elevar la temperatura de síntesis para favorecer la formación de nanopartículas. A 50 °C (**Figura 10A**), las nanopartículas presentaron morfología poliédrica y un tamaño mayor que las obtenidas con  $\text{NaBH}_4$ , asociado a los procesos de nucleación y crecimiento. Aunque hubo variaciones de temperatura, en ambos casos los iones  $\text{Ag}^+$  se redujeron preferentemente sobre núcleos preexistentes, generando partículas facetadas tras una primera etapa de crecimiento de nanopartículas esféricas. En la **Figura 11** se muestra el espectro de absorbancia UV-Vis de una solución coloidal de nanopartículas de plata (AgNPs), sintetizadas a una temperatura de 50 °C utilizando como agente reductor ácido ascórbico en una concentración de 0.5 mM y nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) a 10 mM, en proporciones de 16 mL y 3.2 mL respectivamente.

**Figura 10.**

*Imágenes TEM de las nanopartículas sintetizadas utilizando ácido ascórbico como agente reductor. A) obtenidas a 50°C, B) a 20°C.*



En el gráfico se representa la longitud de onda en el eje X y la absorbancia en el eje Y, en un rango de 250 a 600 nm. Se observa una curva con un pico máximo de absorbancia centrado aproximadamente en 410 nm, característico de la resonancia de plasmones superficiales (SPR, por sus siglas en inglés) de las nanopartículas de plata. Este pico indica la formación efectiva de AgNPs en la solución. Este pico es característico de las nanopartículas de plata esféricas o ligeramente poliédricas, con tamaños generalmente en el rango de 20 a 50 nm (Paramelle et al., 2014). La presencia de este pico y la simetría de la curva indican una buena distribución del tamaño de las nanopartículas y una alta estabilidad coloidal. Por otra parte, la forma de la curva es simétrica y presenta una pendiente ascendente desde los 350 nm hasta el pico, seguida de una disminución suave hacia longitudes de onda mayores. Esta morfología espectral sugiere que las nanopartículas están bien dispersas en el medio coloidal y no presentan agregación significativa.

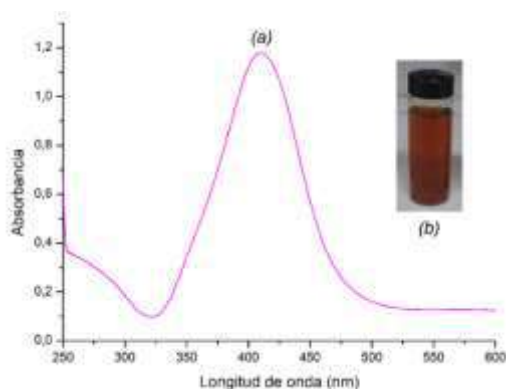
De igual manera podemos observar que la síntesis a 50 °C favorece una reducción más rápida de los iones  $\text{Ag}^+$  por el ácido ascórbico, promoviendo una nucleación más definida y ayuda a un crecimiento controlado de las partículas (Sondi & Salopek-Sondi, 2004). Lo cual se vio

reflejado en la intensidad del pico y la ausencia de señales secundarias que indicarían aglomeración o formación de partículas de mayor tamaño.

Al comparar con la literatura, se ha reportado que las nanopartículas de plata sintetizadas con ácido ascórbico muestran picos SPR entre **410 y 450 nm**, dependiendo de la concentración de reactivos, pH y temperatura (Ashkarran et al., 2012). Nuestros resultados concuerdan con estos valores, lo que respalda la reproducibilidad del método.

### Figura 11.

*Espectro de absorbanza de UV- Vis de una solución coloidal sintetizada de acuerdo a condiciones estándares 3.2 mL AgNO<sub>3</sub> 10mM, 16 mL ácido ascórbico 0,5mM, T = 50 °C*



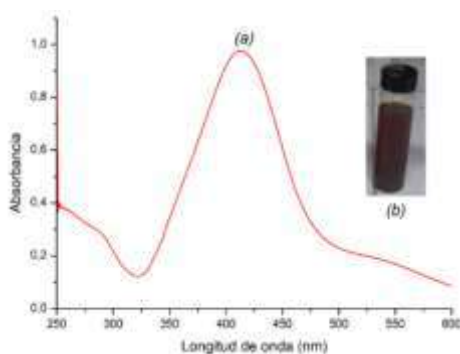
En la **Figura 10B** corresponde a la micrografía TEM de la síntesis por reducción química de AgNPs a 30 °C, las AgNPs mostraron morfología similar, con un leve aumento en tamaño, resultado que se puede atribuir a la etapa de un crecimiento más lento debido a la menor energía disponible. Estas partículas presentaron diferentes densidades electrónicas en la superficie, afectando la interacción iónica y los procesos de recubrimientos.

En la **Figura 12** se muestra el espectro de absorbanza UV-Vis de una solución coloidal de nanopartículas de plata (AgNPs), sintetizadas a una temperatura de **30 °C** utilizando como agente

reductor ácido ascórbico en una concentración de 0.5 mM y nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) a 10 mM, en proporciones de 16 mL y 3.2 mL respectivamente. En el gráfico, la curva presenta un pico de absorbancia en 413 nm, aunque ligeramente más ancho que es que fue sometido a 50°C. También se observa una depresión entre 300 y 350 nm. Este desplazamiento y aumento en el ancho del pico pueden atribuirse a una mayor dispersión en el tamaño de las partículas, o incluso a una posible tendencia a la agregación parcial, lo cual puede ser más frecuente a temperaturas bajas donde el proceso de nucleación y crecimiento es más lento y menos eficiente (Sondi & Salopek-Sondi, 2004). Según Paramelle et al. (2014), una mayor dispersión de tamaños y una menor estabilización coloidal tienden a generar bandas SPR más amplias y desplazadas hacia longitudes de onda mayores. Estos resultados sugieren que la síntesis a 30 °C no favorece un control tan preciso sobre el tamaño y la morfología de las partículas como sí ocurre a temperaturas más altas como 50 °C.

### Figura 12.

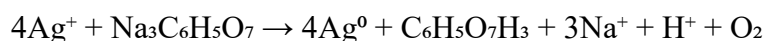
*Espectro de absorbancia de UV- Vis de una solución coloidal sintetizada de acuerdo a condiciones estándares 3.2 mL  $\text{AgNO}_3$  10mM, 16 mL ácido ascórbico 0,5mM,  $T = 30^\circ\text{C}$*



En resumen, aunque ambas temperaturas permiten la síntesis de AgNPs, la eficiencia de la formación y estabilidad de las nanopartículas mejora al aumentar la temperatura de reacción, lo que se traduce en espectros más definidos y centrados a menores longitudes de onda.

#### 4.1.3 Reducción con citrato de sodio

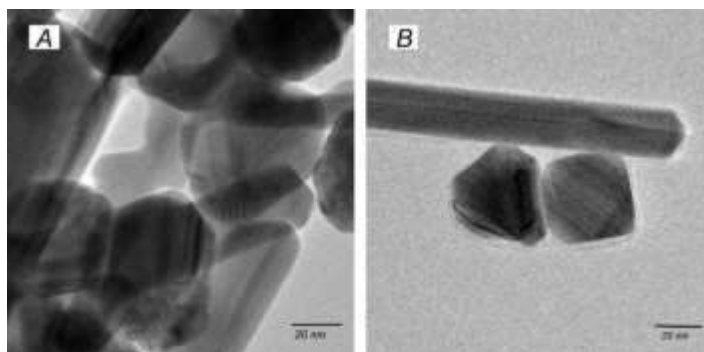
Las micrografías TEM de las nanopartículas sintetizadas utilizando citrato de sodio como agente reductor se muestran en la **Figura 13**. Ambas síntesis se realizaron a 85 °C, siguiendo el método clásico de Turkevich (Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, 1951) como referencia, variando la duración de la síntesis de 11 minutos (figuras 13A) a 30 minutos (**Figura 13B**). En este caso, la reducción de la plata ocurre mediante la siguiente reacción (Siileikaite et al., 2006):



Las nanopartículas obtenidas utilizando citrato de sodio como agente reductor a 85 °C fueron más largas que aquellas obtenidas usando borohidruro de sodio o ácido ascórbico. Las nanopartículas sintetizadas durante 11 minutos (**Figura 13A**) mostraron una distribución de tamaño amplia. Estas variaciones probablemente están relacionadas con el proceso de nucleación-crecimiento.

#### **Figura 13.**

*Imágenes TEM de las nanopartículas sintetizadas utilizando citrato de sodio como agente reductor. A) se mantuvieron a 85 °C durante 11 minutos, y b) se mantuvieron a 85 °C durante 30 minutos.*

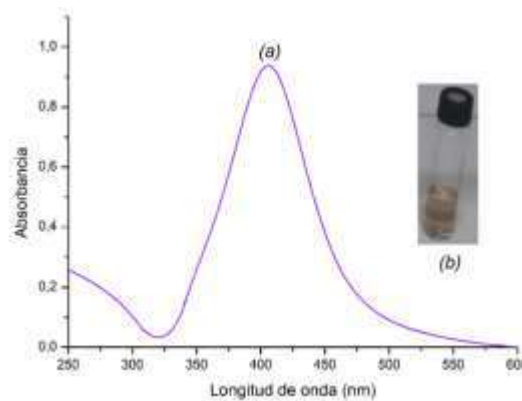


Bajo estas condiciones experimentales se observa una distribución densa de nanopartículas con formas irregulares y cierta tendencia a la aglomeración, lo que nos da a entender el sistema

poseía suficiente energía para promover la formación de nuevas semillas, pudiendo formarse nuevos núcleos mientras la reacción continuaba. Los núcleos iniciales tienen más tiempo para crecer, lo que resulta en nanopartículas más grandes mayoría de forma cuasi-esférica, también formas de agujas o varillas. La **Figura 14** muestra el espectro de absorción UV-Vis de una solución coloidal de nanopartículas de plata (AgNPs) sintetizadas mediante el método de Turkevich, utilizando citrato de sodio como agente reductor. El eje X representa la longitud de onda (nm), en el rango de 250 a 600 nm, mientras que el eje Y muestra la absorbancia de la muestra.

**Figura 14.**

*Espectro de absorción de UV-Vis de una solución coloidal sintetizada de acuerdo a condiciones estándares 50 mL AgNO<sub>3</sub> 1mM, 5 mL citrato de sodio 3,4x10<sup>-2</sup>mM, T = 85 °C durante 11 minutos.*



Nota: (a) Gráfica de espectroscopía UV-Vis. Absorbancia máxima a  $\lambda = 420 \text{ nm}$  y (b) Imagen de la muestra obtenida del coloide característico.

Se observa una banda de absorción intensa centrada aproximadamente en los 420 nm, correspondiente a la resonancia de plasmones de superficie (SPR) típica de nanopartículas de plata irregulares. Esta banda presenta una forma angosta y poco simétrica, lo cual nos da a entender que

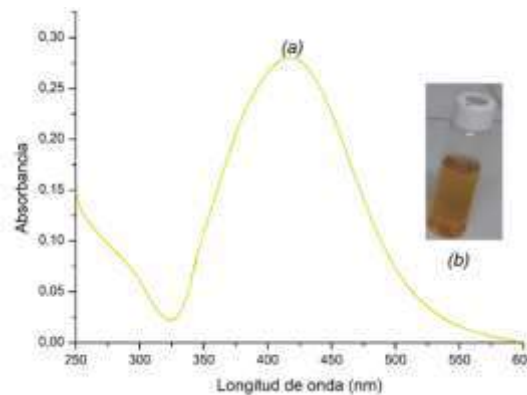
tendremos varios tamaños y morfologías presentes en la síntesis, entre ellos partículas pequeñas. Esto se evidenció durante la realización del procedimiento, ya que, al excederse el tiempo de agitación, aumentar ligeramente la temperatura o presentarse alguna alteración en las condiciones ambientales, no se obtenía el color esperado en la síntesis. En varias ocasiones, el producto resultó con tonalidades turbias o amarillas, cuando lo esperado era un color rosado salmón o una tonalidad más clara. En la **Figura 13B** se presenta la imagen TEM de las nanopartículas de plata obtenidas a 30 °C presentaron un tamaño y forma similares, con un ligero incremento en sus dimensiones, esta diferencia puede atribuirse a la etapa de crecimiento, con menor energía disponible, y a la reducción que ocurre en los planos principales, favoreciendo la formación de partículas alargadas.

La **Figura 15** muestra el espectro de absorbancia UV-Vis de una solución coloidal de nanopartículas de plata (AgNPs), sintetizadas mediante el método clásico de Turkevich., en la misma se observa una banda de absorción principal centrada cerca de los 440 nm, característica de la resonancia de plasmones de superficie (SPR) en nanopartículas de plata. La curva presenta una forma más ancha y menos simétrica que la observada en la síntesis a 11 minutos, indicando una mayor heterogeneidad en tamaño y forma de las partículas. Además, en la región de 250–340 nm, se nota un leve descenso en la absorbancia, típico de la absorción por otros compuestos presentes o por pequeñas partículas sin formación completa de plasmones. Las micrografías TEM respaldan los resultados obtenidos mediante espectroscopía UV-Vis al evidenciar la evolución morfológica de las nanopartículas de plata (AgNPs) en función del tiempo de reacción. A los 11 minutos, se observa una alta densidad de nanopartículas pequeñas con distribución de tamaños relativamente homogénea. Esta morfología se correlaciona con un pico de absorción SPR más intenso y centrado en 420 nm, típico de nanopartículas esféricas o cuasi-esféricas de pequeño tamaño (Samrot et al., 2021).

En contraste, a los 30 minutos, las imágenes TEM revelan un crecimiento significativo en el tamaño de las partículas, así como la aparición de morfologías más complejas. Este cambio estructural se refleja en el corrimiento del pico SPR hacia 440 nm y una disminución en la intensidad de absorción, lo cual sugiere una menor proporción de partículas pequeñas y un aumento en la heterogeneidad de formas y tamaños. Dichos resultados indican que, con tiempos de reacción más prolongados, tiene lugar una maduración morfológica influenciada por procesos como la migración superficial de átomos y la maduración de Ostwald (Zhou et al., 2020).

### Figura 15.

*Espectro de absorción de UV-Vis de una solución coloidal sintetizada de acuerdo a condiciones estándares 50 mL AgNO<sub>3</sub> 1mM, 5 mL citrato de sodio 3,4x10<sup>-2</sup>mM, T = 85 °C durante 30 minutos*



*Nota:* (a) Gráfica de espectroscopía UV-Vis. Absorbancia máxima a  $\lambda = 440 \text{ nm}$  y (b)

Imagen de la muestra obtenida del coloide característico.

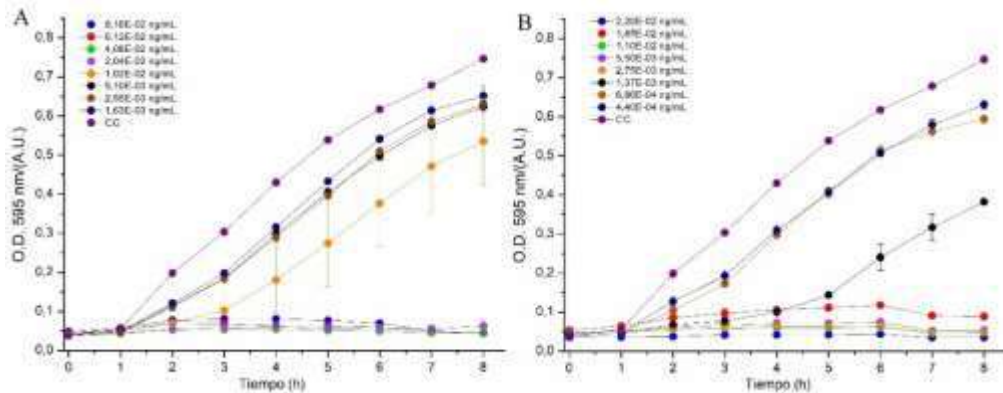
## 4.2 Actividad microbiológica

#### **4.2.1 Concentración mínima inhibitoria**

Luego de realizar las respectivas síntesis, Se realizó la cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300) en presencia de las AgNPs sintetizadas a diferentes concentraciones siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.1. En la **Figura 16** se muestra la cinética de crecimiento de *S. aureus* en presencia de AgNPs sintetizadas con NaBH<sub>4</sub> como agente reductor, a dos temperaturas distintas: subfigura A a 20 °C y subfigura B a 5 °C. Por su parte, la **Figura 17** presenta la cinética de crecimiento bacteriano en presencia de AgNPs sintetizadas con ácido ascórbico, también en dos condiciones: **Figura 17A** a 50 °C y **Figura 17B** a 30 °C. En ambas Figuras, las gráficas, el eje X representa el tiempo de incubación (horas) y el eje Y indica la densidad óptica (DO) a 600 nm, que refleja el crecimiento bacteriano. En ambos métodos, sin importar el agente reductor, se observaron las curvas de crecimiento bacteriano las cuales se dividen en cuatro fases, las cuales son, la fase de latencia, donde las células bacterianas aumentan de tamaño para comenzar la división celular; la fase logarítmica, donde las células doblan su población a un ritmo constante y exponencial; la fase estacionaria, donde algunas células mueren y otras siguen creciendo y dividiéndose, por lo tanto no hay aumento o disminución en el número de células; y la fase de muerte, donde la velocidad de muerte celular es cada vez mayor a medida que transcurre el tiempo (Amin et al., 2009).

**Figura 16.**

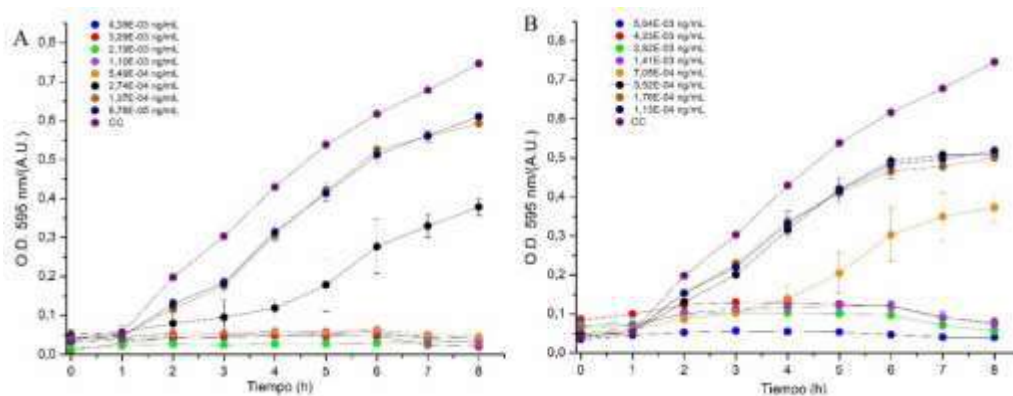
*Cinética de crecimiento de S. aureus en presencia de AgNPs sintetizadas utilizando NaBH<sub>4</sub> como agente reductor. A) obtenida a 20°C, B) obtenida a 5°C.*



En general, se evidenció un efecto inhibitorio creciente con el aumento de la concentración de AgNPs. Por ejemplo, En la **Figura 16A** (20 °C), se observa que a medida que aumenta la concentración de AgNPs, la DO disminuye considerablemente, indicando una inhibición más efectiva del crecimiento bacteriano. En contraste, en la **Figura 16B** (5 °C), aunque también hay inhibición, esta es menos pronunciada en comparación con la obtenida a 20 °C, lo que sugiere que la temperatura de síntesis afecta la actividad antimicrobiana de las AgNPs. En la **Figura 17A** (50 °C), se evidencia un efecto inhibitorio significativo desde concentraciones medias, alcanzando una inhibición cercana al 100 % a 100  $\mu$ L (2,20E-02 ng/mL). La **Figura 17B** (30 °C), aunque muestra un patrón similar, presenta una menor eficacia en las concentraciones más bajas, lo que indica que la temperatura más alta favorece una mejor actividad biológica de las nanopartículas.

**Figura 17.**

*Cinética de crecimiento de S. aureus en presencia de AgNPs sintetizadas utilizando ácido ascórbico como agente reductor. A) obtenida a 50°C, B) obtenida a 30°C.*



Asimismo, se notó que la eficiencia antimicrobiana también dependía del método de síntesis. Por ejemplo, a 12.5 µL, el método con ácido ascórbico a 50 °C mostró una inhibición del 99,61 %, superior a la obtenida con NaBH<sub>4</sub> a 5 °C que fue del 99,25 % pero debemos tener en cuenta que la diferencia de temperatura es de 45 °C, Y si comparamos entre las que fueron sintetizadas con NaBH<sub>4</sub> a 5 °C muestra una inhibición del 99,25 % , superior a las obtenidas a 5 °C que fue de 29,71%,. Esto sugiere que la temperatura de síntesis y el tipo de agente reductor influyen en las propiedades fisicoquímicas de las AgNPs, como el tamaño y la estabilidad, lo cual impacta directamente en su actividad antimicrobiana (Hosseini et al., 2020; Raza et al., 2021).

Comparando con literatura reciente, diversos estudios respaldan que las AgNPs actúan alterando la membrana celular bacteriana, generando especies reactivas de oxígeno y afectando funciones intracelulares (Zhang et al., 2021). Además, la mayor actividad observada a temperaturas más altas (50 °C vs. 5 °C o 30 °C) podría deberse a una mejor dispersión y menor agregación de las partículas, favoreciendo una mayor interacción con la membrana celular bacteriana (Wang et al., 2022).

**Tabla 3.**

*Concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas para las nanopartículas sintetizadas.*

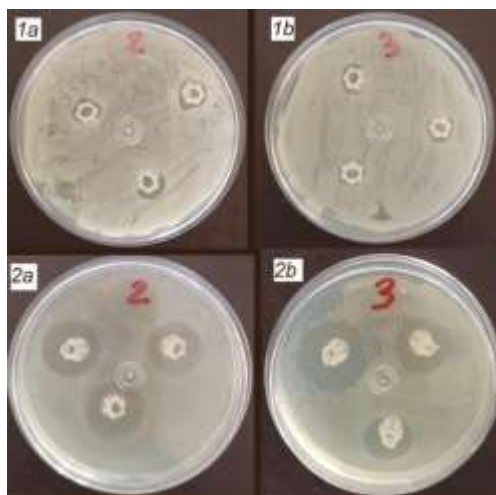
Método	CMI (ng/mL)
1	De $2.04 \times 10^{-02}$ a $8.13 \times 10^{-02}$
2	De $2.75 \times 10^{-03}$ a $2.20 \times 10^{-02}$
3	De $5.49 \times 10^{-04}$ a $4.39 \times 10^{-03}$
4	De $1.41 \times 10^{-03}$ a $5.64 \times 10^{-03}$

#### 4.2.2 Halos de inhibición

El ensayo de halos de inhibición se realizó con bacterias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), en presencia de AgNPs, tras la síntesis por reducción química con borohidruro sódico a 5 °C y con ácido ascórbico a 50 °C, ya que en el análisis por espectrofotometría UV-visible estas presentaron menos afectaciones por el entorno, fueron más sencillas de llevar a cabo y ofrecieron mayor estabilidad en el proceso de síntesis. Además, ambas mostraron altos porcentajes de inhibición, lo que las convierte en opciones más eficientes para su uso en hidrogeles. Otro factor relevante es que estas síntesis requieren un menor volumen de reactivos, lo que representa una alternativa más económica y viable para aplicaciones posteriores. Siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.2.

**Figura 18.**

*Efecto de inhibición de Staphylococcus aureus (ATCC 43300) cultivada en medio Muller-Hilton (MH), utilizando AgNPs sintetizadas con diferentes agentes reductores.*



Tener en cuenta que a) Borohidruro de sodio a 5°C b) Ácido ascórbico a 50°C 1) Coloide envejecido, 2) Coloide recién realizado. Durante el ensayo de actividad antibacteriana en placas de agar, llevado a cabo mediante el método de Kirby-Bauer, se observaron halos de inhibición con diámetros que oscilaron entre los 6 y 8 mm al utilizar un coloide de nanopartículas de plata (AgNPs) con aproximadamente cuatro meses de almacenamiento a 4 °C. En contraste, cuando se emplearon coloides recién sintetizados (con apenas 12 horas de preparación), los halos alcanzaron diámetros más amplios, entre 12 y 15 mm (ver **Tabla 4**). Esta diferencia sugiere una pérdida de efectividad en las nanopartículas a medida que envejecen, y los resultados coinciden con los obtenidos mediante el método de microdilución, conocido por su mayor sensibilidad en la detección de actividad antimicrobiana. Cabe destacar que las mediciones de los halos se realizaron con una precisión de 1 mm, lo que deja un margen para pequeñas variaciones o posibles errores de medición. Sin embargo, los resultados obtenidos

permiten evidenciar claramente la capacidad inhibidora de las AgNPs frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* evaluada.

**Tabla 4.**

*Diámetros de inhibición de S. aureus ATCC 43300 en presencia de las AgNPs sintetizadas por el método de difusión de disco.*

Agente reductor	Nomenclatur	Concentración de AgNPs (ng/mL)	Halo de inhibición (mm)
Borohidruro de sodio	1a	$2,20 \times 10^{-03}$	$6 \pm 0,138$
	2a	$2,20 \times 10^{-03}$	$13 \pm 0,372$
Ácido ascórbico	1b	$4,39 \times 10^{-04}$	$7 \pm 0,255$
	2 b	$4,39 \times 10^{-04}$	$15 \pm 0,487$

Sin embargo, otros estudios han señalado que tanto la frescura del coloide como su estabilidad coloidal son factores clave para mantener la eficacia antimicrobiana de las AgNPs. Se ha comprobado que, con el tiempo, procesos como la aglomeración o la oxidación parcial de las nanopartículas pueden afectar negativamente su capacidad para interactuar con la membrana celular de las bacterias, reduciendo su actividad antibacteriana (Singh et al., 2021; Lima et al., 2023). Así, los resultados de este estudio confirman que las nanopartículas de plata poseen un efecto antibacteriano considerable frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), tanto en microdilución como en difusión en agar. Además, se evidencia que el tiempo de almacenamiento influye significativamente en su desempeño: los coloides frescos presentan una mayor capacidad inhibitoria. Este hallazgo resalta la importancia de optimizar y controlar no solo las condiciones

de síntesis, sino también las de conservación, ya que ambas afectan directamente la estabilidad de las nanopartículas y, por ende, su efectividad. Estos resultados están respaldados por investigaciones recientes que destacan el impacto de la frescura del coloide y del método de síntesis sobre la acción biológica de las AgNPs (Gupta et al., 2020; Ghosh et al., 2022).

### 4.3 Evaluación hemolítica

Para evaluar la citotoxicidad in vitro de los péptidos, se utilizaron células Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 y se midió la actividad hemolítica de nanopartículas de plata (AgNPs) sintetizadas con distintos agentes reductores ( $\text{NaBH}_4$ , ácido ascórbico y citrato de sodio) bajo diversas condiciones. Los resultados se presentan en las **Figuras 19-21**, donde se muestra el porcentaje de hemólisis en función de la concentración de AgNPs (ng/mL). Se empleó Triton X-100 como control positivo, produciendo 100% de hemólisis.

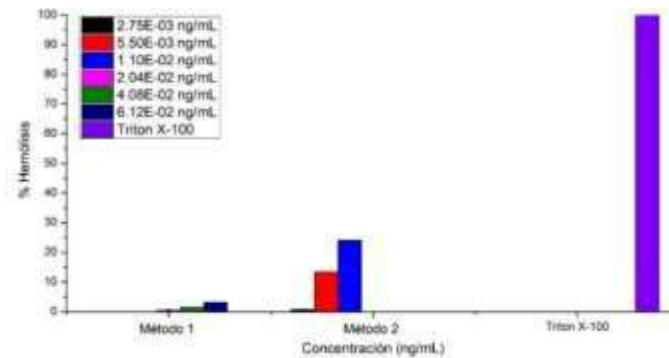
En la **Figura 19** ( $\text{NaBH}_4$  a  $20^\circ\text{C}$ ), se observó una relación dosis-dependiente, alcanzando un máximo de  $3,19 \pm 0,02\%$  de hemólisis a la mayor concentración ( $6,12\text{E-}02$  ng/mL). En contraste, a  $5^\circ\text{C}$  (Ensayo 2), las AgNPs mostraron un efecto inhibitorio, con hasta  $24,00 \pm 0,2\%$  de inhibición. Con ácido ascórbico, las AgNPs sintetizadas a  $50^\circ\text{C}$  (Ensayo 3) alcanzaron un máximo de  $10,52 \pm 1,3\%$  de hemólisis, mientras que a  $30^\circ\text{C}$  (Ensayo 4), la hemólisis fue mayor ( $22,55 \pm 0,01\%$ ). Las AgNPs sintetizadas con citrato de sodio mostraron mayor actividad hemolítica:  $31,10 \pm 0,1\%$  a  $1,14\text{E-}04$  ng/mL (Ensayo 5) y  $36,97 \pm 0,7\%$  a  $4,12\text{E-}05$  ng/mL (Ensayo 6), incrementándose con la concentración.

En conjunto, los resultados indican que la hemólisis inducida por AgNPs depende de la concentración, el agente reductor y la temperatura de síntesis. En general, temperaturas elevadas ( $30^\circ\text{C}$  y  $50^\circ\text{C}$ ) produjeron nanopartículas con mayor actividad hemolítica, posiblemente debido a

características fisicoquímicas como menor tamaño o mayor carga superficial, que favorecen su interacción con la membrana eritrocitaria.

**Figura 19.**

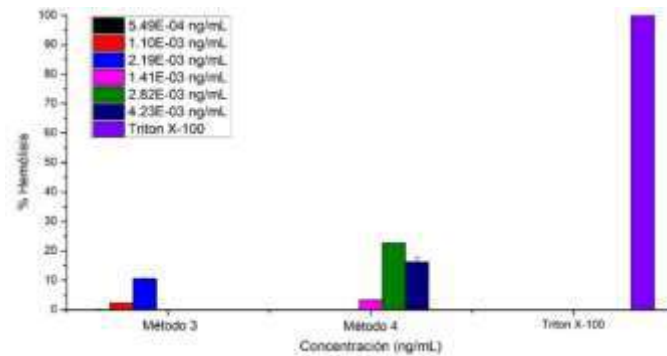
*Actividad hemolítica en presencia de AgNPs sintetizadas utilizando  $\text{NaBH}_4$  como agente reductor. Método 1) a 20 °C; Método 2) a 5 °C.*



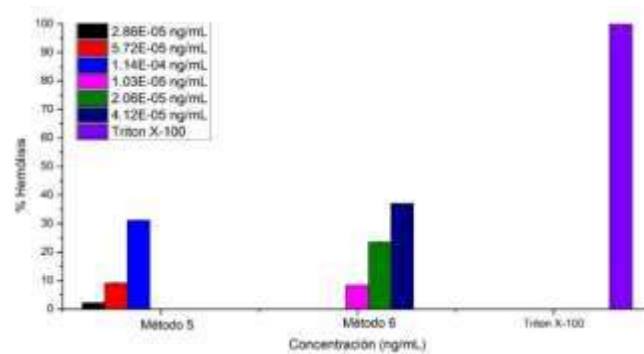
En los ensayos realizados a las AgNPs sintetizadas utilizando ácido ascórbico como agente reductor (**Figura 20**), las AgNPs obtenidas a 30°C presentaron una mayor hemólisis en comparación con las obtenidas a 50°C. Este comportamiento podría estar relacionado con variaciones en la estructura y la carga superficial de las nanopartículas, que influyen en su interacción con la membrana celular. Se sabe que nanopartículas más pequeñas y con una mayor carga superficial positiva tienden a inducir una mayor hemólisis debido a su capacidad para interactuar más intensamente con las membranas de los eritrocitos. Las AgNPs sintetizadas a 30°C probablemente presentaron una forma o distribución de carga que favoreció esta interacción.

**Figura 20.**

*Actividad hemolítica de las AgNPs sintetizadas utilizando ácido ascórbico como agente reductor. Método 3) a 50 °C; Método 4) a 30 °C.*

**Figura 21.**

*Actividad hemolítica de las AgNPs sintetizadas utilizando citrato de sodio como agente reductor. Método 5) a 85 °C durante 11 minutos; Método 6) a 85 °C durante 30 minutos.*



En el caso de las nanopartículas obtenidas con citrato de sodio (**Figura 21**), los resultados también mostraron que el método de síntesis influye en la actividad hemolítica, siendo el Método 6 el que presentó una mayor hemólisis. Las diferencias entre los ensayos pueden estar relacionadas con la forma y el tamaño de las nanopartículas, ya que, en el Método 6, las AgNPs presentaron una mayor interacción con la membrana de los eritrocitos, lo que resultó en una mayor hemólisis.

Este estudio confirma que las condiciones de síntesis, como el agente reductor utilizado y la temperatura de síntesis, tienen un impacto significativo en la actividad hemolítica de las AgNPs. Las nanopartículas sintetizadas a bajas temperaturas (5°C) mostraron un efecto inhibitorio sobre la hemólisis, lo que sugiere que este método podría ser favorable para aplicaciones biomédicas donde se busca minimizar la toxicidad hemolítica. En contraste, las nanopartículas sintetizadas a temperaturas más altas (85°C) presentaron una mayor actividad hemolítica, lo que puede limitar su uso en aplicaciones terapéuticas que requieran biocompatibilidad. Además, las concentraciones más altas de AgNPs generaron un mayor efecto hemolítico, destacando la importancia de la dosis en la toxicidad celular.

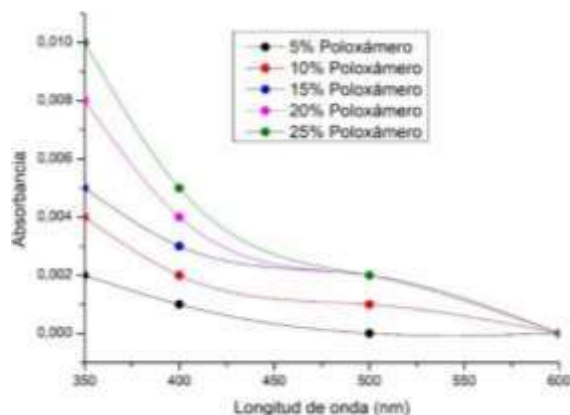
#### **4.4 Desarrollo y evaluación del hidrogel con AgNPs**

##### ***4.4.1. Análisis espectrofotométrico (UV-Vis) de los hidrogeles con diferentes concentraciones de poloxámero 407***

Para evaluar la estabilidad coloidal de las nanopartículas de plata (AgNPs) una vez incorporadas en la matriz del poloxámero, en la **Figura 22** se muestran los espectros UV-Vis obtenidos para hidrogeles de poloxámero 407 preparados con agua tipo I a concentraciones del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % y 25 %. Las mediciones se realizaron en el rango de 350 a 600 nm, registrando en el eje x la longitud de onda (nm) y en el eje y la absorbancia. Como se puede observar, a medida que aumenta la concentración del poloxámero, también lo hace ligeramente la absorbancia, siendo el hidrogel al 25 % el que presentó el valor más alto y el de 5 % el más bajo. Este comportamiento puede estar relacionado con la densidad de la matriz polimérica: cuanto más concentrado está el hidrogel, mayor es la dispersión de la luz dentro del sistema.

**Figura 22.**

*Espectros UV-Vis de hidrogeles de poloxámero 407 a diferentes concentraciones.*



Es importante señalar que en este momento los hidrogeles aún no contienen nanopartículas de plata (AgNPs). Por eso, como era de esperar, no se observa el pico característico de resonancia plasmónica localizado alrededor de los 400 nm, que suele aparecer cuando hay nanopartículas de plata presentes. Las curvas muestran un patrón descendente suave conforme aumenta la longitud de onda, que es típico de los materiales poliméricos sin especies metálicas absorbentes.

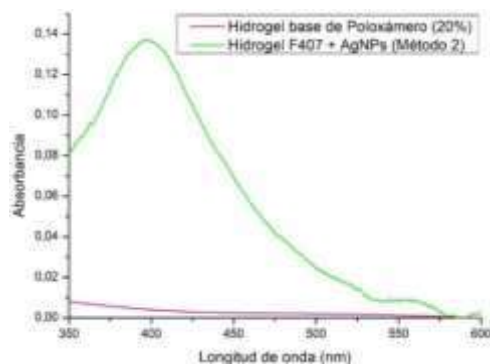
Aunque no se detecta un pico específico, esta evaluación nos permitió confirmar que el poloxámero no genera interferencias espectroscópicas significativas en esta región del espectro. Esto es muy valioso, ya que indica que puede ser una matriz adecuada para incorporar nanopartículas de plata en análisis posteriores sin comprometer la interpretación de los resultados. Por último, se eligió trabajar con agua tipo I y no con PBS, ya que las soluciones salinas como el PBS pueden alterar el comportamiento de los sistemas coloidales cuando se agregan las nanopartículas, favoreciendo su aglomeración debido al aumento de la fuerza iónica del medio (Li et al., 2021).

A partir de esta caracterización, se seleccionó el hidrogel al 20 % como candidato ideal para la siguiente fase del estudio, ya que había demostrado una excelente estabilidad térmica y estructural en pruebas previas en las que se había expuesto a diferentes temperaturas. En particular, el sistema se mantuvo estable tanto a temperatura ambiente como en condiciones fisiológicas (entre 24 y 37 °C), conservando su estructura gelificada de forma reversible. Además, presentó un perfil espectral limpio y consistente, lo que refuerza su potencial como matriz para la incorporación de nanopartículas de plata.

**4.4.1.1 Comparación espectroscópica entre el hidrogel base y el sistema cargado con AgNPs (Método 2).** En la **Figura 23** se muestran los espectros UV-Vis del hidrogel base de poloxámero 407 al 20 % (curvarosada) y del mismo sistema cargado con nanopartículas de plata (AgNPs) sintetizadas mediante el Método 2 (curva verde), evaluados en el rango de 350 a 600 nm. Como se puede ver, el hidrogel sin nanopartículas presenta una absorbancia mínima, lo que confirma que no hay especies absorbentes significativas en esa región del espectro. En cambio, al incorporar las AgNPs, aparece un pico bien definido a 405 nm, característico de la banda de resonancia plasmónica superficial (SPR) de las nanopartículas metálicas.

**Figura 23.**

*Comparación de espectros UV-Vis entre hidrogel de poloxámero 407 al 20% y el mismo sistema cargado con nanopartículas de plata (Método 2).*



Este resultado demuestra que la incorporación de las AgNPs al hidrogel fue un éxito, ya que el surgimiento del pico de absorción en esa zona indica su presencia y estabilidad. Es importante señalar que el coloide de AgNPs sintetizado mediante el método 2, antes de su encapsulación, presentaba un pico máximo a 390,5 nm. El desplazamiento hacia una longitud de onda mayor (405 nm), conocido como red-shift, sugiere una alteración en el entorno dieléctrico de las nanopartículas, atribuible a su interacción con la matriz de poloxámero. Este fenómeno ha sido ampliamente descrito en la literatura científica cuando las nanopartículas metálicas se estabilizan dentro de matrices poliméricas (Pathania et al., 2022; Ghosh et al., 2022).

Además, este desplazamiento puede estar relacionado con un ligero aumento en el tamaño efectivo de las nanopartículas o con interacciones físicas entre ellas dentro del gel. Sin embargo, la conservación de la intensidad del pico indica que no hay una aglomeración significativa, lo cual es esencial para mantener la funcionalidad antimicrobiana del sistema.

Cabe mencionar que las medidas se realizaron en una cubeta de cuarzo con una capacidad de lectura de 3 mL y que, según el protocolo de síntesis y dilución, se estima una concentración

aproximada de  $2,75 \times 10^{-3}$  nanopartículas por cada 100  $\mu\text{L}$  de muestra en el hidrogel final. Las AgNPs empleadas en este sistema se sintetizaron utilizando borohidruro de sodio como agente reductor, en unas condiciones de temperatura controlada de 5 °C, que favorecen la formación de partículas pequeñas y estables. Estos resultados respaldan la elección del hidrogel al 20 % como formulación óptima para continuar con las evaluaciones antimicrobianas, ya que ofrece un entorno adecuado para la estabilización de las AgNPs sin comprometer su actividad.

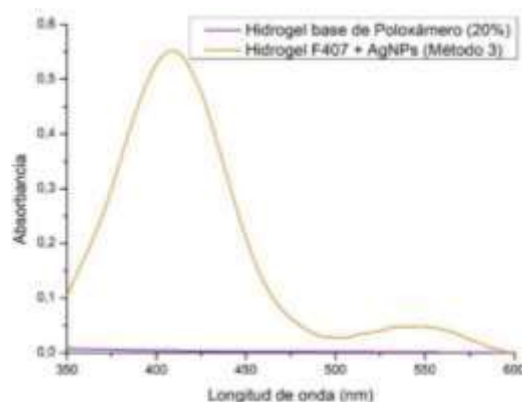
**4.4.1.2 Comparación espectroscópica entre el hidrogel base y el sistema cargado con AgNPs (Método 3).** La **Figura 24** muestra el espectro UV-Vis del hidrogel formulado con poloxámero 407 al 20 % (representado con la línea morada) y del mismo sistema, pero cargado con nanopartículas de plata (AgNPs) sintetizadas mediante el método 3 (línea naranja). Tal y como se observó en análisis anteriores, el hidrogel sin nanopartículas exhibe una absorbancia prácticamente nula en todo el rango analizado, lo que confirma su transparencia óptica y la ausencia de componentes que absorban en esa región del espectro. En contraste, al incorporar las AgNPs sintetizadas mediante el Método 3, se detecta un pico de absorbancia claramente definido en 420 nm, correspondiente a la banda de resonancia plasmónica superficial (SPR) característica de estas nanopartículas metálicas. Este valor implica un desplazamiento hacia el rojo (red-shift) respecto al máximo de absorbancia observado cuando las partículas están en solución acuosa (413 nm), lo que sugiere una modificación en el entorno inmediato de las nanopartículas tras su integración en el hidrogel.

Este desplazamiento espectral podría deberse a varios factores, como un ligero incremento del tamaño efectivo de las nanopartículas, interacciones físicas entre ellas dentro de la red del gel o cambios en el índice de refracción del medio que las rodea. Asimismo, se aprecia una mayor intensidad de absorbancia en comparación con el sistema elaborado mediante el método 2, lo que

indicaría una mayor concentración de nanopartículas o una mejor eficiencia de encapsulación en esta formulación.

**Figura 24.**

*Comparación de espectros UV-Vis entre hidrogel de poloxámero 407 al 20% y el mismo sistema cargado con nanopartículas de plata (Método 3).*



Es importante mencionar que las mediciones se realizaron en una cubeta de cuarzo con capacidad de 3 mL y que la concentración estimada de nanopartículas en el sistema final es de aproximadamente  $5,49 \times 10^{-4}$  partículas por cada 100  $\mu\text{L}$  de hidrogel. En este caso, las AgNPs se sintetizaron utilizando ácido ascórbico como agente reductor, en condiciones de temperatura controlada a 50 °C, lo que favoreció la formación de partículas estables con propiedades ópticas reproducibles. En conjunto, estos resultados confirman que el poloxámero no solo actúa como una matriz de encapsulación efectiva, sino que también modula las características ópticas de las AgNPs, lo que resulta fundamental para el desarrollo de sistemas con actividad antimicrobiana específica y controlada.

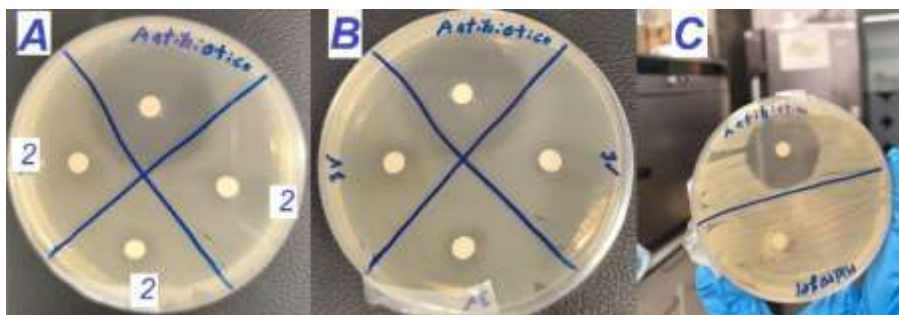
#### **4.4.2. Ensayo de actividad antibacteriana del hidrogel con AgNPs**

Se evaluó la actividad antibacteriana de los hidrogeles cargados con nanopartículas de plata (AgNPs) mediante el método de difusión en agar frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300).

Para ello, se prepararon discos impregnados con hidrogeles que contenían nanopartículas de plata sintetizadas mediante los métodos 2 y 3, respectivamente. También se incluyeron controles: oxacilina como antibiótico de referencia (positivo) y el hidrogel sin carga como control negativo. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 25**. (A) Hidrogel al 20 % de poloxámero 407 cargado con AgNPs sintetizadas por el Método 2. (B) Hidrogel cargado con AgNPs obtenidas mediante el Método 3. (C) Controles: hidrogel sin nanopartículas (negativo) y oxacilina (positivo).

**Figura 25.**

*Evaluación de la actividad antibacteriana mediante halos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300).*



Los discos con hidrogel cargado con AgNPs del Método 2 generaron halos de inhibición promedio de 6 mm. En comparación, los discos con AgNPs obtenidos mediante el Método 3 produjeron halos de 10 mm, lo que indica una mayor efectividad antimicrobiana. El hidrogel sin nanopartículas no mostró ningún efecto inhibitor, mientras que el control positivo con oxacilina produjo halos de 20 mm, lo que, valida la sensibilidad de la cepa bacteriana y la fiabilidad del ensayo. Estos resultados confirman que la incorporación de AgNPs en la matriz de hidrogel al 20 % de poloxámero 407 permite conservar la bioactividad de las nanopartículas, aunque el nivel de eficacia depende del método de síntesis empleado. En particular, el método 3, basado en la reducción con ácido ascórbico a 50 °C, demostró ser más eficiente, posiblemente debido a una

mayor estabilidad coloidal o a una mayor capacidad de encapsulación de las AgNPs dentro del hidrogel. Asimismo, se evidenció que las condiciones de encapsulación, especialmente la sonicación, influyen directamente en el comportamiento del sistema. En ensayos donde se modificaron estos parámetros, no se observó la formación de halos, lo que sugiere una posible aglomeración o pérdida parcial de la funcionalidad de las nanopartículas. Esta observación concuerda con lo reportado por Ghosh et al. (2022), quienes resaltan la importancia del entorno de encapsulación sobre la disponibilidad de las AgNPs en aplicaciones antimicrobianas.

**Tabla 5.**

*Diámetros de inhibición de S. aureus ATCC 43300 en presencia de los hidrogeles cargados de AgNPs sintetizadas por el método de difusión de disco.*

<b>Agente reductor</b>	<b>Nomenclatura</b>	<b>Concentración de AgNPs (ng/mL)</b>	<b>Halo de inhibición (mm)</b>
<b>Borohidruro de sodio</b>	A	$2,20 \times 10^{-3}$	$6 \pm 0,352$
<b>Ácido ascórbico</b>	B	$4,39 \times 10^{-4}$	$10 \pm 0,274$
<b>Oxacilina</b>	C	$3 \times 10^6$	20

## 5. Conclusiones

En este estudio se desarrollaron hidrogeles de poloxámero 407 cargados con nanopartículas de plata (AgNPs), con el objetivo de emplearlos como apósitos antimicrobianos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Los hidrogeles obtenidos mostraron propiedades favorables para la retención de humedad y la liberación controlada de AgNPs, características esenciales para aplicaciones biomédicas.

Durante la síntesis, se evaluaron distintos métodos para la obtención de nanopartículas. El método 3, que empleó ácido ascórbico como agente reductor a 50 °C, generó AgNPs con mayor efectividad antimicrobiana, atribuida a su mayor estabilidad coloidal y mejor encapsulación en la matriz del hidrogel. Aunque el método 2 produjo nanopartículas más pequeñas y cuasi esféricas con buena actividad en solución, su eficacia disminuyó al ser incorporadas en el hidrogel, lo que sugiere desafíos en el proceso de encapsulación.

Las pruebas de actividad antimicrobiana confirmaron que los hidrogeles cargados conservaron la bioactividad de las AgNPs, generando halos de inhibición frente a *S. aureus*, mientras que el hidrogel sin nanopartículas no mostró efecto, validando el papel activo de las AgNPs. Además, se observó que las condiciones de sonicación influyen en la funcionalidad del sistema, ya que una sonicación inadecuada puede causar aglomeración o pérdida de actividad.

Estos resultados destacan el potencial de los hidrogeles desarrollados como apósitos antimicrobianos eficaces y su posible contribución a reducir el uso de antibióticos convencionales, aportando al diseño de biomateriales innovadores para el tratamiento de infecciones.

## 6. Recomendaciones

Profundizar en estudios que evalúen la liberación controlada de AgNPs desde el hidrogel mediante técnicas como la espectroscopía UV-Vis en función del tiempo y la temperatura, lo que permitiría determinar la cinética de liberación y optimizar su efecto terapéutico.

Incluir análisis de biocompatibilidad **in vitro**, como ensayos de viabilidad celular o hemólisis, para validar la seguridad del sistema en aplicaciones biomédicas y explorar su posible uso potencial como apósito en tejidos humanos.

Estudiar el envejecimiento de las nanopartículas de plata encapsuladas en el hidrogel y evaluar su estabilidad estructural y funcional con el paso del tiempo en diferentes condiciones de almacenamiento. Esto permitirá determinar la vida útil del sistema, un aspecto clave para su futura aplicación clínica.

Finalmente, se recomienda escalar el proceso de síntesis y formulación a nivel piloto, con el objetivo de evaluar su viabilidad industrial y su posible incorporación en productos médicos innovadores dirigidos a la prevención de infecciones en heridas crónicas o quirúrgicas.

### Referencias Bibliográficas

Ameh, T., Gibb, M., Stevens, D., Pradhan, S. H., Braswell, E., & Sayes, C. M. (2022). Silver and Copper Nanoparticles Induce Oxidative Stress in Bacteria and Mammalian Cells. *Nanomaterials*, 12(14), 1–13. <https://doi.org/10.3390/nano12142402>

Bahadory, M. (2008). “Synthesis of Noble Metal Nanoparticles”. Tesis para optar por al título de Doctor en Filosofía. Filadelfia: Universidad Drexel.

Baptista, P. V., McCusker, M. P., Carvalho, A., Ferreira, D. A., Mohan, N. M., Martins, M., & Fernandes, A. R. (2018). Nano strategies to fight multidrug resistant bacteria-"A Battle of the Titans". *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL), 1–26. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01441>

Bilgic, E., Aydin, S., Ozgen, A., & Nizamlioglu, M. (2019). Green synthesized silver nanoparticles: Morphology and antibacterial contact effects. *Medicine Science | International Medical Journal*, 8(0), 1. <https://doi.org/10.5455/medscience.2018.07.8996>

Blanco, S., Uribe, P., Moreno, D., Ortiz, C. C., & Gutiérrez, J. (2018). Self-assembled polymer layer with silver nanoparticles as an alternative coating for biomedical applications. *Chemical Engineering Transactions*, 64. <https://doi.org/10.3303/CET1864106>

Carvalho, P. M., Felício, M. R., Santos, N. C., Gonçalves, S., & Domingues, M. M. (2018). Application of light scattering techniques to nanoparticle characterization and development. *Frontiers in Chemistry*, 6(June), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00237>

Chamani, M., Asgari, S., Najmeddin, A., Pourjavadi, A., Amin, M., Gholami, M., & Dorkoosh, F. A. (2024). Antibacterial activity of a silver-incorporated vancomycin-modified mesoporous silica against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomaterials Applications*, 39(5), 439–454. <https://doi.org/10.1177/08853282241274517>

Corma, A., Concepción, P., Boronat, M., Sabater, M. J., Navas, J., Yacaman, M. J., ... Mayoral, A. (2013). Exceptional oxidation activity with size-controlled supported gold clusters of low atomicity. *Nature Chemistry*, 5(9), 775–781. <https://doi.org/10.1038/nchem.1721>

Creighton, J., Blatchford, C., & Albrecht, M. (1978). Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. *Journal of the Chemical Society Faraday Transactions 2*, pp. 790–798.

Cruz, J., Flórez, J., Torres, R., Urquiza, M., Gutiérrez, J. A., Guzmán, F., & Ortiz, C. C. (2017). Antimicrobial activity of a new synthetic peptide loaded in polylactic acid or poly(lactic-co glycolic) acid nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Nanotechnology*, 28(13), 1–11. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa5f63>

D. J., Ferreira, G. S., Duran, A., Fonseca, F. L. A., Bueno, R. F., & Rosa, D. S. (2023). Super effective antimicrobial silver sputtered coatings on poly(lactic acid) against bacteria and omicron SARS-CoV-2. *Materials Today Chemistry*, 30, 101481. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2023.101481>

Dąbrowski, J. M., & Arnaut, L. G. (2015). Photodynamic therapy (PDT) of cancer: From local to systemic treatment. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 14(10), 1765–1780. <https://doi.org/10.1039/c5pp00132c>

Davies, J. (1996). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiología (Madrid, Spain)*, 12(1), 9–16. <https://doi.org/10.1128/membr.00016-10>

Durairaj, S., Sridhar, D., Ströhle, G., Li, H., & Chen, A. (2024). Bactericidal Effect and Cytotoxicity of Graphene Oxide/Silver Nanocomposites. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 16(15), 18300–18310. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c15798>

Fazal, S., Jayasree, A., Sasidharan, S., Koyakutty, M., Nair, S. V., & Menon, D. (2014). Green synthesis of anisotropic gold nanoparticles for photothermal therapy of cancer. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 6(11), 8080–8089. <https://doi.org/10.1021/am500302t>

Ferdous, Z., & Nemmar, A. (2020). Health impact of silver nanoparticles: A review of the biodistribution and toxicity following various routes of exposure. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7). <https://doi.org/10.3390/ijms21072375>

Ferreira, A. M., Vikulina, A. S., Bowker, L., Hunt, J. A., Loughlin, M., Puddu, V., & Volodkin, D. (2024). Nanoarchitectonics of Bactericidal Coatings Based on CaCO<sub>3</sub>–Nanosilver Hybrids. *ACS Applied Bio Materials*, 7(5), 2872–2886. <https://doi.org/10.1021/acsabm.3c01228>

Ge, J., Li, M., Fan, J., Celia, C., Xie, Y., Chang, Q., & Deng, X. (2024). Synthesis, characterization, and antibacterial activity of chitosan-chelated silver nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 35(1), 45–62. <https://doi.org/10.1080/09205063.2023.2265629>

Ghosh, S., Pramanik, N., & Ray, M. (2022). Stability of silver nanoparticles in biological media: Influence of size and surface functionalization. *Journal of Nanoparticle Research*, 24(3), 89. <https://doi.org/10.1007/s11051-022-05468-y>

Gupta, A., Salehi, F., & Patra, H. K. (2020). Silver nanoparticles in antimicrobial coatings: Recent developments. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 89, 11–27. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2020.06.012>

Gutiérrez, J. A., Caballero, S., Díaz, L. A., Guerrero, M. A., Ruiz, J., & Ortiz, C. C. (2018). High Antifungal Activity against Candida Species of Monometallic and Bimetallic Nanoparticles Synthesized in Nanoreactors. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 4(2), 647–653. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00511>

Gutierrez, J. A., Cruz, J., Rondón, P., Jones, N., & Ortiz, C. (2016). Small gold nanocomposites obtained in reverse micelles as nanoreactors. *New Journal of Chemistry*, 40(12), 10432–10439. <https://doi.org/10.1039/c6nj02259f>

Gutierrez, J. A., Silber, J. J., Falcone, R. D., & Correa, N. M. (2021). Modified reverse micelle method as facile way to obtain several gold nanoparticle morphologies. *Journal of Molecular Liquids*, 331. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115709>

Huh, A. J., & Kwon, Y. J. (2011). “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*, 156(2), 128–145. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.002>

Jia, X., Qu, T., Wang, S., Wu, L., Zhang, H., Qi, Y., & Li, X. (2023). Smart self-defensive antibacterial coating with chitosan/mesoporous silica modified with silver nanoparticles. *Composites Part B: Engineering*, 250, 110457. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2022.110457>

Khan, T. H., Saimbi, C. S., Jain, P., & Sinha, S. (2024). Antibacterial and antibiofilm activity of silver nanoparticles synthesized using the leaf extract of *Calotropis procera*. *Journal of Applied Microbiology*, 136(1), 18–31. <https://doi.org/10.1111/jam.15858>

Lee, N. Y., Ko, W. C., & Hsueh, P. R. (2022). Nanoparticles in the treatment of infections caused by multidrug-resistant organisms. *Frontiers in Pharmacology*, 13(July), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.944958>

Martínez-Castañón, G. A., Niño-Martínez, N., Martínez-Gutierrez, F., Martínez-Mendoza, J. R., & Ruiz, F. (2008). Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(8), 1343–1348. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9428-6>

Melo, P., Durán, N., Marcato, P. D., & Seabra, A. B. (2021). Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine*, 16(2), 111–126.

<https://doi.org/10.2217/nnm-2020-0242>

Morones-Ramirez, J. R., Winkler, J. A., Spina, C. S., & Collins, J. J. (2013). Silver enhances antibiotic activity against gram-negative bacteria. *Science Translational Medicine*, 5(190), 190ra81–190ra81. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006276>

Niska, K., Knap, N., Lewicka, Z., Zaleska-Medynska, A., & Inkielewicz-Stepniak, I. (2016). Effect of silver nanoparticles on human pancreatic ductal adenocarcinoma cell line (PANC-1). *Toxicology in Vitro*, 37, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.09.002>

Ortiz, C., Gutiérrez, J. A., Rivas, B. L., & Guerrero, M. A. (2017). Antimicrobial activity of poly(acrylic acid) and polyethylenimine-metal complexes and their synergistic effect against *Pseudomonas aeruginosa*. *Materials Science and Engineering C*, 78, 510–520.

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.038>

Ortiz, C., Hurtado, J., Gaitán, A., Arias, A., & Gutiérrez, J. A. (2023). Hybrid Coatings Based on Sol-Gel Silica Modified with Nanoparticles of Silver and Zinc Oxide for the Prevention of Bacterial Adhesion on Medical Devices. *Coatings*, 13(4), 731.

<https://doi.org/10.3390/coatings13040731>

Panacek, A., Kvitek, L., Pucek, R., Kolar, M., Vecerova, R., Pizurova, N., Sharma, V. K., Nevecna, T., & Zboril, R. (2006). Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(33), 16248–16253.

<https://doi.org/10.1021/jp063826h>

Pelgrift, R. Y., & Friedman, A. J. (2013). Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(13–14), 1803–1815.

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.011>

Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27(1), 76–83.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002>

Ssekatawa, K., Byarugaba, D. K., Kirabo, A., Wampande, E. M., Ejobi, F., Tweyongyere, R., ... Katabazi, F. A. (2021). Use of Nanotechnology in Mitigating Microbial Resistance to Antibiotics. *Infectious Drug Resistance*, 14, 4237–4256. <https://doi.org/10.2147/IDR.S334469>

Syedmoradi, L., Daneshpour, M., Alvandipour, M., Bagherzadeh, M., Ghafar-Zadeh, E., & Nasiri, R. (2017). Point of care testing: The impact of nanotechnology. *Biosensors and Bioelectronics*, 87, 373–387. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.083>

Tiwari, P. M., Vig, K., Dennis, V. A., & Singh, S. R. (2011). Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Nanomaterials*, 1(1), 31–63.

<https://doi.org/10.3390/nano1010031>

## Apéndices

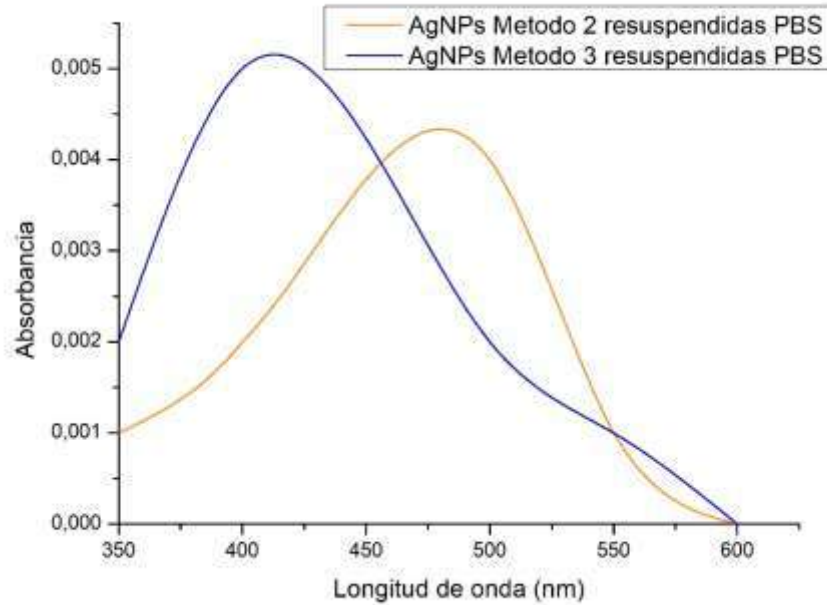
**Apéndice A.** Porcentajes de inhibición bacteriana de las AgNPs en suspensión frente a *Staphylococcus aureus*.

Método	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Concentración (ng/mL)	% de inhibición
1	100	8,16E-02	100,66 $\pm$ 0,004
	75	6,12E-02	99,75 $\pm$ 0,005
	50	4,08E-02	99,57 $\pm$ 0,004
	25	2,04E-02	97,07 $\pm$ 0,007
	12.5	1,02E-02	29,71 $\pm$ 0,067
	6.25	5,10E-03	17,40 $\pm$ 0,010
	3.12	2,55E-03	16,24 $\pm$ 0,004
	2	1,63E-03	13,64 $\pm$ 0,008
	100	2,20E-02	100,08 $\pm$ 0,003
2	75	1,65E-02	95,00 $\pm$ 0,006
	50	1,10E-02	99,90 $\pm$ 0,004
	25	5,50E-03	99,04 $\pm$ 0,008
	12.5	2,75E-03	99,25 $\pm$ 0,008
	6.25	1,37E-03	51,79 $\pm$ 0,017
	3.12	6,86E-04	21,71 $\pm$ 0,006
	2	4,40E-04	16,58 $\pm$ 0,010
	100	4,39E-03	98,78 $\pm$ 0,004
	75	3,29E-03	98,55 $\pm$ 0,007

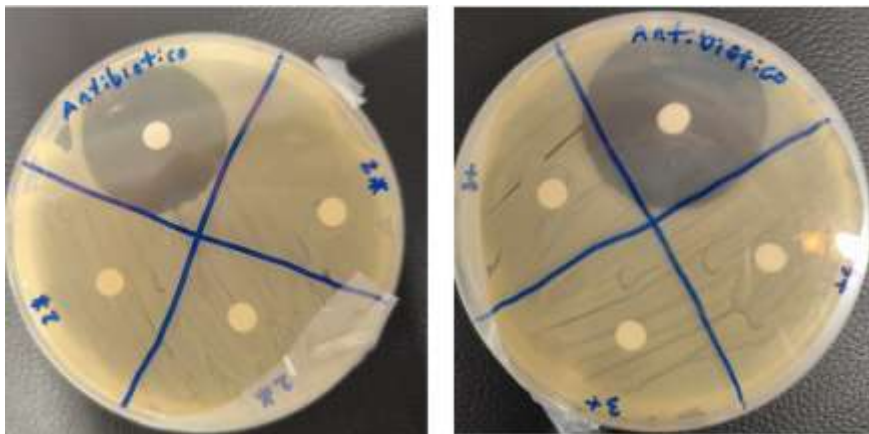
<b>3</b>	50	2,19E-03	101,13±0,006
	25	1,10E-03	101,17±0,006
	12.5	5,49E-04	99,61±0,004
	6.25	2,74E-04	46,36±0,072
	3.12	1,37E-04	22,31±0,012
	2	8,78E-05	75,45±0,048
	100	5,64E-03	99,24±0,003
<b>4</b>	75	4,23E-03	101,75±0,009
	50	2,82E-03	102,20±0,003
	25	1,41E-03	98,99±0,008
	12.5	7,05E-04	54,89±0,032
	6.25	3,52E-04	35,14±0,004
	3.12	1,76E-04	34,81±0,010
	2	1,13E-04	32,53±0,019

**Apéndice B.** Valores de pH de las soluciones de AgNPs y de los hidrogeles cargados

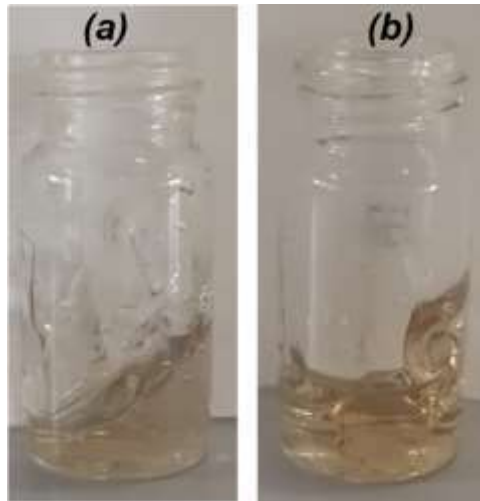
Metodo	PH de las AgNPs	Hidrogel cargado de AgNPs
<b>1</b>	6,61	6,00
<b>2</b>	7,63	7,6
<b>3</b>	5,43	6,75
<b>4</b>	5,66	6,22
<b>5</b>	7,16	7,06
<b>6</b>	6,95	7,07

**Apéndice C. Espectros UV-Vis de AgNPs resuspendidas en PBS**

**Apéndice D.** Imágenes de halos de inhibición obtenidos tras la modificación de las condiciones de sonicación durante la encapsulación de AgNPs, amplitud del 60 %, en ciclos de 10 segundos de activación (ON) y 50 segundos de desactivación (OFF), repitiendo este proceso durante 12 ciclos.



**Apéndice E.** Imágenes de las formulaciones de hidrogel almacenado en un vial, a) agente reductor borohidruro de sodio a 5°C y b) agente reductor ácido ascórbico a 50°C



**Apéndice F.** Imágen del repique de *Staphylococcus aureus*

