



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

**MEJORAMIENTO DE LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA A
PARTIR DEL HONGO LIGNINOLÍTICO ANAMORFO R1 *DE BJERKANDERA SP*
Y SU EVALUACION PARA APLICACIÓN EN APÓSITOS**

Jerónimo Osorio Echavarría

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería

Medellín, Colombia

2020

Mejoramiento de la Síntesis de Nanopartículas de Plata a partir del Hongo Ligninolítico Anamorfo r1 de *Bjerkandera sp* y su Evaluación para Aplicación en Apósitos

Jerónimo Osorio Echavarría

Trabajo de grado
como requisito para optar al título de: Magíster en Ingeniería

Director Ing. Química. Natalia Gómez Vanegas. Ph.D
Codirector Ing. Materiales. Claudia Ossa Orozco. Ph.D

Universidad de Antioquia
Facultad de Ingeniería,
Medellín, Colombia
2020.

Muchos de nuestros sueños parecen al principio imposibles, luego pueden parecer improbables, y luego, cuando nos comprometemos firmemente, se vuelven inevitables

Christopher Reeve

Agradecimientos

Son muchas las personas especiales a las que les gustaría agradecer su apoyo y ánimo. A mi familia, mis padres y en especial a mi hermana, gracias por su amor, comprensión, esfuerzos, apoyo y por la confianza que depositaron en mí, su constante compañía permitió que nunca me rindiera en este largo y arduo camino

Quisiera agradecer a mis tutoras Claudia Ossa y Natalia Gómez, por haberme animado y orientado en todo el momento que necesite sus consejos; y por haberme brindado las herramientas necesarias para poder alcanzar las metas propuestas.

A todos mis compañeros del Grupo de Bioprocesos y del Grupo de Investigación en Biomateriales Biomat, por acogerme de una forma tan amena que me hicieron sentir como en casa, por sus consejos, por los buenos momentos compartidos y por la compañía que me brindaron en esta lucha incansable siguiendo mí causa. Este es un logro que quiero compartir especialmente con ustedes, porque han hecho de mí una persona capacitada que puede enfrentar el mundo con sus alas abiertas dispuesta a cumplir sus sueños.

Al más especial de todos, a ti Dios porque hiciste realidad este sueño, y por todo el amor que me has demostrado.

Con todo cariño, esta tesis es para todos ustedes...

Tabla de Contenido

RESUMEN DEL PROYECTO	13
1. INTRODUCCION	14
2. MARCO TEORICO	17
2.1. Biomateriales	17
2.2. Nanopartículas de plata	19
2.2.1. Síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs)	19
2.2.1.1. Métodos físicos.....	20
2.2.1.2. Métodos químicos.....	20
2.2.1.3. Métodos biológicos	20
2.3. Hongos ligninolíticos	21
2.3.1. Hongo Ligninolítico Anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i>	22
2.3.2. Enzima nitrato reductasa	23
2.4. Heridas en la piel y apósitos	24
2.4.1. Apósitos.....	25
2.4.2. Quitosano y carboximetilcelulosa	26
3. ESTADO DEL ARTE	27
3.1. Generalidades.....	27
3.1.1. Nanopartículas de plata y apósitos.....	29
3.1.2. Apósitos de quitosano	30
3.1.3. Apósitos de carboximetilcelulosa.....	31
3.1.4. Apósitos de CS-CMC	31
4. OBJETIVOS	32
4.1. Objetivo General	32
4.2. Objetivos Específicos.....	32

5.	METODOLOGIA	32
5.1.	Revisión y análisis bibliográfico.....	32
5.2.	Métodos analíticos	32
5.2.1.	Análisis de azúcares reductores.....	32
5.2.2.	Análisis de concentración de biomasa	32
5.2.3.	Análisis de la actividad enzimática	33
5.3.	Obtención de nanopartículas de plata.....	34
5.3.1.	Microrganismo y medio de cultivo	34
5.3.2.	Cultivo para la producción enzimática	34
5.3.3.	Biosíntesis de nanopartículas de plata	35
5.3.3.1.	Efecto del pH y la temperatura sobre la síntesis de la enzima nitrito reductasa y posterior síntesis de nanopartículas de plata.....	35
5.3.3.2.	Caracterización de nanopartículas de plata obtenidas	37
5.4.	Apósitos y funcionalización con nanopartículas de plata	37
5.4.1.	Caracterización de los apósitos de Quitosano/Carboximetilcelulosa.....	38
5.5.	Evaluación biológica de los apósitos.....	38
6.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	39
6.1.	Cinética de producción de la enzima nitrito reductasa	39
6.1.1.	Cinética de crecimiento y producción de la enzima nitrito reductasa ...	39
6.1.2.	Efecto del pH y la temperatura sobre la producción de la enzima nitrito reductasa a partir del hongo de pudrición blanca de la madera hongo anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i>	42
6.2.	Síntesis de nanopartículas de plata a partir del hongo de pudrición blanca de la madera hongo anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i>	43
6.2.1.	Efecto del pH y la temperatura sobre la síntesis de nanopartículas de plata a partir del hongo de pudrición blanca de la madera hongo anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i>	46
6.3.	Mecanismo probable para la síntesis de nanopartículas de plata a partir del hongo de pudrición blanca de la madera hongo anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i>	52

6.4.	Síntesis intracelular y extracelular de nanopartículas de plata a partir del hongo de pudrición blanca de la madera hongo anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i>	55
6.4.1.	Síntesis intracelular de nanopartículas de plata a partir del hongo de pudrición blanca de la madera hongo anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i>	56
6.4.2.	Síntesis extracelular de nanopartículas de plata a partir del hongo de pudrición blanca de la madera hongo anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i>	59
6.5.	Apósitos de quitosano/carboximetilcelulosa suplementados con nanopartículas de plata sintetizadas a partir del hongo de pudrición blanca de la madera anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i>	68
6.5.1.	Caracterización de los apósitos de quitosano/carboximetilcelulosa suplementados con nanopartículas de plata	69
6.5.1.1.	Ensayos antimicrobianos	72
6.5.1.2.	Evaluación de las propiedades de mecánicas de los apósitos de quitosano/carboximetilcelulosa suplementados con nanopartículas de plata	75
6.6.	Ensayo de viabilidad celular de los apósitos fabricados	78
7.	CONCLUSIONES	80
8.	RECOMENDACIONES	83
9.	ANEXOS	83
10.	BIBLIOGRAFIA	93

Lista de figuras

Figura 1. Anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i> a vista Macroscópica (izq.) y anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i> al microscopio en 40X (der). Fuente propia [54].	22
Figura 2. Características estructurales de la nitrato reductasa de eucariotas. En el esquema se representa el flujo de electrones y la reacción que se lleva a cabo [56].	23
Figura 3. Cinética de crecimiento y producción de la enzima nitrato reductasa del hongo ligninolítico anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i> en medio Kimura. Biomasa ■, Glucosa ●, Actividad nitrato reductasa ▲	40
Figura 4. Cinética de producción enzimática del sobrenadante filtrado con AgNO ₃ 1mM del hongo ligninolítico anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i> . T 25 °C_pH 5.0 ●, T 30 °C; _pH 5.0 ■, T 35 °C_pH 5.0 ▲, T 25 °C_pH 7.0 ●, T 30 °C; _pH 7.0 ■, T 35 °C_pH 7.0 ▲, T 25 °C_pH 9.0 ●, T 30 °C _pH 9.0 ■ y T 35 °C_pH 9.0 ▲.	43
Figura 5. Biosíntesis de AgNPs en la mezcla CS. Formación de nanopartículas de plata después de 72 h de reacción para diferentes temperaturas de incubación. a) 25 °C, b) 30 °C y c) 35 °C.	44
Figura 6. Espectros Uv-vis para AgNPs sintetizadas utilizando sobrenadantes del cultivo del anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i> para una temperatura de incubación de 25 °C: a) pH 5.0, b) pH 7.0 y c) pH 9.0. En los tiempos de incubación: 24 h – , 48 h – , 72 h – , 96 h – , 120 h – y 144 h – .	45
Figura 7. Espectros Uv-vis para AgNPs sintetizadas utilizando sobrenadantes del cultivo del anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i> para una temperatura de incubación de 30 °C: a) pH 5.0, b) pH 7.0 y c) pH 9.0. En los tiempos de incubación: 24 h – , 48 h – , 72 h – , 96 h – , 120 h – y 144 h – .	45
Figura 8. Espectros Uv-vis para AgNPs sintetizadas utilizando sobrenadantes del cultivo del anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i> para una temperatura de incubación de 35 °C: a) pH 5.0, b) pH 7.0 y c) pH 9.0. En los tiempos de incubación: 24 h – , 48 h – , 72 h – , 96 h – , 120 h – y 144 h – .	45
Figura 9. Graficas de superficies de respuesta estimada. Evaluación de temperatura y pH sobre la síntesis de AgNPs.	47
Figura 10. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM); a) imágenes de nanopartículas de plata sintetizados en las muestras CS del hongo anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i> . Tiempo de incubación 144 h, pH 9.0, temperatura 25 °C y b) Espectro EDS para las AgNPs visualizadas.	50
Figura 11. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM); a) imágenes de nanopartículas de plata sintetizados en las muestras CS del hongo anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i> . Tiempo de incubación 144 h, pH 9.0, temperatura 35 °C y b) Espectro EDS para las AgNPs visualizadas.	51
Figura 12. FTIR de la mezcla CS incubada a una temperatura de 35 °C y pH 9.0 obtenida a partir del hongo anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i> .	53

Figura 13. Espectros Uv-vis para AgNPs sintetizadas utilizando sobrenadantes del cultivo del anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i> para una temperatura de incubación de 35 °C y pH 9.0 En los tiempos de incubación: 24 h – , 48 h – , 72 h – y 96 h – . b) Producción de tirosina en el sobrenadante filtrado con AgNO ₃ 1mM (mezcla CS) del hongo ligninolítico anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i> . T 35 °C y pH 9.0.	54
Figura 14. Mecanismo propuesto para la síntesis de AgNPs mediante el hongo del anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i>	55
Figura 15. Micrografías electrónicas de barrido del hongo anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i> . Micelio fúngico con una solución ajustada a pH 9.0. Sin ningún tratamiento.	57
Figura 16. Micrografías electrónicas de barrido del hongo anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i> . Micelio fúngico tratado con una solución ajustada a pH 9.0 que recibió tratamiento con nitrato de plata (AgNO ₃) a) micelio incubado a 30 °C, b) micelio incubado a 30 °C y c) micelio incubado a 35 °C.	58
Figura 17. Espectro EDS para las AgNPs visualizadas en el micelio fúngico que se incubó en una solución con AgNO ₃ 1mM ajustada a pH 9.0. Tiempo de incubación 144 h a temperatura de a) 30 °C y b) 35 °C.	59
Figura 18. Biosíntesis de AgNPs en la mezcla SN ajustada a pH 9.0. Formación de nanopartículas de plata a las 144 h de reacción para diferentes temperaturas de incubación.	60
Figura 19. Espectros Uv-vis para AgNPs sintetizadas utilizando la mezcla SN ajustada a pH 9.0 en donde reaccionó el micelio del anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i> para una temperatura de incubación de T 25 °C (–) , T 30 °C (–) y T 35 °C (–).	62
Figura 20. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) imágenes de nanopartículas de plata sintetizados en las mezclas SN ajustadas a pH 9.0 del hongo anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i> . Tiempo de incubación 144 h a temperatura de a) 25 °C, b) 30 °C y c) 35 °C.	63
Figura 21. Espectro EDS para las AgNPs visualizadas en la mezcla SN ajustadas a pH 9.0 del hongo anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i> . Tiempo de incubación 144 h a temperatura de a) 25 °C, b) 30 °C y c) 35 °C.	64
Figura 22. Distribución de frecuencia de tamaños de AgNPs sintetizados en las mezclas SN ajustadas a pH 9.0 del hongo anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i> . Tiempo de incubación 144 h a temperatura a) 30 °C y b) 35 °C.	65
Figura 23. Visualización del patrón SAED de la mezcla SN ajustadas a pH 9.0 que contiene AgNPs sintetizadas a partir del hongo anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i> . Tiempo de incubación 144 h a temperatura de a) 25 °C y b) 35 °C.	66
Figura 24. FTIR de la mezcla SN a pH 9.0 obtenida a partir del hongo anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i> incubada a una temperatura de a) 30 °C y b) 35 °C.	67

Figura 25. Películas de CS-CMC a) sin presencia de AgNPs; b) con presencia de AgNPs. Mezcla CS y c) con presencia de AgNPs. Mezcla SN. Tiempo de secado 72h.....	69
Figura 26. Imágenes del microscopio de las películas de CS-CMC a) sin presencia de AgNPs; b) con presencia de AgNPs. Mezcla CS y c) con presencia de AgNPs. Mezcla SN. Tiempo de secado 72 h.	70
Figura 27. Imágenes de microscopio SEM de las películas de CS-CMC a) sin presencia de AgNPs; b) con presencia de AgNPs. Mezcla CS y c) con presencia de AgNPs. Mezcla SN con su respectivo análisis composicional. Tiempo de secado 72 h.....	71
Figura 28. Apariencia de las zonas de inhibición en placas de agar nutritivo. Se muestra la actividad antimicrobiana de a) películas de CS-CMC-AgNPs _CS_1, b) películas de CS-CMC-AgNPs _CS_2, c) películas de CS-CMC-AgNPs _SN_1, d) películas de CS-CMC-AgNPs _SN_2 y e) películas de CS-CMC, contra la bacteria Gram negativa <i>E. coli</i>	75
Figura 29. Grafica de esfuerzo deformación. Evaluación de las propiedades mecánicas de las películas fabricadas (–) CS-CMC-AgNPs _CS_1, (–) CS-CMC-AgNPs _CS_2, (–) CS-CMC-AgNPs _SN_1, (–) CS-CMC-AgNPs _SN_2, (–) Control CS-CMC	77
Figura 30. Porcentajes de viabilidad de las células Detroit cultivadas con los extractos de los materiales a la máxima concentración vs células control sin ratamiento y células tratadas con DMSO 6% (control positivo de toxicidad).	79
Figura 31. Cultivo de células Detroit. a) Con películas CS-CMC-AgNPs_T35_SN, b) Con el extracto con películas CS-CMC-AgNPs_T35_CS, c) Células control no tratadas y d) Células cultivadas con DMSO al 6% (Control positivo de citotoxicidad). Aumento 20 X. Microscopía convencional.	80
Figura 32. Curva de calibración obtenida a partir de la cuantificación de nitritos empleando el método espectrofluorométrico con 2-3 diaminonaftaleno (DAN)	84
Figura 33. Cinética de producción enzimática del sobrenadante filtrado con 0.1% de KNO ₃ del hongo ligninolítico anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp.</i> Seguimiento en el tiempo durante 144 h.	86
Figura 34. Curva de calibración obtenida para cuantificar la concentración de Tirosina a pH 9.0.....	90

Lista de tablas

Tabla 1. Diseño Factorial Multinivel para el análisis de área bajo la curva de la síntesis de AgNPs del hongo anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp.</i>	36
Tabla 2. Análisis de varianza para la variable Producción NR para un tiempo de 96 h. Cinética de producción enzimática.	41
Tabla 3. Prueba de múltiples rangos (Tukey) para la variable Producción NR para un tiempo de 96 h. Cinética de producción enzimática.	41
Tabla 4. Análisis de varianza para la variable área bajo la curva. Mezcla CS.	46
Tabla 5. Análisis de varianza para la variable área bajo la curva. Mezcla SN. pH 9.0. tiempo de Incubación 144 h.	60
Tabla 6. Valores promedio del experimento de inhibición bacteriana realizado empleando la bacteria <i>E. coli</i>	72
Tabla 7. Análisis de varianza para la variable Halo de Inhibición. Ensayo antimicrobiano de los apósitos de CS-CMC-AgNPs fabricadas.	73
Tabla 8. Espesor de la película, resistencia a la tracción (TS), elongación máxima y módulo elástico (EM) de películas fabricadas.	76
Tabla 9. Análisis de varianza para la variable resistencia a la tracción. Ensayo pruebas mecánicas de los apósitos de CS-CMC-AgNPs fabricadas.	76
Tabla 10. Porcentaje de viabilidad células Detroit para las diferentes muestras tratadas.	78
Tabla 11. Datos curva de calibración nitritos.	83
Tabla 12. Análisis de varianza para la variable Fluorescencia. Cinética de producción enzimática.	84
Tabla 13. Análisis de varianza para la variable Producción NR para un tiempo de 120h. Cinética de producción enzimática.	87
Tabla 14. Análisis de múltiples rangos (Tukey HSD) para la variable Producción NR para un tiempo de 120h. Cinética de producción enzimática.	87
Tabla 15. Datos curva de calibración Tirosina obtenidos a partir de espectroscopia Uv-vis.	89
Tabla 16. Análisis de múltiples rangos (Tukey HSD) para la variable halo de inhibición. Ensayo antimicrobiano de los apósitos de CS-CMC-AgNPs fabricadas.	91

Anexos

Anexo 1. Información general y supuestos del modelo de regresión lineal del diseño de bloques aleatorizados para la validación de la curva de calibración de nitritos. Variable respuesta Fluorescencia.....	83
Anexo 2. Cinética de producción enzimática del sobrenadante filtrado con 0.1% de KNO ₃ del hongo ligninolítico anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i> seguimiento en el tiempo durante 144 h. Análisis de varianza y múltiples rangos para un tiempo de producción de Nitrato reductasa de 120 h	86
Anexo 3. Supuestos del modelo de regresión lineal del diseño de bloques aleatorizados para la validación de la cinética de producción enzimática. Variable respuesta Producción enzima NR. Supuestos para 96 y 120 h de producción enzimática.....	87
Anexo 4. Supuestos del modelo de regresión lineal del diseño de superficie de respuesta para la validación de la síntesis de AgNPs. Variable respuesta área bajo la curva. Supuestos para la solución de reacción a pHs (5.0,7.0 y 9.0), temperatura de incubación (25, 30 y 35°C). Tiempo de incubación 144 h.....	88
Anexo 5. Curva de calibración tirosina. Validación mecanismo de síntesis a partir del hongo anamorfo R1 de <i>Bjerkandera sp</i>	89
Anexo 6. Supuestos del modelo de regresión lineal del diseño de bloques aleatorizados para la validación de la temperatura como factor que influye en la síntesis extracelular de AgNPs en la mezcla SN. Variable respuesta área bajo la curva. Supuestos para la solución de reacción a pH 9.0. Tiempo de incubación 144 h.....	90
Anexo 7. Experimento y Supuestos del modelo de regresión lineal del diseño de bloques aleatorizados para comprobar el efecto antimicrobiano de las películas CS-CMC-AgNPs. Variable respuesta. Halo de inhibición.	91

RESUMEN DEL PROYECTO

Las nanopartículas de plata (AgNPs), se exploran para aplicaciones médicas por su biocompatibilidad. En esta investigación se evaluó la enzima nitrato reductasa (NR) generada por el hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp*, como medio para sintetizar nanopartículas de plata (AgNPs). Se estudiaron 3 métodos de producción de AgNPs (1) biorreducción de iones de plata en el sobrenadante del cultivo (mezcla CS), biorreducción de iones de plata por absorción de átomo de plata en los micelios-pellet (Muestra MP), y biorreducción de iones de plata a partir del sedimento de micelio- pellet (Mezcla SN). Posteriormente, las AgNPs se usaron para producir biopelículas con actividad antimicrobiana.

En cuanto a la síntesis de las AgNPs se observó que el pH al cual se ajustaron las diferentes soluciones y la temperatura de incubación influyeron positivamente sobre el comportamiento del hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* tanto para para la síntesis intra como extracelular de AgNPs. Se observó para un pH de 9.0 y a una temperatura de 35 °C distribuciones de partículas bien definidas con un tamaño aproximado de 10-50 nm; estos resultados se obtuvieron para un tiempo de reacción con AgNO₃ 1mM de 144 h. A partir de la cinética de producción enzimática y los análisis espectrofluorométricos reportados para la síntesis de AgNPs (mezcla CS) se pudo clarificar que posiblemente la enzima nitrato reductasa no está directamente relacionada con el proceso de síntesis empleando este hongo ligninolítico. Mediante análisis de espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) y microscopia electrónica de transmisión (TEM) se pudo comprobar que residuos de proteínas que se encuentra en la superficie del micelio o grupos funcionales químicos se desprendieron más fácil sobre las mezclas CS y SN cuando el hongo fue sometido a mayores tiempos de producción del inóculo (8 días); facilitando la síntesis de AgNPs, reportándose un tamaño aproximado de partícula entre 10-50 nm. Se sugiere en esta investigación que residuos de proteína de tirosina probablemente bajo estas condiciones (pH 9.0 y temperatura de incubación de 35 °C) actuaron como intermediarios en el proceso de reducción del ion Ag⁺ en la solución o en la superficie del micelio en nanopartículas Ag⁰.

Las biopelículas de quitosano y carboximetilcelulosa suplementadas con AgNPs (CS-CMC-AgNPs) sintetizadas a partir de este hongo no modificaron la estructura química de los biopolímeros y se dispersaron uniformemente en la superficie de la película formando aglomerados. Estas biopelículas exhibieron fuerte actividad antimicrobiana frente a la bacteria *Escherichia coli*, una excelente viabilidad celular tratándose con fibroblastos de piel humana y buenas propiedades mecánicas

comparables con la resistencia a la tracción reportada para el tejido de la piel sugiriendo que la adición de AgNPs sintetizadas biológicamente en estas matrices poliméricas pueden mejorar la biocompatibilidad y las propiedades mecánicas de dicho compuesto, lo que los convierte en una herramienta ideal para la fabricación de nuevos apósitos para heridas.

1. INTRODUCCION

Desde el siglo XIX se han usado para el tratamiento de infecciones y quemaduras soluciones diluidas de nitrato de plata hasta la introducción de la crema de sulfadiazina de plata. Entre las formas habituales de aplicación de la plata de uso tópico, los apósitos recubiertos de plata han demostrado ser más eficaces, al ejercer una acción bactericida sobre un rango mayor de bacterias que la crema base, presentando menor irritación que la solución de nitrato de plata y mayor tolerancia, lo cual juega un papel vital en el tratamiento de heridas crónicas.[1], [2]. Estos apósitos varían en la composición, conteniendo desde compuestos de nitrato de plata o sulfadiazina, hasta preparaciones de liberación sostenida de iones de plata. [3]–[5]. En la actualidad el uso de plata ha sido severamente limitado debido a la toxicidad que generan sus iones a los humanos. Sin embargo, el desarrollo de la nanotecnología ha facilitado la producción de partículas de plata nanoestructurada (AgNPs) con alta superficie (y por lo tanto una proporción de área y volumen más alta) que demuestra mayor eficacia contra las bacterias y, lo que es más importante, menos toxicidad para los seres humanos [6]. Recientemente, se demostró que las AgNPs pueden controlar la deposición de colágeno, provocando una alineación adecuada de las fibrillas de estas, con lo cual se acelera la cicatrización de heridas. Los ensayos clínicos que usaron vendajes impregnados con AgNPs en comparación con los vendajes estándar en el tratamiento de las quemaduras superficiales y profundas sugirieron una reepitelización acelerada sin efectos en otras fases dentro del proceso de cicatrización [7]. La incorporación de AgNPs como recubrimiento en productos médicos puede, por tanto, ser una herramienta prometedora para futuras aplicaciones *in vivo* en apósitos y jugar un rol importante en la era de las resistencias antibióticas [8]; además la incursión de otros materiales naturales como quitosano (CS) y la carboximetilcelulosa (CMC) se presenta como sustitutos ideales debido a que la actividad hemostática de ambos promueve el proceso de cicatrización de las heridas [9], [10].

Las nanopartículas de plata (AgNPs) han atraído una considerable atención en cuanto al desarrollo de aplicaciones debido a sus excelentes propiedades físicas y

químicas, alta estabilidad térmica y baja toxicidad [11]; han sido frecuentemente usadas para resolver problemas médicos debido a su biocompatibilidad química y a su resistencia a la oxidación [12]. Estas se reconocen como candidato óptimo para superar patologías previamente tratadas con antibióticos convencionales, debido a sus características antimicrobianas fuertes y de amplio espectro; estudios, por ejemplo, muestran que las AgNPs pueden ejercer su actividad antibacteriana principalmente al alterar la permeabilidad de membrana bacteriana y la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que destruyen proteínas, ADN, así como otros componentes celulares. Otro mecanismo aceptado, es la liberación de iones de plata de AgNPs que forman complejos con grupos tiol (-SH) de enzimas importantes que conducen a la inhibición de ciertas funciones críticas, como la división celular, la replicación del ADN y la transducción de señales [2], [13]. Para cada aplicación, las AgNPs requieren unas características específicas que definirán sus propiedades físicas y químicas, tales como el tamaño y distribución, forma y carga superficial, entre otras; y uno de los desafíos en síntesis de estos materiales es la obtención de nanopartículas con forma y tamaño homogéneo [14]. Con el fin de mostrar las principales ventajas de trabajar con nanopartículas, se ha tratado de buscar la naturaleza de los métodos para la producción de estas, que impliquen la mejora de sus propiedades y su funcionamiento. Diversos métodos físicos y químicos se han utilizado para síntesis de nanopartículas [14]. Técnicas físicas como tecnologías en aerosol y campos ultrasónicos se han implementado para producir y sintetizar nanopartículas, sin embargo existen ciertas desventajas en cuanto a su costo debido a que requieren de la utilización de equipos poco accesibles y/o altas cantidades de energía [15]; otras técnicas como evaporación por láser requieren un instrumento caro y sofisticado y un manejo adecuado, mientras que el rendimiento de producción de nanopartículas es bajo [16]. Por otra parte los métodos químicos involucran el uso de agentes reductores de origen sintético y agentes surfactantes para el control de la morfología y tamaño, produce nanopartículas con adsorción de especies químicas tóxicas en la superficie metálica, lo que podría alterar su biocompatibilidad y podrían ser nocivos para el ser humano y el ambiente [15]–[17].

Es así como ha surgido la necesidad de buscar procesos no tóxicos, más económicos y amigables con el medio ambiente. La obtención de nanometales a partir de diferentes microorganismos eucariotas y procariotas, se plantea como un nuevo método de síntesis, debido a que los microorganismos metabolizan los metales como parte de su alimento y poseen un gran poder enzimático para reducir iones metálicos [18]. Entre estos organismos, los hongos de la pudrición blanca de

la madera son reconocidos por sus aptitudes superiores para producir una gran variedad de proteínas extracelulares, ácidos orgánicos y otros metabolitos, y por su capacidad para adaptarse a medios ambientes severos [19]. El uso de hongos en la producción de AgNPs ha recibido gran interés ya que ofrecen ciertas ventajas sobre el uso de bacterias y plantas; secretan cantidades significativamente más altas de proteínas y enzimas, facilidad de escalado y procesamiento posterior, presencia de micelios que ofrecen un área de superficie mayor, con lo cual se amplificaría la productividad de la síntesis de nanopartículas [20]. Entre muchos microorganismos estudiados, se ha reportado que los hongos de pudrición blanca de la madera *Phanerochaete chrysosporium* y *Anthracoxyllum discolor* producen AgNPs estables, cuando se utiliza como agente reductor (AgNO_3) en medio acuoso. En el caso del *Anthracoxyllum discolor*, se pudo establecer que el mayor pico de absorbancia en el UV-Visible se obtuvo a las 144 h con una longitud de onda de 500 nm, estas condiciones se establecieron para un tiempo de cultivo del hongo de 8 días [21]. Otros estudios evaluaron la síntesis de AgNPs utilizando hongos de pudrición blanca de la madera *Trametes lujbarskyi* y *Ganoderma enigmaticum*. Las nanopartículas sintetizadas mostraron resonancia de plasmón superficial a 419 y 421 nm. El análisis de microscopía electrónica de barrido (TEM) indicó la presencia de AgNPs en un tamaño de 15 nm [12]. Por último cabe resaltar, por ejemplo, que la concentración AgNO_3 y la edad del inóculo afectó significativamente el comportamiento del hongo de estudio en cuestión, anamorfo R1 de *Bjerkandera sp.*, frente a la reducción de los iones en la superficie del micelio (síntesis intracelular). En este caso se encontró que la enzima nitrato reductasa pudo haber estado involucrada en el proceso de reducción y que para una concentración 1mM AgNO_3 , un tiempo de crecimiento de 8 días y un tiempo de incubación de 144 h se encontraron distribuciones de partículas bien definidas que tienen un tamaño aproximado de 70-90 nm [22].

El futuro del cuidado de las heridas debe incluir investigaciones para mejorar el rendimiento y la relación costo-efectividad de los biomateriales avanzados existentes para el cuidado de heridas; el desarrollo de biomateriales nuevos e innovadores; y el desarrollo de dispositivos y procedimientos de diagnóstico rápidos y rentables para detectar y perfilar la película microbiana y evaluar el estado de la cicatrización de heridas [23]. Debido a ello ha surgido la necesidad de buscar nuevos apósitos para ayudar a prevenir infecciones causadas tanto por bacterias Gram positivas como Gram negativas, y mediante la funcionalización de este tipo de partículas sintetizadas biológicamente y la implementación de polímeros naturales el concepto moderno de apósito interactivo contemplaría los cambios en

el entorno de la herida para una mejor cicatrización debido que la respuesta celular local se re-valorizaría mejorando la retención de la humedad, inhibiendo la biopelícula microbiana, disminuyendo los exudados y estimulando el proceso de epitelización [6], [24]. Este estudio pretende mejorar la síntesis de nanopartículas de plata utilizando el potencial de biorreducción que posee el hongo ligninolítico anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* con el fin de utilizar estas AgNPs en aplicaciones biomédicas, teniendo como norte la siguiente pregunta: ¿De qué manera influyen las condiciones operacionales de síntesis de AgNPs en su aplicación para la producción de apósitos de CS-CMC?

2. MARCO TEORICO

2.1. Biomateriales

Un biomaterial puede ser definido como un material natural o sintético, o una mezcla de ambos que está destinado a interactuar con los sistemas biológicos *in vivo* para tratar, evaluar, y remplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo [25]. Estos no deben producir reacciones adversas al estar en contacto con tejidos vivos y fluidos fisiológicos [23]; y al tratarse de materiales que van a ser implantados en cualquier tipo de organismo vivo, deben ser biocompatibles, no tóxicos, químicamente estables, inertes y deben tener resistencia mecánica adecuada [26].

Dentro de los biomateriales sintéticos se encuentran metales, polímeros sintéticos y cerámicos [23], [27]. Los metales son utilizados en el campo de ortopedia como prótesis o dispositivo de fijación, y en cirugía maxilofacial y cardiovascular; presentan excelentes propiedades mecánicas como resistencia a la fatiga y a la tracción, además de alta tenacidad; son resistentes a la corrosión aunque tienen algunas debilidades debido al ambiente hostil del cuerpo humano [26]. Hasta ahora, los tres biomateriales metálicos más utilizados son los aceros inoxidables (SS), las aleaciones de cobalto-cromo (Co-Cr) y las aleaciones de titanio (Ti). Los polímeros sintéticos, por su parte han ofrecido numerosas ventajas para diversas aplicaciones en bioingeniería debido a las propiedades que exhiben como, resistencia a la tracción, buen comportamiento en cuanto a módulo de tracción y buena velocidad de degradación [28]. Polímeros sintéticos como polietileno (PE), poliuretano (PU), politetrafluoroetileno (PTFE), poli acetal (PA), polimetilmetacrilato (PMMA), polietilentereftalato (PET), caucho de silicona (SR), polisulfona (PS), polietereetercetona (PEEK), ácido láctico poli (PLA) y ácido poliglicólico (PGA) siguen siendo importantes en la medicina clínica como componentes esenciales de

dispositivos protésicos permanentes, incluidos implantes de cadera, lentes artificiales, injertos vasculares de gran diámetro, catéteres, etc. [29]. Por último, se destacan los cerámicos, sus principales ventajas para aplicaciones biomédicas radican en la similitud en cuanto a la composición química y las propiedades mecánicas de los tejidos duros naturales. Estos pueden ser biológicamente inertes (alúmina y zirconia) o biológicamente activos y, a menudo, biodegradables (fosfatos de calcio y vidrios bioactivos), cada una con un conjunto único de características que las hacen útiles para aplicaciones específicas en medicina [30].

Existen otros tipos de materiales que son los polímeros naturales que se derivan de animales, microbios o plantas. Varios compuestos naturales se han propuesto como materia prima para la industria de polímeros, como azúcares simples y carbohidratos complejos (celulosa, almidón), lignina y aceites vegetales [31]. En la actualidad, polímeros naturales generalmente clasificados como polisacáridos (quitano, quitina, dextrano, alginatos, condroitina y heparina), proteínas (colágeno, gelatina, fibrina, fibroína de seda y queratina), proteoglicanos, celulosa bacteriana y poliamidas [32], son los más utilizados en aplicaciones clínicas y biomédicas debido a sus cualidades versátiles como biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad y capacidad de adsorber moléculas bioactivas [33], [34]. Una ventaja de este tipo de materiales es que forman parte de la matriz natural del cuerpo y contienen componentes que poseen actividad fisiológica, por tal motivo tienen un efecto terapéutico activo en la reparación del tejido. Como resultado, se suprimen los problemas de toxicidad y de reacciones inflamatorias crónicas provocada por muchos polímeros sintéticos [23].

Generalmente cuando estos biomateriales anteriormente descritos son utilizados en implantes pueden fallar debido a diversos factores. El primer tipo de falla se debe a deformaciones permanentes, fracturas por sobrecarga o fatiga, corrosión y desgaste. El segundo tipo de falla es la infección, inflamación y/o alguna otra respuesta del organismo ante la presencia del material [35]. Muchas veces estos biomateriales son hidrofóbicos y debido a las interacciones que se produce entre la superficie y el medio biológico facilita la unión inicial de las bacterias, la cual no es específica y, por tanto, irreversible. Esta adhesión bacteriana se puede prevenir a través de la fabricación de superficies anti-infecciosas y determinando la características de estas, como morfología de la superficie, microestructura, y composición [36].

Entre las técnicas de modificación superficial más utilizadas se puede encontrar superficies bactericidas a base de plata, las cuales comprenden polímeros

revestidos de plata dopados con plata, nanopartículas de plata o películas delgadas de plata [37]. Recientemente, la fabricación de superficies funcionalizados con nanomateriales como nanopartículas de plata, han sido implementadas para mejorar las propiedades antibacterianas de las superficies de los biomateriales, debido a que puede afectar las funciones celulares y subcelulares de forma significativa y poseen muy buenas propiedades biológicas [38].

2.2. Nanopartículas de plata

Según la Organización Internacional de Normalización (ISO), Las nanopartículas de plata (AgNPs) se definen como partículas coloidales de plata sólidas con un rango de tamaño de 1 a 100 nm. Estos materiales poseen en común una estructura nanocristalina o requieren la presencia de alguna características que se encuentre a nanoescala [39], [40]; y presentan propiedades funcionales únicas, que conducen a aplicaciones variadas en las áreas de medicina, catálisis, sensores ópticos y bactericidas [35].

Una de las características que hace más atractiva la aplicación de las AgNPs es la baja probabilidad del desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos en comparación a los antibióticos, debido a que al interactuar con la pared, proteínas y ADN, pueden internalizarse generando daños por estrés oxidativo, produciendo acumulación de plata (Ag) en el interior de la célula, afectando su permeabilidad y conduciendo a la muerte celular [35]. La preparación y la estabilización de este tipo de nanopartículas se realizan a través de métodos físicos, químicos y biológicos; y un requisito importante para que las AgNPs retengan sus propiedades físicas y sus características antibacterianas es mantener el tamaño a nanoescala y mejorar su estabilidad de dispersión, evitando la agregación [35], [41].

2.2.1. Síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs)

Los métodos de preparación de nanopartículas de plata (AgNPs) se clasifican como *top-down*, en donde se utilizan métodos físicos como procesos de molienda; *bottom-up* que se refiere a métodos químicos en solución coloidal los cuales son procesos de formación de partículas a partir de una solución y a los métodos biológicos [42].

2.2.1.1. Métodos físicos: Este mecanismo consiste en la división de sólidos másicos en porciones más pequeñas con un consumo considerable de energía. No involucra el uso de productos químicos tóxicos y por lo general tienen un tiempo de procesamiento rápido [17]. La síntesis física de nanopartículas puede llevarse a cabo por diversos métodos. Entre muchos métodos de síntesis física de nanopartículas se puede mencionar la síntesis mediante “termólisis”, que se caracteriza por someter a los precursores metálicos (generalmente compuestos organometálicos en estado de oxidación cero) a altas temperaturas en conjunto con un compuesto estabilizante [43], también el depósito químico en fase vapor que consiste en la descomposición de uno o varios compuestos volátiles, en el interior de una cámara de vacío (reactor), o cerca de la superficie de un sólido para dar lugar a la formación de nanopartículas [44]. Cuando se utilizan este tipo de métodos existe la desventaja de no tener suficiente control sobre el tamaño de la partícula, produciendo nanopartículas con un amplio rango de tamaño que pueden originar un efecto poco controlable cuando es administrado en un sistema biológico; además, existe también la desventaja de la aparición de imperfecciones en la estructura de la superficie lo que podría generar un impacto significativo sobre las propiedades físicas y químicas de la superficie de las nanopartículas metálicas [15], [16], [42].

2.2.1.2. Métodos químicos: Este mecanismo de síntesis se basa en la reducción de sales metálicas a los átomos metálicos correspondientes, posteriormente estos átomos actúan como centros de nucleación dando lugar a la formación de racimos atómicos. Los métodos químicos para la síntesis de nanopartículas de plata se pueden dividir en varias categorías, reducción química, técnicas electroquímicas, métodos químicos de irradiación asistida y pirólisis; y por lo general son métodos que involucran soluciones que contienen tres componentes principales: precursores metálicos, agentes reductores y estabilizantes [17]. Existen ciertos beneficios cuando se utilizan métodos químicos, dentro de los que se destacan la reproducibilidad, la disponibilidad de reactivos, bajos costos de producción para alto volumen y tienen la capacidad de sintetizar nanopartículas uniformes con un tamaño de partícula estrecho, defectos relativamente menores y composición química más homogénea [42]; sin embargo sus desventajas incluyen la contaminación de los precursores químicos, el uso de disolventes tóxicos, la generación de productos peligrosos, gran consumo de energía, implementación de procesos costosos e ineficientes [15], [41], [45], [46]

2.2.1.3. Métodos biológicos: La síntesis biológica de AgNPs es un proceso que reemplaza los agentes reductores y estabilizadores por moléculas no tóxicas como

proteínas, hidratos de carbono y antioxidantes producidos por organismos vivos incluyendo bacterias, hongos, levaduras y plantas [17], [47]; es un proceso que utiliza estos organismos vivos como agente reductor, así como agente estabilizador y agente de protección terminal [48]. Los posibles mecanismos de síntesis biológica incluyen el uso de vías enzimáticas como por ejemplo, reductasa de NADPH, nitrato reductasa e hidrogenas [17], [47].

Durante las últimas décadas la obtención de AgNPs se ha dado mediante la reducción de sales de plata con diferentes agentes reductores químicos, como el borohidruro de sodio, entre otros [49], [50]. Con respecto a estos procesos, informes mostraron que AgNPs sintetizadas químicamente son altamente tóxicos para bacterias, peces, almejas, ratas, algas, plantas y humanos [51]; además, se ha descrito que dichos agentes reductores químicos podrían jugar un papel negativo en aplicaciones biomédicas como producto final debido a su toxicidad asociada [49]. Entre las ventajas que ofrece la síntesis por métodos biológicos sobre otros métodos, se puede encontrar que es un proceso sencillo, limpio, eficiente y de bajo costo de producción; las nanopartículas sintetizadas por estas rutas generalmente muestran biocompatibilidad y biodegradabilidad, y se puede obtener un alto rendimiento del producto de interés [48].

2.3. Hongos ligninolíticos

Los basidiomicetos son considerados como un grupo muy interesante de hongos, dada su excepcional capacidad de adaptación que les permite crecer en condiciones ambientales adversas, allí actúan como degradadores naturales de la lignocelulosa. Estos se clasifican como hongos de pudrición parda o pudrición blanca según la forma en que degradan la madera. Los hongos de la pudrición marrón degradan fácilmente los polisacáridos de la madera, pero solo son capaces de alterar en cierta proporción las ligninas tales como la demetoxilato lignina, que deja la madera marrón, seca y débil [52].

Los hongos ligninolíticos denominados hongos de la pudrición blanca de la madera actúan mediante la secreción de un sistema complejo multienzimático transformando la lignina de la pared celular de las plantas en compuestos menos complejos logrando su mineralización [19]. Son degradadores de lignina activos gracias a las capacidades ligninolíticas conferidas por un complejo enzimático extracelular que contiene lignina peroxidasa (LiP), peroxidasa dependiente de manganeso (MnP) y lacasa. Estas enzimas están involucradas en la oxidación de la lignina presente en la madera y en la oxidación de una amplia gama de

xenobióticos con estructuras aromáticas compuestas, incluyendo colorantes sintéticos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH). Este tipo de hongo habita el lumen de la célula de madera y las hifas fúngicas se mueven de una célula a otra a través de fosas confinadas o directamente a través de la pared celular [52], [53].

2.3.1. Hongo Ligninolítico Anamorfo R1 de *Bjerkandera sp*

El género *Bjerkandera* pertenece a la familia Meruliaceae, orden Polyporales, familia Polyporaceae con *Bjerkandera adusta* como especie más conocida y la cual está relacionada en un 86% con otro Polyporal muy estudiado: *Phanerochaete chrysosporium*. Los polyporales son reconocidos por estar involucrados en la pudrición de la madera y como patógenos en árboles vivos, lo cual ha hecho que se estudien intensivamente por sus posibles aplicaciones en la industria maderera, enfocándose en las diferentes familias existentes. En hongos superiores, Basidiomicetos y Ascomicetos, se suelen presentar fases imperfectas asexuales que se denominan anamorfos. Estos anamorfos se caracterizan por presentar esporas asexuales denominadas conidios cuya finalidad es la reproducción rápida y la supervivencia; el microorganismo empleado en dicho estudio se ha reportado como un anamorfo de *Bjerkandera adusta*. Basado en secuencias de ADN ribosomal y análisis morfológico que muestra carencia de formas sexuales y conidios cilíndricos. Además tiene un gran potencial de aplicación biotecnológica debido a su alta calidad nutritiva y organoléptica, como también la facilidad de crecer sobre subproductos agroindustriales [54].



Figura 1. Anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* a vista Macroscópica (izq.) y anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* al microscopio en 40X (der). Fuente propia [54].

2.3.2. Enzima nitrato reductasa

Es la enzima encargada de catalizar la reducción de nitrato a nitrito. En eucariotas, se trata de una proteína homodimérica, que utiliza piridin nucleótidos como donadores de electrones. Cada subunidad está compuesta por un polipéptido de unos 100-120 kDa que contiene tres grupos prostéticos FAD, hemo B₅₅₇ (hemo) y cofactor de molibdeno (MoCo), localizados en tres dominios funcionales.

Los genomas de hongos levaduras y algas contienen un único gen que codifica la nitrato reductasa, sin embargo, las plantas superiores pueden tener dos o más genes.

Se pueden distinguir tres tipos de nitrato reductasa:

- NADH-NR, presente en los sistemas asimiladores de las plantas superiores y algunas algas clorofíceas.
- NAD (P) H-NR, en levaduras y algunas algas verdes.
- NADPH-NR, en hongos [55].

El mecanismo catalítico para la reducción de nitrato eucariótico es como se ilustra en la figura 3. El NADPH proporciona el cofactor FAD con dos electrones que posteriormente se transfieren (uno a la vez) a través del hemo al sitio activo de Mo (molibdeno). El nitrato se une a la forma Mo IV activa de la nitrato reductasa y la transferencia de átomos de O a Mo se acopla con la oxidación de Mo IV a Mo VI liberando nitrito como producto. Una vez completada la semirreacción reductiva, Mo VI vuelve a su forma activa de Mo IV mediante los cofactores de FAD y hemo reducidos [56].

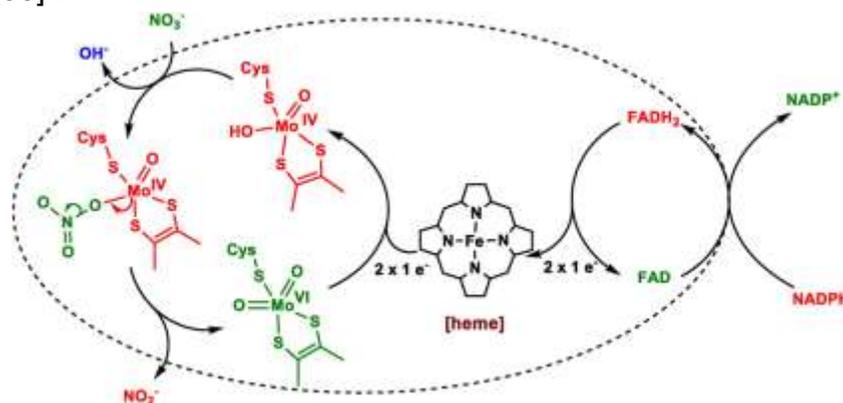


Figura 2. Características estructurales de la nitrato reductasa de eucariotas. En el esquema se representa el flujo de electrones y la reacción que se lleva a cabo [56].

Entre las aplicaciones relacionados con hongos, se ha encontrado que hongos ligninolíticos como el *Phanerochaete chrysosporium* son capaz de degradar policlorobifenilos induciendo la enzima nitrato reductasa mediante la participación de genes específicos [57].

Por otra parte se comprobó que la nitrato reductasa es la responsable de la reducción de los iones de Ag^+ y la subsiguiente formación de AgNPs empleando el hongo *Fusarium Oxysporum* [58]. En cuanto a los hongos de pudrición blanca de la madera, se reportó que la biorreducción de este material inorgánico posiblemente se debe a combinaciones de moléculas encontradas en el extracto fúngico como enzimas, proteínas, aminoácidos, polisacáridos y vitaminas; pero se informó que la nitrato reductasa son las potenciales vías enzimáticas para la biorreducción de plata [12], [47].

2.4. Heridas en la piel y apósitos

La piel humana es la primera y principal barrera contra la invasión de agentes externos nocivos para el cuerpo, representa aproximadamente el 15% del peso corporal total de un adulto y tiene una superficie de 1.5-2 m², lo que lo convierte en el órgano más grande del cuerpo humano [59], [60]. Esta consta de tres capas multi-histológicas, la epidermis, la dermis, y la hipodermis o capa subcutánea. [60]–[62]. Las heridas ocurren cuando un tejido de este tipo se rompe o la integridad celular se ve comprometida debido a problemas mecánicos, físicos o relacionados con el metabolismo. De acuerdo con la duración y la naturaleza del proceso de curación, las heridas de la piel se pueden clasificar como agudas o crónicas. Una herida aguda, por ejemplo, ocurre repentinamente, como consecuencia de abrasiones, avulsiones, quemaduras, incisiones, laceraciones y pinchazos, y se ha asociado un tiempo de curación que depende del tamaño y número de capas de piel que se han visto afectadas. En cuanto a las heridas crónicas según la Wound Healing Society, se pueden clasificar en cuatro categorías: úlceras por presión, diabéticas, venosas y de insuficiencia arterial [63]. Para el tratamiento y reparación del tejido se debe garantizar una cascada de eventos sincronizados en los que participan una variedad de células residentes y migratorias, componentes de la matriz extracelular (EMC) y mediadores solubles. Este proceso incluye cinco fases distintas: hemostasia, inflamación, migración, proliferación y remodelación [63]. Debido a que la mayoría de este tipo de heridas se acompañan frecuentemente de infecciones bacterianas, lo que dificulta el tratamiento y da como resultado altos costos médicos, ha surgido la idea de implementar apósitos de diversos materiales biocompatibles que permitan

proteger la herida de patógenos externos y que puedan garantizar un óptimo proceso de cicatrización [64], [65].

2.4.1. Apósitos

Un apósito se describe como un producto capaz de crear un entorno de cicatrización de heridas de apoyo, diseñados con el fin de absorber exudado, proporcionar un equilibrio óptimo de humedad en la superficie de la herida, evitar la maceración de los tejidos circundantes y controlar la colonización bacteriana. Su objetivo principal es preservar los principios biológicos básicos de humedad, calor, oxigenación y circulación sanguínea [66]; además, debe permitir el intercambio gaseoso, debe ser no tóxico, no alergénico, no adherente y como características principales debe retirarse fácilmente sin trauma y debe estar hecho de un biomaterial adecuado que requiera un procesamiento mínimo [67]–[69]. Existen tres categorías de apósitos ampliamente usados en regeneración de tejido y para el cuidado de heridas: biológicos, sintéticos, naturales y una mezcla de ambos.

Los apósitos tradicionales están formados a partir de gasa y algodón, y mezcla de ambos; se caracterizan por su bajo costo, facilidad de uso y fabricación. Sin embargo, poseen una gran capacidad absorbente de exudados de la herida que causa una deshidratación rápida y promueve el crecimiento bacteriano y la contaminación [62].

Injertos de piel humana y piel de cerdo son los apósitos biológicos, clínicamente más utilizados pero poseen algunas desventajas como suministros limitados, alta antigenicidad, mala adhesividad y riesgo de contaminación cruzada [62], [69], además no siempre es posible utilizar este tipo de apósitos, especialmente cuando una gran superficie del cuerpo se ve afectada [68].

Los apósitos artificiales se fabrican a partir de materiales sintéticos no biológicos y polímeros que no se encuentran en la piel, poseen una vida útil más extensa, inducen una mínima reacción inflamatoria y en su mayoría no generan riesgo de transmisión de patógenos [24], [70]. Este tipo de polímeros se puede adaptar para exhibir excelentes propiedades mecánicas, estabilidad térmica y un perfil de degradación apropiado [71].

Los apósitos con biopolímeros o polímeros naturales se pueden clasificar en dos tipos, uno de ellos con componentes activos que se pueden encontrar en el cuerpo

humano (bioactivos); y polímeros naturales los cuales pueden obtenerse de plantas, bacterias, hongos, o fuentes animales (inertes) [70]. Debido a la disponibilidad de secuencias peptídicas en sus superficies que pueden ser reconocidas por los receptores de la superficie celular, desencadenan la adhesión y proliferación celular [71], por ello se utilizan comúnmente en aplicaciones biomédicas debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad [70].

Por último los apósitos biológico-sintéticos en su mayoría son de dos capas y dentro de su composición hay una alta concentración de polímeros y materiales naturales [69]. Este enfoque combina la resistencia y la durabilidad de un polímero sintético con la biocompatibilidad y bioactividad de los polímeros naturales [71].

2.4.2. Quitosano y carboximetilcelulosa

Durante los últimos años un biopolímero que ha atraído una considerable atención para el desarrollo de biomateriales ha sido el quitosano (CS), el cual es un poli-N-acetil-glucosaminoglicano obtenido generalmente por desacetilación alcalina de la quitina. La quitina se sintetiza mediante una enorme cantidad de organismos vivos, entre los que se encuentran insectos (cutículas) y crustáceos (esqueletos), por ejemplo, cangrejos, camarones y langostas, también se extrae del exoesqueleto de especies de cefalópodos, como el calamar, la sepia y el pulpo; y puede encontrarse en las paredes de algunos hongos [24], [72], [73]. En cuanto a sus aplicaciones, se ha prestado mucha atención a los materiales biomédicos basados en CS debido a sus propiedades únicas como biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad, alta densidad de carga, y mucoadhesión [59], [73]–[75].

Otro biomaterial de origen natural de gran importancia en aplicaciones biomédicas ha sido la carboximetilcelulosa (CMC), un polielectrolito natural derivado de la celulosa introduciendo un grupo carboxilmetilo ($-\text{CH}_2\text{COOH}$). Este ha sido frecuentado en aplicaciones médicas y farmacéuticas debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad, no toxicidad, buenas propiedades formadoras de película y sensibilidad al pH, características que lo han hecho indispensable en la fabricación de vendajes para heridas, crecimiento de huesos y piel artificial [76].

A continuación, se presentan los documentos más actuales (Base de datos bibliográficas usadas- *Springer Link* y *Science Direct* 2013-2018) encontrados para la síntesis de nanopartículas de plata por métodos biológicos, incluyendo la utilización de estas en apósitos y otros biomateriales.

3. ESTADO DEL ARTE

3.1. Generalidades

Durante las últimas décadas se ha informado que las nanopartículas plata (AgNPs) exhiben propiedades físico-químicas notablemente inusuales y actividades biológicas elevadas. Estas han demostrado gran importancia debido a su amplio espectro antimicrobiano contra varias cepas de bacterias, incluyendo *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* entre otras [6]. Debido a ello, se consideran una importante herramienta que contribuye en el desarrollo de nuevos biomateriales que pueden ser utilizados en medicina regenerativa y scaffolds para la ingeniería de tejidos [77]. En este campo se pueden encontrar diversas investigaciones con excelentes resultados que muestran que biomateriales como hidroxiapatita impregnados con AgNPs pueden llegar a promover la integración hueso-implante, reduciendo la infección bacteriana y aumentando su bioactividad [78].

Para incrementar el uso de nanopartículas de plata (AgNPs) en este tipo de biomateriales es importante considerar algunas propiedades fisicoquímicas, que incluyen el tamaño (área de superficie), forma, carga superficial y recubrimiento, aglomeración y la velocidad de disolución debido a que son particularmente importantes para determinar sus interacciones e impactos biológicos. Las partículas más pequeñas tienen un área de superficie más grande y, por lo tanto, tienen un mayor potencial tóxico [79], [80]. En cuanto a esto, se ha tratado de implementar nuevos procesos de síntesis de AgNPs que mejoren dichas propiedades y dentro de los métodos existentes, la utilización de métodos biológicos se puede considerar una herramienta interesante al ser un método no tóxico porque no requiere de materiales peligrosos en la superficie de los nanomateriales [18]. Recientemente estudios han mostrado que diferentes extractos de planta se pueden usar como un agente reductor para sintetizar AgNPs [13], [16], [45]. Estas AgNPs fueron incorporadas en diferentes biomateriales como apósito para quemaduras logrando una contracción de la herida casi completa en un modelo de rata después 18 días [13], también se reportó que estas AgNPs tienen un gran efecto antimicrobiano por lo cual podrían jugar un papel importante dentro del desarrollo de diferentes dispositivos biomédicos [41], [45], [49].

Entre los organismos involucrados en la síntesis biológica de AgNPs, la implementación de hongos se plantea como una excelente vía de síntesis de AgNPs debido, en primera instancia a la tolerancia filamentosa, elevada capacidad de unión

y captación intracelular con metales; y por último a que la malla del micelio fúngico puede soportar presiones de flujo, agitación y otras condiciones en diversos procesos que requieran el uso de biorreactores, cámaras y otros equipos [47], [81], [82]. Trabajos, por ejemplo muestran que es más ventajoso con respecto a las bacterias y plantas debido a que tienen mayor tolerancia, ofrecen crecimiento rápido de micelios, producción fácil de biomasa y viabilidad económica [83], además poseen una gran tendencia a crecer incluso en condiciones difíciles lo cual facilitaría la capacidad de secretar una gran cantidad de enzimas y proteínas específicas [84]. Es bien conocido que la síntesis de nanopartículas aparece mediante el uso de enzimas específicas secretadas por los hongos, esto llevaría a la posibilidad de que los microorganismos generadores sobre expresen moléculas reductoras específicas y agentes de protección y, por lo tanto se pueda controlar el tamaño y la forma de las nanopartículas sintetizadas [12]. Existen diversos hongos como *Colletotrichum*, *Aspergillus fumigatus* [81], [82], *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternante*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium brevicompactum*, *Trichoderma asperellum* y *Verticillium sp* [83], [85] y hongos de pudrición blanca de la madera [12], [47], [86], [87] que han sido estudiados para sintetizar AgNPs. Con respecto a los hongos de pudrición blanca de la madera se reportó AgNPs biocompatibles con buenas propiedades físico-químicas mejoradas, por lo que puede ser una alternativa para el desarrollo de diversas herramientas de uso clínico [12], [86], [87].

Un importante aspecto a tener en cuenta con las AgNPs es el efecto citotóxico asociado. Investigaciones recientes indicaron que se pueden conseguir variaciones en la toxicidad de nanopartículas metálicas modificando su superficie mediante la unión a otras moléculas. Dicho estudio arrojó que las nanopartículas recubiertas de péptidos bifénilos (conteniendo glicina, cisteína, tirosina, triptófano y metionina) mostraron una enorme estabilidad y causaron menos toxicidad en varias líneas celulares de trucha arcoíris [88]. Saravanan *et al.* por ejemplo, usaron AgNPs sintetizada por medio del hongo de pudrición blanca de la madera *Phenerochaete chrysosporium* y detallaron que este tipo de AgNPs tuvieron un efecto antibacteriano significativo contra bacterias patógenas humanas resistentes a medicamentos y confirmaron que no hubo toxicidad considerable contra células de fibroblastos de embriones de ratón [86]. Por otra parte, trabajos preliminares encontraron que la acción de proteínas como tirosina y triptófano tuvieron un rol fundamental como agente estabilizante de las AgNPs sintetizadas por el también hongo de pudrición blanca de la madera anamorfo R1 de *Bjerkandera sp*; estos resultados pueden ser prometedores debido a que este tipo de AgNPs con estos recubrimientos proteicos

puede jugar un papel importante en cuanto a su estabilidad y biocompatibilidad para la implementación y fabricación de nuevos biomateriales [87].

3.1.1. Nanopartículas de plata y apósitos

Una de las aplicaciones más prometedoras de las nanopartículas de plata (AgNPs) en el campo biomédico se encamina hacia el desarrollo de nuevos apósitos. Un punto importante dentro de la fabricación efectiva del apósito impregnado con AgNPs debe tener en cuenta la naturaleza de los materiales utilizados en el proceso de preparación y los resultados previstos de los productos finales [33]. Entre los biomateriales más utilizados para la fabricación de apósitos se encuentran los polímeros. Diversos polímeros sintéticos en su mayoría caracterizados mediante electrospinning como nanofibras de poliuretano, acetatos de celulosa, poli(N, N-dietil-acrilamida) interactivo y de respuesta térmica han sido utilizadas como potencial apósito para heridas [24], [89]. Se ha descrito, que hidrogeles de poli (alcohol vinílico) (PVA) / quitosano (CS) cargados con AgNPs sintetizadas biológicamente poseen una estructura porosa altamente interconectada, AgNPs bien distribuidos, resistencia a la tracción y biocompatibilidad adecuadas, que cumplirían los criterios básicos para aplicaciones para vendaje de heridas [89], [90]; por otra parte, con respecto a otros polímeros se encontró que películas poli (N-vinilpirrolidona) (PVP) y polietilenglicol (PEG) impregnadas con AgNPs obtenidas de extractos de miel, así como la fabricación de hidrogeles a partir de estos compuestos pueden ser usados para evaluar la fuerza de adhesión en la piel humana [91].

Con respecto a los polímeros naturales (biopolímeros) y teniendo en cuenta las excelentes propiedades cicatrizantes que exhiben algunos de ellos, se cree que la combinación de estos con AgNPs puede ser altamente beneficiosa en el proceso de cicatrización de heridas ya que la combinación podría actuar sobre heridas de dos maneras. En primer lugar, la acción promotora del crecimiento celular de las proteínas encontradas en los biopolímeros y la segunda, la acción antimicrobiana de amplio espectro de AgNPs sobre los microbios que afectan a las heridas [5], [24]. una gran variedad de ellos, como homoglicanos entre los que se encuentra la quitina y quitosano (CS) estructurados en nanofibras y celulosa en forma scaffolds; heteroglicanos como los alginatos y la carragenina en forma de hidrogeles y proteínas como el colágeno y la queratina en forma de esponjas, han sido ampliamente utilizados en el campo de la medicina regenerativa, debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad. En cuanto a trabajos recientes, se reportó

excelentes resultados en la fabricación de hidrogeles de carragenina tipo *Kappa* impregnadas con AgNPs sintetizadas mediante un método verde utilizando extracto de semilla de planta de *Citrullus colocynthis* y esponjas de CS fúngico cargadas con AgNPs biosintetizados a partir de extractos de plantas medicinales *Cuscuta reflexa*, estos estudios arrojaron niveles aceptable de toxicidad, lo que hace de este tipo de productos sustitutos ideales para vendajes de heridas [72], [92].

3.1.2. Apósitos de quitosano

Recientemente el quitosano (CS) ha atraído una considerable atención para la fabricación de apósitos debido a que pueden promover la curación de heridas activando los fibroblastos, regulando la deposición y la disposición de las fibras de colágeno, facilitando la migración celular y estimulando la granulación y vascularización [13], [34], [62], [73]. Entre sus propiedades más conocidas se sabe que el CS es un polímero que posee actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. El mecanismo más aceptado propone que la actividad antimicrobiana del CS se debe a las interacciones electrostáticas que ocurren entre los grupos cargados positivamente de CS (grupos amino de glucosaminas) y los grupos cargados negativamnete que se encuentran en la pared celular bacteriana (componentes de la superficie entre los que se destaca los peptidoglicanos). El segundo mecanismo propuesto describe la formación de una envoltura polimérica alrededor de las bacterias, lo que posiblemente inhibiría la absorción de nutrientes. El último mecanismo informa que el CS pueden interactuar con metales traza y oligoelemntos esenciales para el crecimiento bacteriano [93].

Por otra parte se ha informado el uso nanocompuestos de CS impregnados con nanopartículas inorgánicas entre ellas oro (AuNPs) y plata (AgNPs), como posible material antibacteriano de vendajes para herida [33], [94]–[96]. Verma *et al.* demostraron la cicatrización acelerada de las heridas y la actividad antimicrobiana de compuestos de sericina y CS impregnados con AgNPs en un modelo de herida de rata. Los resultados revelaron que el efecto combinado de AgNPs y el material compuesto aumentó la producción de colágeno, y la reepitelización se produjo en heridas abiertas [33]. Por otra parte, Lu *et al.* realizaron evaluaciones in vivo en ratones confirmando que los apósitos de CS funcionalizados con AgNPs y óxido de Zinc (CS-AgNPs / ZnO) permitieron una cicatrización más rápida, una reepitelización más completa y unas propiedades de deposición de colágeno más densa en comparación con el apósito de CS puro unido con ungüento de ZnO. Estos

resultados sugieren que apósitos compuesto de quitosano y plata pueden tener una aplicación potencial para el cuidado de heridas.

3.1.3. Apósitos de carboximetilcelulosa

Entre muchos de estos polímeros naturales, la carboximetilcelulosa (CMC), también ha jugado un rol importante en aplicaciones potenciales como apósitos para heridas [97]. Por tener una alta capacidad de unión al agua, buena compatibilidad con la piel y la membrana mucosa, se ha utilizado como único material o combinándolo con fármacos en vendajes para el tratamiento de heridas [98]. Estudios recientes muestran, por ejemplo, que vendajes de CMC son capaces de promover la cicatrización de la herida de espesor parcial, a través de la regulación de la pérdida de agua transepidérmica en una forma dependiente del peso molecular del polímero, además se ha demostrado que fibras hechas de celulosa carboximetilada poseen buenas propiedades de hinchamiento, que les permite formar un gel cohesivo para la eliminación de bacterias por encapsulación [99].

Entre otras aplicaciones, el CMC se ha mezclado con una gran variedad de nanopartículas. Entre estas nanopartículas, las nanopartículas de plata, oro y sílice han atraído un interés significativo debido a sus propiedades únicas adecuadas para aplicaciones *in vivo*. Se informó el desarrollo de apósitos de herida de hidrogel de CMC cargado con AgNPs, con propiedades antimicrobianas óptimas, lo que aseguraría un entorno húmedo de la herida y facilitarían la cicatrización temprana de esta [100], [101].

3.1.4. Apósitos de CS-CMC

Gracias a las excelentes propiedades que exhiben ambos polímeros, la implementación de mezclas CS-CMC han sido ampliamente utilizados en diversas aplicaciones biomédicas, por ejemplo, debido a que el CMC es un polímero aniónico con una estructura similar a la del CS, se puede establecer una unión cruzada fuerte con este para formar un complejo polielectrolito. Investigaciones recientes han mostrado que compuestos de CS / CMC como scaffolds que contienen vidrio bioactivo han sido usados en aplicaciones de ingeniería de tejidos óseos [102]. También otros estudios detallaron que la incorporación de CMC a la matriz polimérica de CS mejora la resistencia a la tracción, y absorción de agua; mostrando así, que este tipo de mezclas puede mejorar la capacidad de hinchamiento y adsorción de proteínas en la fabricación de apósitos [76], [97].

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar el proceso de síntesis de nanopartículas de plata a partir del hongo ligninolítico anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* para su aplicación en apósitos.

4.2. Objetivos Específicos

- Estudiar la producción de la enzima nitrato reductasa a partir del hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* y su influencia en la síntesis de nanopartículas de plata.
- Desarrollar un método para la fabricación de apósitos de quitosano y carboximetilcelulosa con nanopartículas de plata.
- Determinar la morfología, las propiedades antimicrobianas y de biocompatibilidad in vitro de los apósitos fabricados.

5. METODOLOGIA

5.1. Revisión y análisis bibliográfico

Se analizó detalladamente la conformación del marco teórico y de la revisión del estado del arte, comprendiendo la búsqueda en bases de datos bibliográficas (*Springer Link* y *Science Direct*) y el manejo de la información se realizó mediante el referenciador bibliográfico Mendeley®.

5.2. Métodos analíticos

5.2.1. Análisis de azúcares reductores

Para cada una de las muestras tomadas se determinó la concentración de glucosa mediante el método colorimétrico de los azúcares reductores DNS (ácido dinitro salicílico) [19].

5.2.2. Análisis de concentración de biomasa

De los cultivos con hongo suspendido, se tomó una muestra representativa de volumen conocido (20 mL), con una pipeta de boca ancha y se filtró al vacío por papel de filtro previamente seco. Posteriormente la muestra se secó durante 2 h a

105 °C y se determinó el peso de la biomasa seca [19].

5.2.3. Análisis de la actividad enzimática

La biorreducción de nanopartículas de plata (AgNPs) ocurre debido a la presencia de agentes reductores los cuales reducen los iones en la solución de nitrato de plata en átomos de plata de dimensiones nano [22]. La actividad nitrato reductasa (NR) se valoró con respecto a la velocidad de aparición del producto, en este caso el nitrito. En este proyecto se utilizó denominada unidad de actividad (U). Se reportó la actividad NR como los μ moles de producto formado (Nitrito) por minuto. La actividad de la preparación enzimática se expresó en unidades por unidad de volumen (U/L) [103].

La cuantificación de nitrito se basó en la reacción del ion nitrito con el 2,3-diaminonaftaleno (DAN) que tiene como producto el 1-(H)-naftotriazol (NAT), el cual emite fluorescencia a 450 nm. Por lo tanto, la intensidad de fluorescencia fue proporcional a la cantidad de nitrito liberado por el hongo en el medio de cultivo [104], [105] . Para la construcción de la curva de calibración se preparó una solución base de nitrito a 100 mg de $\text{NO}_2 \text{ L}^{-1}$ mezclando 15 mg de nitrito de sodio en 100 mL de agua desmineralizada. Para la estandarización de la curva se realizaron 3 conjuntos de experimentos utilizando una concentración DAN a 10 mg/100ml y manteniendo cada conjunto de muestras de nitrito en un rango que comprendió 3, 7, 13, 27, 40 y 53 μg de $\text{NO}_2 \text{ L}^{-1}$. Para estandarizar la curva de calibración y corroborar que la cuantificación de nitritos es confiable, se realizó un diseño de bloques aleatorizados que permitiera demostrar el efecto de cada medición realizada sobre la variable fluorescencia, teniendo en cuenta un posible efecto de las 6 concentraciones de nitrito evaluadas. En el Anexo 1 se muestra los resultados obtenidos.

Para la preparación del Flouorforo se disolvió 2,3-diaminonaftaleno (DAN) (10 mg) en 100 mL de ácido clorhídrico 0,25 N para obtener la solución madre de DAN a 100 mg/L⁻¹. Los análisis de nitrito se realizaron agregando 50 μ L de solución DAN a 1 mL de muestra del filtrado del hongo que reacciona con el KNO_3 . La mezcla se agitó en vórtex y luego se dejó reposar durante 7 minutos en oscuridad. Trascorrido ese tiempo se añadieron 25 μ L de una solución de hidróxido de sodio 0,58 M (volumen final para el análisis de fluorescencia de 575 μ L) y se incubó la placa 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, la mezcla se homogeneizó y la medición de fluorescencia se realizó inmediatamente. La fluorescencia se midió en

el espectrofluorímetro SYNERGY H1, biotek ® a 365 nm de longitud de onda de excitación y 450 nm de emisión [105].

5.3. Obtención de nanopartículas de plata

5.3.1. Microorganismo y medio de cultivo

Se utilizó la cepa del hongo de la pudrición blanca de la madera anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* [106] , que fue cedida por el laboratorio de Bioprocesos del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Antioquia. La cepa madre se conservó en astillas de madera con glicerol y se almacenaron a 4 °C. A partir de la cepa madre se realizaron repiques en cajas Petri con medio Kimura sólido y los inóculos necesarios para poner en marcha todos los ensayos, se prepararon transfiriendo 4 trozos de agar colonizado a Ferbatch con medio de cultivo Kimura líquido [19]. Posteriormente, la capa de micelio formada se homogenizó en una licuadora durante 20 s para los diferentes ensayos.

5.3.2. Cultivo para la producción enzimática

Para la determinación de la cinética de crecimiento y síntesis de nitrato reductasa (NR) a partir del hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* se realizó un experimento con muestras destructivas por triplicado correspondientes a cada día de la cinética (2, 4, 6 y 8 días). La experimentación se llevó a cabo en matraces de 100 mL con 40 mL de medio Kirk Modificado pH 5.5 [19], [87] empleando un 10% v/v de inóculo homogenizado. Los matraces se incubaron a 30 °C con agitación de 175 rpm; se tomaron muestras periódicas para determinar la concentración de biomasa, sustrato y la actividad de la enzima NR. Para el análisis de la actividad NR, el sobrenadante obtenido de cada filtración de la cinética de producción enzimática se mezcló con nitrato de potasio (KNO₃) a una concentración final de 0.1% P/V. Este ensayo se realizó en matraces de 100 mL y se incubaron a 30 °C con una agitación de 175 rpm. Se efectuó un monitoreo de la actividad enzimática cada 24 h hasta completar 144 h de reacción. Cada muestra se corrió tres veces. En este experimento se realizó seguimiento de azúcares reductores y biomasa para detectar si las diferentes fases de crecimiento y el consumo de sustrato estuvieron directamente relacionadas con la síntesis de la enzima NR dentro del extracto fúngico.

5.3.3. Biosíntesis de nanopartículas de plata

Para llevar a cabo este proceso de biosíntesis de nanopartículas de plata (AgNPs), en primera instancia, el micelio triturado del hongo ligninolítico anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* se mezcló con Tween 80 (formación pellets) antes de que fueran transferidos asépticamente en el cultivo.

La biorreducción de AgNPs se llevó a cabo de tres maneras: (1) biorreducción de iones de plata en el sobrenadante del cultivo (Mezcla CS), (2) biorreducción de iones de plata por absorción de átomo de plata en los micelios-pellet (MP), y (3) biorreducción de iones de plata a partir del sedimento de micelio- pellet (Mezcla SN). Para llevar a cabo estos procesos los pellets se lavaron con agua desionizada; los sedimentos lavados (1% w/v) y el sobrenadante de cultivo (1% v/v) se trataron con una solución de nitrato de plata (AgNO_3) por separado. Se evaluó una concentración inicial de dicha solución 1mM. Ambos procesos (mezclas) se incubaron después en la oscuridad a 175 rpm por 144 h [87]. Todos los ensayos se realizaron por triplicado con el fin de verificar la reproducibilidad. Una vez terminado el proceso las muestras se sonicaron y se realizó fraccionamiento por tamaños de las AgNPs utilizando membranas de UF con diferentes MWCO (Cortes de peso molecular).

5.3.3.1. Efecto del pH y la temperatura sobre la síntesis de la enzima nitrato reductasa y posterior síntesis de nanopartículas de plata

Se estudió el efecto del pH y la temperatura tomando como referencia la biorreducción de iones de plata en el sobrenadante del cultivo (mezcla CS). En este proceso se evaluaron 3 temperaturas de incubación (25, 30 y 35 °C) y tres valores de pH (5, 7 y 9) sobre la solución obteniendo 9 extractos fúngicos. Se valoró simultáneamente la actividad de la NR, así como la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) con el fin de verificar la relación de este tipo de enzima con respecto a la reducción y posterior formación de AgNPs.

Para la evaluación de la síntesis de AgNPs se planteó un diseño de experimentos factorial multinivel (3^2). En este diseño se trabajó como variable de respuesta el área bajo la curva de los espectros obtenidos a partir de la mezcla CS [107]. La significancia se determinó usando un análisis de varianza (ANOVA) y la metodología de análisis de superficie de respuesta empleando el programa estadístico Statgraphics centurión ®. La tabla 1 presenta el diseño desarrollado.

Tabla 1. Diseño Factorial Multinivel para el análisis de área bajo la curva de la síntesis de AgNPs del hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp.*

Bloque	Temperatura (°C)	pH
1	25	5
1	30	5
1	35	5
1	25	7
1	30	7
1	35	7
1	25	9
1	30	9
1	35	9
2	25	5
2	30	5
2	35	5
2	25	7
2	30	7
2	35	7
2	25	9
2	30	9
2	35	9
3	25	5
3	30	5
3	35	5
3	25	7
3	30	7
3	35	7
3	25	9
3	30	9
3	35	9

5.3.3.2. Caracterización de nanopartículas de plata obtenidas

Para examinar la morfología y presencia de plata [87], se realizaron mediciones en espectrofotometría UV-Vis empleando el espectroflorímetro SYNERGY H1, biotek para mirar la producción de nanopartículas de plata (AgNPs). Dichos ensayos fueron monitoreados cada 24 h midiendo la absorbancia de las muestras SN y SC haciendo barridos espectrofotométricos de 300-800 nm. Para observar tamaño y la distribución de las AgNPs se empleó microscopía electrónica de barrido (SEM) (JEOL JSM-6490LV), microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Tecnai F20 Super Twin TMP) y dispersión de luz dinámica (DLS) (Micrometrics Nanoplus 3 Dynamic Light Scattering). Adicionalmente, se realizó un análisis semicuantitativo de la composición química de la muestra por espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS) mediante el sistema acoplado al equipo de TEM y SEM. Para determinar las posibles biomoléculas responsables de la reducción de los iones plata y para la confirmación de las capas o restos que cubren las AgNPs, se hicieron pruebas de espectroscopía de radiación infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

5.4. Apósitos y funcionalización con nanopartículas de plata

En primera instancia para la preparación de los apósitos de quitosano (CS) y carboximetilcelulosa (CMC) se realizó un proceso de estandarización para observar que concentración de CMC era la ideal para la fabricación de las películas CS-CMC. Para este proceso la solución de CS se preparó disolviendo polvo de quitosano en una solución acuosa de ácido acético glacial al 2% (v/v); sobre la marcha se agregó diferentes concentraciones de CMC por separado (1 y 1,2% w /w (base seca del peso del CS)) y se agitó vigorosamente durante 2 h. Finalmente, se evaluaron dos procesos de plastificación añadiendo en uno, glicerol 30 % w / w sobre la base seca del peso del CS y otro añadiendo glicerol al 1% v/v del volumen total de la solución.

Para el proceso de fabricación de biopelículas que contenían nanopartículas de plata (AgNPs) se realizó el mismo proceso descrito con anterioridad a diferencia que la dispersión de AgNPs se diluyó sobre la solución CS-CMC en una relación de 1% v/v y se mezcló durante 15 min. Se trabajó la proporción sobre la mejor concentración de CMC. Finalmente, se añadió glicerol como plastificante bajo las mejores condiciones halladas anteriormente y se agitó durante 30 min. Una vez preparadas las soluciones formadoras de biopelículas, se colocaron 20 mL de cada disolución en cápsulas de vidrio de (70x70 mm y 3 mm de profundidad) y

posteriormente se secaron a 25 °C durante 72 h [108].

5.4.1. Caracterización de los apósitos de Quitosano/Carboximetilcelulosa

Los apósitos se caracterizaron usando microscopia electrónica de barrido (SEM) y microscopia digital convencional para evaluar la superficie del material y la morfología de la superficie antes y después del depósito de nanopartículas de plata (AgNPs).

Se determinó la actividad antimicrobiana de los apósitos compuestos de quitosano-carboximetilcelulosa y AgNPs empleando *Escherichia coli* [109], [110]. La cepa fue cedida por el laboratorio de Bioprocesos del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Antioquia. Para la reactivación, la cepa se cultivó en 5 ml de caldo nutritivo por 24 h. Luego 100 µL de caldo bacteriano se cultivaron en cajas de Petri en agar bacteriológico; para este caso se empleó el método de difusión por agar y en las soluciones para formar apósitos que contenían AgNPs se sumergió papel filtro de 0.2 µm (diámetro=12 mm) para los diferentes ensayos. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h. Después de la incubación, se midió la zona de inhibición alrededor del papel filtro [10], [87]. Se realizó en este experimento una validación estadística para confirmar si había una diferencia estadísticamente significativa sobre el halo de inhibición. Los ensayos se realizaron por duplicado para las mejores muestras obtenidas de las mezclas CS y mezclas SN que contenían AgNPs.

Las propiedades mecánicas de las películas se determinaron utilizando una maquina universal DBBP-20 (Bongshin, Corea), de acuerdo con el método estándar ASTM D882-91 (ASTM, 2001). Con el fin de determinar la máxima resistencia a la tracción (TS, MPa), el módulo de elasticidad (EM, MPa) y la elongación máxima (EB, %), las películas se cortaron en piezas en forma rectangular (65 mm x 12 mm) y se montaron entre los agarres de la máquina. Se realizaron ensayos por duplicado teniendo en cuenta las mejores condiciones de síntesis de las mezclas CS y SN.

5.5. Evaluación biológica de los apósitos.

La biocompatibilidad *in vitro* de los apósitos se estudió mediante ensayos de citotoxicidad, este ensayo permitió estudiar el efecto o potencial tóxico del material sobre las células [83]. Los ensayos se efectuaron a apósitos solo de Quitosano-

Carboximetilcelulosa (CS-CMC) con nanopartículas de plata (AgNPs) que fueron obtenidas bajo los mejores resultados de síntesis.

Se determinó la toxicidad indirecta de los materiales sobre las células Detroit (Fibroblastos de piel humana) utilizando el método realizado por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa (MTT). Los materiales fueron incubados en medio DMEM (medio basal) con suero fetal bobino (SFB) al 10% durante 24 h a 37 °C. De forma paralela se cultivaron en platos de 96 pozos las células Detroit durante 24 h. Pasado este tiempo de incubación, se extrajo el medio de cultivo donde fueron incubados los materiales y con este medio se realizaron diluciones 1:2 y se adicionaron como medio de cultivo a las células previamente cultivadas. Se evaluaron concentraciones desde 100 % (Sin diluir), hasta 3.12 %, en total 6 concentraciones. Se utilizó como control positivo de toxicidad del dimetil sulfoxido (DMSO) al 6 %, realizando también diluciones seriadas a partir de esta concentración. Se incubó durante 72 h a 37 °C, 5 % dióxido de carbono (CO₂). Finalizada la incubación se adicionó el MTT y luego de 4 h de incubación a 37 °C, se adicionó DMSO y se determinó la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro. Se estableció el porcentaje de viabilidad de las células cultivadas con el extracto de los materiales. Los ensayos se realizaron en dos experimentos independientes y con dos replicas por ensayo. Este proceso fue estandarizado por el programa de estudio y control de enfermedades tropicales (PECET) adscrito a la Universidad de Antioquia.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Cinética de producción de la enzima nitrato reductasa

6.1.1. Cinética de crecimiento y producción de la enzima nitrato reductasa

Para realizar el seguimiento al crecimiento, consumo de glucosa y síntesis de la enzima nitrato reductasa (NR) del anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* se usó el mismo medio empleado para la producción de inóculo (Medio Kimura). El seguimiento a la biomasa en el tiempo (Figura 3), presentó crecimiento exponencial desde los primeros días de cultivo, esta fase tuvo una duración aproximada de 4 días, luego de esta etapa, apareció una fase estacionaria con la subsecuente fase de muerte. El comportamiento del crecimiento del hongo, coincidió con el consumo de glucosa, pues cuando existió un crecimiento exponencial se presentó el mayor consumo de sustrato. Posterior a ello, se observó una desaceleración del consumo, cuando

termina la fase estacionaria. La máxima cantidad de biomasa fue de $4,07 \pm 0,131$ g/L, presentada al día 6 de cultivo donde se alcanzó la fase estacionaria.

En cuanto a la actividad (NR) la máxima tasa de síntesis de esta se detectó durante el final de la fase estacionaria y a comienzos de la fase de muerte y exhibió su máximo nivel en el día 8 de reacción. La máxima cantidad de enzima detectada fue de 5.87×10^{-3} (U/L) $\pm 0.0998 \times 10^{-3}$ (Figura 3). Por otra parte, una vez detectado este pico máximo de síntesis enzimática, se produjo incremento de pH en el medio con respecto al establecido inicialmente (pH 5.5), esto pudo deberse a la presencia de proteasas inducidas por el fenómeno de metabolismo endógeno del hongo durante la fase de decaimiento de la biomasa la cual empieza a observarse en el día 8 de reacción; las proteasas producen lisis e hidrólisis de las enzimas presentes, produciendo amonio y generando incremento de pH del medio [19]. Este resultado puede indicar que a partir del día 8, donde el hongo empieza a entrar en la fase de decaimiento de la biomasa, ocurra una desaceleración de la síntesis de NR. En cuanto a los otros días restantes de la cinética se observó un incremento en la actividad NR después del día 2 y un comportamiento estacionario entre los días 4 y 6. Este comportamiento pudo estar sujeto a las condiciones de crecimiento del hongo. En este lapso de tiempo (2-6 días) el hongo no ha alcanzado la fase de decaimiento de biomasa y su maquinaria enzimática se encuentra estable debido a que la totalidad del sustrato del hongo no se ha sido consumido (Figura 3).

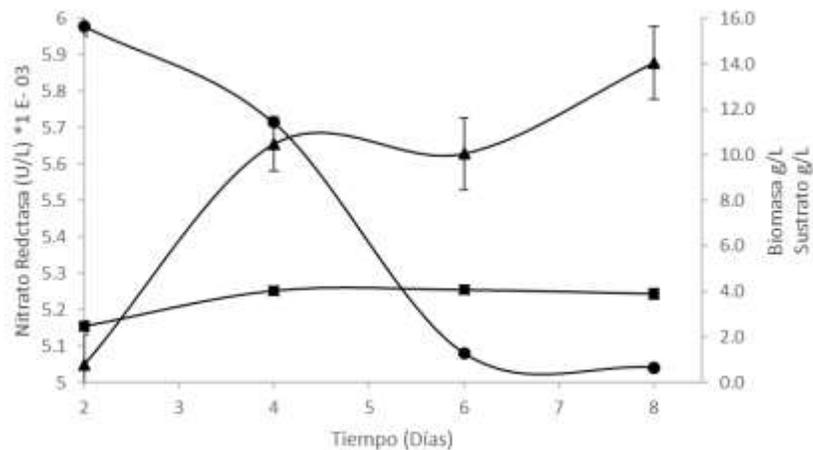


Figura 3. Cinética de crecimiento y producción de la enzima nitrato reductasa del hongo ligninolítico anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* en medio Kimura. Biomasa ■, Glucosa ●, Actividad nitrato reductasa ▲.

En la Tabla 2 se presenta el análisis ANOVA para un tiempo de producción enzimática de 96 h (tiempo en el cual se reportaron picos altos-Anexo 2). Según los valores logrados ($p \leq 0.05$) con un nivel de confianza del 95% y la prueba de múltiples rangos (Tabla 3), se pudo establecer que hubo una diferencia estadísticamente significativa de síntesis de la enzima NR entre cada uno de los niveles evaluados (días de la cinética de crecimiento y producción enzimática). Con respecto a un tiempo de síntesis de NR de 120 h (otro pico detectado dentro de la cinética-Anexo 2) se pudo constatar que no hubo similitudes en cuanto a la tasa de aparición de la NR, sin embargo, la prueba de múltiples rangos arrojó que para los días 4 y 6 no se encontraron cambios en cuanto a la síntesis de NR. Con respecto a estos resultados obtenidos y teniendo en cuenta que mediante este diseño de experimentos se quiso encontrar el mejor tiempo para valorar la síntesis enzimática; se evidenció que entre los días de cinética de síntesis de NR evaluados, la máxima producción de NR se logró a mayores tiempos, en este caso para la reacción que se llevó a cabo con el sobrenadante filtrado del día 8 de crecimiento del hongo anamórfo R1 de *Bjerkandera sp.* La evaluación en horas de la síntesis de NR para cada día de la cinética muestra en el Anexo 2, así como el análisis ANOVA y de múltiples rangos para un tiempo de síntesis enzimática de 120 h. La validación de los supuestos de regresión lineal de ambos modelos se muestra en el Anexo 3.

Tabla 2. Análisis de varianza para la variable Producción NR para un tiempo de 96 h. Cinética de producción enzimática.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4.96997E-10	3	1.65666E-10	62.93	0.0000
Intra grupos	2.106E-11	8	2.6325E-12		
Total (Corr.)	5.18057E-10	11			

Tabla 3. Prueba de múltiples rangos (Tukey) para la variable Producción NR para un tiempo de 96 h. Cinética de producción enzimática.

Días de la Cinética		Casos	Media	Grupos Homogéneos
2		3	0.000100967	X
6		3	0.000105633	X
4		3	0.0001131	X
8		3	0.000117567	X

6.1.2. Efecto del pH y la temperatura sobre la producción de la enzima nitrato reductasa a partir del hongo de pudrición blanca de la madera hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp*

La figura 4 presenta los diferentes valores logrados en las condiciones evaluadas de temperatura T y valores de pH para determinar el efecto de estas variables sobre la síntesis de nitrato reductasa (NR).

De acuerdo con la figura 4 cuando se ajustó el extracto fúngico con AgNO_3 (mezcla CS) a pH altos disminuyó considerablemente la síntesis de NR. Con respecto a la disminución de la síntesis de NR en la mezcla CS, se pudo inferir que se debió a dos razones. Primero, a que a pH tan altos parámetros cinéticos de la reacción enzimática como la estabilidad del complejo Enzima-Sustrato, así como la velocidad del paso limitante de la reacción pudieron verse afectados, y segundo a que el pH de 9.0 ajustado dentro de la solución pudo haber deteriorado la estabilidad de la enzima extracelular, causando que se vuelva inactiva irreversiblemente [111]. Por otra parte, se evidenció que cuando se ajustó la solución a pH 5.0 y 7.0 no se vio tan comprometida la síntesis de NR en comparación con la solución a pH 9.0. Esto sugiere que cuando existe una partición casi igual de H^+ o una concentración mayor entre el microambiente enzimático y el sobrenadante del cultivo la estabilidad de la enzima no se ve regulada [111], [112].

Con respecto a la temperatura, se conoce que algunas enzimas son muy sensibles a los cambios de temperatura [113]. De acuerdo con la figura 4, temperaturas altas de incubación no favorecieron la síntesis de NR y posiblemente influyó sobre algunos parámetros de la reacción, específicamente la ionización dependiente del pH [114]. Este comportamiento se observó en mayor proporción cuando la solución fue ajustada a un pH de 9.0 (Figura 4) donde se puede apreciar que se presentó una inactivación total de la enzima después de 96 h en reacción con AgNO_3 1 mM ($T=35\text{ }^\circ\text{C}$). En este caso la velocidad de la reacción pudo verse afectada a medida que la temperatura de incubación fue aumentando, lo cual posiblemente indujo cambios conformacionales sobre la enzima, impidiendo la liberación del producto nitrito en el sobrenadante cuando la solución estaba en condiciones alcalinas. Los resultados en este estudio fueron similares a los reportados por Sachdeva y Hooda [112]; los cuales argumentan que esta puede ser una enzima altamente sensible al pH, donde incluso ligeras disminuciones o aumentos en las concentraciones de H^+ en la vecindad de la enzima puede provocar cambios drásticos en su actividad. La investigación arrojó que a pH de 7.5 la NR no se ve regulada y sugiere que la

disminución dentro del proceso de síntesis estuvo estrechamente relacionada con el incremento en la temperatura de incubación ($T > 30^{\circ}\text{C}$) [112].

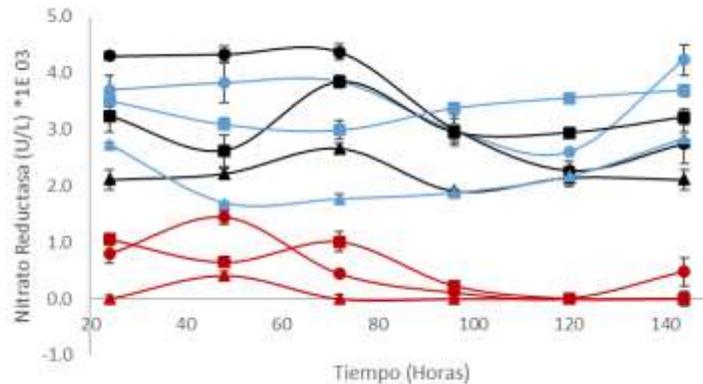


Figura 4. Cinética de producción enzimática del sobrenadante filtrado con AgNO_3 1mM del hongo ligninolítico anamorfo R1 de *Bjerkandera sp.* T 25 °C_pH 5.0 ●, T 30 °C; _pH 5.0 ■, T 35 °C_pH 5.0 ▲, T 25 °C_pH 7.0 ●, T 30 °C; _pH 7.0 ■, T 35 °C_pH 7.0 ▲, T 25 °C_pH 9.0 ●, T 30 °C _pH 9.0 ■ y T 35 °C_pH 9.0 ▲.

6.2. Síntesis de nanopartículas de plata a partir del hongo de pudrición blanca de la madera hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp*

Para la biosíntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) se tuvieron en cuenta las condiciones encontradas como mejores para la síntesis de la enzima nitrato reductasa (NR) (filtrado obtenido del día 8 de crecimiento del hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp*). En primera instancia se evaluó la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) tomando como referencia la biorreducción de iones de plata en el sobrenadante del cultivo (mezcla CS). Se corroboró que cuando se agregó sal de plata (AgNO_3) al extracto obtenido a partir del cultivo del hongo ligninolítico anamorfo R1 de *Bjerkandera sp*, se produjo un cambio de color de amarillo pálido a color marrón oscuro durante las primeras 72 h de incubación ajustando la solución a pH de 9.0, como se muestra en la figura 5. El cambio de color de la solución se debió a la formación de AgNPs debido a la excitación de las vibraciones de la superficie de plasmón de las nanopartículas [115]–[117].

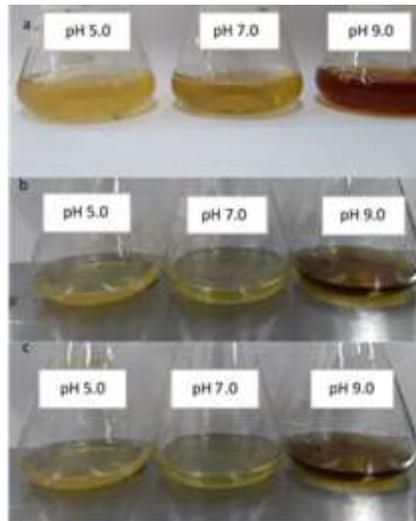


Figura 5. Biosíntesis de AgNPs en la mezcla CS. Formación de nanopartículas de plata después de 72 h de reacción para diferentes temperaturas de incubación. a) 25 °C, b) 30 °C y c) 35 °C.

En las figuras 6, 7 y 8 se muestra la solución analizada mediante espectroscopia Uv-vis en función del tiempo de reacción entre AgNO_3 1mM con el extracto fúngico para los diferentes pHs y temperaturas evaluados. No se observó evidencia de síntesis de AgNPs cuando se añadió AgNO_3 directamente al filtrado fúngico con la solución ajustada a pH 5.0 y 7.0 (Figura 6.a y 6.b, Figura 7.a y 7.b y Figura 8.a y 8.b); por el contrario, se observó un pico de absorción de resonancia de plasmón superficial (SPR) prominente, centrado a 400 nm ajustando el pH de la solución a 9.0 (Figura 6.c, 7.c y 8.c) indicando la presencia de AgNPs [115]–[117]. Estudios previos han mostrado que la SPR puede reflejar características de las AgNPs como la forma, el tamaño, las constantes dieléctricas, la cantidad sintetizada en la solución, la interacción entre ellas etc. Dicha propiedad óptica puede reportarse a partir de ciertas bandas en el espectro Uv-vis [118]. Partiendo de ello y considerando que la mayor absorbancia se detectó después de 144 h de incubación a pHs de 9.0 para todos los rangos de temperatura evaluados, se estableció este tiempo como el mejor en cuanto a producción de AgNPs. Bajo estos análisis, se pudo establecer que la reducción a iones de plata pudo estar influenciada por la presencia de algunos compuestos proteicos y que estos actuaron como intermediarios en la obtención de AgNPs [12], [119].

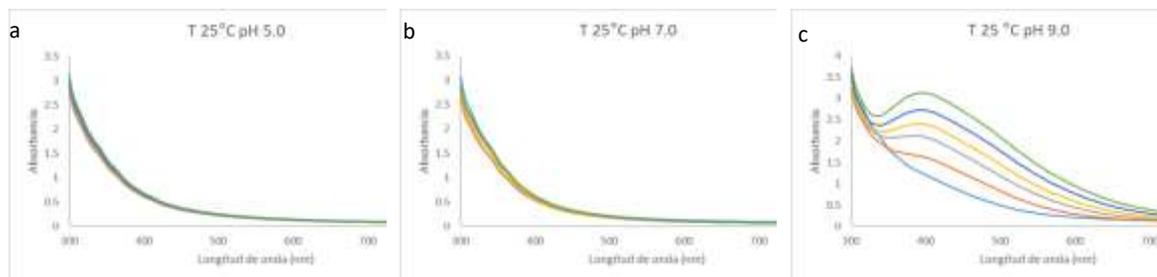


Figura 6. Espectros Uv-vis para AgNPs sintetizadas utilizando sobrenadantes del cultivo del anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* para una temperatura de incubación de 25 °C: a) pH 5.0, b) pH 7.0 y c) pH 9.0. En los tiempos de incubación: 24 h —, 48 h —, 72 h —, 96 h —, 120 h — y 144 h —.

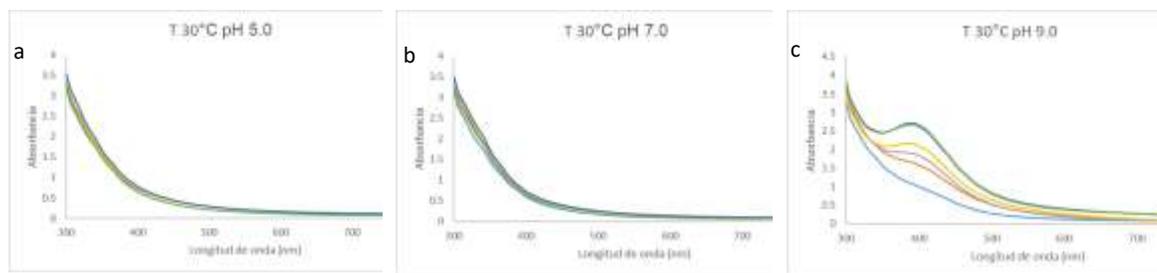


Figura 7. Espectros Uv-vis para AgNPs sintetizadas utilizando sobrenadantes del cultivo del anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* para una temperatura de incubación de 30 °C: a) pH 5.0, b) pH 7.0 y c) pH 9.0. En los tiempos de incubación: 24 h —, 48 h —, 72 h —, 96 h —, 120 h — y 144 h —.

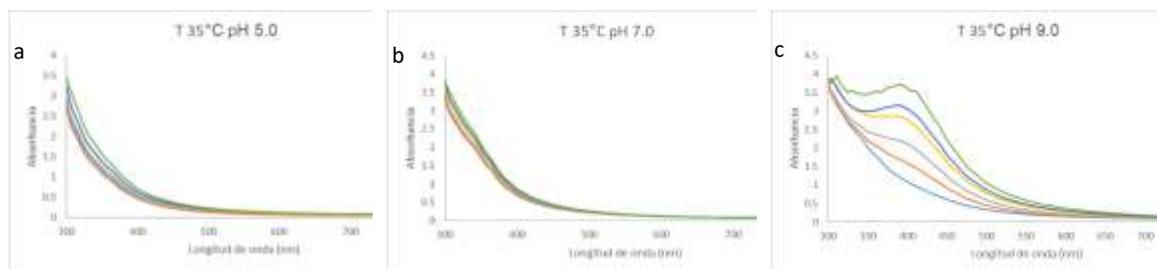


Figura 8. Espectros Uv-vis para AgNPs sintetizadas utilizando sobrenadantes del cultivo del anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* para una temperatura de incubación de 35 °C: a) pH 5.0, b) pH 7.0 y c) pH 9.0. En los tiempos de incubación: 24 h —, 48 h —, 72 h —, 96 h —, 120 h — y 144 h —.

6.2.1. Efecto del pH y la temperatura sobre la síntesis de nanopartículas de plata a partir del hongo de pudrición blanca de la madera hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp*

Mediante el desarrollo de un diseño factorial 3^2 , se identificaron los efectos de los factores de estudio temperatura y pH sobre la variable de respuesta área bajo la curva de los espectros (variable cuantitativa que permite relacionar adecuadamente la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) en cuanto a la resonancia de plasmones superficiales (SPR), mayor área bajo la curva de los espectros detectada mayor formación de AgNPs dentro de la solución) [107]. Se evaluó un tiempo de 144 h de reacción con AgNO_3 1mM, porque fue el tiempo establecido según las figuras 6.c, 7.c y 8.c.

En la tabla 4 se presenta el ANOVA para un tiempo de incubación de 144 h; de acuerdo con los valores logrados ($p < 0.05$) con un nivel de confianza del 95% se pudo establecer que la temperatura y el pH presentaron un efecto significativo sobre la variable de respuesta área bajo la curva. Esto indicó que la cantidad de nanopartículas sintetizadas estuvieron fuertemente influenciadas por la variación de ambos parámetros, trabajando los rangos establecidos.

Tabla 4. Análisis de varianza para la variable área bajo la curva. Mezcla CS.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	151.38	1	151.38	0.05	0.8256
B:pH	850991.	1	850991.	280.56	0.0000
AA	41179.2	1	41179.2	13.58	0.0016
AB	14967.2	1	14967.2	4.93	0.0387
BB	286657.	1	286657.	94.51	0.0000
bloques	742.876	2	371.438	0.12	0.8854
Error total	57631.5	19	3033.24		
Total (corr.)	1.25232E6	26			

La figura 9 muestra los resultados estimados para el área bajo la curva empleando superficies de respuesta, este análisis estimó la posible condición de operación óptima para la síntesis de AgNPs. A partir de ello se pudo mostrar que la producción y estabilización de AgNPs dentro del sobrenadante de los cultivos de producción del inóculo se vio favorecida cuando estas se ajustaron a pHs de 9.0; en el rango de temperatura evaluado se encontró que el nivel más bajo de este factor favoreció el aumento del área ($T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Este resultado indicó que un número considerable de AgNPs pudo haber sido sintetizada bajo estas condiciones [107], pero posiblemente a una ($T=35\text{ }^{\circ}\text{C}$) la concentración de AgNPs dentro del sobrenadante pudo haber aumentado [120], ya que se detectó la máxima absorbancia (Figura 8.c).

Cuando este tipo de nanopartículas se irradian con luz como sucede caracterizando la solución en el Uv-vis, el campo electromagnético induce una oscilación colectiva coherente de los electrones libres formando lo que se conoce como banda de conducción [121]. Como la longitud de onda específica donde se alcanzó la máxima amplitud de oscilación se reportó a 400 nm; este hecho pudo haber desencadenado que propiedades físico/químicas como la morfología y el tamaño de las nanopartículas sintetizadas no hayan variado en cuanto a forma y tamaño. En el Anexo 4 se presenta la validación de los supuestos del modelo.

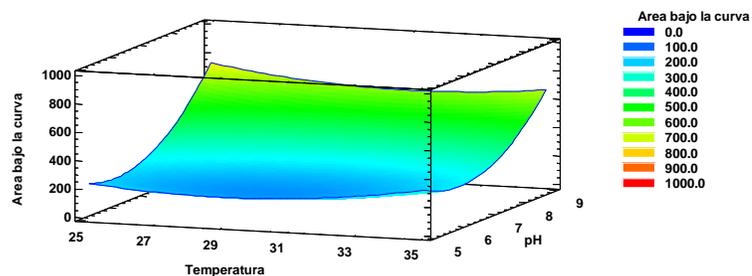


Figura 9. Graficas de superficies de respuesta estimada. Evaluación de temperatura y pH sobre la síntesis de AgNPs.

En cuanto al pH, los resultados hallados concuerdan con lo reportado por Birla *et al.* y Kobashigawa *et al.*, y posiblemente la estabilización de las AgNPs se intensificó debido a la repulsión electrostática derivada de la adsorción de OH^- , mientras que a medida que disminuyó el pH se evidenció una síntesis reducida o casi nula; y pudo darse debido a la falta de disponibilidad de iones OH^- (Figura 6.a y 6.b, Figura 7.a y 7.b y Figura 8.a y 8.b). Dentro de este proceso de síntesis, los nucleófilos OH^- desempeñaron un papel crucial en el mantenimiento de la estabilidad de las AgNPs al propiciar un adecuado ambiente de adsorción y electrones para la reducción de

los iones de plata. Bajo estas condiciones se pudieron haber formado más regiones de nucleación debido a la disponibilidad de iones OH^- que evitan la formación de agregados a través de la adsorción de nanocristales y mantiene el tamaño de las AgNPs (Figura 6.c, 7.c y 8.c).

Con respecto a la temperatura, se pudo establecer claramente un aumento en la intensidad de la banda de absorción característica de plata de la mezcla CS ajustada a pH 9.0 a medida que la temperatura de incubación fue aumentando, alcanzando la máxima absorbancia para una $T=35\text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 8.c); este proceso de reducción se efectuó rápidamente debido a que la aparición del pico característico de plata se empezó a evidenciar dentro de las primeras 24 de reacción. La síntesis de AgNPs en este proyecto se corroboró con los resultados reportados por Birla *et al.*, Darroudi *et al.* y Verma *et al.*, que mostraron el aumento de la síntesis al aumentar la temperatura en el momento de la reacción [120], [122], [123]. Para estos ensayos se reportó la presencia de una sola banda SPR en todos los espectros Uv-vis trabajando la mezcla CS a pH 9.0 bajo todos los rangos de temperatura (Figura 6.c, 7.c y 8.c). Dicho resultado corresponde a la producción de nanopartículas isotrópicas, con morfología uniforme y con poca polidispersidad. Se observó también que las intensidades de estos espectros aumentaron en función del tiempo y la temperatura (Figura 6.c, 7.c y 8.c), lo que indicó la formación de un mayor número de AgNPs dentro de la solución [124].

Para comprender mejor este sistema, se puede explicar la extinción de los diferentes espectros a partir de la teoría de Mie [119], [125], en este caso para AgNPs metálicos que tienen un único centro de banda plasmónica pronunciado a 400 nm. En primera instancia es importante entender que la SPR es la propiedad óptica más destacada de éste tipo de nanoestructuras metálicas. Consiste en una oscilación colectiva de electrones de conducción en un metal cuando los electrones se perturban desde sus posiciones de equilibrio, por ejemplo, por una onda electromagnética (luz) [126]. Este parámetro físico, se puede clasificar partiendo de dos características: propagación de plasmones superficiales y plasmones superficiales localizados. Las nanoestructuras que soportan los plasmones de superficie localizados, como las de este proyecto, pueden llegar a experimentar un campo electromagnético uniforme cuando son excitados por la luz, ya que sus dimensiones son mucho más pequeñas que la longitud de onda [121]. Bajo esta explicación, la teoría de Mie supone que el coeficiente de extinción total de pequeñas partículas metálicas se presenta como la suma de todas las oscilaciones multipolares eléctricas y magnéticas que contribuyen a la absorción y dispersión del

campo electromagnético que interactúa. Teniendo en cuenta que dentro de la mezcla CS al aumentar la temperatura de incubación no se presentaron grandes desplazamientos a la izquierda (desplazamiento azul) o hacia la derecha (desplazamiento rojo) en la longitud de onda máxima en el pico SPR, y no se observaron plasmones adicionales (Figura 6.c, 7.c y 8c), se puede sugerir que dentro de este proceso biológico se controló la morfología (esférica) y el tamaño de las AgNPs [123], [127]. En este experimento la posición del pico que corresponde a la resonancia dipolar no cambió a longitudes de onda más largas en consecuencia, a energías más bajas, lo que provocó una desaceleración en el crecimiento de la partícula. Posiblemente bajo estas condiciones (pH 9.0 y T=35 °C) se obtuvieron AgNPs de radios inferiores a 40 nm [128]. Se sugiere que trabajar a unas condiciones de temperatura elevada provoca choques térmicos, incrementa la velocidad de síntesis y la simetría de partículas [126].

Para comprobar lo explicado anteriormente fue necesario realizar mediciones mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) para determinar la morfología y el tamaño de las nanopartículas. Las figuras 10.a y 11.a muestran la diferencia en el tamaño y la forma de las AgNPs una vez se ajustó el filtrado fúngico bajo las diferentes condiciones trabajadas. Se observó que la mayoría de las partículas fueron de forma esférica y que estaban separadas con poca aglomeración. Los rangos estuvieron entre 10 y 50 nm sugiriendo que en este proceso se controló el tamaño y la forma de las AgNPs, y que ciertos residuos biológicos pudieron haber realizado la función de estabilización de las AgNPs (Figura 10.a y 11.a) [116], [129]. Para este caso, partículas más pequeñas de distribución de tamaño uniforme se formaron a medida que la temperatura de incubación de la reacción fue aumentando y cuando se trabajó a pHs altos. El análisis de espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS) (Figura 10.b y 11.b) proporcionó evidencia adicional de la reducción de AgNPs a plata elemental. Se observó un gran pico de absorción óptica, que es típico para la absorción de nanocristales de plata metálicos debido a la resonancia de la superficie del plasmón, confirmando la presencia de plata elemental [83].

Los resultados anteriormente citados dentro de la mezcla CS, dieron a entender que la intensidad de la banda SPR máxima y el ancho de la banda estuvieron influenciados por la forma de la partícula, el tiempo de incubación y en mayor proporción por el pH y la temperatura a la cual se encontraba la solución en el momento de la reacción; y que residuos de proteína u otro tipo de moléculas secretadas por el hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* en el sobrenadante pueden

ser las encargadas de la formación y posterior recubrimiento de AgNPs estables a estas condiciones como es reportado por varias investigaciones realizadas a partir de diferentes hongos [119], [129], [130].

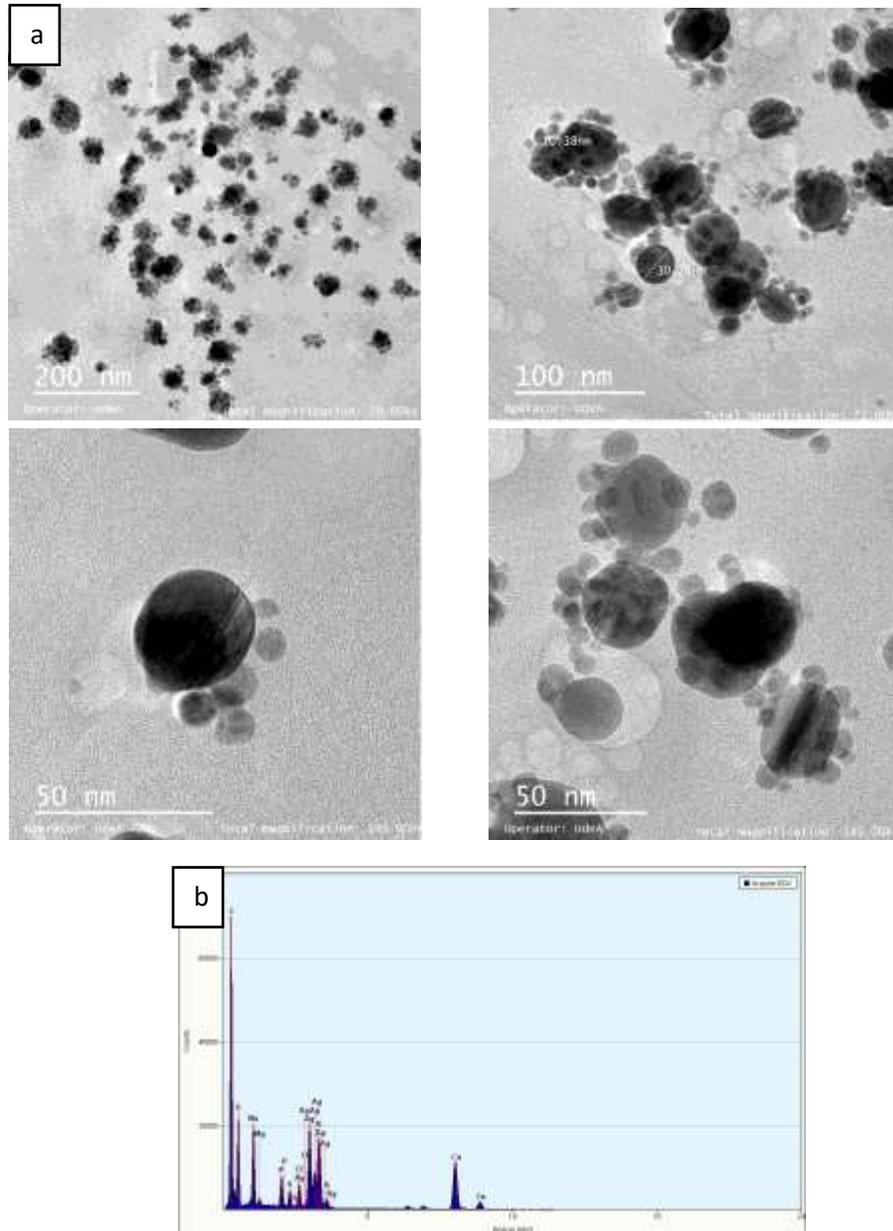


Figura 10. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM); a) imágenes de nanopartículas de plata sintetizados en las muestras CS del hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp.* Tiempo de incubación 144 h, pH 9.0, temperatura 25 °C y b) Espectro EDS para las AgNPs visualizadas.

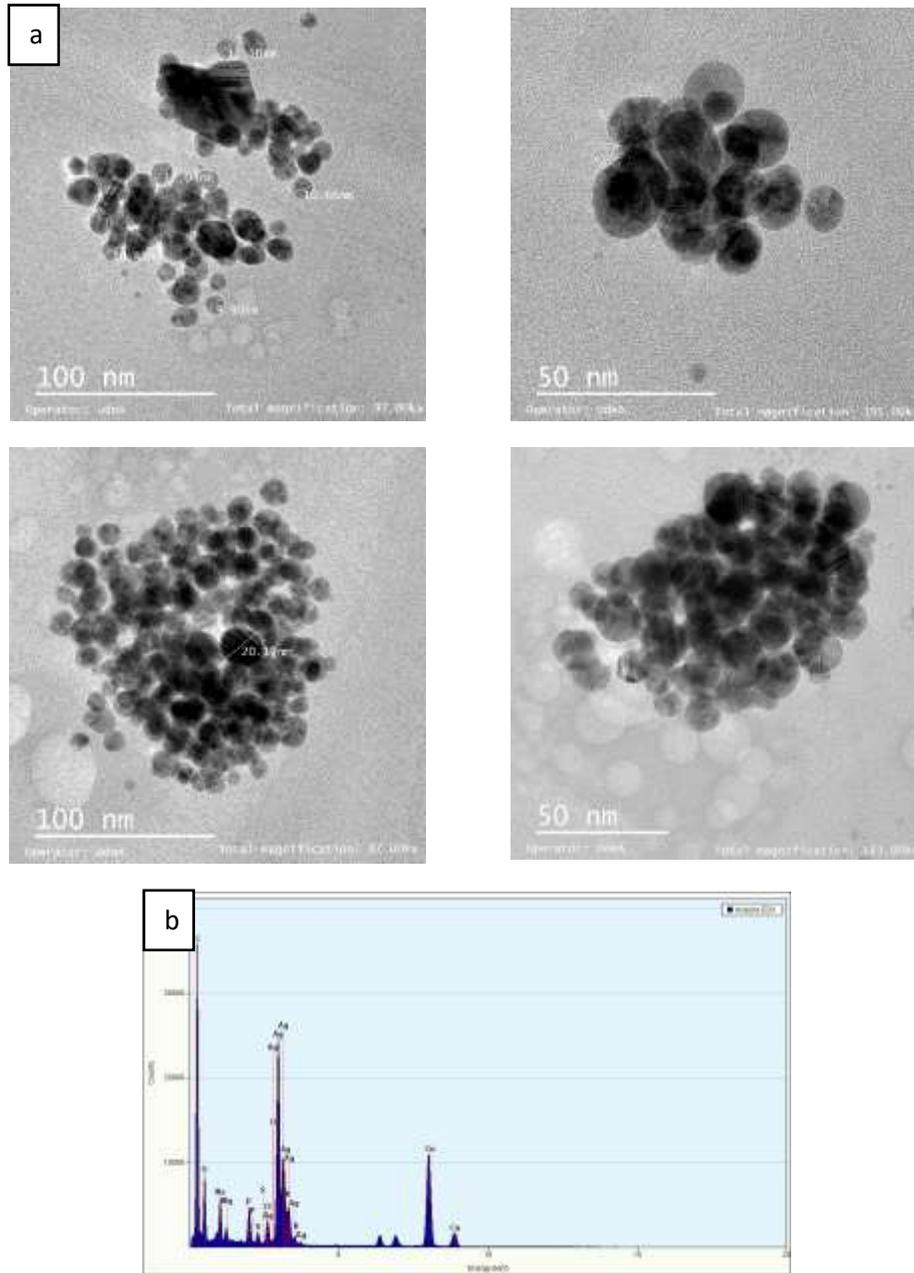


Figura 11. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM); a) imágenes de nanopartículas de plata sintetizados en las muestras CS del hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp.* Tiempo de incubación 144 h, pH 9.0, temperatura 35 °C y b) Espectro EDS para las AgNPs visualizadas.

6.3. Mecanismo probable para la síntesis de nanopartículas de plata a partir del hongo de pudrición blanca de la madera hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp*

Se realizó para este experimento mediciones mediante espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) a las mezclas CS la cual dio mejor absorbancia y un pico SPR más pronunciado (T=35 °C, pH 9.0) para identificar las interacciones de las proteínas con los iones de plata, las cuales pueden ser responsable de la reducción del ion de plata y de la estabilidad de las nanopartículas de plata (AgNPs) sintetizadas. La figura 12 muestra una banda ancha entre 3.300 y 3.500 cm^{-1} . Esta banda puede asignarse al estiramiento -N-H de la banda de amida I y al estiramiento O-H de las aminas aromáticas. Esta banda pronunciada indicó fuertes enlaces de hidrógeno y dio a entender que los átomos de nitrógeno pueden considerarse como sitios de unión activos de la plata durante la reducción de AgNO_3 en el filtrado fúngico [124], [131]. Por otra parte, se halló una banda prominente entre 1.630 y 1.680 cm^{-1} dicha banda aparece debido a las vibraciones del estiramiento -C=O (carbonilo) en el enlace amida de las proteínas secretadas por el hongo en el filtrado [124]. Otro pico fuerte se presentó a 667 cm^{-1} [132], posiblemente esta banda corresponde a compuestos heterocíclicos que se pueden encontrar dentro del filtrado fúngico entre ellos polifenoles [133].

Xie *et al.* en su trabajo de investigación explicó que la ausencia de un pico prominente a 1162 cm^{-1} en el FTIR puede desencadenar un agotamiento de los residuos fenólicos en este caso, de la mezcla CS, que acompañada por la aparición de un estiramiento de un grupo carbonilo como se reporta en la figura 12, permite la formación de una estructura de fenóxido a partir de la oxidación del grupo fenólico tirosina (667 cm^{-1}) [134]. En este ensayo y teniendo en cuenta que a medida que la temperatura aumentó, el pico de absorbancia incrementó y que solo a pH de 9.0 se alcanzó mayor producción de AgNPs (Figura 6.c, 7.c y 8.c.), y que bajo estas condiciones disminuyó drásticamente la actividad nitrato reductasa (NR) (Figura 4); vía de reducción la cual se tiene referenciada por diversos hongos [12], [116]; se puede decir que la síntesis de AgNPs mediante este microorganismo se pudo haber dado gracias a la transferencia de electrones de los aminoácidos libres que se encontraban en la mezcla CS, propiamente de residuos de tirosina (Tyr). Dado que la síntesis en este proceso se dio ajustando el pH de la mezcla CS a 9.0, posiblemente los grupos o residuos Tyr inicialmente protonados, permitieron la transferencia de electrones.

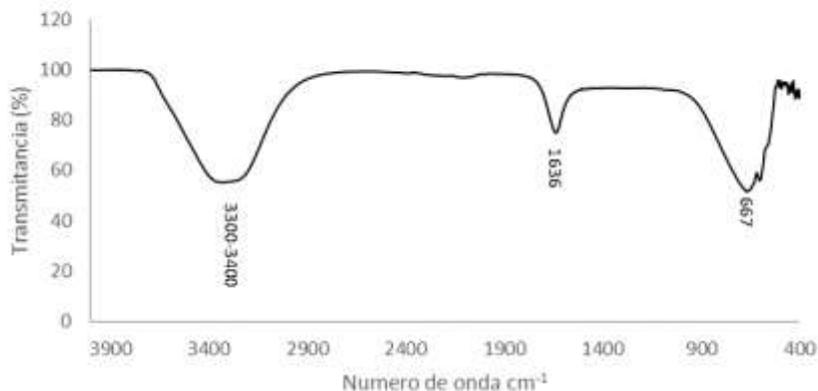


Figura 12. FTIR de la mezcla CS incubada a una temperatura de 35 °C y pH 9.0 obtenida a partir del hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp.*

Para determinar efectivamente que la Tyr Tuvo un papel influyente con respecto a la donación de los electrones libres para la reducción de Ag^+ a Ag^0 ; la mezcla CS se ajustó a pH de 9.0 y se puso a incubar a 35°C por 96 h. Se pudo establecer en este experimento que a medida que el pico de resonancia de plasmón superficial (SPR) fue aumentando (Figura 13.a), la concentración de tirosina fue creciendo (Figura 13.b), reportándose la máxima cantidad de tirosina de 1.65 g/L \pm 0,014 a las 72 h de incubación. Este resultado indicó mayor concentración de AgNPs (aumento del pico SPR y la absorbancia) [120], [122], [123] a medida que la concentración de tirosina fue aumentando en la solución. Es bien conocido que el tamaño de las nanopartículas de plata (AgNPs) se puede controlar no solo con la cantidad empleada del agente reductor sino también por la alteración del pH al momento de la reacción. La tirosina contiene grupos funcionales tanto ácidos como básicos, a un pH por debajo del punto isoeléctrico (pI 5,6), la tirosina tiene una carga neta positiva, es decir, el $-\text{NH}_2$ puede cambiar parcialmente a $-\text{NH}_3^+$. Por encima de pI de 5.6, la tirosina tiene una carga negativa neta, es decir, la unidad $-\text{COOH}$ puede pasar a $-\text{COO}^-$, y el grupo $-\text{OH}$ puede cambiar a $-\text{O}^-$ [135]. En este experimento el pH de la reacción estuvo por encima del pI de la Tyr (pH 9.0), confirmando que la forma aniónica del aminoácido es responsable de la transferencia de electrones al ion de plata en el proceso de síntesis. En este caso la capacidad reductora surgió debido a la ionización del grupo fenólico de la tirosina a un pH alto (9.0) que, por transferencia de electrones a los iones de plata, se transformó posiblemente en una quinona. El pico a 667 cm^{-1} (Figura 12) muestra el estiramiento del enlace C – S. Posiblemente las quinonas pudieron haberse formado y actuaron como grupos

funcionales redox (Figura 14) [136]. Otro punto importante que pudo haberse manifestado bajo estas condiciones es el incremento de los grupos COO⁻ lo que pudo haber generado un mayor recubrimiento de los núcleos de plata por parte de este agente biológico produciendo menor aglomeración dentro de la suspensión coloidal [137], [138]. Estos resultados como lo reportan Zoya y Rafiuddin y Kumar *et al.* en sus investigaciones arrojaron que la disminución del tamaño, así como el proceso de síntesis de AgNPs se ve favorecido no solo por la cantidad de Tyr, sino también por el pH de la solución al momento de la reacción, sugiriendo que a pHs de Tyr alcalinos incrementan la reducción y posterior formación de AgNPs [135], [139]. En el anexo 5 se muestra la curva de calibración de la Tirosina a pH 9.0, mediante la cual se corroboró la concentración de esta proteína en la mezcla CS.

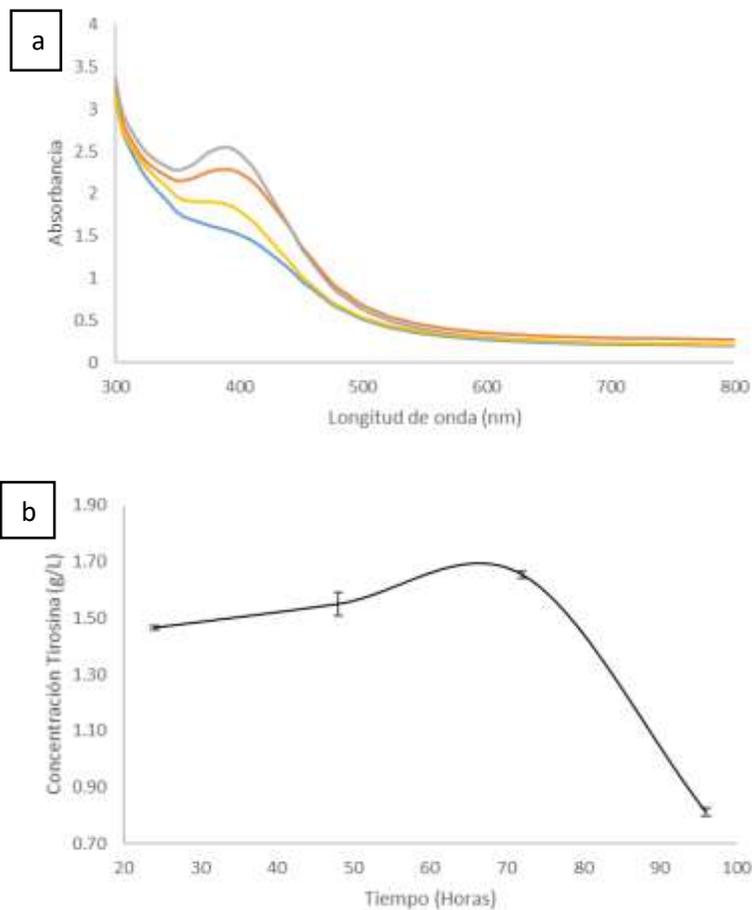


Figura 13. Espectros Uv-vis para AgNPs sintetizadas utilizando sobrenadantes del cultivo del anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* para una temperatura de incubación de 35 °C y pH 9.0 En los tiempos de incubación: 24 h — , 48 h — , 72 h — y 96 h — . b)

Producción de tirosina en el sobrenadante filtrado con AgNO_3 1mM (mezcla CS) del hongo ligninolítico anamorfo R1 de *Bjerkandera sp.* T 35 °C y pH 9.0.

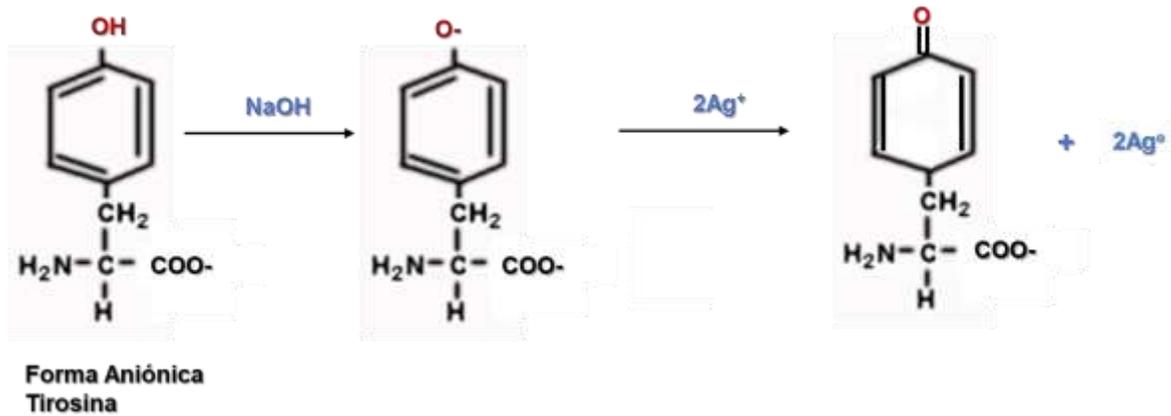


Figura 14. Mecanismo propuesto para la síntesis de AgNPs mediante el hongo del anamorfo R1 de *Bjerkandera sp.*

A partir de los resultados mostrados en el espectro FTIR (Figura 12) y en la valoración de la Tyr (Figura 13 y Figura 14) se pudo identificar claramente que este tipo de proteína en el filtrado juega un papel crucial dentro del proceso de estabilización de las AgNPs y da a entender que este proceso acoplado a protones fue influyente dentro de la reducción del ion de plata Ag^+ a Ag^0 . Estos resultados, con respecto a los reportes de algunos autores en sus trabajos, como Singh *et al.*, Husseiny *et al.*, Xie *et al.*, Wang *et al.* y Kumar *et al.* [117], [130], [133], [134], [139] mostraron que las moléculas de proteínas no solo actuaron como agentes reductores, sino que también actuaron como agentes estabilizadores y de recubrimiento al unir los AgNPs a través de los grupos amino libres.

6.4. Síntesis intracelular y extracelular de nanopartículas de plata a partir del hongo de pudrición blanca de la madera hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp*

En este proceso se evaluó la biorreducción de iones de plata por absorción de átomo de plata en los micelios-pellet (Muestra MP-síntesis intracelular) y biorreducción de iones de plata a partir del sedimento de micelio-pellet (Mezcla SN-síntesis extracelular). Estos procesos se realizaron tomando como referencia los mejores resultados de síntesis dentro de la mezcla CS. Los sedimentos lavados (1%

w/v) obtenidos a partir del día 8 de crecimiento se trataron con una solución de nitrato de plata (AgNO_3) ajustada a un pH de 9.0 e incubada a 144 h. Se evaluaron tres temperaturas de incubación ($T=25, 30$ y $35\text{ }^\circ\text{C}$).

6.4.1. Síntesis intracelular de nanopartículas de plata a partir del hongo de pudrición blanca de la madera hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp*

Para obtener más información sobre la síntesis intracelular de las nanopartículas de plata (AgNPs), se realizó un análisis de la muestra del micelio fúngico que reaccionó con nitrato de plata (AgNO_3) mediante el uso de microscopía electrónica de barrido (SEM). La micrografía SEM (Figura 16) muestra AgNPs sobre la superficie del micelio. Se observaron algunas partículas más pequeñas que tienen formas esféricas, así como algunas otras formas irregulares con un tamaño aproximado de 60 a 200 nm con poco agrupamiento cuando el micelio reaccionó con la solución AgNO_3 1 mM incubada a $35\text{ }^\circ\text{C}$ y con bastante aglomeración cuando se trabajó la solución a $30\text{ }^\circ\text{C}$. Este resultado indicó que el proceso de reducción se dio en la superficie del micelio.

Para una mejor comprensión del proceso de reducción intracelular, se realizaron mediciones adicionales de SEM tomando como referencia una muestra control sin reaccionar con el AgNO_3 (Figura 15). En la micrografía SEM del control se puede observar que los espacios intersticiales fueron cubiertos por depósitos de sustancias extracelulares. Por el contrario, el micelio fúngico que recibió tratamiento con AgNO_3 se ensanchó y presentó espacios vacíos intermedios (Figura 16.b y 16.c). Partiendo de ello, bajo estas imágenes se puede inferir que los iones Ag^+ son adsorbidos en la superficie del micelio, posiblemente a través de la interacción electrostática entre Ag^+ y los grupos funcionales cargados negativamente que se encuentran sobre la pared celular de los micelios. Posteriormente, los iones de plata se reducen gracias a complejos proteicos presentes en la pared celular, lo cual conduce a la formación de núcleos de plata. En estas condiciones más regiones de nucleación se forman debido a la disponibilidad de iones OH^- (pH 9.0) que ayudan a prevenir que los agregados se formen a través de la absorción de nanocristales.

Con respecto a la temperatura, se observó poca acumulación de AgNPs sobre la superficie del micelio cuando la temperatura de incubación aumentó debido a la desnaturalización de las proteínas, este proceso pudo haber ocasionado variaciones en la nucleación de las especies Ag^+ y haber afectado el aumento de tamaño de estas. Se pudo evidenciar a una ($T=25\text{ }^\circ\text{C}$) que el micelio no se ensanchó

y la síntesis se vio reducida (Figura 16.a). Estos resultados sugieren que la temperatura de incubación afectó la síntesis intracelular. Con esta comparación se pudo determinar que al ser más inmóviles los micelios tratados, estos son capaces de captar más iones Ag^+ que otras sustancias celulares externas que se distribuyen en el espacio intersticial, reduciendo así la mayor parte de Ag^+ in situ a Ag^0 . El espectro de dispersión de energía de rayos X (EDS) reveló síntesis de AgNPs, debido a la presencia un pico a aproximadamente 3 keV que corresponde a la formación de plata pura [140] (Figura 17), indicando que temperaturas entre 30 °C y 35 °C son ideales para que se lleve a cabo el proceso de reducción intracelular a partir del hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp.* Estos hallazgos están en concordancia con lo reportado por Nandanatham *et al.*, Sastry *et al.*, Osorio *et al.*, Sanghi y Verma confirmando que en primera instancia las AgNPs se forman en la superficie del micelio y no en la solución [87], [131], [141], [142].

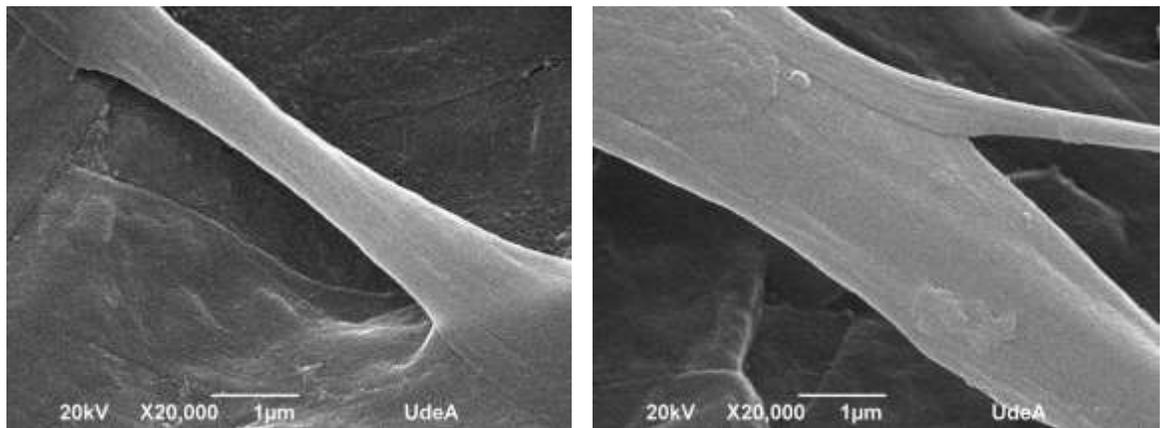


Figura 15. Micrografías electrónicas de barrido del hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp.* Micelio fúngico con una solución ajustada a pH 9.0. Sin ningún tratamiento.

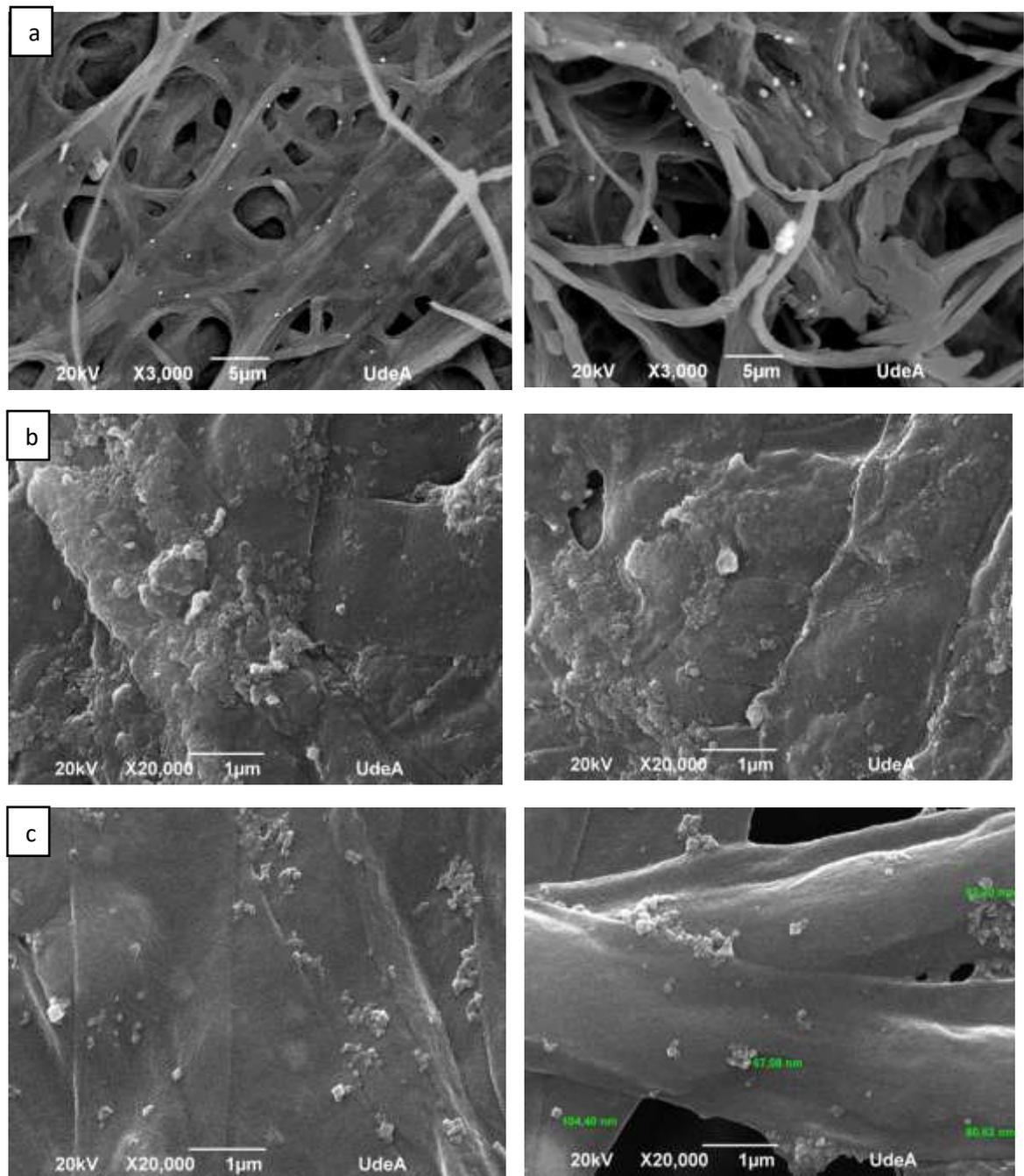


Figura 16. Micrográficas electrónicas de barrido del hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp.* Micelio fúngico tratado con una solución ajustada a pH 9.0 que recibió tratamiento con nitrato de plata (AgNO_3) a) micelio incubado a 30 °C, b) micelio incubado a 30 °C y c) micelio incubado a 35 °C.

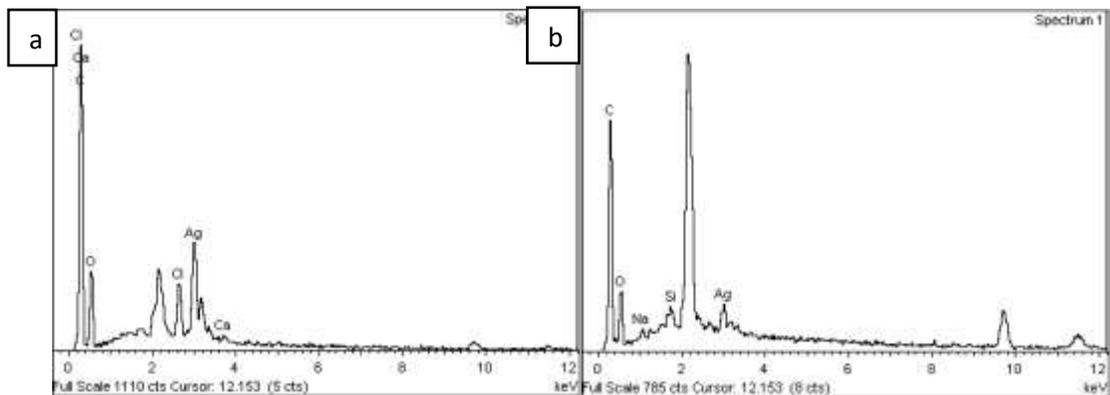


Figura 17. Espectro EDS para las AgNPs visualizadas en el micelio fúngico que se incubó en una solución con AgNO_3 1mM ajustada a pH 9.0. Tiempo de incubación 144 h a temperatura de a) 30 °C y b) 35 °C.

6.4.2. Síntesis extracelular de nanopartículas de plata a partir del hongo de pudrición blanca de la madera hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp*

Para confirmar más a fondo que ciertos residuos proteicos o biomoléculas son los responsables de la síntesis y posterior estabilización de nanopartículas de plata (AgNPs), las muestras de Ag^+ en contacto con el micelio fúngico se examinaron utilizando espectroscopia Uv-vis, espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), microscopia electrónica de transmisión (TEM) y espectroscopia de dispersión de energía de rayos X (EDS).

La figura 18 muestra la solución que contenía la biomasa fúngica después de la exposición con una solución de AgNO_3 1 mM a una temperatura de 25, 30 y 35 °C y pH 9.0 durante 144 h de incubación. La formación de AgNPs se demostró claramente por el cambio de color de la solución de transparente a amarillo –marrón para una temperatura de incubación de 30 y 35 °C. Este cambio de color elucidó la presencia de AgNPs debido a la excitación de las superficies de plasmón [119], [129]. En este experimento, se observó que la solución acuosa contenía AgNPs, caracterizadas por un color marrón-rojo intenso. Esto demostró que la reducción de los iones Ag^+ se llevó a cabo extracelularmente debido a los sedimentos liberados durante el proceso de agitación.

La reducción de los iones de Ag^+ que se encontraban en la solución una vez fue expuesta la biomasa fúngica se monitorizó mediante espectroscopia Uv-vis (Figura 19). Se encontró que la banda de resonancia de plasmón superficial (SPR) estaba

centrada a 450 nm trabajando una temperatura de incubación de 30 y 35 °C respectivamente, lo que corresponde a la formación de AgNPs [87]. No se observó una banda SPR cuando la reacción con el micelio se llevó a cabo a 25 °C. Para este proceso de síntesis extracelular, se realizó un diseño de bloques aleatorizados. A partir de este diseño de experimentos se quiso demostrar que tan dependiente es el proceso de síntesis de la temperatura de incubación, para este caso se tomó como variable de respuesta el área bajo la curva de los espectros obtenidos de las mezclas SN debido a que es la variable más cercana que se puede correlacionar con la banda de absorción característica de plata [107]

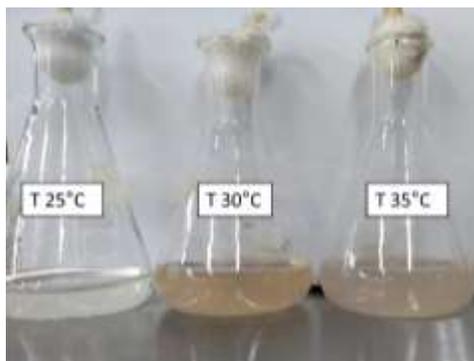


Figura 18. Biosíntesis de AgNPs en la mezcla SN ajustada a pH 9.0. Formación de nanopartículas de plata a las 144 h de reacción para diferentes temperaturas de incubación.

En la tabla 5 se presenta el ANOVA para un tiempo de incubación de 144 h y pH 9.0 para las diferentes temperaturas evaluadas; de acuerdo con los valores logrados ($p \leq 0.05$) con un nivel de confianza del 95% se pudo establecer que la síntesis de AgNPs se vio influenciada por la temperatura a la cual la reacción se llevó a cabo.

Tabla 5. Análisis de varianza para la variable área bajo la curva. Mezcla SN. pH 9.0. tiempo de Incubación 144 h.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	15662.2	2	7831.09	216.56	0.0000
Intra grupos	216.971	6	36.1618		
Total (Corr.)	15879.2	8			

Mediante este análisis se determinó que la reducción del ion Ag^+ se pudo haber dado gracias a la liberación de los sedimentos del micelio al momento de la agitación y se sugiere que la temperatura a la cual se lleva la reacción juega un papel importante en el proceso de síntesis extracelular. Se pudo establecer en este análisis que trabajar a temperaturas entre $30\text{ }^\circ\text{C}$ y $35\text{ }^\circ\text{C}$ podría facilitar aún más la secreción de ciertas biomoléculas o residuos de proteína sobre la superficie del micelio, lo que conduce a la liberación de estas en la solución que contiene Ag^+ . Este tipo de biomoléculas pueden jugar un papel determinante al momento de la reducción y a su vez pueden ser agentes estabilizadores de las AgNPs sintetizadas. La validación de los supuestos del modelo se presenta en el Anexo 6.

Las características electrónicas de las AgNPs son notablemente sensibles y pueden influir en su forma y tamaño, dichos cambios se pueden observar en el patrón de espectro visible. El aumento del ancho de banda de la SPR está estrictamente relacionado con la disminución de las dimensiones de las partículas como resultado de la inducción de dispersión de electrones en la superficie [140]. En este proceso extracelular se observó que no hubo cambio de resonancia trabajando a temperaturas de 30 y $35\text{ }^\circ\text{C}$, esto puede ser información importante para la caracterización de las nanopartículas. La presencia de una sola banda a 450 nm (Figura 19) donde se detectó la máxima absorbancia muestra que las AgNPs pueden tener morfología esférica y que la cantidad de ellas pudo haber aumentado con el incremento de la temperatura. Este resultado concuerda con los resultados reportados por Liang *et al.* y Seetharaman *et al.*, donde se sugiere que la eficacia de la síntesis extracelular a partir de hongos está estrechamente relacionada con el aumento de la temperatura al momento de la incubación [83], [143]. Teniendo en cuenta que dentro de la mezcla SN hubo un desplazamiento hacia la derecha (desplazamiento rojo) en la longitud de onda máxima en el pico SPR (450 nm) (Figura 19) con respecto a la mezcla CS (400 nm) (Figura 8.c), y disminuyó considerablemente la absorbancia se puede inferir el incremento del tamaño de AgNPs, así como una menor concentración de ellas dentro de la solución [122], [126], [127]. También es importante mencionar que la naturaleza y las características morfológicas de las nanopartículas pueden detectarse también desde el pico de SPR. En este experimento como solo se presentó una única banda SPR en los espectros de absorción, se pudo decir que dentro de la mezcla SN se formaron nanopartículas esféricas y uniformes. Estos resultados concuerdan con los reportes hechos por Zhang y Yang y Pirtarighat *et al.*, donde se infiere que el número de picos SPR se desarrolla a medida que aumenta la anisotropía [144],

[145]. Por lo tanto, se concluye que las AgNPs biosintetizados a partir de este hongo son de forma esférica.

La ausencia de una banda de absorción característica a 25 °C sugiere que a bajas temperaturas, la energía cinética de las moléculas pudo haber disminuido notablemente y pudo haber desencadenado la disminución del consumo de los iones de plata [120], este proceso implica que bajo esta temperatura posiblemente era necesario el aumento del tiempo de incubación para que se alcanzarán buenas condiciones de síntesis.

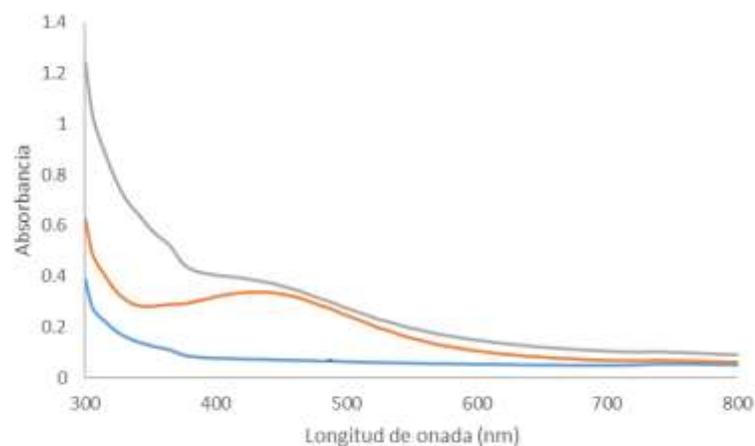


Figura 19. Espectros Uv-vis para AgNPs sintetizadas utilizando la mezcla SN ajustada a pH 9.0 en donde reaccionó el micelio del anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* para una temperatura de incubación de T 25 °C (—) , T 30 °C (—) y T 35 °C (—).

Se realizó análisis TEM para determinar la relación de la banda SPR obtenidas a partir de los espectros con la morfología y el tamaño de las AgNPs. En las micrografías TEM (Figura 20) se puede observar partículas en un rango entre 10 y 50 nm. Mediante estas imágenes se pudo comprobar que la morfología de las AgNPs sintetizadas jugó un papel determinante en función de la SPR adscrita a los espectros. A través de las micrografías obtenidas para una temperatura de incubación de 30 y 35 °C se verificó una buena disposición de AgNPs cuasi-esféricas con poca aglomeración (Figura 20.b y 20.c), en cambio trabajando a 25 °C se observó que el proceso de síntesis fue lento y dejó menos posibilidades para la disminución del tamaño de partícula, además se encontró que las nanopartículas obtenidas en su mayoría presentaron una morfología anisotrópica (Figura 20.a).

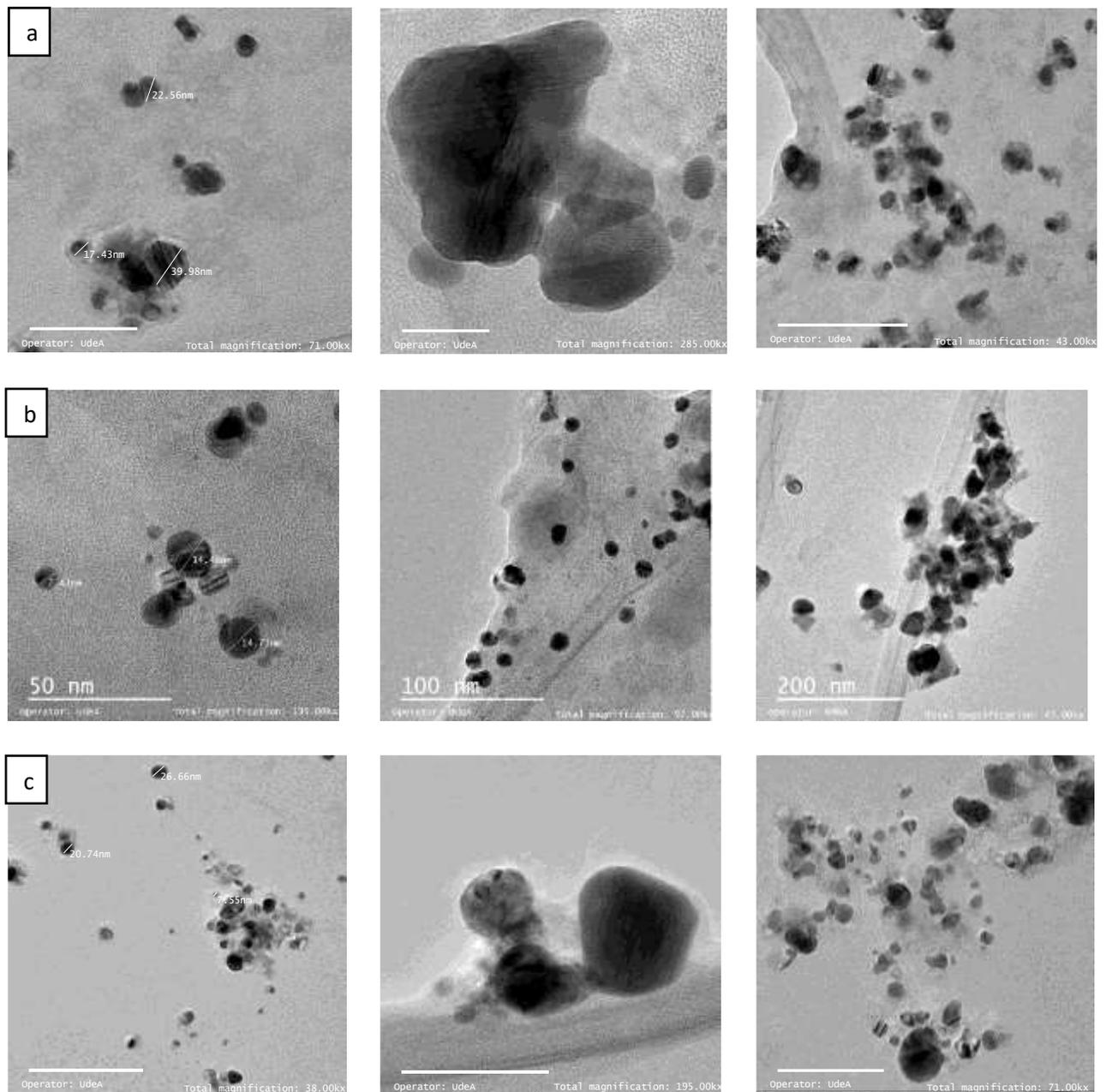


Figura 20. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) imágenes de nanopartículas de plata sintetizados en las mezclas SN ajustadas a pH 9.0 del hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp.* Tiempo de incubación 144 h a temperatura de a) 25 °C, b) 30 °C y c) 35 °C

El análisis EDS acoplado al TEM, determinó si las muestras correspondían a plata. El pico de absorción óptica se presentó aproximadamente a 3keV, lo que es típico para la absorción de nanocristales de plata metálicos debido a la resonancia de la superficie del plasmón, lo que confirma la presencia de plata elemental a tamaño nanométrico [83] (Figura 21). El espectro arrojó también, picos de oxígeno y carbono, estos picos prominentes se originaron debido a la presencia de biomoléculas, que posiblemente cumplieron un papel de recubrimiento y estabilización de las AgNPs tal y como lo reportaron en sus investigaciones Choong *et al.* [146] , Saravanan *et al.* [86], Balakumaran *et al.* [147] y Seetharaman *et al.* [83].

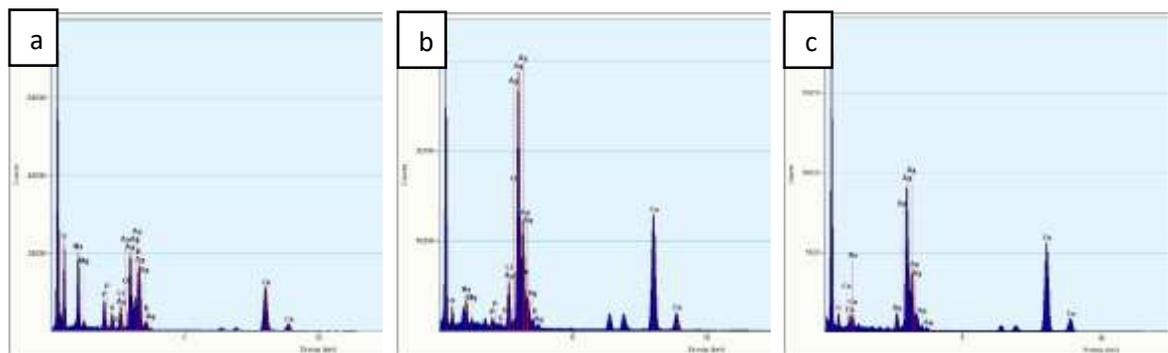


Figura 21. Espectro EDS para las AgNPs visualizadas en la mezcla SN ajustadas a pH 9.0 del hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp.* Tiempo de incubación 144 h a temperatura de a) 25 °C, b) 30 °C y c) 35 °C.

Por otra parte, se utilizó el análisis de dispersión dinámica de la luz (DLS) para determinar la distribución, el tamaño hidrodinámico y el índice de polidispersidad de las nanopartículas de plata (AgNPs) sintetizadas a partir del hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp.* en la suspensión coloidal SN que fue ajustada a pH 9.0 y se incubó a 30 y 35 °C. En las figuras 22.a y 22.b se muestra la caracterización completa de la frecuencia de tamaño de las AgNPs en función del número de partículas. Se puede observar que la cantidad de partículas de mayor tamaño fue tan pequeña que no se alcanza a apreciar muy bien en el gráfico, es decir, las partículas de menor tamaño son predominantes trabajando en estas condiciones. Para este experimento se obtuvo un rango de distribución de tamaños de AgNPs sintetizadas entre 0 y 70 nm para ambas temperaturas de incubación. La mayor cantidad de AgNPs se encontró, en promedio, para tamaños cercanos que comprendieron los 40 y 50 nm. El valor del índice de dispersión (PDI) de las nanopartículas de plata fue de 0.180 para una T = 30°C y 0.207 para T=35°C. El valor PDI "0" representa una distribución monodispersa, mientras que el valor "1" representa una distribución

polidispersa [148]. Mediante este análisis se pudo establecer que las AgNPs preparadas presentaron una alta monodispersidad y que bajo estas condiciones alcalinas la tasa de crecimiento de las AgNPs pudo haber disminuido con el incremento de la tasa de nucleación (Figura 20.a., 20.b y 20.c) [122], [148], [149].

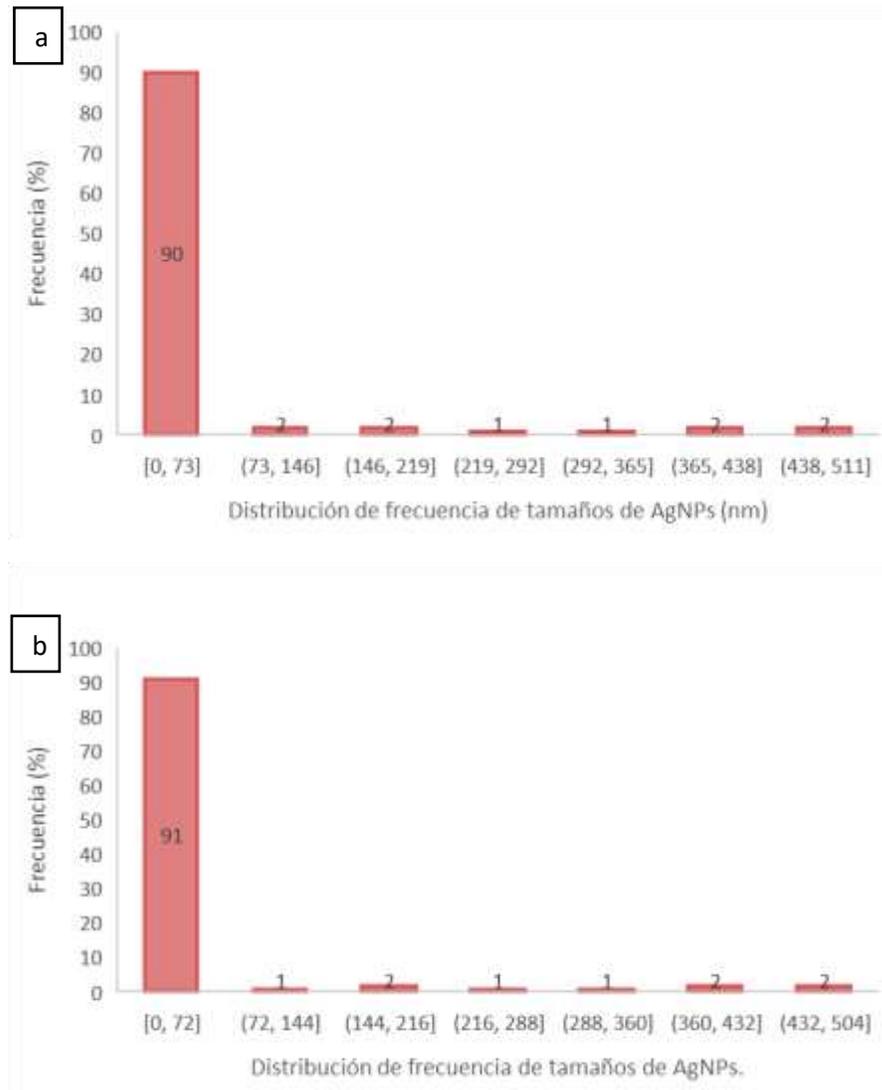


Figura 22. Distribución de frecuencia de tamaños de AgNPs sintetizados en las mezclas SN ajustadas a pH 9.0 del hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp.* Tiempo de incubación 144 h a temperatura a) 30 °C y b) 35 °C

Otra forma mediante la cual se pudo confirmar la reducción a plata elemental fue a través la inserción del patrón de área seleccionada de difracción de electrones acoplado al TEM (SAED) (Figura 23) el cual indicó para una temperatura de

incubación de 25 y 35 °C la formación de plata policristalina de acuerdo con los planos (111), (200), (220) y (311) encontrados. Estos patrones muestran reflexiones características del cristal de plata fcc (cubica centrada en las caras) [143]. Estos resultados arrojaron que efectivamente se sintetizó AgNPs, según lo reporta Syed *et al.* en su investigación [129].

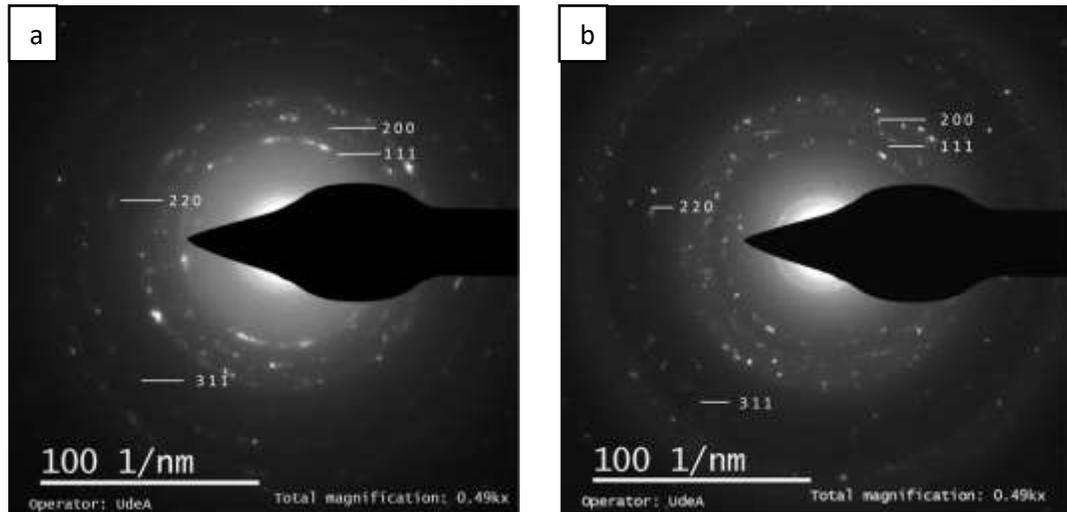


Figura 23. Visualización del patrón SAED de la mezcla SN ajustadas a pH 9.0 que contiene AgNPs sintetizadas a partir del hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp.* Tiempo de incubación 144 h a temperatura de a) 25 °C y b) 35 °C.

Por ultimo en este experimento, se realizó análisis FTIR para confirmar que dentro de este proceso extracelular ciertos compuestos biológicos que se encontraban sobre la superficie del micelio estuvieron estrechamente relacionados en el recubrimiento y estabilización de las AgNPs, así como del proceso de reducción, una vez fueron liberados a la solución que contenía Ag^+ . Se realizaron estos ensayos estipulando la mejor correlación entre los procesos de síntesis, que fueron validados mediante espectroscopia Uv-Vis (banda SPR) y TEM (Tamaño y morfología). En este proceso se analizaron las muestras correspondientes a una temperatura de 30 y 35 °C.

Los datos que se obtuvieron de acuerdo a la figura 24 a. y 24 b. muestran que la presencia de bandas amida I dentro de este proceso extracelular trabajando a temperaturas de 30 y 35 °C, así como se reportó con respecto a las mezclas CS, surgieron debido al estiramiento de carbonilo y las vibraciones de estiramiento N-H en el enlace amida de la proteína, así como la presencia de polifenoles. A través de

estos resultados se verificó que, dentro del proceso intracelular, grupos funcionales fuertes como lo son el carbonilo, presentes en las sustancias extracelulares de los intersticios del micelio, actuaron como agentes adsorbentes; este proceso dio a entender que estos grupos funcionales pudieron adsorber aún más las partículas ubicadas en la superficie, lo que provocó el recubrimiento de estas nanopartículas (Figura 20). A partir de estos FTIR se pudo constatar que este tipo de residuos proteicos tuvieron un efecto significativo sobre la dispersión de las AgNPs obtenidas y que bajo condiciones de pHs altos, los potenciales de carga superficiales de las AgNPs aumentaron y ayudaron a mantener la repulsión entre ellas (Figura 20) [122], [148] .

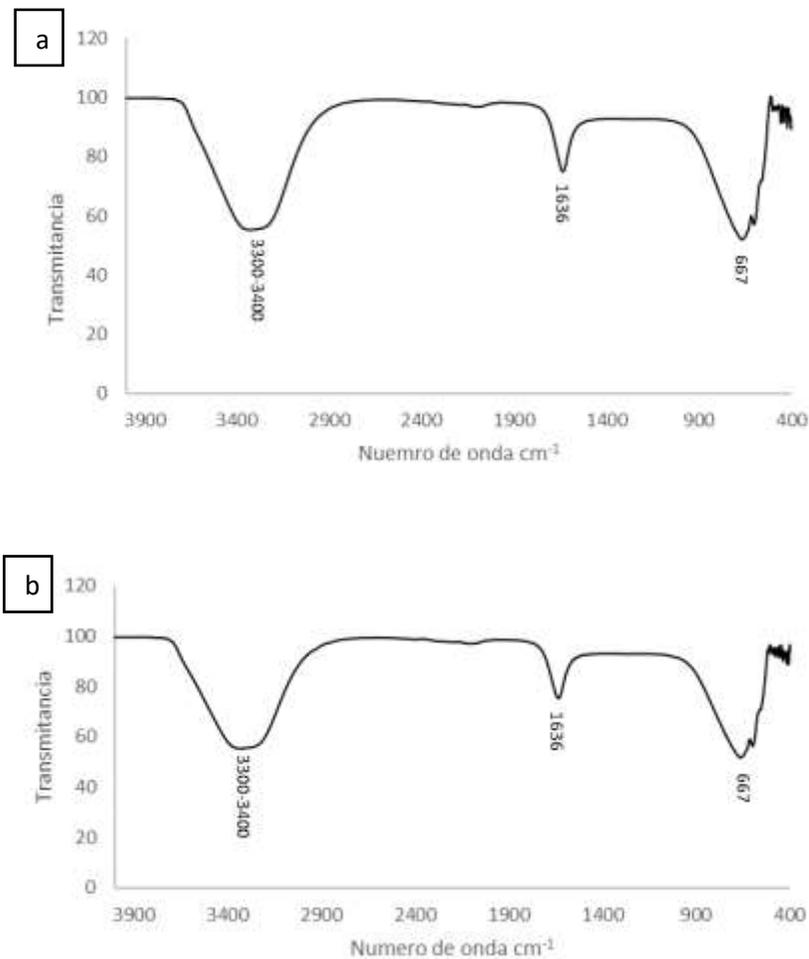


Figura 24. FTIR de la mezcla SN a pH 9.0 obtenida a partir del hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* incubada a una temperatura de a) 30 °C y b) 35 °C.

6.5. Apósitos de quitosano/carboximetilcelulosa suplementados con nanopartículas de plata sintetizadas a partir del hongo de pudrición blanca de la madera anamorfo R1 de *Bjerkandera sp*

Para la fabricación de los apósitos de quitosano (CS) y carboximetilcelulosa (CMC) suplementados con nanopartículas de plata (CS-CMC-AgNPs) se utilizaron las mejores condiciones de síntesis. Estableciendo que para pHs altos y temperaturas elevadas se obtuvieron los mejores resultados, se fabricaron apósitos con muestras previamente purificadas y filtradas de las mezclas CS ajustada a pH 9.0 e incubada a 35 °C, como también con muestras previamente tratadas de la mezcla SN, bajo las mismas condiciones citadas anteriormente. Para los dos tipos de suspensiones coloidales que tenían AgNPs se empleó un tiempo de incubación de 144 h para la obtención de estas, en este tiempo se obtuvieron los picos más altos de la banda de absorción característica de plata, lo que indicó formación de un número más elevado de AgNPs como se reportó en la figura 8 c. y en la figura 19.

En primera instancia se realizó un proceso de estandarización que nos permitiera observar bajo que concentración de CMC y de glicerina se obtenían las biopelículas con propiedades organolépticas adecuadas. En la figura 25 se puede observar que las biopelículas de CS-CMC fabricadas se tornaron de un color transparente grisáceo brillante. No se observó cambios en la coloración una vez se adicionaron las distintas muestras de AgNPs. En cuanto al grosor de la película, se pudo notar que

ese pequeño incremento en la concentración de CMC al momento de la fabricación hicieron que fueran más gruesas, lo que posiblemente se pudo haber dado debido al mayor contenido de sólidos dentro de la película. Estos resultados arrojaron biopelículas con propiedades organolépticas adecuadas (Figura 25) y se observó que tanto la concentración de CMC (1.2%) y el porcentaje menor de glicerina no afectaron características de la matriz de CS. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Salari *et al.*, Wong y Ramli los cuales sugieren que mayores concentraciones de CMC pueden llegar a mejorar las propiedades morfológicas y mecánicas de las biopelículas fabricadas [99], [108].

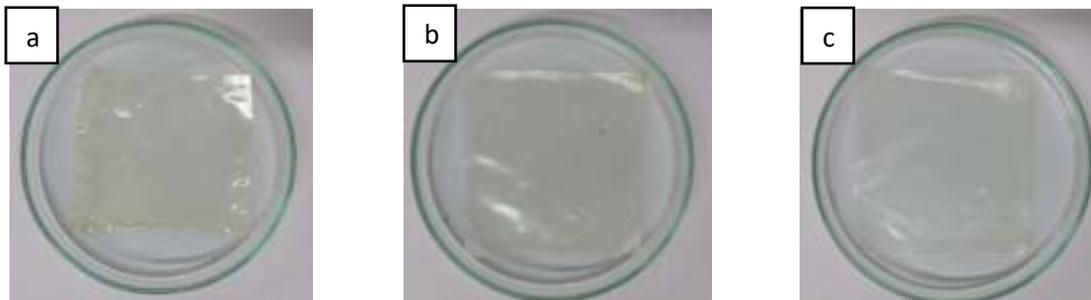


Figura 25. Películas de CS-CMC a) sin presencia de AgNPs; b) con presencia de AgNPs. Mezcla CS y c) con presencia de AgNPs. Mezcla SN. Tiempo de secado 72h.

6.5.1. Caracterización de los apósitos de quitosano/carboximetilcelulosa suplementados con nanopartículas de plata

En un ensayo preliminar, se analizaron las muestras por microscopía convencional a aumentos de 40x, con respecto a las películas control de quitosano-carboximetilcelulosa (CS-CMC) y a aquellas que contenían AgNPs (CS-CMC-AgNPs) previamente tratadas y purificadas de las mezclas CS y SN.

En primera instancia se observó en la muestra control (Figura 26.a) la formación de estructuras superficiales homogéneas con una integridad estructural compacta, mostrando en algunas porciones de la biopelícula un ensamble superpuesto en una sola dirección. Con respecto a las biopelículas que contenían 1% v/v de la suspensión coloidal de AgNPs se observó para ambas mezclas (CS y SN) la formación de estructuras superficiales heterogéneas con una integridad semi-compacta y porosa, en donde se encontraban embebidas las AgNPs, con pequeñas porciones superpuestas en distintas direcciones (Figura 26. b y c.).

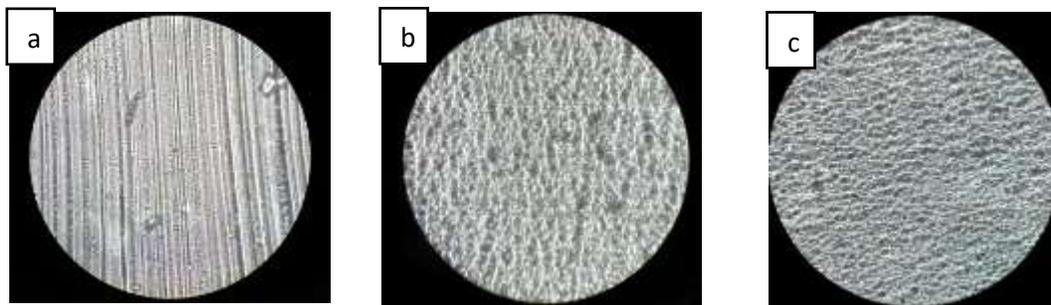


Figura 26. Imágenes del microscopio de las películas de CS-CMC a) sin presencia de AgNPs; b) con presencia de AgNPs. Mezcla CS y c) con presencia de AgNPs. Mezcla SN. Tiempo de secado 72 h.

Con respecto a las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) se puede observar que la película de CS-CMC tenía una superficie uniforme y lisa (Figura 27.a). Las películas que contienen AgNPs mostraron una estructura homogénea y densa con nanocristales o nanopartículas uniformemente dispersas sobre la superficie de la película CS-CMC en un tamaño comprendido entre 60 y 200 nm (Figura 27.b y 27.c), lo que confirmó una buena interacción de las AgNPs con la matriz polimérica. Fouda *et al.* describieron en su investigación que AgNPs obtenidas a partir de extractos de miel de abeja se distribuyeron uniformemente sobre la superficie de la biopelícula, formando pequeñas agrupaciones insulares, describieron que este fenómeno se pudo haber presentado debido a que algunas de estas partículas sintetizadas están recubiertas por polisacáridos y proteínas, por lo tanto se creó una barrera física que impidió la difusión de la plata a través de la solución, en este caso de carragenina formando pequeñas aglomeraciones [91]. En este caso se vio reflejado el mismo efecto (Figura 27.b y 27.c). Los espectros FTIR de las AgNPs sintetizadas en la mezcla CS (Figura 12) y SN (Figura 24.b) a partir del hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* en esta investigación dieron a entender que estas partículas se encontraban recubiertas por residuos proteicos distribuidos en la superficie del micelio o por grupos carbonilo adsorbentes remanentes en los espacios intersticiales del micelio fúngico, esto probablemente creó una barrera física que impidió la difusión de AgNPs una vez se preparó la película CS-CMC.

Diversos autores han reportado buenas propiedades físico químicas de apósitos cuando se utilizan matrices poliméricas de CS-CMC [76]. Estos resultados anteriormente descritos arrojaron que las AgNPs provocaron cambios en la morfología de las películas haciendo la superficie más porosa y rugosa (Figura 26.b y 26.c). Este comportamiento reflejado puede ser un indicio muy importante en cuanto a la aplicación de las películas de CS-CMC-AgNPs obtenidas, debido a que estas características morfológicas podrían ayudar a absorber los exudados de la herida e incrementaría el intercambio de oxígeno sobre la superficie de esta [150].

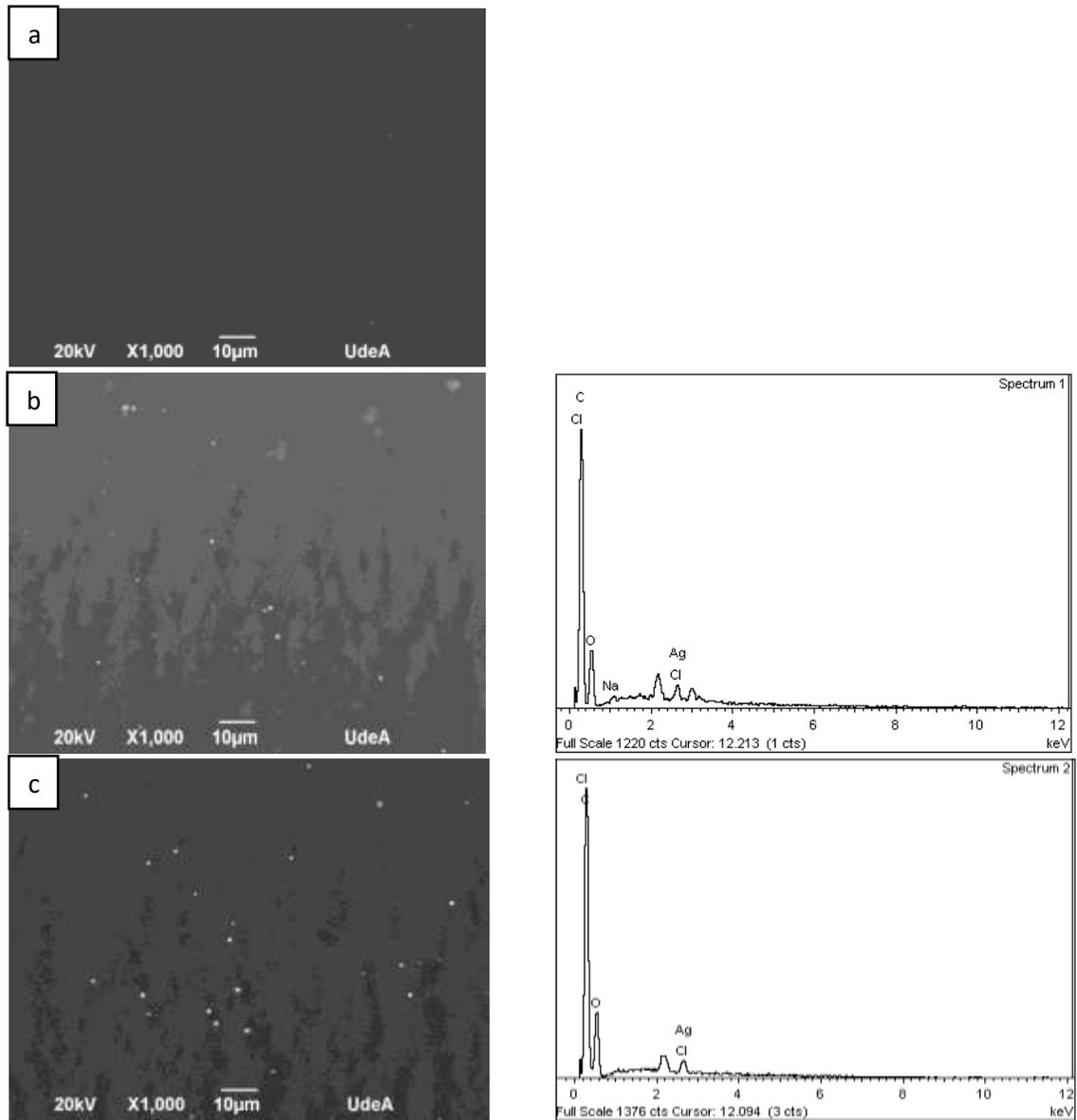


Figura 27. Imágenes de microscopio SEM de las películas de CS-CMC a) sin presencia de AgNPs; b) con presencia de AgNPs. Mezcla CS y c) con presencia de AgNPs. Mezcla SN con su respectivo análisis composicional. Tiempo de secado 72 h.

6.5.1.1. Ensayos antimicrobianos

Las propiedades antibacterianas de las soluciones formadoras de película de quitosano y carboximetilcelulosa (CS-CMC), así como las que tenían nanopartículas de plata (CS-CMC-AgNPs) se evaluaron frente a el patógeno *Escherichia coli* (*E. coli*) a través del ensayo de difusión en disco de agar. Las soluciones formadoras que contenían AgNPs obtenidas a partir de la biorreducción de iones de plata en el sobrenadante del cultivo (mezcla CS) se rotularon CS_1 y CS_2. Las soluciones formadoras que contenían AgNPs a partir de la biorreducción de iones de plata provenientes del sedimento de micelio- pellet (Mezcla SN-síntesis extracelular) se rotularon SN_1 y SN_2.

Estos ensayos revelaron que las soluciones formadoras de película (CS-CMC-AgNPs) inhibían el crecimiento mostrando una pronunciada actividad antimicrobiana frente a este patógeno (Tabla 6). La película compuesta solo de los biopolímeros sin la adición de la solución de AgNPs mostró una zona de inhibición, pero alrededor de los 3 halos evaluados se formaron esporas, por lo cual se pudo decir que hubo poca o casi ninguna actividad inhibidora frente al patógeno Gram negativa *E. coli* (Tabla 6) (Figura 28.e). Estos resultados reflejaron en otras palabras, que la inefectividad antimicrobiana de las soluciones formadoras CS-CMC fue dependiente de la concentración de CMC y sugiere que la actividad antimicrobiana puede existir solo debido a la matriz de CS. Bajo estas condiciones los efectos antimicrobianos del CS decayeron notablemente debido que el CMC inhibió las interacciones entre los grupos amino protónicos del CS y los componentes aniónico de la bacteria *E. coli* [151].

Tabla 6. Valores promedio del experimento de inhibición bacteriana realizado empleando la bacteria *E. coli*.

Organismo	Diámetro inicial (mm)	Zona de inhibición diámetro (mm)				
		Muestra CS_1	Muestra CS_2	Muestra SN_1	Muestra SN_2	Control
<i>Escherichia coli</i>	12	32.9 ± 2.2	30.3 ± 2	31 ± 4.9	27.1 ± 2.7	ND

La acción bactericida de los AgNPs ha sido ampliamente estudiada y según diversas investigaciones puede ejercerse a través de diferentes mecanismos. El mecanismo

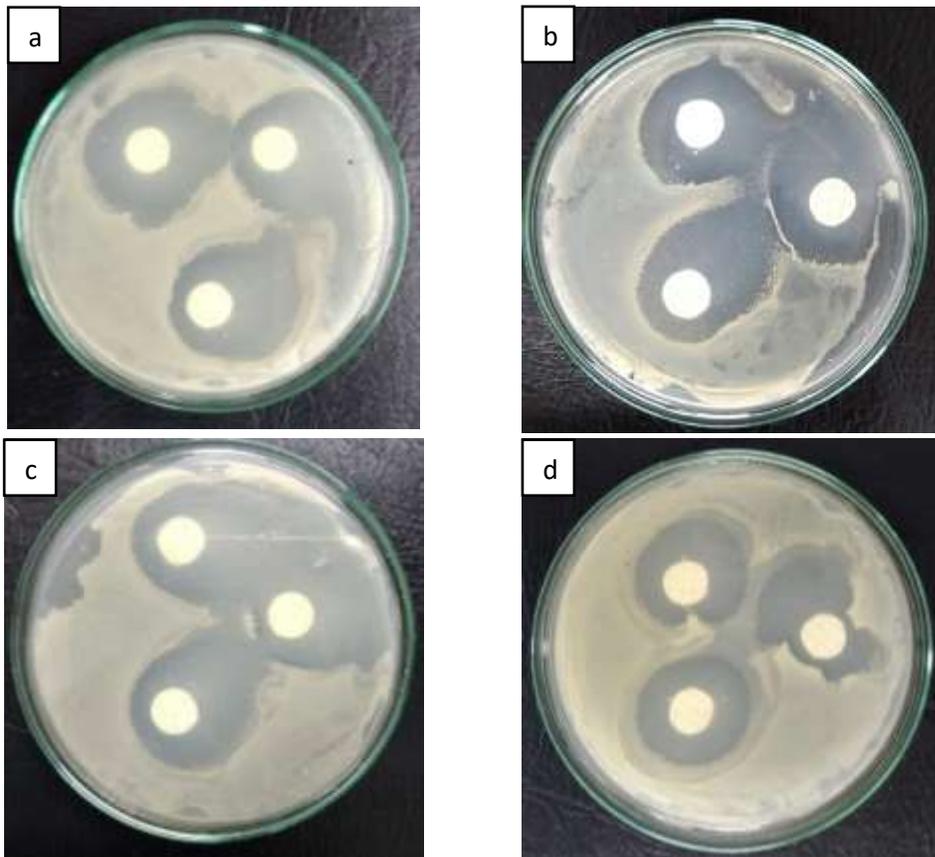
principal más aceptado deriva de la capacidad del complejo AgNPs para inducir la generación de especies reactivas de oxígeno y el estrés oxidativo [80]. En cuanto a los resultados hallados y observando que estas películas suplementadas con AgNPs inhibieron en gran medida el crecimiento de *E. Coli* (Figura 28.a, 28.b, 28.c y 28.d), se pudo decir que el tamaño de AgNPs jugó un papel importante dentro de la mezcla una vez fue preparada la película. Como se reportó anteriormente, debido a el tamaño tan pequeño obtenido de AgNPs (10-50 nm), es más fácil que estas puedan difundirse a través de la membrana microbiana, aumentando en gran medida la permeabilidad de las células. En este ensayo la actividad antimicrobiana de las AgNPs contra esta bacteria estuvo relacionada en primera instancia, entre la interacción de iones de plata cargados positivamente con los ácidos nucleicos cargados negativamente y algunos componentes bio-macromoleculares (residuos proteicos que actuaron como agentes estabilizantes y de recubrimiento de AgNPs). Estas interacciones posiblemente causaron cambios estructurales, desnaturalización de proteínas y deformación en la pared celular de la *E. coli* lisando la célula y provocando la muerte [152], [153].

Para validar los resultados anteriormente descritos se quiso demostrar el efecto que tiene las diferentes soluciones de CS-CMC-AgNPs sobre el crecimiento de la bacteria. En la tabla 7 se presenta el análisis Anova para la variable respuesta halo de inhibición. De acuerdo con los valores logrados ($p \leq 0.05$) con un nivel de confianza del 95% se pudo establecer que hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los halos de inhibición hallados entre cada uno de los niveles evaluados (diferentes mezclas CS y SN que contenían AgNPs), en cuanto a ello, la prueba de múltiples rangos arrojó que para las diferentes muestras evaluadas solo se encontraron diferencias significativas cuando las películas de CS-CMC fueron impregnadas con AgNPs provenientes de la mezcla CS1 y SN2

Tabla 7. Análisis de varianza para la variable Halo de Inhibición. Ensayo antimicrobiano de los apósitos de CS-CMC-AgNPs fabricadas

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	118.964	3	39.6548	3.95	0.0202
Intra grupos	241.143	24	10.0476		
Total (Corr.)	360.107	27			

Con respecto a estos resultados se pudo confirmar que efectivamente las AgNPs sintetizadas en el medio del cultivo y las AgNPs obtenidas a partir de los sedimentos liberados por el hongo una vez reaccionan con la solución AgNO_3 1mM tienen un excelente poder antimicrobiano. Estos resultados soportan lo reportado por algunos investigadores, como Salari *et al.*, Hajji *et al.* y Zheng *et al.* y confirma que dado que la capa tridimensional de peptidoglicano ($\sim 7-8$ nm) de *E. Coli* es tan delgada facilita aún más la penetración de las de las AgNPs en el interior del citoplasma, incrementado la interacción con la superficie de la bacteria y específicamente con la captura de los iones de plata liberados [108], [152], [154]. En el Anexo 7 se encuentra la tabla de la prueba de múltiples rangos para halo de inhibición y la validación de los supuestos del modelo.



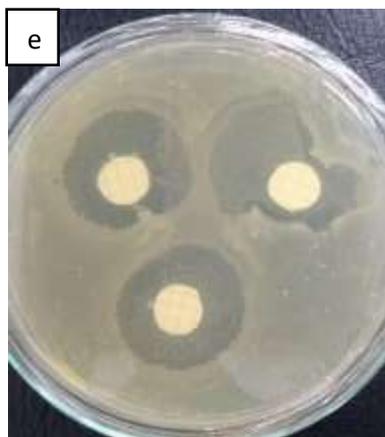


Figura 28. Apariencia de las zonas de inhibición en placas de agar nutritivo. Se muestra la actividad antimicrobiana de a) películas de CS-CMC-AgNPs _CS_1, b) películas de CS-CMC-AgNPs _CS_2, c) películas de CS-CMC-AgNPs _SN_1, d) películas de CS-CMC-AgNPs _SN_2 y e) películas de CS-CMC, contra la bacteria Gram negativa *E. coli*.

6.5.1.2. Evaluación de las propiedades de mecánicas de los apósitos de quitosano/carboximetilcelulosa suplementados con nanopartículas de plata

Las propiedades de tracción son también un criterio de evaluación importante para el apósito de heridas. En este documento, las propiedades de tracción de las muestras de quitosano y carboximetilcelulosa (CS-CMC) así como las que tenían nanopartículas de plata (CS-CMC-AgNPs) se midieron mediante una máquina de prueba de material universal a una tasa de deformación de 8 mm / min bajo temperatura ambiente. La curva de tensión-deformación se muestra en la figura 29. Las soluciones formadoras que contenían AgNPs obtenidas a partir de la biorreducción de iones de plata en el sobrenadante del cultivo (mezcla CS) se rotularon CS. Las soluciones formadoras que contenían AgNPs a partir de la biorreducción de iones de plata provenientes del sedimento de micelio- pellet (mezcla SN-síntesis extracelular) se rotularon SN.

Según los datos obtenidos (Tabla 8-Figura 29) se estableció que la suplementación con AgNPs incrementó la resistencia a la tracción (TS) y el módulo de elasticidad (EM) de los apósitos de CS-CMC. Un aumento de la concentración de AgNPs sintetizadas, por ejemplo, de la mezcla SN, aumentó la TS de 3.27 MPa (control sin AgNPs) a 9.77 MPa. Con respecto a las partículas sintetizadas a partir de la mezcla

CS se observó el mismo comportamiento y la TS aumentó a 5.14 MPa. Con respecto al EM se vio también un aumento pronunciado con respecto al control (Tabla 8).

El análisis Anova se presenta a continuación (Tabla 9). No se detectó una diferencia significativa entre cada nivel evaluado, sugiriendo que la resistencia a la tracción no se vio afectada por la incorporación de las AgNPs a la matriz polimérica. Con respecto a la muestra CS-CMC, se pudo observar que la resistencia a la tracción disminuyó referente a las biopelículas que tenían incorporadas AgNPs. Bao *et al.*, en sus investigaciones encontraron buenos resultados de resistencia a la tracción cuando hubo un entrecruzamiento entre ambos polímeros con respecto al hallado en este trabajo [97]. Se sugiere que en este proceso la disminución de la resistencia a la tracción pudo haberse presentado debido al método de fabricación empleado, el tiempo de secado de las películas, las condiciones ambientales y en mayor proporción a la concentración de CMC que se empleó (1.2 %). La unión del polímero CMC, considerando el tiempo de secado de las películas, pudo haber afectado la integridad estructural de la matriz del polímero CS.

Tabla 8. Espesor de la película, resistencia a la tracción (TS), elongación máxima y módulo elástico (EM) de películas fabricadas

Muestra	Espesor película (mm)	Resistencia a la tracción (MPa)	Módulo de elasticidad (MPa)	elongación máxima (%)
CS-CMC	0.115 ±0.007	3.27 ±0.94	11.7 ± 0.7	25.8 ± 5.7
CS-CMC-AgNPs_CS	0.07± 0.014	5.14 ± 1.54	10.4 ± 0.7	46.8 ± 4.6
CS-CMC-AgNPs_SN	0.055 ± 0.02	9.77 ± 3.77	13.2 ± 4.9	50.8 ± 0.1

Tabla 9. Análisis de varianza para la variable resistencia a la tracción. Ensayo pruebas mecánicas de los apósitos de CS-CMC-AgNPs fabricadas

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	44.845	2	22.4225	3.84	0.1487
Intra grupos	17.5003	3	5.83343		
Total (Corr.)	62.3453	5			

Por otra parte, el porcentaje de elongación de las muestras aumentó al adicionar AgNPs y se observó que para todas las AgNPs sintetizadas a partir de ambas mezclas hubo un incremento de hasta 1.7% con respecto al control (Tabla 8). Diversos autores han propuesto que la presencia de nanopartículas en la matriz de quitosano crea una estructura compacta con continuidades aumentadas dentro de la red de polisacáridos, lo que lleva a una disminución en la elongación a la rotura [10], [155], [156]. En este proyecto el efecto de los AgNPs en la mejora de la resistencia mecánica de las películas pudo deberse a la sustitución parcial, en su mayoría, del polímero CS por las nanopartículas en la matriz de la película [108]. Este comportamiento en conjunto con el refuerzo de la matriz CMC ocasionó una mejor interconexión partículas entre sí para formar una estructura compacta, lo que reforzó aún más las propiedades de tracción de la película (Figura 29). Estos resultados estuvieron en concordancia con lo reportado por Salari *et al.*, además la disminución de espesor con respecto a la muestra control (CS-CMC) y las buenas propiedades mecánicas halladas, sugieren que pudo haberse mejorado la durabilidad de las películas fabricadas.

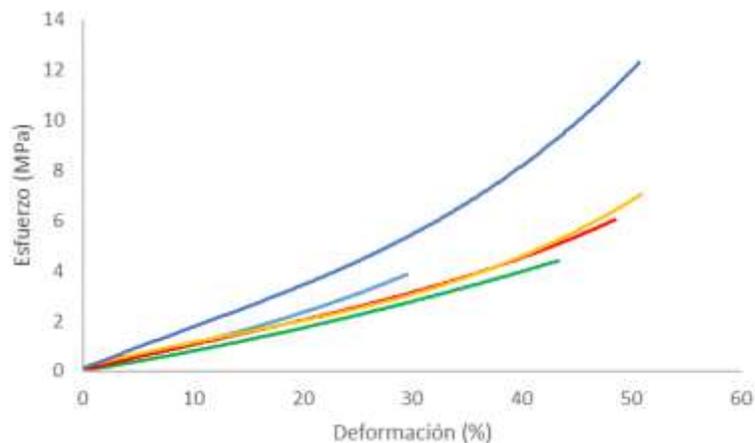


Figura 29. Grafica de esfuerzo deformación. Evaluación de las propiedades mecánicas de las películas fabricadas (—) CS-CMC-AgNPs _CS_1, (—) CS-CMC-AgNPs _CS_2, (—) CS-CMC-AgNPs _SN_1, (—) CS-CMC-AgNPs _SN_2, (—) Control CS-CMC

Por ultimo cabe resaltar, que según la figura 29 las biopelículas fabricadas tienen un comportamiento viscoelástico lineal. Se encontró en este experimento, como lo reportan Ghalei *et al.* que las propiedades mecánicas del apósito fabricado estaban

en los rangos de resistencia a la tracción reportados para piel que es de aproximadamente 1–32 MPa [157]. Esto indicó que este tipo de biopelículas suplementadas con AgNPs sintetizadas biológicamente a partir del hongo de pudrición blanca de la madera anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* pueden considerarse suficientemente adecuadas para aplicaciones de vendajes para heridas.

6.6. Ensayo de viabilidad celular de los apósitos fabricados

La mitocondria es la fábrica de energía de las células, que juega un papel importante en el crecimiento y proliferación celular. Como medida de la viabilidad celular, la actividad mitocondrial de las células Detroit (fibroblastos de piel humana) después de la exposición a apósitos de quitosano-carboximetilcelulosa impregnados con nanopartículas de plata (CS-CMC-AgNPs) durante 24 h se determinó utilizando el ensayo MTT. Los apósitos tratados se rotularon como T35 SN y T35 CS.

Las células Detroit cultivadas con el extracto de los materiales a la máxima concentración (100%) mostraron porcentajes de viabilidad mayores al 98%, comparable con lo observado en las células control no tratadas que presentaron viabilidad del 100%. Por su parte, las células tratadas con dimetil sulfoxido (DMSO) 6% evidenciaron una clara disminución en su viabilidad. (Tabla 10 y Figura 30). Los resultados se expresaron como el porcentaje de viabilidad de las células cultivadas con el extracto de los materiales vs células control sin tratamiento y células tratadas con DMSO 6%. Los datos corresponden al valor promedio (X) + la desviación estándar un ensayo por duplicado.

Tabla 10. Porcentaje de viabilidad células Detroit para las diferentes muestras tratadas

Tratamiento	% Viabilidad células Detroit
Extracto de T35SN	100.8 ± 4.5
Extracto de T35 CS	99.6 ± 3.2
DMSO 6%	15.5 ± 2.9
Control no tratado	100.0 ± 2.2

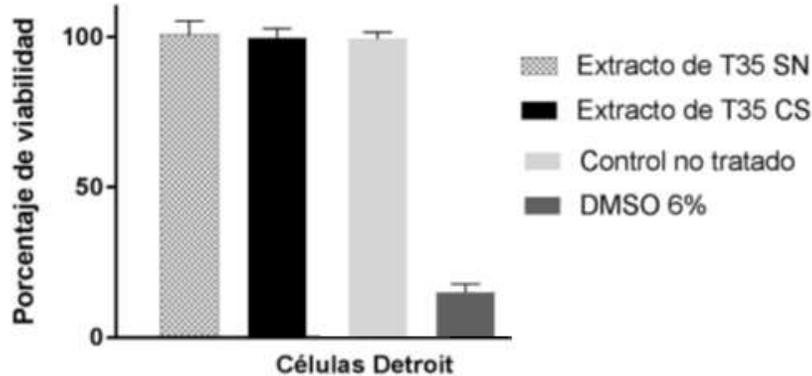


Figura 30. Porcentajes de viabilidad de las células Detroit cultivadas con los extractos de los materiales a la máxima concentración vs células control sin tratamiento y células tratadas con DMSO 6% (control positivo de toxicidad).

La figura 31 muestra las imágenes obtenidas durante el cultivo de las células Detroit con el extracto de los materiales a la máxima concentración, las células control no tratadas y las células tratadas con DMSO 6% (Control positivo de citotoxicidad). Se observó que las células cultivadas con el extracto de los apósitos de CS-CMC-AgNPs y las células control sin tratamiento se encuentran viables, con la formación de una monocapa y de morfología característica. Varios parámetros con respecto a las AgNPs como el tamaño, la forma, el grado de aglomeración, la composición química de la superficie, la carga, la concentración y el tiempo de exposición pueden influir significativamente en la toxicidad del nanomaterial [158]. Con respecto a lo hallado en esta investigación, se sugiere que la baja o casi nula citotoxicidad de las AgNPs sintetizadas a partir del hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* frente a fibroblastos de piel humana pudo ser gracias a los tamaños obtenidos, la morfología, la baja polidispersidad, la poca aglomeración y en especial a los agentes de recubrimiento, como residuos proteicos, que se forman dentro del proceso de síntesis. Gracias a estos recubrimientos se pudieron tener partículas biocompatibles con buenas propiedades antimicrobianas y en un futuro pueden considerarse como una herramienta poderosa en el campo de la nanomedicina para la fabricación de nuevos apósitos para heridas. Estos resultados hallados concuerdan, con el trabajo realizado por Saravanan *et al.* quien reporto viabilidad celular elevada de AgNPs sintetizadas a partir del hongo de pudrición blanca de la madera *Phenerochaete chrysosporium* (MTCC787) cuando fueron evaluadas utilizando células de fibroblastos de ratón [86].

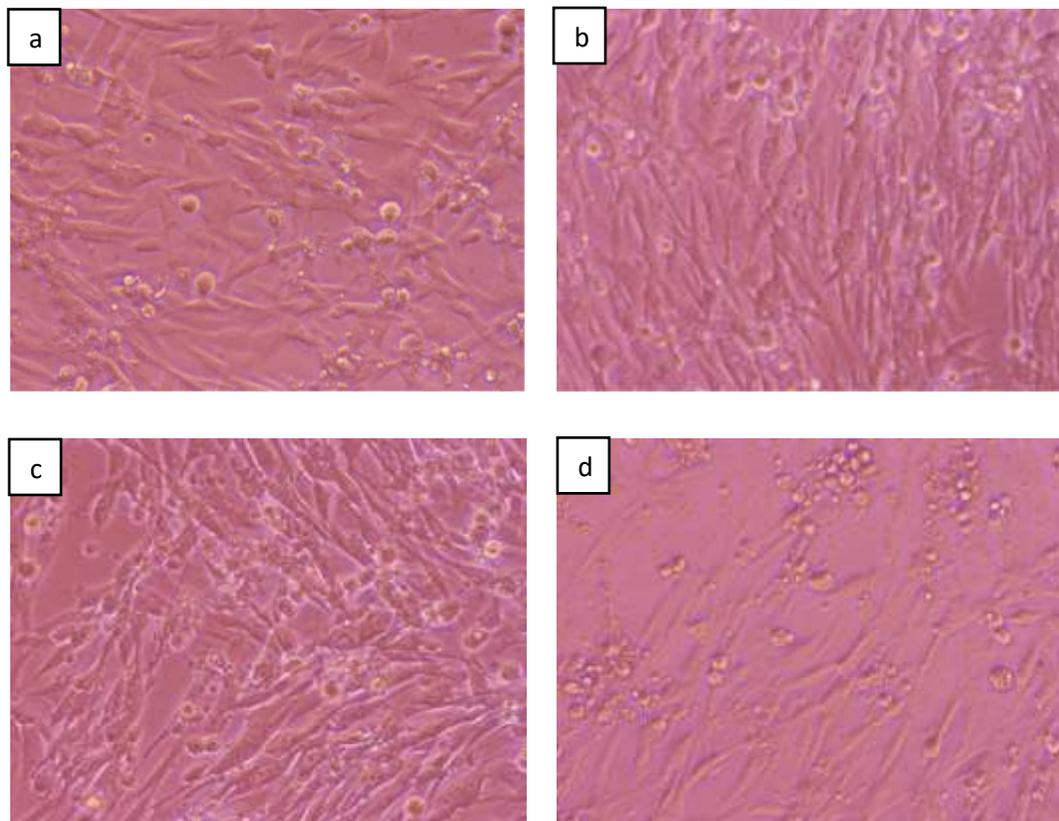


Figura 31. Cultivo de células Detroit. a) Con películas CS-CMC-AgNPs_T35_SN, b) Con el extracto con películas CS-CMC-AgNPs_T35_CS, c) Células control no tratadas y d) Células cultivadas con DMSO al 6% (Control positivo de citotoxicidad). Aumento 20 X. Microscopía convencional.

7. CONCLUSIONES

En este trabajo se describió un método de reducción biológica para la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) utilizando el hongo de pudrición blanca de la madera anamorfo R1 de *Bjerkandera sp.* La caracterización mediante espectroscopía Uv-vis, espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), dispersión de luz dinámica (DLS) y espectroscopía de energía de dispersión de rayos X (EDS) confirmaron la reducción del ion Ag^+ en Ag^0 empleando diversos métodos de síntesis.

En cuanto a la actividad de la nitrato reductasa (NR), la máxima tasa de síntesis de esta se detectó durante el final de la fase estacionaria de crecimiento del hongo y a

comienzos de la fase de muerte donde la totalidad del sustrato ya había sido consumido y exhibió su máximo nivel cuando el sobrenadante filtrado del día 8 de crecimiento del hongo de pudrición blanca de la madera anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* reaccionó con KNO_3 (Sustrato de la enzima). La máxima cantidad de enzima detectada fue de 5.87×10^{-3} (U/L) $\pm 0.0998 \times 10^{-3}$

Se evaluó el efecto del pH y la temperatura sobre la síntesis de la enzima nitrato reductasa (NR). Se pudo establecer que estos factores afectaron significativamente la actividad catalítica de la enzima. Niveles altos en cuanto a la temperatura incubación de la solución donde se sintetizó la NR ($T=35^\circ\text{C}$) posiblemente influyeron sobre algunos parámetros de la reacción, específicamente la ionización dependiente del pH, provocando que a valores de pH altos se inactivará por completo la enzima.

En relación al proceso de síntesis mediante la biorreducción de iones de plata secretada en el sobrenadante del cultivo del hongo (mezcla CS), se pudo observar en los espectros Uv-vis que hubo un efecto positivo cuando el proceso se llevó a cabo a diferentes temperaturas, pero únicamente cuando la solución se ajustó a pH de 9.0. Estos incrementos en la síntesis dieron a entender que los nucleófilos OH^- propiciaron un adecuado ambiente de adsorción y de transferencia de electrones para la reducción de los iones de plata dentro de la mezcla. Se reportó la presencia de una sola banda de resonancia de plasmón superficial (SPR) centrada a 400 nm en todos los espectros. Este resultado correspondió a la producción de nanopartículas isotrópicas. Este proceso se comprobó mediante TEM y se encontraron AgNPs con morfología esférica, con pocas aglomeraciones en un rango de un tamaño aproximado entre 10-50 nm.

El grado de adsorción de los iones Ag^+ sobre la superficie del micelio fúngico (Muestra MP) no se vio afectado cuando la solución en donde estaban sumergidos los pellets (AgNO_3 1mM) se ajustó a pH 9.0. La síntesis intracelular no arrojó buenos resultados cuando la solución se incubó a 25°C , por el contrario, fue incrementando a medida que la temperatura alcanzó valores de 30 y 35°C respectivamente; siendo esta última la mejor condición hallada. Mediante SEM se observó una producción estable y uniformemente distribuidas de AgNPs en un tamaño entre 60 y 200 nm.

Se pudo corroborar mediante FTIR y en las micrografías TEM tomadas que los residuos de proteínas o grupos funcionales químicos que se encuentran en la superficie del micelio se desprendieron más fácil y en mayor cantidad, cuando la

solución SN ajustada a pH de 9.0, se incubó a temperaturas entre 30 y 35 °C. Los espectros de absorción Uv-vis arrojaron una única banda de resonancia de superficie de plasmón (450 nm), sugiriendo que dentro de esta solución se formaron nanopartículas esféricas y uniformes. Mediante DLS se pudo comprobar que bajo estas condiciones agentes micromoleculares liberados redujeron Ag^+ en la solución de AgNO_3 en nanopartículas Ag^0 con una baja polidispersidad produciendo un buen tamaño de partícula que osciló entre 10-50 nm.

Los mayores niveles de producción de AgNPs (Mezcla CS incubada a 35 °C y pH ajustado a 9.0), no correspondieron con las mejores condiciones de síntesis de la NR. Mediante FTIR se encontró que probablemente este proceso no es tan dependiente de este tipo de enzima. Se realizó una estandarización a partir de tirosina comercial y se encontró que esta clase de biomolécula presente en el filtrado es responsable de la síntesis y la estabilización de las AgNPs. Este proceso acoplado a protones se intensificó cuando la reacción se llevó a altas temperaturas ($T=35^\circ\text{C}$) permitiendo una mayor capacidad de reducción del ion de plata Ag^+ a Ag^0 .

Mediante microscopia convencional se corroboró que las AgNPs provocaron cambios en la morfología de las películas de quitosano-carboximetilcelulosa (CS-CMC) convirtiendo la superficie porosa y rugosa. Las micrografías SEM mostraron que las AgNPs se dispersaron uniformemente sobre la superficie del apósito formando aglomerados. Se observó que los conglomerados tenían AgNPs en un rango de 60-200 nm con morfología cuasi esférica. Esto indicó que, sobre la superficie de las películas, las AgNPs se estabilizaron debido a la capa proteica con la cual estaban envueltas. Estas características morfológicas muestran el potencial biomédico de los apósitos fabricados debido a que podrían ayudar a absorber los exudados de la herida e incrementar el intercambio de oxígeno sobre la superficie de esta.

Se evaluó la actividad antimicrobiana contra la bacteria Gram negativa *E. coli*, las propiedades mecánicas y la biocompatibilidad de las películas de CS-CMC-AgNPs. Los resultados mostraron que las biopelículas con presencia de estos nanocompuestos exhibieron una fuerte actividad microbiana frente a este patógeno, una excelente viabilidad celular tratándose con fibroblastos de piel humana y buenas propiedades mecánicas comparables con la resistencia a la tracción reportada para el tejido de la piel. Estos hallazgos sugieren que este tipo de biopelículas tratadas con AgNPs sintetizadas a partir del hongo de pudrición blanca de la madera anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* tienen un alto potencial para ser

aplicado como biomaterial en áreas específicas de la biomedicina como la ingeniería de tejidos.

8. RECOMENDACIONES

Emplear otros métodos para la caracterización de AgNPs, así como para los apósitos preparados que permitan identificar otras propiedades mecánicas sensibles del producto final. Entre estas técnicas de caracterización se pueden mencionar el ángulo de contacto y microscopia de fuerza atómica (AFM).

En el país, se plantea como reto implementar tecnologías más limpias para el desarrollo de procesos biotecnológicos y de nuevos biomateriales. Para consolidar la reducción de AgNPs empleando métodos biológicos como alternativa, deben realizarse futuras investigaciones para proporcionar un avance significativo en la implementación de nuevos mecanismos de extracción de dichas partículas, debido a las excelentes propiedades que pueden ofrecer.

9. ANEXOS

Anexo 1. Información general y supuestos del modelo de regresión lineal del diseño de bloques aleatorizados para la validación de la curva de calibración de nitritos. Variable respuesta Fluorescencia.

Tabla 11. Datos curva de calibración nitritos

Concentración Nitritos ($\mu\text{g/L}$)	Medida 1 (U.R.F)	Medida 2 (U.R.F)	Medida 3 (U.R.F)	Promedio (U.R.F)
3	20633	24573	24339	23181
7	25359	26178	27463	26333
13	33612	35647	33384	34214
27	52274	48900	51257	50810
40	66428	65734	65970	66044
53	84000	85881	82487	84122

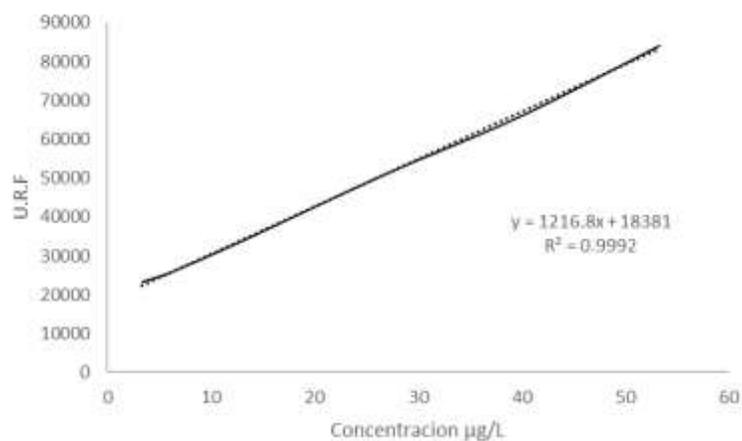


Figura 32. Curva de calibración obtenida a partir de la cuantificación de nitritos empleando el método espectrofluorométrico con 2-3 diaminonaftaleno (DAN)

Tabla 12. Análisis de varianza para la variable Fluorescencia. Cinética de producción enzimática.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.77808E6	2	889040.	0.00	0.9985
Intra grupos	8.76125E9	15	5.84084E8		
Total (Corr.)	8.76303E9	17			

Normalidad

Prueba de Kolmogorov-Smirnov

	<i>Normal</i>
DMAS	0.204079
DMENOS	0.122272
DN	0.204079
Valor-P	0.449044

Debido a que ($p > 0.05$), se puede decir que los residuos provienen de una distribución normal con 95% de confianza.

Homocedasticidad.

Verificación de Varianza El estadístico de Levene's evalúa la hipótesis de que la desviación estándar de la variable respuesta Fluorescencia dentro de cada uno de los 3 niveles de la variable dependiente (Medición Curva) es la misma. Debido a que ($p > 0.05$) se dice que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95.0% de confianza.

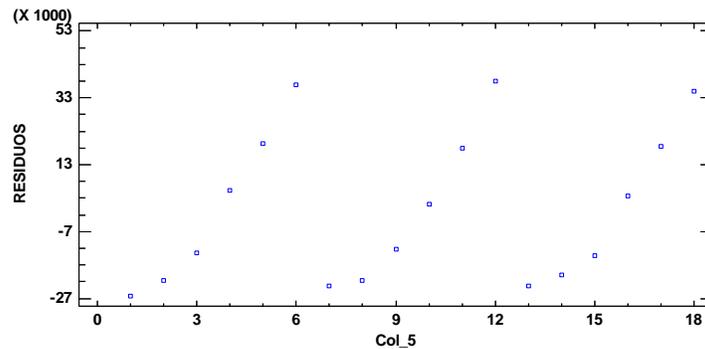
Prueba de Levene's

		<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's		0.0342065	0.966447

<i>Comparación</i>	<i>Sigma1</i>	<i>Sigma2</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Valor</i>
1 / 2	24968.1	24197.9	1.06467	0.9469
1 / 3	24968.1	23308.9	1.14744	0.8837
2 / 3	24197.9	23308.9	1.07774	0.9365

Independencia. Permite observar auto correlación entre los residuos. Los residuos no presentan un comportamiento sistemático.

Gráfico de residuos



Anexo 2. Cinética de producción enzimática del sobrenadante filtrado con 0.1% de KNO_3 del hongo ligninolítico anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* seguimiento en el tiempo durante 144 h. Análisis de varianza y múltiples rangos para un tiempo de producción de Nitrato reductasa de 120 h

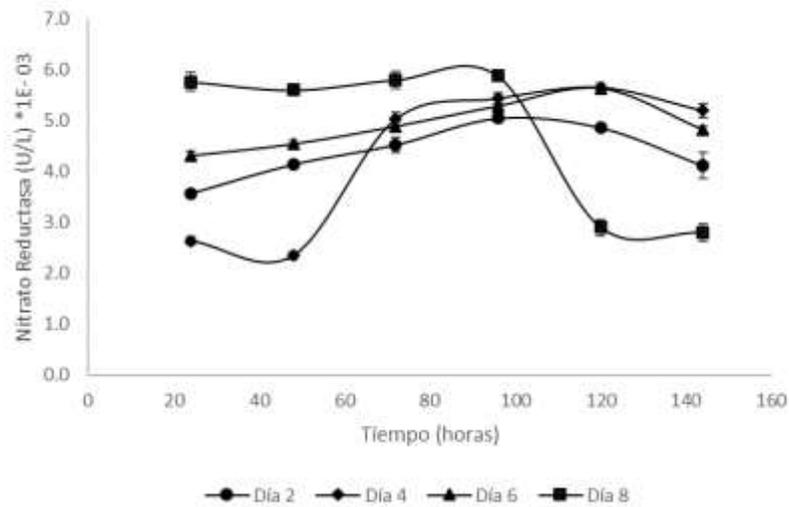


Figura 33. Cinética de producción enzimática del sobrenadante filtrado con 0.1% de KNO_3 del hongo ligninolítico anamorfo R1 de *Bjerkandera sp*. Seguimiento en el tiempo durante 144 h.

Tabla 13. Análisis de varianza para la variable Producción NR para un tiempo de 120h. Cinética de producción enzimática.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	5.89503E-9	3	1.96501E-9	210.22	0.0000
Intra grupos	7.478E-11	8	9.3475E-12		
Total (Corr.)	5.96981E-9	11			

Tabla 14. Análisis de múltiples rangos (Tukey HSD) para la variable Producción NR para un tiempo de 120h. Cinética de producción enzimática.

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
8	3	0.000057966 7	X
2	3	0.000094733 3	X
6	3	0.000111367	X
4	3	0.0001131	X

Anexo 3. Supuestos del modelo de regresión lineal del diseño de bloques aleatorizados para la validación de la cinética de producción enzimática. Variable respuesta Producción enzima NR. Supuestos para 96 y 120 h de producción enzimática.

Normalidad

Prueba de Kolmogorov-Smirnov. a. 96 h. b. 120 h

96H	<i>Normal</i>
DMAS	0.153354
DMENOS	0.15893
DN	0.15893
Valor-P	0.922264

120H	<i>Normal</i>
DMAS	0.116586
DMENOS	0.146946
DN	0.146946
Valor-P	0.957869

Debido a que ($p > 0.05$), se puede decir que los residuos provienen de una distribución normal con 95% de confianza.

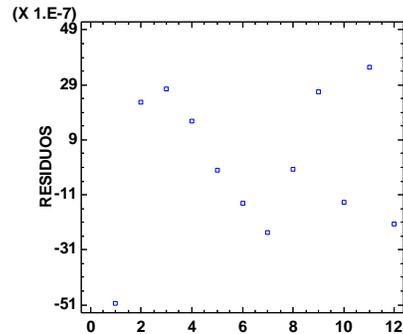
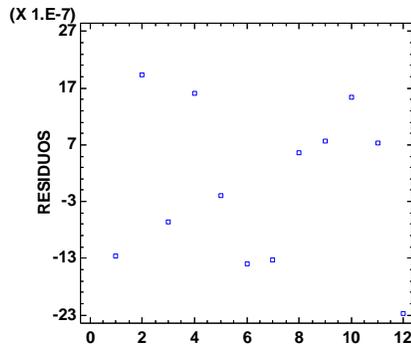
Homocedasticidad

Verificación de Varianza El estadístico de Levene's evalúa la hipótesis de que la desviación estándar de la variable producción de la enzima nitrato reductasa dentro de cada uno de los 4 niveles de la variable dependiente (días de la cinética) es la misma. Debido a que ($p > 0.05$) para ambos casos se dice que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95.0% de confianza

Prueba de Levene's. a. 96 h. b. 120 h

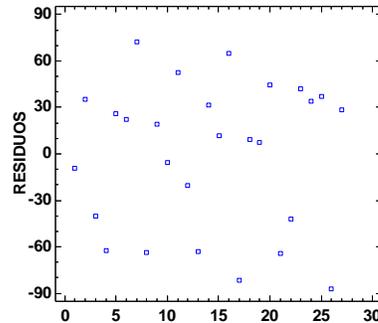
120h	Prueba	Valor-P	96h	Prueba	Valor-P
Levene's	1.93147	0.203076	Levene's	0.508428	0.687403

Independencia. residuos para la validación del modelo del diseño de la cinética de producción de nitrato reductasa. a. 96 h. b. 120 h. Permite observar auto correlación entre los residuos. Los residuos no presentan un comportamiento sistemático.



Anexo 4. Supuestos del modelo de regresión lineal del diseño de superficie de respuesta para la validación de la síntesis de AgNPs. Variable respuesta área bajo la curva. Supuestos para la solución de reacción a pHs (5.0, 7.0 y 9.0), temperatura de incubación (25, 30 y 35°C). Tiempo de incubación 144 h.

Independencia y Homocedasticidad. Permite observar auto correlación entre los residuos. Los residuos no presentan un comportamiento sistemático.



Normalidad

Prueba de Kolmogorov-Smirnov. Síntesis de AgNPs. Muestra CS.

	<i>Normal</i>
DMAS	0.129491
DMENOS	0.153259
DN	0.153259
Valor-P	0.550078

Debido a que ($p > 0.05$), se puede decir que los residuos provienen de una distribución normal con 95% de confianza.

Anexo 5. Curva de calibración tirosina. Validación Mecanismo de síntesis a partir del hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp*

Tabla 15. Datos curva de calibración Tirosina obtenidos a partir de espectroscopia Uv-vis.

Concentración Tirosina g/L	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Promedio
0.35	2.1	2.1	2.1	2.1
0.32	1.9	1.9	1.9	1.9
0.25	1.6	1.6	1.6	1.6
0.2	1.3	1.3	1.3	1.3
0.15	0.9	0.9	1.0	0.9
0.1	0.6	0.6	0.6	0.6

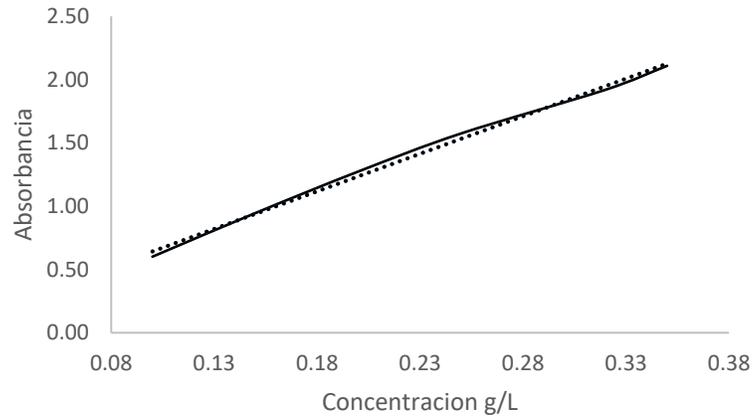
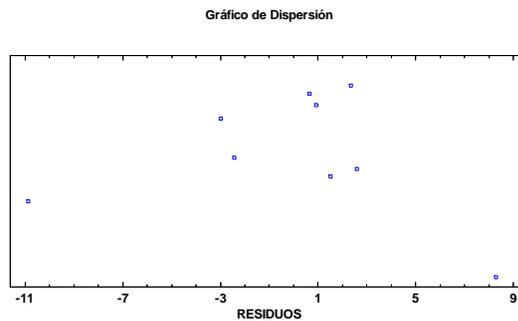


Figura 34. Curva de calibración obtenida para cuantificar la concentración de Tirosina a pH 9.0.

Anexo 6. Supuestos del modelo de regresión lineal del diseño de bloques aleatorizados para la validación de la temperatura como factor que influye en la síntesis extracelular de AgNPs en la mezcla SN. Variable respuesta área bajo la curva. Supuestos para la solución de reacción a pH 9.0. Tiempo de incubación 144 h.

Independencia

Permite observar auto correlación entre los residuos. Los residuos no presentan un comportamiento sistemático



Homocedasticidad.

Verificación de Varianza. Debido a que ($p > 0.05$) se dice que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95.0% de confianza.

Prueba de Levene's

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	4.49038	0.0642471

Normalidad.

Prueba de Kolmogorov-Smirnov.

	<i>Normal</i>
DMAS	0.197708
DMENOS	0.216291
DN	0.216291
Valor-P	0.793756

Debido a que ($p > 0.05$), se puede decir que los residuos provienen de una distribución normal con 95% de confianza.

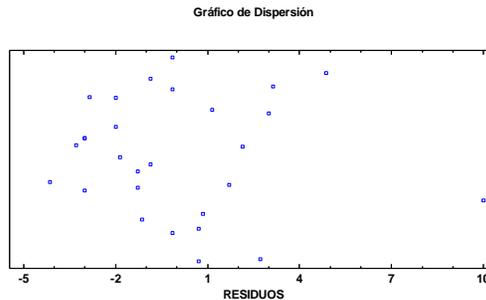
Anexo 7. Experimento y Supuestos del modelo de regresión lineal del diseño de bloques aleatorizados para comprobar el efecto antimicrobiano de las películas CS-CMC-AgNPs. Variable respuesta. Halo de inhibición.

Tabla 16. Análisis de múltiples rangos (Tukey HSD) para la variable halo de inhibición. Ensayo antimicrobiano de los apósitos de CS-CMC-AgNPs fabricadas

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
SN2	7	27.1429	X
CS2	7	30.2857	X X
SN1	7	31.0	X X
CS1	7	32.8571	X

Independencia

Permite observar auto correlación entre los residuos. Los residuos no presentan un comportamiento sistemático



Homocedasticidad.

Verificación de Varianza. Debido a que ($p > 0.05$) se dice que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95.0% de confianza.

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	2.04738	0.134004

Normalidad.

Prueba de Kolmogorov-Smirnov.

	<i>Normal</i>
DMAS	0.126209
DMENOS	0.100072
DN	0.126209
Valor-P	0.763894

Debido a que ($p > 0.05$), se puede decir que los residuos provienen de una distribución normal con 95% de confianza.

10. BIBLIOGRAFIA

- [1] J. F. Salvador Sanz, a. Novo Torres, E. Lorda Barraguer, F. Castillo, J. E. Torra I Bou, and M. J. Torregrosa Ramos, "Estudio comparativo de efectividad de un ap??sito de plata nanocristalina frente a sulfadiazine arg??ntica en el tratamiento de pacientes quemados," *Cir. Plast. Ibero-Latinoamericana*, vol. 37, pp. 253–266, 2011.
- [2] N. K. Rajendran, S. S. D. Kumar, N. N. Houreld, and H. Abrahamse, "A review on nanoparticle based treatment for wound healing," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 44, no. October 2017, pp. 421–430, 2018.
- [3] L. I. F. Moura, A. M. A. Dias, E. Carvalho, and H. C. de Sousa, "Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment—A review," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 7, pp. 7093–7114, 2013.
- [4] B. Boonkaew, M. Kempf, R. Kimble, P. Supaphol, and L. Cuttle, "Antimicrobial efficacy of a novel silver hydrogel dressing compared to two common silver burn wound dressings: Acticoat?? and PolyMem Silver ??," *Burns*, vol. 40, pp. 89–96, 2014.
- [5] a Hebeish, M. El-Rafie, M. El-Sheikh, a Seleem, and M. El-Naggar, "Antimicrobial wound dressing and anti-inflammatory efficacy of silver nanoparticles," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 65, pp. 509–515, 2014.
- [6] J. Boateng and O. Catanzano, "Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing - A Review," *J. Pharm. Sci.*, vol. 104, no. 11, pp. 3653–3680, 2015.
- [7] M. Berthet, Y. Gauthier, C. Lacroix, B. Verrier, and C. Monge, "Nanoparticle-Based Dressing: The Future of Wound Treatment?," *Trends Biotechnol.*, vol. 35, no. 8, pp. 770–784, 2017.
- [8] R. A. Cabrales *et al.*, "Efectividad de los apósitos de plata en la prevención de la infección del sitio operatorio en heridas contaminadas," vol. 27, no. 3, pp. 247–254, 2014.
- [9] G. Juncu, A. Stoica-Guzun, M. Stroescu, G. Isopencu, and S. I. Jinga, "Drug release kinetics from carboxymethylcellulose-bacterial cellulose composite films," *Int. J. Pharm.*, vol. 510, no. 2, pp. 485–492, 2016.
- [10] D. Archana, B. K. Singh, J. Dutta, and P. K. Dutta, "Chitosan-PVP-nano silver oxide wound dressing: In vitro and in vivo evaluation," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 73, pp. 49–57, 2015.
- [11] J.-W. Rhim and L.-F. Wang, "Preparation and characterization of carrageenan-based nanocomposite films reinforced with clay mineral and silver nanoparticles," *Appl. Clay Sci.*, vol. 97–98, pp. 174–181, 2014.
- [12] G. Krishna, P. Vadapally, and M. a. Singara Charya, "Biogenic synthesis of

silver nanoparticles from white rot fungi: Their characterization and antibacterial studies,” *OpenNano*, 2017.

- [13] M. Naseri-Nosar and Z. M. Ziora, “Wound dressings from naturally-occurring polymers: A review on homopolysaccharide-based composites,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 189, no. November 2017, pp. 379–398, 2018.
- [14] S. Prabhu and E. K. Poulouse, “Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects,” *Int. Nano Lett.*, vol. 2, no. 32, p. 32, 2012.
- [15] S. Gurunathan, “Biologically synthesized silver nanoparticles enhances antibiotic activity against Gram-negative bacteria,” *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 29, pp. 1–10, 2015.
- [16] M. Dhayalan, M. I. J. Denison, M. Ayyar, N. N. Gandhi, K. Krishnan, and B. Abdulhadi, “Biogenic synthesis, characterization of gold and silver nanoparticles from *Coleus forskohlii* and their clinical importance,” *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 183, no. April, pp. 251–257, 2018.
- [17] L. Wei, J. Lu, H. Xu, A. Patel, Z.-S. Chen, and G. Chen, “Silver nanoparticles : synthesis properties and therapeutic applications,” *Drug Discov. Today*, vol. 20, no. 5, pp. 595–601, 2015.
- [18] S. Patra, S. Mukherjee, A. K. Barui, A. Ganguly, B. Sreedhar, and C. R. Patra, “Green synthesis, characterization of gold and silver nanoparticles and their potential application for cancer therapeutics,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 53, pp. 298–309, 2015.
- [19] J. Osorio, “Evaluación De La Decoloración De Efluentes Industriales En Un Reactor De Lecho Fijo Empleando El Hongo De La Pudrición Blanca De La Madera *Anthracoophyllum Discolor*,” Universidad de Antioquia, 2010.
- [20] N. Pantidos and L. E. Horsfall, “Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles by Bacteria , Fungi and Plants,” *J. Nanomed. Nanotechnol.*, vol. 5, no. 5, p. 10, 2014.
- [21] J. Osorio, L. Muñoz, and A. Martinez, “Produccion de nanoparticulas de plata a partir del hongo de pudricion blanca *Anthracoophyllum discolor*.” Medellin, 2014.
- [22] J. Osorio, “EVALUACION DE LA SINTESIS DE NANOPARTICULAS DE PLATA A PARTIR DE HONGOS LIGNINOLITICOS PARA LA PRODUCCION DE BIOPELICULAS DE CARRAGENINA,” Universidad De Antioquia, 2016.
- [23] G. Sandri *et al.*, *Wound Healing Biomaterials*. 2016.
- [24] G. D. Mogoşanu and A. M. Grumezescu, “Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing,” *Int. J. Pharm.*, vol. 463, pp. 127–136, 2014.
- [25] S. V. Dorozhkin, “Calcium orthophosphate bioceramics,” *Eurasian Chem. J.*, vol. 12, pp. 247–258, 2015.

- [26] A. Mahapatro, "Bio-Functional Nano-Coatings on Metallic Biomaterials," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 55, pp. 227–251, 2015.
- [27] Q. Chen and G. a. Thouas, "Metallic implant biomaterials," *Mater. Sci. Eng. R Reports*, vol. 87, pp. 1–57, 2015.
- [28] F.-M. Chen and X. Liu, "Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering," *Prog. Polym. Sci.*, 2015.
- [29] D. Banoriya, R. Purohit, and R. K. Dwivedi, "Advanced Application of Polymer based Biomaterials," *Mater. Today Proc.*, vol. 4, no. 2, pp. 3534–3541, 2017.
- [30] J. J. Li, N. Sydney, L. Health, and S. Leonards, *Tissue Response to Biomaterials*. Elsevier Inc., 2018.
- [31] B. Imre and B. Pukánszky, "From natural resources to functional polymeric biomaterials," *Eur. Polym. J.*, vol. 68, pp. 481–487, 2015.
- [32] X. Wang, J. Chang, and C. Wu, "Bioactive inorganic / organic nanocomposites for wound healing," *Appl. Mater. Today*, vol. 11, pp. 308–319, 2018.
- [33] S. S. D. Kumar, N. K. Rajendran, N. N. Houreld, and H. Abrahamse, "Recent advances on silver nanoparticle and biopolymer based biomaterials for wound healing applications," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 115, pp. 165–175, 2018.
- [34] S. Bin Park, E. Lih, K. S. Park, Y. K. Joung, and D. K. Han, "Biopolymer-based functional composites for medical applications," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 68, pp. 77–105, 2017.
- [35] C. Y. Florez, "“ Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables : síntesis , caracterización fisicoquímica y actividad bactericida ,” 2014.
- [36] D. Campoccia, L. Montanaro, and C. R. Arciola, "A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces," *Biomaterials*, vol. 34, no. 34, pp. 8533–8554, 2013.
- [37] J. Hasan, R. J. Crawford, and E. P. Ivanova, "Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials," *Trends Biotechnol.*, vol. 31, no. 5, p. 295, 2013.
- [38] X. Liu, P. K. Chu, and C. Ding, "Surface nano-functionalization of biomaterials," *Mater. Sci. Eng. R Reports*, vol. 70, no. 3–6, pp. 275–302, 2010.
- [39] P. I. Dolez, *Nanoengineering: Global Approaches to Health and Safety Issues*. 2015.
- [40] M. Ahmadi, H. Elmongy, T. Madrakian, and M. Abdel-Rehim, "Nanomaterials as sorbents for sample preparation in bioanalysis: A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 958, pp. 1–21, 2016.
- [41] Q. Guan, C. Xia, and W. Li, "Bio-friendly controllable synthesis of silver nanoparticles and their enhanced antibacterial property," *Catal. Today*, no.

April, pp. 1–7, 2018.

- [42] K. N. Thakkar, S. S. Mhatre, and R. Y. Parikh, “Biological synthesis of metallic nanoparticles,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 6, no. 2, pp. 257–262, 2010.
- [43] G. L. Gómez, “Nanopartículas de plata : tecnología para su obtención , caracterización y actividad biológica,” *Investig. en Discapac.*, vol. 2 no. 1, pp. 18–22, 2013.
- [44] R. Zanella, “Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño,” *Www.Mundonano.Unam.Mx*, vol. 5, no. 1, pp. 69–81, 2012.
- [45] S. S. Sana and L. K. Dogiparthi, “Green synthesis of silver nanoparticles using Givotia moluccana leaf extract and evaluation of their antimicrobial activity,” *Mater. Lett.*, vol. 226, pp. 47–51, 2018.
- [46] D. Patel, M. Patel, and R. Krishnamurthy, “Silver Nanoparticles : Biosynthesis and Its Antimicrobial Activity,” *Cibtech J. Bio-Protocols*, vol. 2, no. 1, pp. 50–57, 2013.
- [47] Y. S. Chan and M. M. Don, “Biosynthesis and structural characterization of Ag nanoparticles from white rot fungi,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, pp. 282–288, 2013.
- [48] C. R. B. Lopes and L. C. Courrol, “Green synthesis of silver nanoparticles with extract of Mimusops coriacea and light,” *J. Lumin.*, vol. 199, no. November 2017, pp. 183–187, 2018.
- [49] K. Jadhav, D. Dhamecha, D. Bhattacharya, and M. Patil, “Green and ecofriendly synthesis of silver nanoparticles: Characterization, biocompatibility studies and gel formulation for treatment of infections in burns,” *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 155, pp. 109–115, 2016.
- [50] P. V. Asharani, Y. Lian Wu, Z. Gong, and S. Valiyaveetil, “Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models,” *Nanotechnology*, vol. 19, 2008.
- [51] R. Amooaghaie, M. R. Saeri, and M. Azizi, “Synthesis, characterization and biocompatibility of silver nanoparticles synthesized from Nigella sativa leaf extract in comparison with chemical silver nanoparticles,” *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 120, pp. 400–408, 2015.
- [52] H. Lee *et al.*, “Biotechnological procedures to select white rot fungi for the degradation of PAHs,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 97, pp. 56–62, 2014.
- [53] V. Sol and M. Vr, “Chemosphere Immobilization of ligninolytic enzymes from white-rot fungi in cross- linked aggregates rkov a Stanislava Vob e,” vol. 202, pp. 694–707, 2018.
- [54] M. I. Gaviria Arroyave, “Escalado Del Proceso De Decoloracion De Efluentes Industriales Textiles En Un Reactor Prototipo 5L De lecho Fijo Con El Hongo Anamorfo R1 De Bjerkandera,” universidad de antioquia, 2014.

- [55] F. J. O. Calahorro, "Universidad de Córdoba óxido nítrico y la asimilación de nitrógeno en *El Chlamydomonas*," 2013.
- [56] P. Kalimuthu, P. Ringel, T. Kruse, and P. V Bernhardt, "Direct electrochemistry of nitrate reductase from the fungus *Neurospora crassa*," vol. 1857, pp. 1506–1513, 2016.
- [57] S. De, M. Perkins, and S. K. Dutta, "Nitrate reductase gene involvement in hexachlorobiphenyl dechlorination by *Phanerochaete chrysosporium*," *J. Hazard. Mater.*, vol. 135, pp. 350–354, 2006.
- [58] N. Durán, P. D. Marcato, O. L. Alves, G. I. H. De Souza, and E. Esposito, "Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains.," *J. Nanobiotechnology*, vol. 3, p. 8, 2005.
- [59] A. R. Fajardo *et al.*, "Silver sulfadiazine loaded chitosan/chondroitin sulfate films for a potential wound dressing application," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 2, pp. 588–595, 2013.
- [60] J. E. Lai-Cheong and J. a. McGrath, "Structure and function of skin, hair and nails," *Med. (United Kingdom)*, vol. 45, no. 6, pp. 347–351, 2017.
- [61] I. Tsakovska *et al.*, "Quantitative structure-skin permeability relationships," *Toxicology*, vol. 387, no. March, pp. 0–1, 2017.
- [62] E. a. Kamoun, E. R. S. Kenawy, and X. Chen, "A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings," *J. Adv. Res.*, vol. 8, no. 3, pp. 217–233, 2017.
- [63] V. Bourganis, O. Kammona, A. Alexopoulos, and C. Kiparissides, "Recent advances in carrier mediated nose-to-brain delivery of pharmaceuticals," vol. 128, no. March, pp. 337–362, 2018.
- [64] S. Asghari, S. Logsetty, and S. Liu, "Imparting commercial antimicrobial dressings with low-adherence to burn wounds," *Burns*, vol. 42, no. 4, pp. 877–883, 2016.
- [65] J. Wang and M. Windbergs, "Functional electrospun fibers for the treatment of human skin wounds," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 119, pp. 283–299, 2017.
- [66] J. L. Velázquez-Velázquez *et al.*, "Anti-biofilm and cytotoxicity activity of impregnated dressings with silver nanoparticles.," *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, vol. 49, pp. 604–11, 2015.
- [67] K. Vowden and P. Vowden, "Wound dressings: principles and practice," *Surg.*, vol. 32, pp. 462–467, 2014.
- [68] M. Farokhi, F. Mottaghitalab, Y. Fatahi, A. Khademhosseini, and D. L. Kaplan, "Overview of Silk Fibroin Use in Wound Dressings," *Trends Biotechnol.*, vol. xx, 2018.
- [69] R. Jayakumar, M. Prabakaran, P. T. Sudheesh Kumar, S. V. Nair, and H. Tamura, "Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing

- applications,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, no. 3, pp. 322–337, 2011.
- [70] J. Boateng and O. Catanzano, “Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing - A Review,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 104, no. 11, pp. 3653–3680, 2015.
- [71] S. P. Miguel *et al.*, “Electrospun polymeric nanofibres as wound dressings: A review,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 169, pp. 60–71, 2018.
- [72] a. Sathiyaseelan, a. Shajahan, P. T. Kalaihelvan, and V. Kaviyaran, “Fungal chitosan based nanocomposites sponges-An alternative medicine for wound dressing,” *Int. J. Biol. Macromol.*, 2016.
- [73] H. Hamedi, S. Moradi, S. M. Hudson, and A. E. Tonelli, “Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review,” vol. 199, no. June, pp. 445–460, 2018.
- [74] S. Ahmed and S. Ikram, “Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing,” *Achiev. Life Sci.*, vol. 10, no. 1, pp. 27–37, 2016.
- [75] A. Sionkowska, “Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 36, pp. 1254–1276, 2011.
- [76] D. Hu, T. Qiang, and L. Wang, “Quaternized chitosan/polyvinyl alcohol/sodium carboxymethylcellulose blend film for potential wound dressing application,” *Wound Med.*, vol. 16, pp. 15–21, 2017.
- [77] M. I. N. Ahamed, S. Sankar, P. M. Kashif, S. K. H. Basha, and T. P. Sastry, “Evaluation of biomaterial containing regenerated cellulose and chitosan incorporated with silver nanoparticles.,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 72, pp. 680–6, 2015.
- [78] P. N. Lim, L. Chang, and E. S. Thian, “Development of Nanosized Silver-Substituted Apatite for Biomedical Applications: A Review.,” *Nanomedicine*, vol. 11, pp. 1331–1344, 2015.
- [79] H. J. Johnston, G. Hutchison, F. M. Christensen, S. Peters, S. Hankin, and V. Stone, “A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity,” *Crit. Rev. Toxicol.*, vol. 40, no. November 2009, pp. 328–346, 2010.
- [80] X. Zhang, Z. Liu, W. Shen, and S. Gurunathan, “Silver Nanoparticles : Synthesis , Characterization , Properties , Applications and Therapeutic Applications,” *Drug Discov. Today*, vol. 20, no. 5, 2016.
- [81] A. Pasha, S. Baker, D. Rakshith, and S. Satish, “Mycosynthesis of silver nanoparticles bearing antibacterial activity,” *Saudi Pharm. J.*, 2015.
- [82] D. Patel, M. Patel, and R. Krishnamurthy, “Silver Nanoparticles : Biosynthesis and Its Antimicrobial Activity,” vol. 2, no. 1, pp. 50–57, 2013.

- [83] P. K. Seetharaman *et al.*, “Antimicrobial and larvicidal activity of eco-friendly silver nanoparticles synthesized from endophytic fungi *Phomopsis liquidambaris*,” *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 16, no. June, pp. 22–30, 2018.
- [84] T. I. Shaheen and A. A. Abd El Aty, “In-situ green myco-synthesis of silver nanoparticles onto cotton fabrics for broad spectrum antimicrobial activity,” *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018.
- [85] M. Madakka, N. Jayaraju, and N. Rajesh, “Mycosynthesis of silver nanoparticles and their characterization,” *MethodsX*, vol. 5, pp. 20–29, 2018.
- [86] M. Saravanan, S. Arokiyaraj, T. Lakshmi, and A. Pugazhendhi, “Synthesis of silver nanoparticles from *Phenerochaete chrysosporium* (MTCC-787) and their antibacterial activity against human pathogenic bacteria,” *Microb. Pathog.*, vol. 117, no. February, pp. 68–72, 2018.
- [87] J. Osorio-echavarría, N. A. Gómez-vanegas, J. Osorio-echavarría, and C. P. Ossa-oroSCO, “Preparation of carrageenan biofilms mixed with silver nanoparticles by biological synthesis method • Obtención de biopelículas de carragenina suplementadas con nanopartículas de plata sintetizadas biológicamente,” *Dyna*, vol. 84, no. 201, pp. 82–87, 2017.
- [88] M. Connolly, “Mecanismos subyacentes a la toxicidad de nanopartículas metálicas [Manuscrito]: aproximaciones ‘in vitro e in vivo.’” 2017.
- [89] E. a. Kamoun, X. Chen, M. S. Mohy Eldin, and E.-R. S. Kenawy, “Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers,” *Arab. J. Chem.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–14, 2015.
- [90] N.-T. Nguyen and J.-H. Liu, “A green method for in situ synthesis of poly(vinyl alcohol)/chitosan hydrogel thin films with entrapped silver nanoparticles,” *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, vol. 45, pp. 2827–2833, 2014.
- [91] M. M. G. Fouda, M. R. El-Aassar, G. F. El Fawal, E. E. Hafez, S. H. D. Masry, and A. Abdel-Megeed, “k-Carrageenan/poly vinyl pyrrolidone/polyethylene glycol/silver nanoparticles film for biomedical application,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 74, pp. 179–184, 2015.
- [92] S. Azizi, R. Mohamad, R. Abdul Rahim, R. Mohammadinejad, and A. Bin Ariff, “Hydrogel beads bio-nanocomposite based on Kappa-Carrageenan and green synthesized silver nanoparticles for biomedical applications,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 104, pp. 423–431, 2017.
- [93] D. Simõesa, S. P. Miguela, M. P. Ribeiroa, P. Coutinho, A. G. Mendonça, and Ilídio J. Correiaa, “Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review,” vol. 128, no. March, pp. 337–362, 2018.
- [94] A. Mohandas, S. Deepthi, R. Biswas, and R. Jayakumar, “Chitosan based metallic nanocomposite scaffolds as antimicrobial wound dressings,” *Bioact. Mater.*, vol. 3, no. 3, pp. 267–277, 2017.

- [95] Z. Lu *et al.*, “Enhanced antibacterial and wound healing activities of microporous chitosan-Ag/ZnO composite dressing,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 156, pp. 460–469, 2017.
- [96] M. S. Rubina *et al.*, “Collagen-chitosan scaffold modified with Au and Ag nanoparticles: Synthesis and structure,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 366, pp. 365–371, 2016.
- [97] D. Bao, M. Chen, H. Wang, J. Wang, C. Liu, and R. Sun, “Preparation and characterization of double crosslinked hydrogel films from carboxymethylchitosan and carboxymethylcellulose,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 110, pp. 113–120, 2014.
- [98] L. Vinklárková *et al.*, “Film wound dressing with local anesthetic based on insoluble carboxymethylcellulose matrix,” *J. Appl. Biomed.*, vol. 15, no. 4, pp. 313–320, 2017.
- [99] T. W. Wong and N. A. Ramli, “Carboxymethylcellulose film for bacterial wound infection control and healing,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 112, pp. 367–375, 2014.
- [100] A. Das, A. Kumar, N. B. Patil, C. Viswanathan, and D. Ghosh, “Preparation and characterization of silver nanoparticle loaded amorphous hydrogel of carboxymethylcellulose for infected wounds,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 130, pp. 254–261, 2015.
- [101] E. Bozaci, E. Akar, E. Ozdogan, A. Demir, A. Altinisik, and Y. Seki, “Application of carboxymethylcellulose hydrogel based silver nanocomposites on cotton fabrics for antibacterial property,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 134, pp. 128–135, 2015.
- [102] R. Sainitya *et al.*, “Scaffolds containing chitosan/carboxymethyl cellulose/mesoporous wollastonite for bone tissue engineering,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 80, pp. 481–488, 2015.
- [103] M. G. Redinbaugh and W. H. Campbell, “Quaternary structure and composition of squash NADH:nitrate reductase.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 260, no. 6, pp. 3380–3385, 1985.
- [104] M. Carré, B. Mahieux, J. André, and M. Viriot, “Fluorimetric nitrite analysis an improvement of the method,” *Analisis*, vol. 27, pp. 835–838, 1999.
- [105] J. Platas Gil, “Estudio del secretoma de las células madre de tejido adiposo y de péptidos PTHrP en células articulares osteoartísticas,” 2016. .
- [106] R. Taboada-Puig, T. Lú-Chau, M. T. Moreira, G. Feijoo, M. J. Martínez, and J. M. Lema, “A new strain of *Bjerkandera* sp. production, purification and characterization of versatile peroxidase,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 27, pp. 115–122, 2011.
- [107] C. Arenas Ramos, “Síntesis de nanopartículas metálicas a partir de extractos

de raspo de uva,” Universidad Politécnica de Cataluña, 2017.

- [108] M. Salari, M. Sowti Khiabani, R. Rezaei Mokarram, B. Ghanbarzadeh, and H. Samadi Kafil, “Development and evaluation of chitosan based active nanocomposite films containing bacterial cellulose nanocrystals and silver nanoparticles,” *Food Hydrocoll.*, vol. 84, no. March, pp. 414–423, 2018.
- [109] M. Baláž *et al.*, “Bio-mechanochemical synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activity,” *Adv. Powder Technol.*, vol. 28, pp. 3307–3312, 2017.
- [110] L. Biao *et al.*, “Synthesis, characterization and antibacterial study on the chitosan-functionalized Ag nanoparticles,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 76, pp. 73–80, 2017.
- [111] M. E. Magar, *Enzyme Kinetics*. 1972.
- [112] V. Sachdeva and V. Hooda, “Effect of changing the nanoscale environment on activity and stability of nitrate reductase,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 89, pp. 52–62, 2016.
- [113] R. Baxter, N. Hastings, A. Law, and E. J. . Glass, *Enzyme Kinetics. Principles and methods.*, vol. 39, no. 5. 2008.
- [114] D. L. Purich, *Enzyme Kinetics: Catalysis & Control*. 2010.
- [115] V. Sarsar, M. K. Selwal, and K. K. Selwal, “Biofabrication, characterization and antibacterial efficacy of extracellular silver nanoparticles using novel fungal strain of *Penicillium atramentosum* KM,” *J. Saudi Chem. Soc.*, vol. 19, no. 6, pp. 682–688, 2015.
- [116] B. K. Nayak, A. Nanda, and V. Prabhakar, “Biogenic synthesis of silver nanoparticle from wasp nest soil fungus, *Penicillium italicum* and its analysis against multi drug resistance pathogens,” *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 16, no. February, pp. 412–418, 2018.
- [117] S. M. Husseiny, T. A. Salah, and H. A. Anter, “Biosynthesis of size controlled silver nanoparticles by *Fusarium oxysporum*, their antibacterial and antitumor activities,” *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.*, vol. 4, no. 3, pp. 225–231, 2015.
- [118] Y. Delgado-Beleño, C. E. Martínez-Nuñez, M. Cortez-Valadez, N. S. Flores-López, and M. Flores-Acosta, “Optical properties of silver, silver sulfide and silver selenide nanoparticles and antibacterial applications,” *Mater. Res. Bull.*, vol. 99, no. November 2017, pp. 385–392, 2018.
- [119] J. M. Kobashigawa, C. A. Robles, M. L. Martínez Ricci, and C. C. Carmarán, “Influence of strong bases on the synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using the ligninolytic fungi *Trametes trogii*,” *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 26, pp. 1331–1337, 2019.
- [120] A. Verma and M. S. Mehata, “Controllable synthesis of silver nanoparticles using Neem leaves and their antimicrobial activity,” *J. Radiat. Res. Appl. Sci.*, vol. 9, no. 1, pp. 109–115, 2016.

- [121] D. Wang, S. C. Pillai, S. H. Ho, J. Zeng, Y. Li, and D. D. Dionysiou, "Plasmonic-based nanomaterials for environmental remediation," *Appl. Catal. B Environ.*, vol. 237, no. June, pp. 721–741, 2018.
- [122] S. S. Birla, S. C. Gaikwad, A. K. Gade, and M. K. Rai, "Rapid Synthesis of Silver Nanoparticles from *Fusarium oxysporum* by Optimizing Physicocultural Conditions," *Sci. World J.*, vol. 2013, pp. 1–12, 2013.
- [123] M. Darroudi, M. Bin Ahmad, A. H. Abdullah, and N. A. Ibrahim, "Green synthesis and characterization of gelatin-based and sugar-reduced silver nanoparticles," pp. 569–574, 2011.
- [124] S. Hamed, S. A. Shojaosadati, S. Shokrollahzadeh, and S. Hashemi-Najafabadi, "Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using a novel and non-pathogenic fungus, *Neurospora intermedia*: Controlled synthesis and antibacterial activity," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 30, no. 2, pp. 693–704, 2014.
- [125] A. Wei, *PLASMONIC NANOMATERIALS Enhanced Optical Properties from Metal Nanoparticles and their Ensembles*. 2004.
- [126] L. De Sio, *Active Plasmonic Nanomaterials*. 2015.
- [127] K. B. Mogensen and K. Kneipp, "Size-Dependent Shifts of Plasmon Resonance in Silver Nanoparticle Films Using Controlled Dissolution: Monitoring the Onset of Surface Screening Effects," *J. Phys. Chem. C*, vol. 118, no. 48, pp. 28075–28083, 2014.
- [128] D. Mazón, "Determinacion de nanopartículas metálicas mediante técnicas espectroscópicas y polarimétricas," Universidad de Cantabria, 2012.
- [129] A. Syed, S. Saraswati, G. C. Kundu, and A. Ahmad, "Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Humicola* sp. And evaluation of their cytotoxicity using normal and cancer cell lines," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 114, pp. 144–147, 2013.
- [130] D. Singh, V. Rathod, S. Ningnanagouda, J. Hiremath, A. K. Singh, and J. Mathew, "Optimization and characterization of silver nanoparticle by endophytic fungi *penicillium* sp. isolated from *curcuma longa* (Turmeric) and application studies against MDR *E. coli* and *S. aureus*," *Bioinorg. Chem. Appl.*, vol. 2014, 2014.
- [131] R. Sanghi and P. Verma, "Biomimetic synthesis and characterisation of protein capped silver nanoparticles," *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 1, pp. 501–504, 2009.
- [132] S. Sarkar and V. Kotteeswaran, "Green synthesis of silver nanoparticles from aqueous leaf extract of Pomegranate (*Punica granatum*) and their anticancer activity on human cervical cancer cells," *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 9, no. 2, 2018.

- [133] L. Wang, Y. Wu, J. Xie, S. Wu, and Z. Wu, "Characterization, antioxidant and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles from *Psidium guajava* L. leaf aqueous extracts," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 86, no. February, pp. 1–8, 2018.
- [134] J. Xie, J. Y. Lee, D. I. C. Wang, and Y. P. Ting, "Silver nanoplates: From biological to biomimetic synthesis," *ACS Nano*, vol. 1, no. 5, pp. 429–439, 2007.
- [135] Z. Zaheer, "Silver nanoparticles formation using tyrosine in presence cetyltrimethylammonium bromide," vol. 89, pp. 211–215, 2012.
- [136] P. R. Selvakannan *et al.*, "Synthesis of Aqueous Au Core - Ag Shell Nanoparticles Using Tyrosine as a pH-Dependent Reducing Agent and Assembling Phase-Transferred Silver Nanoparticles at the Air - Water Interface," no. 10, pp. 7825–7836, 2004.
- [137] S. Babu, B. Kumar, and K. Kumar, "Environment friendly approach for size controllable synthesis of biocompatible Silver nanoparticles using diastase," vol. 49, pp. 131–136, 2017.
- [138] S. Babu, B. Kumar, and K. Kumar, "Tyrosine assisted size controlled synthesis of silver nanoparticles and their catalytic , in-vitro cytotoxicity evaluation," vol. 51, pp. 23–29, 2017.
- [139] M. Kumar *et al.*, "Synthesis , characterization , mechanistic studies and antimicrobial ef fi cacy of biomolecule capped and pH modulated silver nanoparticles," vol. 249, pp. 1145–1150, 2018.
- [140] K. AbdelRahim, S. Y. Mahmoud, A. M. Ali, K. S. Almaary, A. E. Z. M. A. Mustafa, and S. M. Hussein, "Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Rhizopus stolonifer*," *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 24, no. 1, pp. 208–216, 2017.
- [141] N. Vigneshwaran, A. a. Kathe, P. V. Varadarajan, R. P. Nachane, and R. H. Balasubramanya, "Biomimetics of silver nanoparticles by white rot fungus, *Phaenerochaete chrysosporium*," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 53, pp. 55–59, 2006.
- [142] A. Ahmad, S. S. b , Priyabrata Mukherjee b, D. M. B, M. I. K. B, R. K. B, and M. S. C, "Extracellular Biosynthesis of Metal Sulfide Nanoparticles Using the Fungus *Fusarium oxysporum*," *Curr. Nanosci.*, vol. 10, no. 4, pp. 588–595, 2003.
- [143] L. Ma *et al.*, "Optimization for extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by *Penicillium aculeatum* Su1 and their antimicrobial activity and cytotoxic effect compared with silver ions," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 77, pp. 963–971, 2017.
- [144] D. Zhang and H. Yang, "Facile synthesis of anisotropic silver nanoparticles and their surface-enhanced Raman scattering properties," vol. 1060, pp. 1–5,

2014.

- [145] S. Pirtarighat, M. Ghannadnia, and S. Baghshahi, "Biosynthesis of silver nanoparticles using *Ocimum basilicum* cultured under controlled conditions for bactericidal application," vol. 98, no. December 2018, pp. 250–255, 2019.
- [146] E. Bernardo-mazariegos *et al.*, "Silver nanoparticles from *Justicia spicigera* and their antimicrobial potentialities in the biocontrol of foodborne bacteria and phytopathogenic fungi," no. xx, 2018.
- [147] M. D. Balakumaran, R. Ramachandran, P. Balashanmugam, D. J. Mukeshkumar, and P. T. Kalaichelvan, "Mycosynthesis of silver and gold nanoparticles: Optimization, characterization and antimicrobial activity against human pathogens," *Microbiol. Res.*, vol. 182, pp. 8–20, 2016.
- [148] S. Raj and R. Trivedi, "Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Enicostemma axillare* (Lam.) leaf extract," vol. 503, pp. 2814–2819, 2018.
- [149] P. Li, S. Li, Y. Wang, Y. Zhang, and G. Han, "Physicochemical and Engineering Aspects Green synthesis of β -CD-functionalized monodispersed silver nanoparticles with enhanced catalytic activity," vol. 520, pp. 26–31, 2017.
- [150] P. Marie Arockianathan, S. Sekar, B. Kumaran, and T. P. Sastry, "Preparation, characterization and evaluation of biocomposite films containing chitosan and sago starch impregnated with silver nanoparticles," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 50, no. 4, pp. 939–946, 2012.
- [151] O. M. Dragostin *et al.*, "New antimicrobial chitosan derivatives for wound dressing applications," *Carbohydr. Polym.*, vol. 141, pp. 28–40, 2016.
- [152] K. Zheng, M. I. Setyawati, D. T. Leong, and J. Xie, "Antimicrobial silver nanomaterials," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 357, pp. 1–17, 2018.
- [153] S. Raja, V. Ramesh, and V. Thivaharan, "Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Calliandra haematocephala* leaf extract, their antibacterial activity and hydrogen peroxide sensing capability," *Arab. J. Chem.*, vol. 10, no. 2, pp. 253–261, 2017.
- [154] S. Hajji *et al.*, "Nanocomposite films based on chitosan–poly(vinyl alcohol) and silver nanoparticles with high antibacterial and antioxidant activities," *Process Saf. Environ. Prot.*, vol. 111, pp. 112–121, 2017.
- [155] J. W. Rhim, S. Bin Lee, and S. I. Hong, "Preparation and characterization of Agar/Clay nanocomposite films: The effect of clay type," *J. Food Sci.*, vol. 76, no. 3, 2011.
- [156] Y. Xie, X. Liao, J. Zhang, F. Yang, and Z. Fan, "Novel chitosan hydrogels reinforced by silver nanoparticles with ultrahigh mechanical and high antibacterial properties for accelerating wound healing," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 119, pp. 402–412, 2018.

- [157] S. Ghalei, J. Nourmohammadi, A. Solouk, and H. Mirzadeh, "Enhanced cellular response elicited by addition of amniotic fluid to alginate hydrogel-electrospun silk fibroin fibers for potential wound dressing application," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 172, no. August, pp. 82–89, 2018.
- [158] W. R. Rolim *et al.*, "Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles: Characterization, cytotoxicity evaluation and antibacterial activity," vol. 463, no. May 2018, pp. 66–74, 2019.

