

Preparation of carrageenan biofilms mixed with silver nanoparticles by biological synthesis method

Jerónimo Osorio-Echavarría^{a*} Natalia Andrea Gómez-Vanegas^a Juliana Osorio-Echavarría^a
& Claudia Patricia Ossa-Orozco^b

^a Grupo de Bioprosesos, Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

*jeronimo.osorio@udea.edu.co, juliana.osorio@udea.edu.co, andrea.gomez@udea.edu.co

^b Grupo de Investigación en Biomateriales, Programa de Bioingeniería, Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
claudia.ossa@udea.edu.co

Received: February 11th, 2016. Received in revised form: August 13th, 2016. Accepted: January 25th, 2017.

Abstract

Improving the antimicrobial properties of silver nanoparticles (AgNPs) depends on the coating, size and shape; therefore, it is necessary to implement techniques to increase the morphological and physicochemical characteristics in their synthesis and production. In this research, AgNPs were synthesized by the ligninolytic fungi anamorph R1 of *Bjerkandera sp*; the fungi's pellets were mixed with 1 mM solution of silver nitrate (AgNO₃) and were incubated for 144 h. Subsequently, *kappa* carrageenan biofilms mixed with AgNPs were prepared. Scanning electron microscopy (SEM) showed that AgNPs did not modify the structure of the biopolymer (carrageenan), forming agglomerates in a range of 70-300 nm. These biofilms had strong antimicrobial properties against *Escherichia coli* (E.coli), for that reason, this biological synthesis method is an innovative process for obtaining biomaterials.

Keywords: *Bjerkandera* Anamorfo R1 *sp*; silver nanoparticles (AgNPs); biofilms; *kappa* carrageenan; antimicrobial properties.

Obtención de biopelículas de carragenina suplementadas con nanopartículas de plata sintetizadas biológicamente

Resumen

El mejoramiento de las propiedades antimicrobianas en nanopartículas de plata (AgNPs) depende del revestimiento, tamaño y forma, por tanto en la síntesis y producción de estas se hace necesario implementar técnicas que permitan mejorar sus características morfológicas y fisicoquímicas. En esta investigación se sintetizaron AgNPs mediante el hongo ligninolítico anamorfo R1 de *Bjerkandera sp*, para este caso los pellets (hongo) se pusieron en contacto con la solución 1 mM de nitrato de plata (AgNO₃) y se incubaron durante 144 h. Posteriormente, con las AgNPs se prepararon películas de carragenina *kappa*. Se encontró mediante el análisis de microscopía de barrido (SEM) que las AgNPs no modificaron la estructura del biopolímero (carragenina), formando aglomerados en un rango de 70-300 nm. Estas biopelículas exhibieron fuerte actividad antimicrobiana frente a la bacteria *Escherichia coli* (*E.coli*) mostrando que este método de reducción biológica es un proceso innovador para la obtención de biomateriales.

Palabras clave: anamorfo R1 de *Bjerkandera sp*; nanopartículas de plata (AgNPs); biopelículas, carragenina *kappa*; actividad antimicrobiana.

1. Introducción

Durante los últimos años se han dado a conocer numerosas investigaciones sobre los materiales

biopoliméricos, muchas de estas se han enfocado en encontrar métodos de preparación, caracterización y en las potenciales aplicaciones en el campo de los biomateriales. Los materiales biopoliméricos poseen propiedades de

How to cite: Osorio-Echavarría, J.O., Gómez-Vanegas, N.A., Osorio-Echavarría, J. and Ossa-Orozco, C.P., Obtención de biopelículas de carragenina suplementadas con nanopartículas de plata sintetizadas biológicamente. DYNA 84(201), pp. 82-87, 2017.

biocompatibilidad y biodegradabilidad [1], que han permitido que estos sean ampliamente utilizados en la formación de películas biodegradables con excelentes propiedades adsorbentes [2]. La carragenina es un biopolímero, soluble en agua, obtenido a partir de algas rojas y ha sido frecuentemente utilizada para preparar biopelículas biodegradables debido a que promueve la formación de geles con alta capacidad de retención de agua [3]. Los bionanocompuestos son una clase de materiales híbridos compuestos de una matriz biopolimérica reforzados con ciertos materiales antimicrobianos como fibras, plaquetas y partículas con tamaño de 100 nm o menos; y actualmente están siendo implementados debido a las excelentes propiedades que exhiben respecto a su funcionalidad [4]. Entre estos materiales, las nanopartículas de plata han atraído una considerable atención en cuanto al desarrollo de este tipo de compuestos debido a sus excelentes propiedades físicas y químicas. Se ha comprobado por ejemplo, que son superiores a los materiales orgánicos antimicrobianos en cuanto a durabilidad, estabilidad con la temperatura, toxicidad y selectividad, además se ha observado que dichas partículas provocan daños estructurales en la pared celular de las bacterias, inhibiendo la cadena de transporte de electrones de la célula, provocando su propia destrucción [3].

La generación de diversas aplicaciones para las nanopartículas ha implicado la búsqueda de diversos métodos físicos y químicos que permitan su producción. Entre los métodos físicos se han aplicado las tecnologías en aerosol y campos ultrasónicos, 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. Por otra parte los métodos químicos involucran el uso de agentes reductores de origen sintético, además de agentes surfactantes para el control de la morfología y tamaño, estos reactivos son usualmente nocivos para el ser humano y el ambiente [3].

Debido a lo anterior surgió la necesidad de buscar procesos 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; esto debido a que los microorganismos metabolizan los metales como parte de su alimento y poseen un gran poder enzimático para reducir iones metálicos. Entre estos organismos, los hongos ligninolíticos son reconocidos por tener propiedades superiores para producir una gran variedad de proteínas extracelulares, ácidos orgánicos y otros metabolitos, y por su capacidad para adaptarse a ambientes severos [5].

Entre muchos microorganismos estudiados, se ha reportado que los hongos de pudrición blanca de la madera *Phanerochaete chrysosporium* y anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* (anteriormente identificado como *Anthracophyllum discolor*) producen nanopartículas de plata estables, cuando se utiliza como agente reductor nitrato de plata (AgNO_3) en medio acuoso. En el caso del anamorfo R1 se pudo establecer que el mayor pico de absorbancia en el UV-Visible se obtuvo a las 144 h de incubación con una longitud de onda de 500 nm y un tiempo de cultivo del hongo de 5 días [6]. También se han evaluado hongos de pudrición blanca de la madera de malasia *Pycnoporus sanguineus* y

Schizophyllum commune, en donde se reportó a partir de los espectros FTIR que la biorreducción de plata se produjo cuando los iones de plata interactuaron con los grupos funcionales que se encontraban en la superficie del micelio de los hongos, produciendo nanopartículas de plata con un tamaño promedio de 52.8 a 103 nm [7].

Este trabajo tuvo como objetivo sintetizar nanopartículas de plata (AgNPs) utilizando métodos biológicos a partir del hongo de pudrición blanca de la madera anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* para la preparación de películas biopoliméricas con carragenina, para probar su efecto combinado sobre la actividad antimicrobiana de las películas.

2. Metodología

2.1. Microorganismo

Se utilizó la cepa del hongo de la pudrición blanca de la madera anamorfo R1 [8] perteneciente a la colección del laboratorio de Bioprocesos del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Antioquia. La cepa madre de este hongo se conservó en astillas de madera con glicerol y se almacenó a 4 °C. A partir de la cepa madre se hicieron repiques cada mes en cajas Petri con medio Kimura sólido compuesto por agar (15 g/L), glucosa (20 g/L), peptona (5 g/L), extracto de levadura (2 g/L), KH_2PO_4 (1 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g/L) y pH 5.5. Los inóculos necesarios para poner en marcha los ensayos se prepararon transfiriendo 4 trozos de agar colonizado a matraces Fernbach con medio de cultivo Kimura líquido compuesto de glucosa (20 g/L); peptona (5 g/L); extracto de levadura (2 g/L); KH_2PO_4 (1 g/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g/L) y pH 5.5. Posteriormente, la capa de micelio formada se homogenizó en una licuadora durante 20 s para los diferentes ensayos.

Los micelios triturados de cada hongo se mezclaron con Tween 80 y se transfirieron asépticamente al medio de cultivo Kimura líquido a pH 5.5. La mezcla se incubó a 30 °C a 200 rpm, de tal manera que se favoreciera la formación de pellets; luego se centrifugaron para obtener dos fracciones: pellets y sobrenadante. El tiempo de formación de pellets fue de 8 días (edad del inóculo).

2.2. Biosíntesis de nanopartículas de plata empleando el hongo de pudrición blanca de la madera anamorfo R1 de *Bjerkandera sp*

La producción AgNPs se realizó mediante el método de biorreducción de iones de plata por absorción de átomos de plata en los micelios-pellet (MP) [7]. Estos ensayos se realizaron con inóculos de 8 días de crecimiento y los pellets obtenidos en concentración 1 % w/v se pusieron en contacto con la solución de 1 mM AgNO_3 (solución SN), se incubaron a 30 °C en oscuridad, con una agitación de 200 rpm, durante 144 h, y cada ensayo se hizo por triplicado [6]. Simultáneamente se realizó un control para la solución de AgNO_3 . Se tomaron muestras cada 24 h por un tiempo de 144 h y fueron analizadas espectrofotométricamente con el fin de identificar la banda de absorción característica de la plata, usando un espectrofotómetro Uv-vis (Thermo spectronic

Helios α) modo barrido, en un rango que comprendía longitudes de onda entre 350 a 800 nm. El error se calculó hallando la desviación estándar de los barridos espectrofotométricos para cada tiempo de incubación y dividiendo dicha variable por el número de repeticiones efectuadas.

2.3. Caracterización de las nanopartículas de plata

La caracterización y distribución de tamaño de las AgNPs se realizaron por microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para el SEM se liofilizó el hongo usando un Liofilizador Labconco 2.5L, posteriormente pequeños trozos de muestras MP se fijaron en una cinta de grafito, se recubrieron con oro (Au) (equipo DENTON VACUUM Desk IV) y se analizaron en el microscopio JEOL-JSMiA 6490 LV [9]. El análisis TEM se realizó en el equipo Tecnai F20 Súper Twin TMP, una gota de solución SN que contenía AgNPs, fue colocada en una rejilla de cobre recubierta de carbono [10]. Adicionalmente se realizó un análisis semicuantitativo de la composición química de la muestra por espectrometría de dispersión de energías de rayos X (EDS) mediante el sistema acoplado al equipo SEM.

2.4. Preparación de las películas de carragenina

Se prepararon dispersiones de carragenina kappa κ marca Caisson Labs adicionando las AgNPs con el objetivo de obtener biopelículas, para posteriormente evaluar las características morfológicas y antimicrobianas del compuesto formado. Las biopelículas se prepararon disolviendo carragenina en agua destilada en relación 2 % w/v y usando 1 % de glicerol como plastificante. La biopelículas con AgNPs se prepararon adicionando 0.5 mL de la solución SN que contenía la nanopartículas, adicionalmente se preparó una biopelícula sin AgNPs como control [4]. Cada solución se mezcló aproximadamente 20 min a 95 °C usando un agitador magnético (Heidolph MR 3001) sobre una película de teflón nivelado a 1000 rpm. Una vez preparadas las soluciones formadoras de biopelículas, se colocaron en moldes de vidrio de 70x70 mm y 3 mm de profundidad, para ser secadas posteriormente a 25 °C durante 72 h.

2.5. Caracterización y evaluación del efecto antimicrobiano de las películas de carragenina y nanopartículas de plata

La morfología de las películas con y sin nanopartículas de plata se analizaron usando microscopio estéreo (Motic Ba310) y microscopio electrónico de barrido, (JEOL GSM-6610LV). Para el análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) las superficies se recubrieron con oro utilizando un equipo de pulverización catódica DENTON VACUUM Desk IV. La composición química de la película fue determinada por espectrometría de dispersión de energías de rayos X (EDS). Se determinó la actividad antimicrobiana de la carragenina y películas compuestas de carragenina y AgNPs empleando el patógeno *Escherichia coli*. Para la reactivación de la cepa la bacteria se cultivó en 5 ml medio TSB (*Tryptic soy broth*) líquido por 24 h. Luego 200 μ L de

caldo bacteriano fueron cultivados en cajas de Petri que contenían medio diferencial EMB (Eosina azul de metileno). Para este caso se empleó el método de difusión por agar y se sumergieron 100 μ L de solución que contenían AgNPs en papel filtro de 0.45 μ m (diámetro=13 mm) para los diferentes ensayos. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Después de la incubación, se midió el halo de inhibición alrededor del papel filtro [4].

3. Resultados y discusión

3.1. Síntesis intracelular y caracterización morfológica de las AgNPs

El análisis de las imágenes por microscopía electrónica de barrido (SEM) (Fig. 1a) muestra que la mayoría de las AgNPs sintetizadas presentes en la superficie celular tienen forma esférica con un tamaño aproximado de 60 a 200 nm (observar círculo en la imagen). El resultado indicó que el proceso de reducción se dio en la superficie del micelio y que las AgNPs se distribuyeron uniformemente sobre está, formando pequeñas agrupaciones. Nadanathangam et al (2009) demostraron que la mayoría de los AgNPs sintetizados en la superficie celular fueron de un tamaño de 50 a 200 nm empleando el hongo de pudrición blanca de la madera *Phanerochaete chrysosporium* y afirmaron que los grupos adsorbentes presentes en las sustancias extracelulares adsorbieron las partículas localizadas en la superficie del micelio, sellando las AgNPs y formando una capa que evita que se aglomeren cuando la mezcla se está agitando [10]. Los resultados obtenidos corroboraron lo argumentado por Nadanathangam et al (2009) y se pudo establecer en esta investigación que el tiempo de incubación de 144 h y la edad del inóculo de 8 días favorecieron la adsorción de los iones de plata de la solución AgNO₃ sobre la superficie del micelio; debido a que hubo una mayor interacción con los grupos funcionales presentes en este (anión carboxilato, carboxilo y enlace peptídico de las proteínas y de hidroxilo de sacáridos) [7]. El EDS (Fig. 1b) muestra fuertes señales de Ag⁰ y otros elementos como carbono, oxígeno, y fósforo que pudieron estar presentes debido a que son elementos que requiere el hongo para poder cumplir sus funciones vegetativas.

3.2. Síntesis extracelular y caracterización de AgNPs obtenidas

La Fig. 2 presenta el cambio que se dio en la solución SN procedente del inóculo para una edad de 8 días del hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* y 144 h de incubación. Se pudo observar durante el proceso de incubación que el medio en donde se encontraban sumergidos los pellets cambio de color durante las primeras 96 h y que para tiempos mayores fue incrementando la intensidad del color. En este caso se puede decir que se observó una reacción positiva para la biosíntesis de AgNPs, debido a que el cambio de color de la solución donde fue incubado el hongo elucida la presencia de AgNPs en una solución debido a la excitación de los plasmones superficiales [9]. Estos cambios en la coloración pueden ser evidencia cualitativa de la síntesis extracelular de AgNPs, resultados que están en concordancia con lo reportado por Chan y Don (2006) [6].

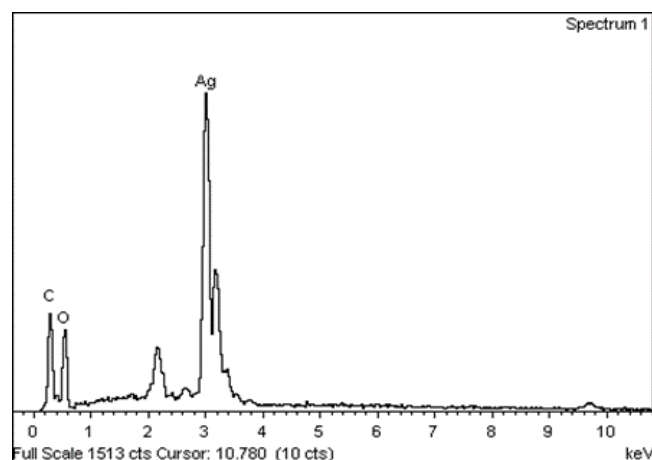
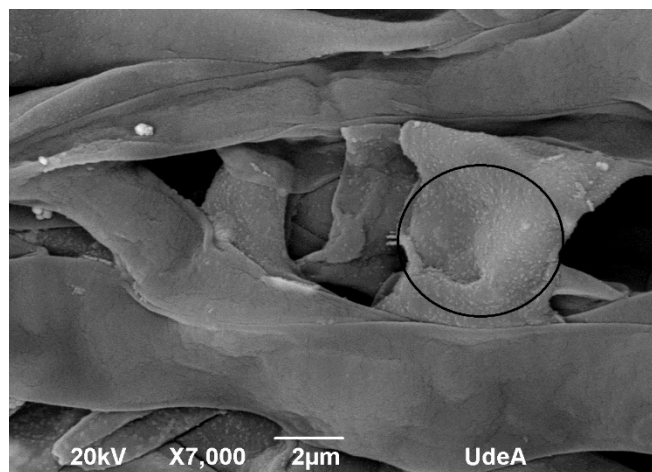


Figura 1. a) Micrografías por SEM de nanopartículas de plata sintetizadas en la superficie del hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp*; b). Espectro EDS para las AgNPs visualizadas por SEM.
Fuente: Propia

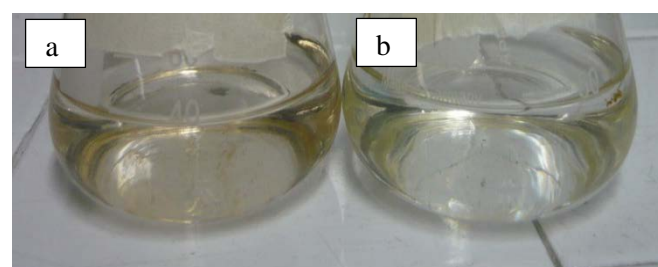


Figura 2. a) Muestra la formación de AgNPs después de 144 h de incubación de las muestras SN del hongo ligninolítico anamorfo R1 de *Bjerkandera sp*. b) Muestra control.
Fuente: Propia

La Fig. 3 muestra el espectro UV-Vis del experimento seguido en el tiempo a partir de 96 h de incubación en donde se empezó a notar el cambio de color en las muestras analizadas. Esta prueba permitió tener otra evidencia de la síntesis extracelular de las AgNPs. En esta figura se observa una banda de absorción característica de plata cercana a 500 nm, y que la aparición de

dicha banda se empezó a notar a partir de las 96 h de incubación, alcanzando su máxima amplitud para un tiempo de exposición de 144 h. En los ensayos realizados se encontró el pico máximo de absorbancia de 500 nm en lugar de 413 nm, dicho comportamiento pudo deberse a una disminución en el tamaño de partícula [10]. Estos resultados confirmaron lo descrito por Musarrat et al (2010), quienes reportaron que los espectros de absorción óptica de las nanopartículas metálicas están dominadas principalmente por resonancia de plasmones superficiales, y que el pico de absorción tiene relación con el tamaño y la distribución de las partículas [11]. Este comportamiento se evidenció en el espectro mostrado en la Fig. 3 donde se observó que las bandas fueron más amplias con una cola de absorción en las longitudes de onda especificadas. Por otra parte, se realizaron barridos espectrofotométricos de 200-300 nm para las 144 h de incubación y se observó la aparición de dos picos de absorción en la región UV correspondiente a 220 y 300 nm (Fig. 4). Es posible que el pico a 220 nm se deba a la presencia de un grupo amino, y que el otro pico cercano a los 300 nm puede deberse a la excitación de los electrones de los residuos de proteína como triptófano y tirosina. Posiblemente la acción de estas proteínas pudo haber estabilizado las AgNPs sintetizadas [12,13].

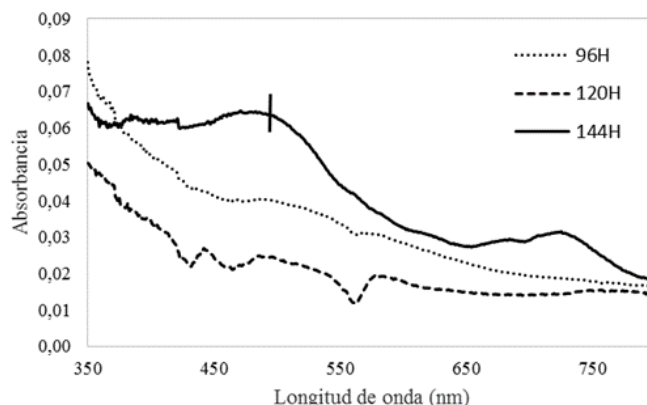


Figura 3. Espectro UV-vis para AgNPs sintetizadas en la solución SN del hongo Anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* con un error calculado de (0,025-0,002). 96 h de incubación (•••); 120 h de incubación (---); 144 h de incubación (—).
Fuente: Propia.

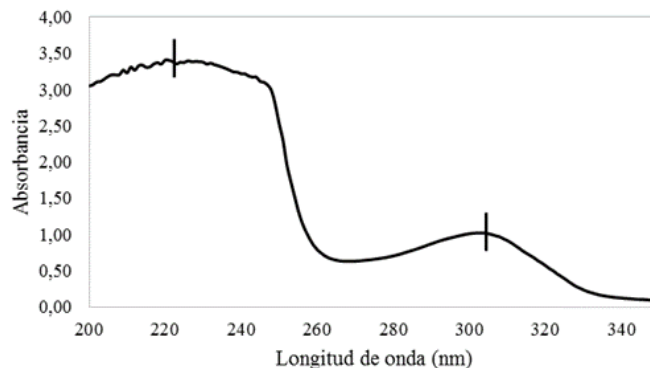


Figura 4. Espectro UV-vis para AgNPs sintetizadas utilizando el hongo de pudrición blanca de la madera anamorfo R1 de *Bjerkandera sp* con incubación de 144 h.
Fuente: Propia

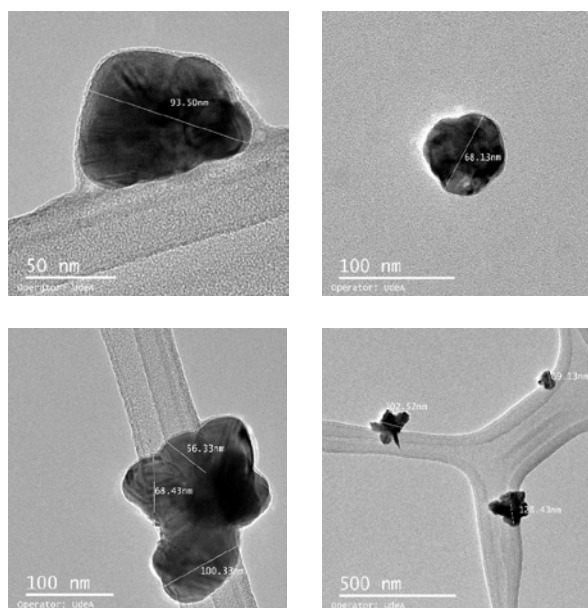


Figura 5. Micrografías por TEM de nanopartículas de plata sintetizadas en las muestras SN del hongo anamorfo R1 de *Bjerkandera sp.*
Fuente: Propia.

La Fig. 5 muestra las imágenes TEM de las AgNPs. Se observa que poseen una geometría casi esférica y que están rodeadas por una capa de matriz orgánica. Estas imágenes indican que el proceso de estabilización de las AgNps inició a partir de un agente de recubrimiento, lo cual apoya la deducción del análisis de espectrofotometría de absorbancia (Fig. 4) y afirma que la acción de las proteínas presentes en la superficie o de los grupos funcionales químicos liberados durante el proceso de agitación redujeron el Ag^+ en la solución AgNO_3 en nanopartículas Ag^0 .

3.3. Películas de carragenina

Las películas mostraron estructuras superficiales homogéneas con integridad estructural compacta, la película de carragenina κ sin AgNPs tiene una estructura porosa, mostrando un ensamble de porciones de la película superpuestas en diferentes direcciones (Fig. 6a y 6b). Este comportamiento se observó también en la estructura de las películas secas de carragenina κ y AgNPs, en esta biopelícula se observó que las partículas se dispersaron uniformemente sobre la superficie formando aglomerados (Fig. 7a y 7b). Fouda et al (2014), describieron que las AgNPs sintetizadas a partir de extractos de miel de abeja se encontraban dispuestas sobre la superficie de la biopelícula, agregadas en formaciones insulares. Atribuyeron este fenómeno a que algunas de estas partículas sintetizadas están recubiertas por polisacáridos y proteínas, y por lo tanto se creó una barrera física que impidió la difusión de la plata a través de la solución de la carragenina formando pequeñas aglomeraciones [3]. En este trabajo se observó el mismo efecto (Fig. 7a y 7b), y probablemente se creó una barrera física que impidió la difusión de AgNPs debido a que estas estaban recubiertas por sacáridos que se encuentran distribuidos en la superficie del micelio (Fig. 5) o grupos carbonilo adsorbentes presentes en las sustancias extracelulares, que se encontraban remanentes en los espacios intersticiales del micelio fúngico.

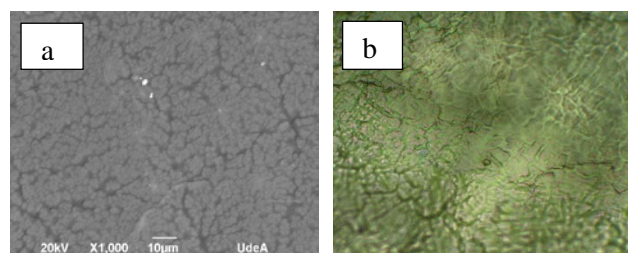


Figura 6. Imágenes de las películas de carragenina, sin presencia de AgNPs; a) SEM; b) Estereoscopia 40X.
Fuente: Propia

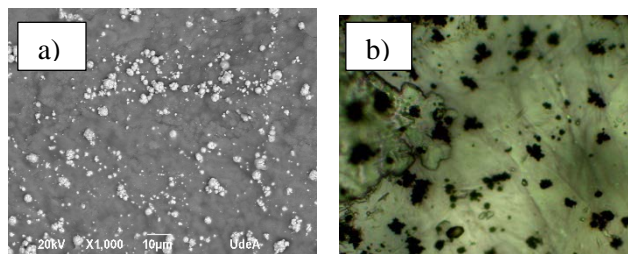


Figura 7. Imágenes de las películas de carragenina, con presencia de AgNPs; a) SEM; b) Estereoscopia 40X.
Fuente: Propia.

3.4. Efecto antimicrobiano del compuesto formado a partir de carragenina y nanopartículas de plata

Los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana que fueron determinados por el diámetro del halo de inhibición (DI) de las biopelículas fabricadas se muestran en la Fig. 8. La película de carragenina sin la adición de la solución de AgNPs no mostró ninguna actividad inhibitoria frente a *E. coli* (DI = 13 mm). Sin embargo, las biopelículas que contienen AgNPs exhibieron una pronunciada actividad antibacteriana contra dicho patógeno (DI=19 mm). Rhim y Wang (2014), mostraron que los halos de inhibición de *E. coli* obtenidos con la mezcla de carragenina con AgNPs (DI= 7,96mm) fueron mayores que los halos que contenían solo carragenina (DI=5 mm). En esta investigación las AgNPs fueron sintetizadas por un método de reducción química modificada usando como precursor AgNO_3 y citrato de sodio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) como agente estabilizante [4].

En esta investigación se pudo observar que el halo de inhibición aumento un 5,6% con respecto a lo reportado por Rhim y Wang (2014), sugiriendo que estas biopelículas compuestas con partículas sintetizadas a partir del hongo anamorfo R1 son capaces de penetrar aún más la membrana bacteriana y que posiblemente la reducción del ion Ag^+ por acción de las proteínas presentes en la superficie del micelio o de los grupos funcionales químicos liberados durante el proceso de agitación jugaron un rol importante. En este caso la biopelícula de carragenina mezclada con una solución de AgNPs inactivo la acción de las enzimas, facilitando aún más la unión AgNPs a las proteínas y fosfolípidos presentes en la membrana celular bacteriana inhibiendo la acción de las bicapas lipídicas, provocando la lisis celular [4,14,15]

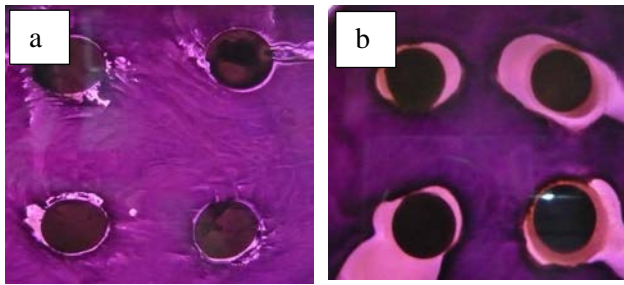


Figura 8. Apariencia de las zonas de inhibición en placas de agar EMB. Se muestra la actividad antimicrobiana contra la bacteria Gram negativa *E. coli*. Películas de a) carragenina y b) carragenina y AgNPs. Fuente: Propia.

4. Conclusiones

Las micrografías SEM mostraron que las AgNPs no modificaron la estructura química del biopolímero carragenina y se pudo observar que se dispersaron uniformemente en la superficie de la película formando aglomerados. Se observó que los conglomerados estaban compuestos por AgNPs en un rango de 70-300 nm con morfología cuasi esférica y que estos se encontraban separados unos de otros, lo cual indicó la estabilización debido a la capa proteica con la cual estaban envueltas las AgNPs. Se evaluó la actividad antimicrobiana de las biopelículas de carragenina *kappa* contra la bacteria Gram negativa *E. coli*. Los resultados mostraron que las biopelículas con presencia de estos nanocompuestos exhibieron una fuerte actividad antimicrobiana frente a este patógeno; mostrando así, un alto potencial para ser aplicadas como biomaterial en áreas como la farmacéutica o medicina.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Grupo de Bioprocesos y al Grupo de Investigación en Biomateriales por el apoyo en la realización de este proyecto, al Comité de Desarrollo para la Investigación CODI de la Universidad de Antioquia por la financiación de este proyecto y al programa Sostenibilidad Universidad de Antioquia - CODI (Estrategia de Sostenibilidad 2013-2014).

Referencias

- [1] Sionkowska, A., Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials. Review. Progress in Polymer Science, 36, pp. 1254-1276, 2011. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.05.003
- [2] Lima, P.H.L., Pereira, S.V.A., Rabello, R.B., Rodriguez-Castellón, E., Beppu, M.M., Chevallier, P., Mantovani, D. and Vieira R.S., Blood protein adsorption on sulfonated chitosan and κ -carrageenan films. Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces, 111, pp. 719-725, 2013. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.06.002
- [3] Fouda, M.M.G., El-Aassar, M.R., El Fawal, G.F., Hafez, E.E., Masry, S.H.D. and Abdel-Megeed, A., κ -Carrageenan/poly vinyl pyrrolidone/polyethylene glycol/silver nanoparticles film for biomedical application. International Journal of Biological Macromolecules, 74, pp. 179-184, 2015. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.11.040
- [4] Rhim, J-W. and Wang, L-F., Preparation and characterization of carrageenan-based nanocomposite films reinforced with clay mineral and silver nanoparticles. Applied Clay Science, 97-98, pp. 174-181, 2014. DOI: 10.1016/j.clay.2014.05.025

- [5] Osorio, J., Evaluación de la decoloración de efluentes industriales en un reactor de lecho fijo empleando el hongo de la pudrición blanca de la madera *Anthracyphyllum discolor*, Tesis, Universidad de Antioquia, 2010.
- [6] Osorio, J., Muñoz, L. y Martínez, A., Producción de nanopartículas de plata a partir del hongo de pudrición blanca *Anthracyphyllum discolor*, 2014.
- [7] Chan, Y.S. and Don M.M., Biosynthesis and structural characterization of Ag nanoparticles from white rot fungi. Materials Science & Engineering C, 33, pp. 282-288, 2012. DOI: 10.1016/j.msec.2012.08.041
- [8] Taboada-Puig, R., Lú-Chau, T., Moreira M.T., Feijoo, G., Martínez, M.J. and Lema, J.M., A new strain of *Bjerkandera* sp. production, purification and characterization of versatile peroxidase. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27, pp. 115-122, 2011. DOI: 10.1007/s11274-010-0435-2, 10.1007/s11274-011-0788-1
- [9] Metuku, R.P., Pabba, S., Burra, S. et al., Biosynthesis of silver nanoparticles from *Schizophyllum radiatum* HE 863742.1: Their characterization and antimicrobial activity, 3 Biotech, 4(3), pp. 227-234, 2014. DOI: 10.1007/s13205-013-0138-0
- [10] Vigneshwaran, N., Kathe. A.A., Varadarajan, P.V., Nachane, R.P. and Balasubramanya, R.H., Biomimetics of silver nanoparticles by white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 53, pp. 55-59, 2006. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2006.07.014
- [11] Musarrat, J., Dwivedi, S., Singh, B.R., Al-Khedhairi, A.A., Azam, A. and Naqvi, A., Production of antimicrobial silver nanoparticles in water extracts of the fungus *Amylomyces rouxii* strain KSU-09. Bioresource Technology, 101(22), pp. 8772-8776, 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.06.065
- [12] Narasimha, G., Praveen, B., Malikarjun, K. and Deva Prasad Raju, B., Mushrooms (*Agaricus bisporus*) mediated biosynthesis of silver nanoparticles, characterization and their antimicrobial activity. International Journal of Nano Dimension, 2(1), pp. 29-36, 2011.
- [13] Devi, L.S. and Joshi, S.R., Ultrastructures of silver nanoparticles biosynthesized using endophytic fungi. Journal of Microscopy and Ultrastructure, 3, pp. 29-37, 2014. DOI: 10.1016/j.jmau.2014.10.004
- [14] Gurunathan, S., Biologically synthesized silver nanoparticles enhances antibiotic activity against Gram-negative bacteria. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 29, pp. 1-10, 2015. DOI: 10.1016/j.jiec.2015.04.005
- [15] Zapata, S., Muñoz, J., Ruiz, O.S., Montoya O.I. y Gutiérrez, P.A., Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. Vitae, 16(63), pp. 75-82, 2009.

J.O. Osorio-Echavarría, es Bioingeniero de la Universidad de Antioquia, Colombia, formado en 2016. Actualmente es estudiante de primer semestre de Maestría en Ingeniería en la Universidad de Antioquia, e investigador del Grupo de Investigación Bioprocesos. Sus áreas de investigación incluyen: nanobiotecnología y biomateriales. ORCID: 0000-0002-3880-4915

J. Osorio-Echavarría, es Ing. Química de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia formada en 2006, con MSc. en Ingeniería graduada en 2010. Actualmente es profesora ocasional de la Universidad de Antioquia, en el Programa de Ingeniería Bioquímica e investigadora del Grupo de Investigación Bioprocesos. Sus áreas de investigación incluyen: biotecnología ambiental (tratamiento de efluentes con hongos), biomateriales (síntesis con hongos) y escalado de bioprocesos. ORCID: 0000-0002-0923-137X

N.A. Gómez-Vanegas, es Ing. Química de la Universidad de Antioquia, Colombia en 1999, MSc en Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, 2004. En la actualidad docente ocasional del Departamento de Ingeniería Química - Universidad de Antioquia. Áreas de investigación en tecnología de las enzimas, procesos fermentativos y aprovechamiento de materiales lignocelulósicos. ORCID:0000-0002-4447-3729

C.P. Ossa-Orozco, es Ing. Mecánica de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia, formada en 2000, con PhD en Ingeniería Metalúrgica y de Materiales de la Universidad de São Paulo, Brasil, graduada en 2005. Actualmente es profesora asociada de la Universidad de Antioquia, en el programa de Bioingeniería e investigadora del Grupo de Investigación en Biomateriales. Sus áreas de investigación incluyen los biomateriales (síntesis y caracterización), los materiales porosos (*scaffolds*), los fosfatos de calcio y los polímeros naturales. ORCID: 0000-0002-0223-4113